

В. Г. Спрыгин, Н. Ф. Кушнерова

**КАЛИНА — НОВЫЙ НЕТРАДИЦИОННЫЙ ИСТОЧНИК  
ОЛИГОМЕРНЫХ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ**Отделение биохимических технологий Тихоокеанского океанологического  
института им. В. И. Ильичева, Владивосток

В настоящее время отмечается повышенный интерес к биологически активным добавкам, содержащим комплексы олигомерных проантоцианидинов (КОПЦ) в связи с их способностью “гасить” радикальные реакции в организме. За это свое свойство КОПЦ получили название “гормона молодости” [1]. В основе строения соединений, входящих в эту группу, лежат две мономерные единицы — катехин и (–)-эпикатехин, а также их галлоильные производные. Полимерные структуры из 2-х и более единиц и образуют КОПЦ [2].

Однако, несмотря на то, что КОПЦ встречаются во многих растениях, их содержание в подавляющем большинстве достаточно низкое и даже при оптимальных условиях экстракции выход конечного продукта, чаще всего, не превышает 0,1 – 0,5 % от массы сухого исходного сырья [3]. Ввиду невысокого содержания КОПЦ в исходном сырье (в косточках винограда *Vitis vinifera* и в коре хвойных *Pinus maritima*, используемых при промышленном получении КОПЦ) конечный продукт имеет очень высокую цену. Это делает актуальным поиск новых отечественных источников сырья для создания альтернативных препаратов, содержащих КОПЦ.

В ходе многолетних исследований растений дальневосточной флоры, имеющих пищевое назначение, нами из отходов (отжим) производства сока калины (*Viburnum*), была получена биологически активная добавка к пище “Калифен” [4], содержащая в качестве активного начала КОПЦ в высокой концентрации. Целью настоящей работы является изучение качественных и количественных показателей содержащегося в отжиме калины КОПЦ.

*Экспериментальная часть*

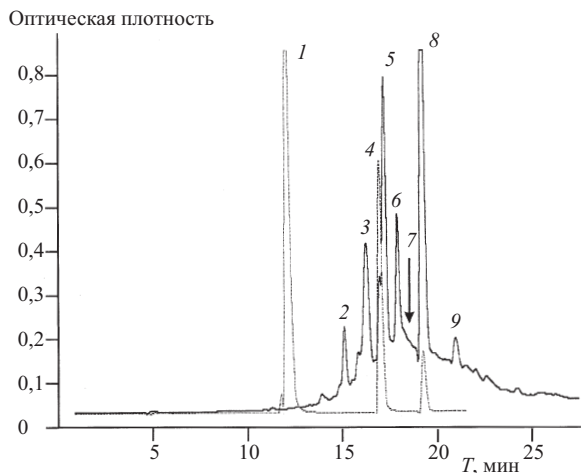
В работе использовали (+)-катехин, (–)-эпикатехин, галловую кислоту (3,4,5-тригидроксибензойную кислоту), 2,2'-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат (ABTS) (Sigma-Aldrich St. Louis, USA), 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметил-хроман-2-карбоновую кислоту (Тролокс — водорастворимый синтетический аналог витамина E) (Fluka AG), проантоцианидины димеры (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>) и тример T<sub>2</sub> (предоставлены Dr. Takahashi, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ibaraki, Japan). Для экстракции применяли обращеннофазовые патроны Supelclean ENVI-18 (10 г) (Waters Associates, Bedford, MA, USA), сефадекс LH-20 (Amersham-Pharmacia, UK), “Экстракт виноградных косточек” (Stryka Botanicals, Switzerland), содержащий по аналитическому паспорту не менее 95 % полифенолов.

Суховоздушное сырье, включающее гребни (ось соцветия, освобожденная от ягод), косточки и кожицу ягод калины экстрагировали 40 % этиловым спиртом методом реперколяции. Выход экстракта составлял 1 л на 1 кг сырья. Порцию полученного экстракта упаривали на роторном испарителе ( $T \leq 30^\circ \text{C}$ ) для удаления спирта. Водную фракцию дважды экстрагировали гексаном в соотношении с экстрактом 1:1 для удаления липофильных соединений и центрифугировали. Обработанное водное извлечение наносили на хроматографическую колонку с Сефадексом LH-20 (800 × 26 мм), уравновешенную дистиллированной водой. Колонку последовательно элюировали дистиллированной водой (для удаления органических кислот и углеводов), 20 % раствором этилового спирта (для удаления фенольных кислот и низкомолекулярных полифенолов флавоноидной природы). Фракцию проантоцианидинов (ПЦ) элюировали 70 % раствором ацетона в воде. Ацетон удаляли на роторном испарителе ( $T \leq 30^\circ \text{C}$ ).

Для установления основных компонентов выделенного из калины КОПЦ его фракционировали по методу, описанному в работе [5], в нашей модификации. Для этого водный раствор КОПЦ наносили на экстракционную колонку, заполненную обращеннофазовым силикагелем Supelclean ENVI-18. Фракцию, содержащую сумму мономерных катехинов (МК) и низкомолекулярных проантоцианидинов (НМПЦ) (фракция I) со степенью полимеризации 2 – 4, элюировали этилацетатом (50 мл). Фракцию высокомолекулярных проантоцианидинов (ВМПЦ) (фракция II) элюировали метанолом (20 мл).

Полученную фракцию I анализировали методом обращеннофазовой ВЭЖХ. В работе использовали хроматограф Knauer (Germany), оснащенный спектральным детектором K-2700, регистрирующим в диапазоне 190 – 1024 нм, и станцией обработки данных на базе компьютера P III — 450 с пакетом прикладных программ Eurochrom 2000, вер. 1.65 (Germany). Хроматографию проводили на колонке Nucleosil 5C<sub>18</sub> (250 мм × 4,6 мм) Knauer (Germany) при комнатной температуре в градиентном режиме, используя в качестве растворителей 0,5 % раствор уксусной кислоты (компонент А) и метанол (компонент Б) по линейному градиенту: 0 – 15 мин, 5 % Б; 15 – 20 мин, от 5 до 50 % Б; 20 – 25 мин, от 50 до 70 % Б; 25 – 30 мин, от 70 до 80 % Б; при скорости элюирования 0,6 мл/мин.

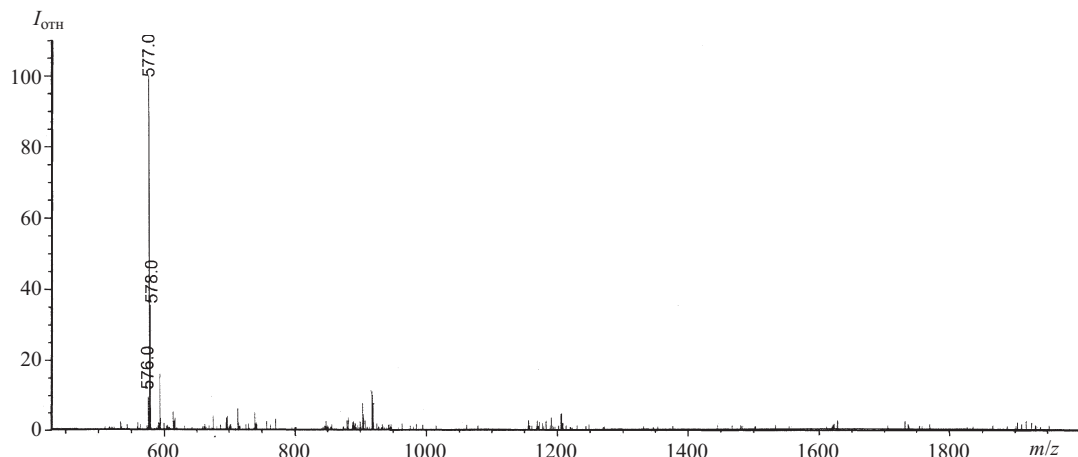
В качестве опорной смеси свидетелей использовали стандарты: галловую кислоту (ГК), катехин и эпикатехин (Sigma, USA). Для пиков, имеющих характерную



**Рис. 1.** ВЭЖХ/УФ хроматограмма фракции мономеров и низкомолекулярных проантоцианидинов, выделенной из отжима калины (сплошная линия), и хроматограмма опорной смеси стандартов (прерывистая линия). Идентификация отдельных пиков: 1 — галловая кислота, 2 — проантоцианидин В<sub>3</sub> (димер), 3 — проантоцианидин В<sub>1</sub> (димер), 4 — катехин, 5 — тример Т<sub>2</sub>, 6 — проантоцианидин В<sub>4</sub>, 7 — проантоцианидин В<sub>2</sub>, 8 — (-)-эпикатехин, 9 — проантоцианидин (тример).

для проантоцианидинов полосу поглощения в области 278 – 280 нм и совпадающих по времени элюирования с истинными стандартами проантоцианидинов димеров (В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>4</sub>) и тримеров Т<sub>2</sub> и С<sub>1</sub>, собирали элюат, соответствующий пикам идентифицируемых соединений, упаривали в токе азота и снимали масс-спектры (API-ES). Масс-спектры получали на масс-селективном детекторе HP 1100 (модель G1946A), оснащенный камерой ионизации API-ES (электроспрей ионизация при атмосферном давлении).

Для изучения распределения антирадикальной активности (АА) по фракциям в зависимости от степени полимеризации 10 мг соответствующего КОПЦ, очищенного от фенольных кислот, фракционировали по методу, описанному нами ранее [6], на три фракции — мономерную, олигомерную и полимерную, которые содержали соответственно МК, НМПЦ ( $n = 2 - 4$ ) и ВМПЦ ( $n \geq 5$ ).



**Рис. 2.** API-ES масс-спектр (в отрицательном режиме) соединений, соответствующих пикам 2,3,6 ВЭЖХ профиля, представленного на рис. 1. Молекулярный ион  $(M-H)^-$   $m/z$  577

Уровень АА отдельных фракций оценивали по способности восстанавливать органический катион радикал АВТS<sup>+</sup> (2,2'-азинобис-3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) [7], по методу, подробно описанному нами ранее [6]. Количественно АА полученных фракций выражали в мкМ-экв Тролокса на мг-экв В<sub>1</sub>. За одну единицу АА принимали АА 1 мкМ Тролокса. Для расчета величин АА полученных фракций строили калибровочный график в диапазоне от 1,25 до 40 нМ (0,3125 до 10 мкг) Тролокса ( $\Delta A_{734} = 0,033 \div 0,805$ ).

Определение содержания ПЦ в отдельных фракциях проводили методом, основанным на образовании цветного комплекса при реакции ванилина с конденсированными танинами в кислой среде по методу [5]. Количественно содержание ПЦ выражали в мг-экв проантоцианидина В<sub>1</sub> (ПЦВ<sub>1</sub>), которое определяли по калибровочной кривой в диапазоне 18 – 55 мкг ПЦВ<sub>1</sub> на пробу. Для определения в аликвоту 450 мкл раствора образца в этаноле добавляли 1,2 мл 10 % раствора Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в абсолютном этаноле и 1,2 мл 1 % раствора ванилина в абсолютном этаноле. Реакционную смесь оставляли на 10 мин при комнатной температуре для развития окраски и измеряли абсорбцию при 500 нм на спектрофотометре Ultraspek II (LKB, Sweden) против бланка, содержащего реагенты и абсолютный этанол вместо образца. Если полученная величина абсорбции выходила за пределы калибровочного графика, образец разводили абсолютным этанолом и измерение повторяли. Все измерения проводили не менее 3 раз.

### Результаты и их обсуждение

Было установлено, что суммарное содержание ОПЦ в экстракте отжима калины в пересчете на воздушно-сухое сырье составляет 1,5 %, что является высоким показателем и свидетельствует о перспективности использования отходов переработки калины как источника ПЦ.

ВЭЖХ-профиль фракции низкомолекулярных олигомерных проантоцианидинов и мономерных катехинов, полученной из калины, представлен на рис. 1.

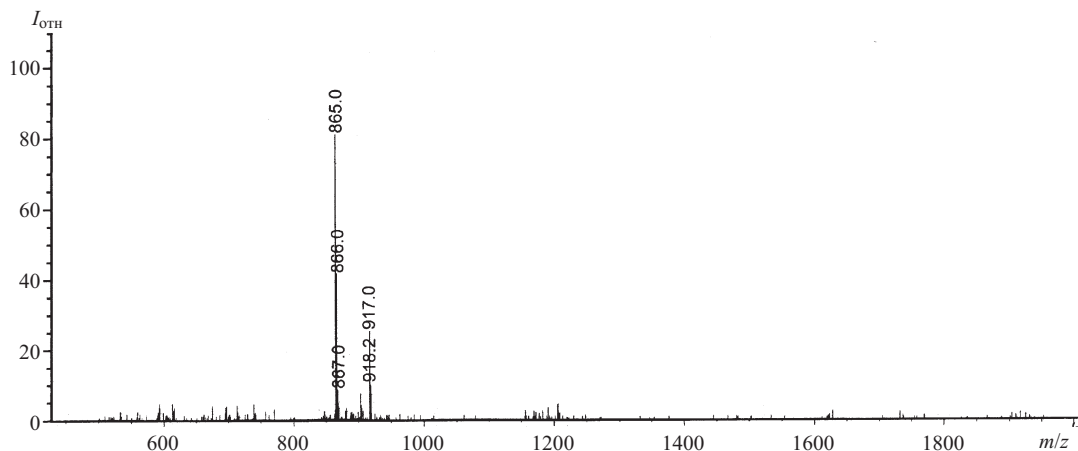


Рис. 3. API-ES масс-спектр соединений, соответствующих пикам 5,9 ВЭЖХ профиля, представленного на рис. 1. Молекулярный ион  $(M-H)^-$   $m/z$  865

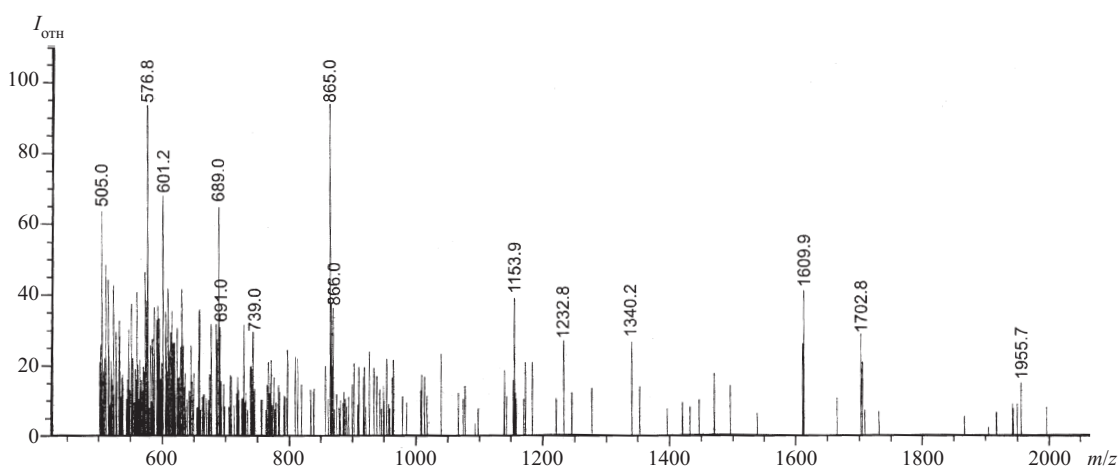


Рис. 4. API-ES масс-спектр в отрицательном режиме суммарного препарата низкомолекулярной фракции олигомерных проантоцианидинов. Молекулярные пики  $(M-H)^-$  соответствующие димерам  $m/z$  577, тримерам  $m/z$  865 и тетрамерам  $m/z$  1153,9. Массовые пики  $m/z$  601,2 соответствуют  $Na^+$  аддуктам димеров

Сравнение времени элюирования с истинными стандартами ПЦ позволили идентифицировать три димера  $V_1$ ,  $V_3$  и  $V_4$  и тример  $T_2$ .

Масс-спектры пиков, соответствующих димерам и тримерам на ВЭЖХ хроматограмме, представлены на рис. 2 и 3. На спектрах отчетливо видны пики молекулярных ионов  $(M-H)^-$   $m/z$  577 и  $m/z$  865, соответствующие димерным и тримерным ОПЦ.

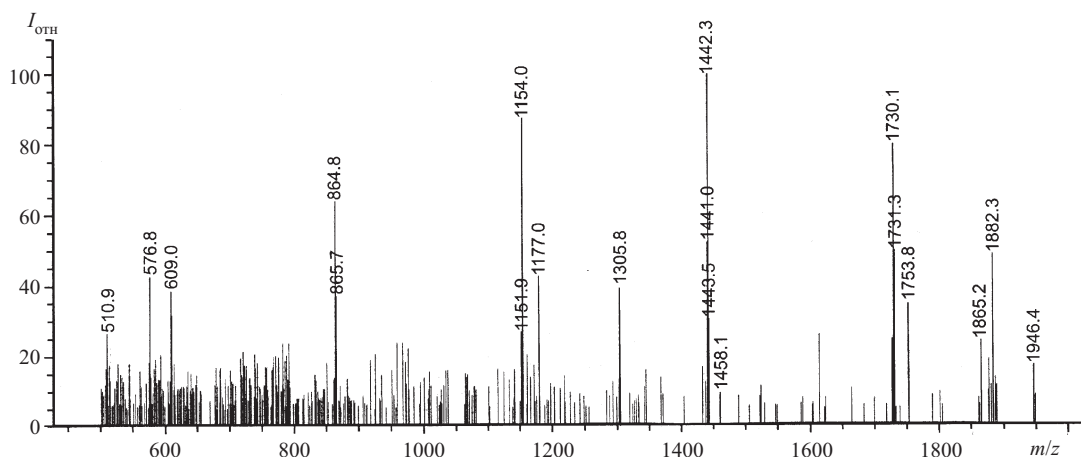
Таким образом, в качестве основных компонентов низкомолекулярной фракции олигомерных проантоцианидинов были идентифицированы мономеры катехин и (-)эпикатехин, проантоцианидины димеры  $V_1$ ,  $V_3$  и  $V_4$ , тример  $T_2$ , а также тример неустановленного строения.

Полученные нами результаты по определению основных компонентов низкомолекулярной фракции олигомерных проантоцианидинов, выделенной из отжима калины (*Viburnum*), согласуются с литературными данными по составу комплексов олигомерных проантоцианидинов из других природных источников. Известно [3, 8, 9], что преобладающими компонентами фракции низкомолекулярных проантоцианидинов,

кроме мономерных катехинов, являются димеры — проантоцианидины  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_3$  и тримеры  $C_1$  и  $T_2$ .

Для характеристики состава фракций олигомеров и полимеров, полученных в результате разделения исходного ОПЦ, нами были сняты спектры API-ES (в отрицательном режиме) суммарных фракций. Полученные спектры представлены на рис. 4, 5. На спектре фракции низкомолекулярных проантоцианидинов (рис. 4) наблюдаются сигналы в области массовых чисел  $m/z$ , соответствующие молекулярным ионам  $(M-H)^-$  577, 865, 1153,9, которые принадлежат димерам, тримерам и тетрамерам.

В спектре фракции ВМПЦ также были отмечены пики, соответствующие димерам ( $m/z$  576,8), тримерам ( $m/z$  864,8) и тетрамерам ( $m/z$  1154), что, с одной стороны, может быть обусловлено как не полным отделением низкомолекулярных ПЦ при фракционировании исходного экстракта, так и образованием многозарядных ионов  $[(M-2H)^{2-}/2]$  и  $[(M-3H)^{3-}/3]$  для ПЦ с высокой степенью полимеризации [10]. Наличие ионов  $m/z$  1305,8 указывает на присутствие тетрамеров, включающих одну галлолизированную субъединицу флаван-3-ола. Пики  $m/z$  1442,3 соответствуют пен-



**Рис. 5.** API-ES масс-спектр в отрицательном режиме суммарного препарата высокомолекулярной фракции олигомерных проантоцианидинов. Молекулярные пики  $(M-H)^-$ , соответствующие димерам  $m/z$  577, тримерам  $m/z$  865, тетрамерам  $m/z$  1154,  $m/z$  1305,8 тетрамерам, включающим одну галлоизированную субъединицу флаван-3-ола,  $m/z$  1442,3 пентамерам,  $m/z$  1730 гексамерам  $m/z$  1882 гексамерам, включающим одну галлоизированную субъединицу флаван-3-ола. Массовые пики  $m/z$  1177 и 1753,8 соответствуют  $Na^+$  аддуктам соответствующих тетрамеров и гексамеров

тамерам,  $m/z$  1730 — гексамерам,  $m/z$  1882 — гексамерам, включающим одну галлоизированную субъединицу флаван-3-ола. Массовые пики  $m/z$  1177 и 1753,8 соответствуют  $Na^+$  аддуктам соответствующих тетрамеров и гексамеров. Таким образом, полученный нами КОПЦ из калины содержит проантоцианидины со степенью полимеризации до  $n = 6$ , с наличием среди мономерных звеньев галлоизированных субъединиц флаван-3-олов. Присутствие иона  $m/z$  1151,9 может косвенно указывать на присутствие молекул, имеющих степень полимеризации 8 [11]. В то же время известно, что наибольшей биодоступностью, а соответственно и биологической активностью, обладают ОПЦ со степенью полимеризации, не превышающей  $n = 6$ , что

обусловлено их способностью растворяться в воде [12].

Сравнение процентного содержания основных фракций КОПЦ, выделенных из калины и экстракта виноградных косточек, показало достаточно высокую степень их соответствия (таблица). Более 90 % составляют наиболее важные компоненты КОПЦ: метаболитически активная фракция НМПЦ, которая, обладая высокой биодоступностью [13], непосредственно попадает в кровь и далее участвует в регуляции биохимических процессов и ВМПЦ. Последняя хотя и содержит ПЦ с низкой биодоступностью, однако является высоко активной и способна оказывать действие в сфере желудочно-кишечного тракта [2]. Кроме этого фракция ВМПЦ, подвергаясь окислительному гидро-

**Количественное содержание и антирадикальная активность фракций комплексов олигомерных проантоцианидинов в экстрактах из калины и из виноградных косточек**

Фракция	мг-экв ПЦВ <sub>1</sub> /фракцию	ААмкМ-Т/мг-экв ПЦВ <sub>1</sub>	ААмкМ-Т/фракцию	% содержания/фракцию	% АА/ фракцию
<b>КОПЦ из калины</b>					
МК	0,72 ± 0,04	7,32 ± 0,35	5,27	7,48	5,4
НМПЦ	0,95 ± 0,06	8,50 ± 0,6	8,08	9,88	8,3
ВМПЦ	7,95 ± 0,35	10,11 ± 1,4	80,37	82,64	86,3
КОПЦ из калины (суммарный) -расчетные величины	9,62	9,74	93,72	100	100
КОПЦ из калины (суммарный) -экспериментальные величины	10	8,56 ± 0,43	85,6		
<b>Экстракт виноградных косточек</b>					
МК	0,91 ± 0,03	5,56 ± 0,5	5,06	9,77	5,98
НМПЦ	1,06 ± 0,05	6,87 ± 0,5	7,28	11,39	8,6
ВМПЦ	7,34 ± 0,28	9,85 ± 0,7	72,3	78,84	85,4
Экстракт виноградных косточек (суммарный) – расчетные величины	9,31	9,09	84,64	100	100
Экстракт виноградных косточек (суммарный) – экспериментальные величины	10	6,86 ± 0,5	68,6		

**Примечание:** Мг-экв ПЦВ<sub>1</sub> — мг-эквивалент проантоцианидина В<sub>1</sub>; ААмкМ-Т — антирадикальная активность в мкМ Тролокса; АА — антирадикальная активность; МК — мономерные катехины; НМПЦ — низкомолекулярные проантоцианидины; ВМПЦ — высокомолекулярные проантоцианидины

лизу в желудке, способна служить источником НМПЦ, увеличивая таким образом количество ПЦ с высокой биодоступностью [14]. Удельное содержание НМПЦ в КОПЦ, выделенном из калины, было ниже на 15 %, однако необходимо отметить, что калина как источник сырья для получения КОПЦ имеет определенное преимущество перед виноградными косточками. Одной из нежелательных фракций при получении КОПЦ является фракция фенольных кислот, относительное содержание которой может достигать 25 % при использовании в качестве сырья отходов переработки винограда [6], тогда как в КОПЦ, полученном из отжима калины, этот показатель не превышает 10 %.

Широта спектра биологической активности ПЦ определяется во многом их АА [5], которая является наиболее универсальным показателем, отражающим потенциальную эффективность КОПЦ. Величину АА исходных КОПЦ и выделенных из них фракций оценивали по способности восстанавливать органический радикал АВТС + [7]. Полученные результаты в единицах ААмкМ-Г на мг-экв ПЦВ<sub>1</sub> представлены в таблице. Использование в нашей работе мг-экв ПЦВ<sub>1</sub> в отличие от обычно используемых мг-экв ГК или мг-экв катехина обусловлено особенностью протекания реакции ПЦ с ванилином, которая является специфической на их концевые группы.

Ввиду того, что молярные коэффициенты экстинкции, полученные для мономеров, на 25 – 40 % ниже таковых для димеров и тримеров, использование мономеров для построения калибровочных кривых приводит к значительной переоценке концентрации концевых групп ПЦ, и соответственно их количественного содержания [16]. Таким образом, использование ПЦВ<sub>1</sub> в качестве стандартного соединения для построения калибровочной кривой позволяет более корректно проводить количественную оценку содержания различных фракций КОПЦ, а соответственно и величину их удельной АА.

Удельная АА суммарного КОПЦ, выделенного из калины, на 25 % была выше таковой у экстракта виноградных косточек. Подобная картина наблюдалась и в отдельных фракциях. Так удельная АА наиболее важной фракции НМПЦ была на 24 % выше в КОПЦ из калины по сравнению с экстрактом виноградных косточек, что компенсировало ее меньшее содержание. При этом суммарная активность фракции НМПЦ в КОПЦ из калины была на 10 % выше, чем в экстракте виноградных косточек. Аналогичная картина наблюдалась и во фракции МК, активность которой в КОПЦ из калины была выше на 32 %, тогда как АА НМПЦ в обоих КОПЦ находилась примерно на одном уровне. По нашему мнению, это обусловлено размером молекул ПЦ. Изменение соотношения катехина и эпикатехина, проантоцианидинов степени полимеризации  $n = 2 - 4$ , а также наличие дополнительных галлоильных групп во фракциях МК или НМПЦ может существенно изменять удельную величину АА. По мере уве-

личения молекулярной массы и размера молекулы ПЦ структура ее становится более устойчивой и отличие конфигураций отдельных звеньев или наличие дополнительных галлоильных групп, скорее всего, уже не оказывают серьезного влияния на уровень активности молекулы в целом.

Таким образом, полученные результаты показали, что КОПЦ, выделенный из отжима калины, содержит в своем составе ПЦ со степенью полимеризации до  $n = 6$ , при этом среди мономерных звеньев присутствуют галлолизированные субъединицы флаван-3-олов, результатом чего является более высокая АА, а соответственно и биологическая активность.

По удельной АА как суммарного комплекса, так и всех отдельных фракций выделенный продукт превосходит эталонный КОПЦ из виноградных косточек. Это свидетельствует о перспективности использования отжима калины как для получения фитопрепаратов, содержащих КОПЦ, так и для получения непосредственно очищенного КОПЦ с высокой антирадикальной активностью в виде самостоятельного продукта. Это не только позволит получить ценный продукт, имеющий широкие возможности для применения в качестве ингредиента при производстве продуктов питания направленного действия и пищевых биологически активных добавок, но и позволит создать технологию утилизации побочных продуктов переработки калины.

## ЛИТЕРАТУРА

1. A. M. Fine, *Altern. Med. Rev.*, **5**(2), 144 – 151 (2000).
2. C. Santos-Buelga and A. Scalbert, *J. Sci. Food Agric.*, **80**(7), 1094 – 1117 (2000).
3. S. S. Herodez, M. Hadolin, M. Skerget, et al., *Chemie Ingenieur Technik*, **73**(6), 731 – 733 (2001).
4. В. Г. Спрыгин, Н. Ф. Кушнерова, *Бюл. изобрет., Пол. мод.*, № 6, 206 (2003); патент RU2199249.
5. B. S. Sun, J. M. Ricardo-da-Silva, and I. Spranger, *J. Agric. Food Chem.*, **46**(10), 4267 – 4274 (1998).
6. В. Г. Спрыгин, Н. Ф. Кушнерова, *Хим.-фарм. журн.*, **36**(3), 31 – 35 (2002).
7. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **26**(9 – 10), 1231 – 1237 (1999).
8. S. Carando, P. L. Teissedre, L. Pascual-Martinez, et al., *J. Agric. Food Chem.*, **47**(10), 4161 – 4166 (1999).
9. S. de Pascual-Teresa, C. Santos-Buelga, and J. C. Rivas-Gonzalo, *J. Agric. Food Chem.*, **48**(11), 5331 – 5337 (2000).
10. S. Guyot, T. Doco, J. M. Souquet, et al., *Phytochemistry*, **44**(2), 351 – 357 (1997).
11. J. F. Hammerstone, S. A. Lazarus, A. E. Mitchell, et al., *J. Agric. Food Chem.*, **47**(2), 490 – 496 (1999).
12. E. Haslam, *J. Nat. Prod.*, **59**(2), 205 – 215 (1996).
13. A. Scalbert, C. Morand, C. Manach, et al., *Biomed. Pharmacother.*, **56**(6), 276 – 282 (2002).
14. J. P. E. Spencer, H. Schroeter, A. R. Rechner, et al., *Antioxidants & Redox Signaling*, **3**(6), 1023 – 1039 (2001).
15. D. Bagchi, M. Bagchi, S. J. Stohs, et al., *Toxicology*, **148**(2 – 3), 187 – 197 (2000).
16. V. Cheynier, B. Labarbe, and M. Moutounet in: *Methods Enzymol.*, Vol. 335, L. Packer (eds.), Academic Press Inc., San Diego (2001), pp. 82 – 94.

Поступила 01.09.03