

БИОХИМИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

УДК 541.127
©Коллектив авторов

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ АРОНИИ (*ARONIA MELANOCARPA*), СОДЕРЖАЩЕГО ПРОАНТОЦИАНИДИНЫ

О.М. Ипатова¹, Н.Н. Прозоровская¹, И.Ф. Русина², В.Н. Прозоровский¹.

¹Государственное учреждение Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва, Погодинская ул., 10

²Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН
119977 Москва, ул. Косыгина, 4

В системах *in vitro* и *in vivo* исследованы антиоксидантные свойства экстракта листьев *Aronia melanocarpa*. Методом хемилюминесценции (ХЛ) в экстракте и его ВЭЖХ-фракциях измерены эффективная концентрация антиоксидантов и их антирадикальная активность (АРА), определяемая константой скорости их взаимодействия с пероксирадикалами (константа k_7) в модельной реакции инициированного окисления углеводорода. Экстракт содержит комбинацию сильных и слабых ингибиторов. Величина k_7 сильных ингибиторов соразмерна с величиной k_7 таких стандартных антиоксидантов, как α -токоферол и его синтетический аналог хроман. Установлен факт снижения антирадикальной активности при высоких концентрациях экстракта в реакционной смеси. Продемонстрировано, что экстракт оказывает значительное ингибирующее действие на перекисное окисление липидов (ПОЛ), инициированное в ткани печени введением животным CCl_4 , при этом степень ингибирования зависит от дозы экстракта. Показано также, что экстракт оказывает ингибирующее действие на рост перекисного числа полиненасыщенного льняного масла в условиях ускоренного окисления (60°C). Полученные результаты свидетельствуют, что экстракт листьев аронии обладает выраженными антиоксидантными свойствами.

Ключевые слова: *Aronia melanocarpa*, проантоцианидины, антиоксидантные свойства, антирадикальная активность, хемилюминесцентный метод

ВВЕДЕНИЕ. В связи с возрастающим загрязнением окружающей среды и ростом распространенности заболеваний, развитие которых прямо или косвенно связано с повреждающим действием свободных радикалов, вопрос обеспеченности организма человека антиоксидантами стоит достаточно остро. Поэтому поиск натуральных, нетоксичных и достаточно мощных природных антиоксидантов является весьма актуальным.

Повышенный интерес к растительным экстрактам, содержащим проантоцианидины, обусловлен тем, что они являются эффективными "ловушками" свободных радикалов и проявляют широкий спектр биологических активностей [1]. При этом показано, что в ряде случаев цельный экстракт дает больший биологический эффект, чем отдельные его фракции, что обусловлено, по-видимому, синергичностью взаимодействия присутствующих в экстракте соединений [2].

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА АРОНИИ ЧЕРНОПЛОДНОЙ

Олигомерные проантоцианидины являются продуктами конденсации от двух до десяти структурных единиц, представляющих собой производные флаван-3-олов (катехины) и/или флаван-3,4-диолов (лейкоантоцианидины) [3]. Как правило, в экстрактах присутствуют и мономерные предшественники структурных единиц олигомеров. Термин "проантоцианидины" обусловлен тем фактом, что при нагревании этих соединений с реагентом "н-бутанол-HCl" происходит катализируемая кислотой деполимеризация с выходом антоцианидинового продукта красного цвета, оттенок которого зависит от типа антоцианидина (например, цианидин - красный с фиолетовым оттенком, а дельфинидин - синевато-красный и т.п.) [4].

Арония черноплодная (*Aronia melanocarpa* (Michx) Elliot) относится к роду *Aronia Pers.* семейства розоцветных и естественно распространена в умеренном поясе восточной части Северной Америки [5]. Арония считается ценным плодовым и лекарственным растением, зрелые плоды которой и свежий сок обладают гипотензивными свойствами, обусловленными присутствием веществ с Р-витаминной активностью [6]. Показано также, что полифенолы листьев и плодов аронии оказывают желчегонное действие, не изменяя при этом состава желчи [7].

По разработанной в НИИ биомедицинской химии РАМН технологии был получен экстракт листьев аронии (*Aronia melanocarpa*), содержащий сумму фенольных соединений, включая проантоцианидины (олигомеры, главным образом, со степенью полимеризации 2-4 и мономеры) и производные кверцетина [8,9].

Цель настоящей работы состояла в исследовании антиоксидантной активности экстракта листьев аронии в системах *in vitro* и *in vivo*, которое включало:

- измерение в цельном экстракте и отдельных его фракциях эффективной концентрации антиоксидантов (АО) и их антирадикальной активности (АРА) кинетическим методом добавок в модельной реакции инициированного окисления углеводорода (кумол и этилбензол) с контролем интенсивности хемилюминесценции (ХЛ);

- оценку ингибирующего действия экстракта на перекисное окисление липидов (ПОЛ), инициированное в ткани печени введением CCl_4 лабораторным животным;

- оценку защитных свойств экстракта против окислительных изменений полиненасыщенного льняного масла.

МЕТОДИКА. Материалом служил сухой очищенный экстракт листьев Аронии черноплодной (*Aronia melanocarpa*), приготовленный по запатентованной технологии [8] и содержащий сумму фенольных соединений, включая проантоцианидины и производные кверцетина [9].

Методы. Для измерения суммарного содержания фенольных соединений использовали метод Фолина-Чокальте (модификация метода Фолина-Деннис), который определяет все свободные фенольные группы [4].

Проантоцианидины выявляли с помощью высоко специфичной реакции Bates-Smith [10] превращения гидроксифлаван-3,4-диола в антоцианидол с интенсивной красной окраской при нагревании с разведенной минеральной кислотой. Эта реакция лежит в основе "проантоцианидинового метода", который использовали для измерения общего количества флаваноидных остатков в составе как олигомерных проантоцианидинов, так и их мономерных предшественников, присутствующих в экстракте [4].

Антоцианидин, а именно цианидин, идентифицировали по спектру, который снимали после реакции с "н-бутанол-HCl" в кюветах с толщиной поглощаемого слоя 10 мм на самопишущем спектрофотометре "Hewlett Packard" модель 8453.

Фракционирование экстракта проводили методом ВЭЖХ на хроматографе ALTEX, модель 421, используя изократическую систему разделения - 15% ацетонитрил: 85% 0,1%-ного раствора трифторуксусной кислоты в воде. Регистрацию элюата вели при 280 нм. При аналитическом фракционировании использовали колонку C18 (0,4x25 см); скорость элюции была 1 мл/мин. Раствор

исследуемого материала (1 мг/мл) вводили в колонку в объеме 50 мкл. При препаративном фракционировании использовали колонку C18 (2,5 x 25 см); скорость элюции была 3 мл/мин. Раствор исследуемого материала (100 мг/мл) вводили в объеме 0,5 мл. Собранные фракции, объединенные в соответствии с пиками поглощения, высушивали под вакуумом на роторном испарителе. Результаты препаративного фракционирования не отличались от аналитического.

Эффективную концентрацию антиоксидантов и их относительную активность измеряли методом хемилюминесценции (ХЛ-метод), суть которого состоит в регистрации изменения интенсивности свечения в модельной цепной реакции инициированного окисления углеводорода (RH) при известной скорости инициирования после введения в систему ингибитора окисления [11]. Интенсивность свечения (I) пропорциональна квадрату концентрации пероксирадикалов. Любое изменение концентрации пероксирадикалов приводит к изменению интенсивности свечения. После добавления ингибитора регистрируется ослабление свечения, которое по мере расходования ингибитора восстанавливается до первоначального уровня (I_0).

Измерения интенсивности ХЛ проводили на фотометрической установке СНК-7 для измерения слабых световых потоков [12], используя фотоумножитель ФЭУ-38. Субстратами окисления служили кумол и этилбензол. Стационарную концентрацию свободных пероксирадикалов в процессе окисления субстрата обеспечивали инициатором азо-бис-изобутиронитрилом (АИБН). Для усиления свечения использовали активатор дибромантрацен (ДБА), что позволяет проводить измерения при низких значениях скорости инициирования радикалов ($W_i = 10^8 - 10^9$ моль/л с) и, следовательно, малых добавках исследуемого образца. Реакцию проводили при температуре 60°C.

Навеску исследуемого образца растворяли и 0,05-0,25 мл приготовленного раствора вводили в реакционную смесь (4,9-5,5 мл), помещенную в термостатируемый реакционный сосуд ХЛ-установки, после чего регистрировали изменение интенсивности свечения. В качестве растворителя использовали диметилсульфоксид (ДМСО) и ацетонитрил.

Скорость инициирования свободных радикалов (W_i) в каждом опыте контролировали по периодам торможения, обусловленным добавками стандартного сильного ингибитора - хромана С₁, для которого стехиометрический коэффициент ингибирования равен строго 2, что позволяет количественно измерить W_i до и после введения образца при выходе ХЛ на стационарный уровень свечения.

Суммарная эффективная концентрация антиоксидантов представляет собой суммарную эффективную концентрацию ингибиторов, которые прореагировали со свободными радикалами до возвращения на стационарный уровень свечения, умноженную на число радикалов, которые погибли на этих ингибиторах. Слагаемыми суммарной концентрации являются эффективная концентрация более сильных и более слабых ингибиторов, гасящих радикалы с более высокой и более низкой скоростью соответственно. Таким образом,

$$\Sigma [AO]_{эф} = \Sigma f[InH]_{(1+2)} = f[InH]_1 + f[InH]_2,$$

где f - стехиометрический коэффициент ингибирования, характеризующий число свободных радикалов, гибнущих на молекулах антиоксидантов.

Суммарную эффективную концентрацию ингибиторов в исследуемом образце рассчитывали по формуле (1), следующей из теории ХЛ жидкофазного окисления углеводородов:

$$\Sigma f [InH] = \gamma T W_i (S_1/S_0) \quad (1),$$

где γ - фактор разбавления, T - период торможения, т.е. время от момента введения препарата до выхода интенсивности свечения на первоначальный (стационарный) уровень, W_i - скорость инициирования свободных радикалов, S_1 - площадь над кривой тушения, которая пропорциональна количеству свободных радикалов,

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА АРОНИИ ЧЕРНОПЛОДНОЙ

гибнущих на ингибиторе, $S_0 = S_1 + S_2$, где S_0 - площадь, которая пропорциональна суммарному количеству пероксирадикалов, образовавшихся в реакции за время измерения T , S_2 - площадь под кривой ХЛ.

Эффективную константу скорости взаимодействия ингибитора с пероксирадикалами определяли по значению интенсивности свечения в минимуме кинетической кривой ХЛ ($i_{\min} = I_{\min}/I_0$) при добавлении исследуемого образца по формуле:

$$k_7 = \frac{(1 - i_{\min}) \cdot \sqrt{W_1 \cdot k_6}}{\sum f[InH] \cdot \sqrt{i_{\min}}} \quad (2)$$

подставляя в формулу значение $\sum f[InH]$, определенное по формуле (1).

В случае достаточно большого содержания ингибиторов в образце, когда наблюдалось полное тушение ХЛ, константу k_7 рассчитывали по наклону касательной к кинетической кривой ХЛ в точке перегиба (по $\tan \varphi$):

$$k_7 = \frac{\sqrt{k_6} \cdot \tan \varphi}{\sqrt{W_1} \cdot 0.237} \quad (3)$$

Скорость инициирования свободных радикалов в каждом опыте контролировали по периодам торможения, обусловленным добавками сильного ингибитора хромана C_1 ($f=2$), до и после введения препарата и выхода интенсивности ХЛ на стационарный уровень после полного израсходования ингибиторов.

Для сравнительной оценки АРА исследуемых препаратов были использованы следующие стандартные антиоксиданты: α -токоферол ("Serva", Германия), кверцетин ("Aldrich", Германия) и ионол ("Merck", Германия).

Для оценки действия экстракта на показатели перекисного окисления липидов использовали рекомендуемую схему [13] и методы [14].

Мышам-самцам линии СВА вводили внутрижелудочно 0,25 мл 7%-ного масляного раствора CCl_4 и через 20 мин животным опытной группы вводили аналогичный объем экстракта нужной концентрации; а мышам контрольной группы - аналогичный объем физиологического раствора. Каждая группа (интактная, опытная, контрольная) включала 5 животных. Через двое суток животных забивали, изолировали печень и определяли продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) - диеновые конъюгаты, гидроперекиси и малоновый диальдегид (МДА).

При исследовании защитных свойств экстракта против окислительных изменений полиненасыщенного масла использовали свежее льняное масло, полученное однократным прессованием целых очищенных семян льна (Производитель ООО "Лен", г. Чкаловск Нижегородской области). Льняное масло без и с добавленным экстрактом аронии помещали в открытые стеклянные бюксы и в течение требуемого срока выдерживали в термостате при 60°C, сохраняя постоянным соотношение массы продукта и площади поверхности, контактирующей с воздухом.

Степень ингибирования роста перекисного числа рассчитывали, используя начальные и конечные (после тепловой обработки или длительного хранения) показатели перекисного числа (ПЧ).

Перекисное число определяли стандартным методом [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Краткая характеристика экстракта листьев *Aronia melanocarpa*. Общее содержание фенольных соединений в экстракте аронии, определяемое по общему содержанию свободных фенольных групп, составило в пересчете на катехин 78 %.

Суммарное количество флаваноидных остатков в экстракте, измеренное с использованием реагента "н-бутанол-НСl", составило в пересчете на цианидин 63 %. Этот метод (реакция эндо-типа) определяет содержание антоцианидиновых

остатков, образующихся в результате катализируемой HCl деполимеризации конденсированных ганнинов, а также мономерных лейкоантоцианидинов.

В результате хроматографического анализа экстракта методом ВЭЖХ было достигнуто разделение экстракта на шесть основных фракций, соответствующих пикам поглощения при 280 нм. Пример аналитического разделения представлен на рис. 1. Препаративное фракционирование показало, что основная часть материала (56%) сосредоточена во второй фракции, являющейся также основным носителем проантоцианидин-положительного материала.

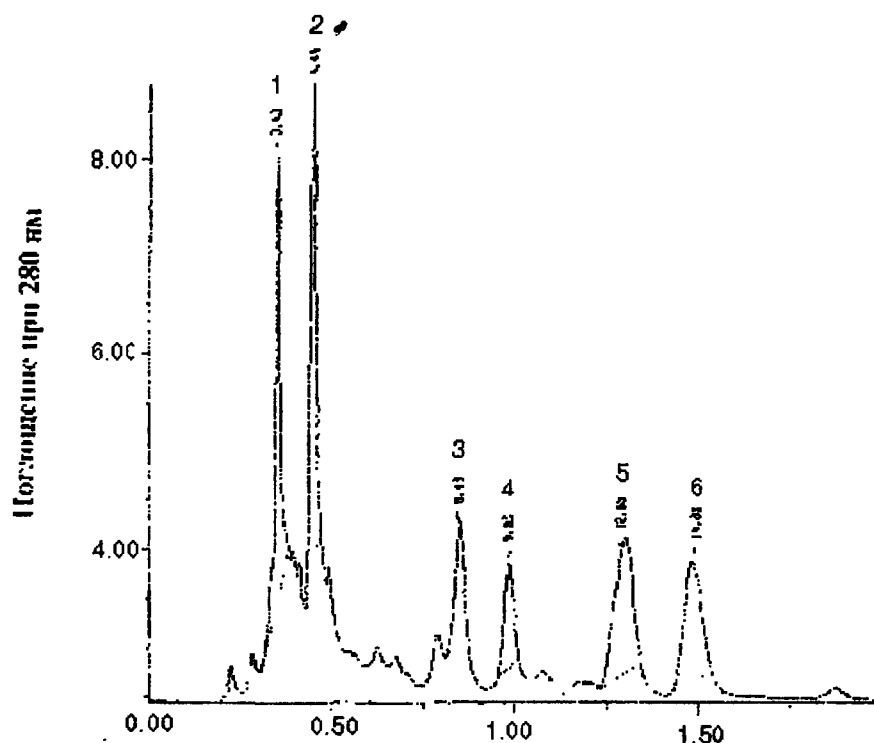


Рисунок 1.

Аналитическое фракционирование экстракта аронии методом ВЭЖХ, см. раздел "Методика".
Номера собранных при препаративном разделении фракций соответствуют номерам пиков, обозначенным на рисунке.

Исследование экстракта ХЛ-методом. Измерение антирадикальной активности ингибиторов в отношении пероксирадикалов кумола показало, что цельный экстракт и фракция 2 содержат сильные ингибиторы, величина константы k_1 которых соразмерна с величиной k_1 хромана С1 (синтетический аналог α -токоферола), а k_1 ингибитора фракции 5 значительно превышает ее (рис.2 и 3; табл.1). Антирадикальная активность (АРА) ингибиторов других фракций была значительно слабее и величина k_1 колебалась в интервале $(0,5 - 0,7) \times 10^4 \text{ (M}\cdot\text{c)}^{-1}$.

Анализ кинетических кривых показал, что в цельном экстракте и фракции 2 присутствует композиция антиоксидантов двух типов - более сильного и более слабого ингибирующего действия (рис. 2 и 3). При добавлении исследуемого материала в реакционную смесь наблюдается тушение ХЛ. Интенсивность свечения резко снижается, но не достигает нулевого уровня, как в случае хромана. По мере расходования ингибитора свечение восстанавливается до стационарного уровня. Однако восстановление происходит как бы в два этапа: быстрый (вертикальный участок кинетической кривой) и медленный этап (пологий участок). Известно, что при наличии смеси различных ингибиторов в цепных

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА АРОНИИ ЧЕРНОПЛОДНОЙ

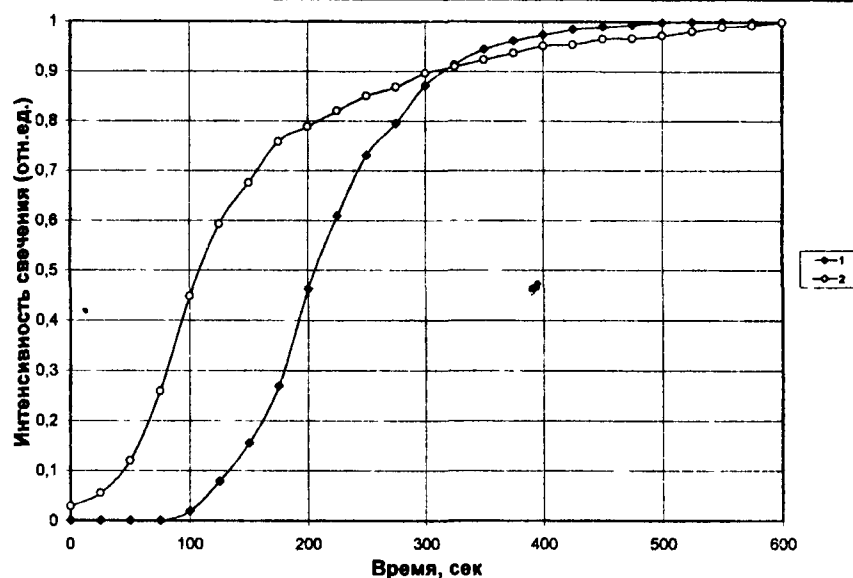


Рисунок 2.

Кинетические кривые свечения при добавлении экстракта листьев аронии черноплодной (1) и стандартного антиоксиданта хромана С (2).

RH - кумол (50%); $T = 60^{\circ}\text{C}$; инициатор - АИБН; скорость иницирования:

(1) $W_i = 2,04 \times 10^{-8} \text{ (М} \cdot \text{с}^{-1})$ и (2) $W_i = 2,08 \times 10^{-8} \text{ (М} \cdot \text{с}^{-1})$; активатор - ДБА, растворитель - ДМСО.

По вертикали: интенсивность свечения (относительные единицы, I/I_0)

По горизонтали: время (секунды).

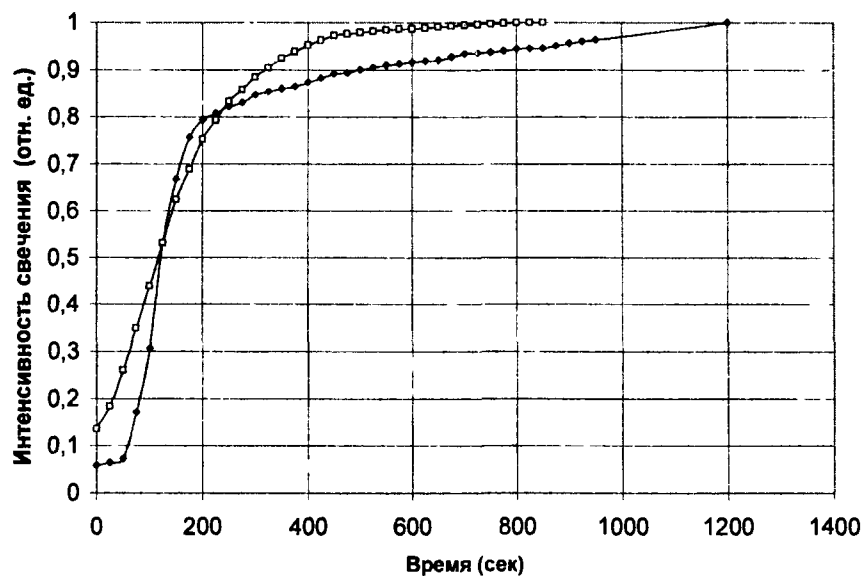


Рисунок 3.

Кинетические кривые свечения при добавлении фракции 2 (1) и фракции 5 (2) экстракта аронии:

RH - кумол (50%); $T = 60^{\circ}\text{C}$; инициатор - АИБН; скорость иницирования:

(1) $W_i = 2,35 \times 10^{-8} \text{ (М} \cdot \text{с}^{-1})$ и (2) $W_i = 2,11 \times 10^{-8} \text{ (М} \cdot \text{с}^{-1})$; активатор - ДБА; растворитель - ДМСО.

реакциях свободнорадикального окисления в первую очередь расходуются ингибиторы, обладающие максимальной АРА, далее подходит очередь более слабых ингибиторов [16]. В суммарной эффективной концентрации антиоксидантов второй фракции на долю сильных ингибиторов приходится 52% ; цельного экстракта - 95% , а фракция 5 однородна по составу (табл. 1а). Однако

при использовании в качестве субстрата окисления этилбензола, перокси-радикалы которого в 400 раз активнее пероксирадикалов кумола, доля эффективной концентрации более сильных ингибиторов в цельном экстракте составляла 33%, а во второй фракции - 56% (табл. 1б).

Таблица 1. Удельная эффективная концентрация ингибиторов и их антирадикальная активность, определяемая константой скорости их взаимодействия с пероксирадикалами углеводорода (константа k_7); измеренные ХЛ-методом в цельном экстракте Аронии и его фракциях

а) RH - кумол

Образец	$\Sigma f[\text{InH}]_{(1+2)}$ моль/г	$f[\text{InH}]_{(1)}$ моль/г	$k_{7(1)} (\text{M}\cdot\text{c})^{-1}$	$f[\text{InH}]_{(2)}$ моль/г	$k_{7(2)} (\text{M}\cdot\text{c})^{-1}$
Экстракт	$3,58 \times 10^{-3}$	$2,24 \times 10^{-3}$	$5,63 \times 10^4$	$1,34 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^3$
Фракция 2	$4,75 \times 10^{-3}$	$2,47 \times 10^{-3}$	$5,62 \times 10^4$	$2,28 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^3$
Фракция 5	$2,47 \times 10^{-3}$		$1,47 \times 10^5$		

б) RH - этилбензол

Образец	$\Sigma f[\text{InH}]_{(1+2)}$ моль/г	$f[\text{InH}]_{(1)}$ моль/г	$k_{7(1)} (\text{M}\cdot\text{c})^{-1}$ $(\text{M}\cdot\text{c})^{-1}$	$f[\text{InH}]_{(2)}$ моль/г	$k_{7(2)} (\text{M}\cdot\text{c})^{-1}$ $(\text{M}\cdot\text{c})^{-1}$
Экстракт	$2,45 \times 10^{-3}$	$0,81 \times 10^{-3}$	$2,96 \times 10^5$	$1,64 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^4$
Фракция 2	$3,16 \times 10^{-3}$	$1,77 \times 10^{-3}$	$4,36 \times 10^5$	$1,39 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^4$

Экстракт является весьма сложным для исследования объектом, поскольку представляет собой гетерогенную смесь фенольных соединений, включая олигомерные проантоцианидины с разной степенью полимеризации. Поэтому возникают определенные трудности с интерпретацией результатов измерения эффективной концентрации антиоксидантов. Информативность этого показателя снижается, поскольку не зная молекулярной массы каждого из ингибиторов, невозможно вычислить коэффициент ингибирования f и соответственно оценить эффективность его действия. На молекуле различных ингибиторов может гибнуть разное число пероксирадикалов, а в случае олигомерных проантоцианидинов - на различных структурных единицах. Различия в скорости взаимодействия могут отражать как присутствие разных ингибиторов, так и очередность взаимодействия разных активных групп одного и того же ингибитора с пероксирадикалами.

Таким образом, полученная информация сводится к тому, что экстракт содержит антиоксиданты, способные ингибировать *in vitro* инициированное окисление углеводорода, причем большинство антиоксидантов относится к сильным ингибиторам.

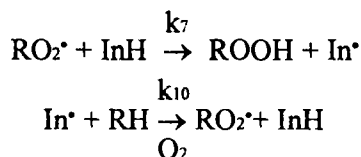
Однако при добавлении экстракта в реакционную смесь в разных концентрациях было замечено, что по мере увеличения концентрации экстракта в реакционной смеси происходит снижение антирадикальной активности (табл. 2). Феномен уменьшения ингибирующего действия антиоксидантов в области высоких концентраций описан как для ряда природных ингибиторов (α -токоферола, β -каротина, ретинола), так и для синтетических антиоксидантов [16,17].

Таблица 2. Изменение антирадикальной активности при изменении концентрации экстракта в реакционной смеси (RH - этилбензол)

Образец	Концентрация в реакционной смеси, г/мл	$k_7 (\text{M}\cdot\text{c})^{-1}$ $(\text{M}\cdot\text{c})^{-1}$
Цельный экстракт Аронии	$1,2 \times 10^{-5}$	$2,96 \times 10^5$
	$6,3 \times 10^{-6}$	$6,75 \times 10^5$
	$2,4 \times 10^{-6}$	$1,62 \times 10^6$
α -Токоферол	10^{-6} М	$4,9 \times 10^6$
Хроман С	10^{-6} М	$4,92 \times 10^6$
Кверцетин	10^{-6} М	$4,03 \times 10^5$
Ионол	10^{-6} М	$2,2 \times 10^4$

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА АРОНИИ ЧЕРНОПЛОДНОЙ

В случае высоких концентраций экстракта может иметь место конкуренция между реакцией взаимодействия ингибитора с пероксирадикалами (RO_2^*) и реакцией взаимодействия радикала ингибитора (In^*) с углеводородом, т.е. реакцией продолжения цепи:



Кроме того, нельзя исключить возможность образования комплексов между "избытком" проантоцианидинов (в случае высоких концентраций экстракта в реакционной смеси) и углеводородом, использованным в качестве субстрата окисления. Так, известно, что проантоцианидины способны образовывать комплексы с молекулами многих типов, включая углеводы, белки, полисахариды и др. Известно также, что в растительных экстрактах, например, в экстракте коры приморской ("Пикногенол") и листьев *Gingo biloba*, присутствуют в небольших концентрациях металлы переходной валентности (Fe: 65 и 23 мкг/г; Cu: <3 и 5 мкг/г и Zn: 4 и 2 мкг/г соответственно) [1].

Основываясь на всех результатах проведенных измерений, часть которых приведена в табл. 2, оптимальный интервал концентрации экстракта в реакционной смеси составляет $2,4 \times 10^{-7}$ - $2,4 \times 10^8$ г/мл.

Следует отметить, что повторные измерения антирадикальной активности экстракта аронии, проводимые в течение года в одних и тех условиях со строгим соблюдением всех параметров (субстрат окисления, инициатор, скорость инициирования, активатор, концентрация экстракта в реакционной смеси), продемонстрировали неизменность величины константы k_7 после хранения экстракта в течение года при комнатной температуре, в сухом месте, в плотно закупоренной емкости темного стекла.

Если говорить об антиоксидантной активности экстракта, следует учитывать, что антирадикальная активность характеризует способность соединения реагировать со свободными радикалами и определяет скорость только данной элементарной реакции в общепринятой модели ингибированного окисления, тогда как антиоксидантная активность отражает способность соединений тормозить процесс окисления в целом, являясь брутто-характеристикой процесса, скорость которого определяется соотношением скоростей элементарных реакций АО и их радикалов [12, 16]. Проявление высокой антирадикальной активности *in vitro* не обязательно означает наличие высокой антиоксидантной активности *in vivo*. Поэтому для проверки антиоксидантных свойств экстракта были проведены исследования *in vivo*.

Оценка действия экстракта аронии на показатели перекисного окисления липидов. Внутрижелудочное введение раствора CCl_4 , который является одним из сильнейших стимуляторов перекисного окисления липидов (ПОЛ), мышам (контрольная группа) сопровождалось достоверным ($p < 0,05$) по отношению к интактным животным увеличением первичных (диеновые конъюгаты), вторичных (гидроперекиси) и одного из конечных продуктов (малоновый диальдегид) ПОЛ в ткани печени, что указывает на инициирование реакций свободнорадикального окисления. Внутрижелудочное введение экстракта аронии в дозе 0,8 мг/кг достоверно ($p < 0,05$) снижало содержание всех продуктов ПОЛ, при этом степень ингибирования образования диеновых конъюгатов составляла 49%; гидроперекисей - 84% и малонового диальдегида (МДА) - 48%.

Исследование зависимости степени ингибирования одного из наиболее важных конечных продуктов ПОЛ - малонового диальдегида от вводимой дозы экстракта продемонстрировало наличие прямой корреляции между дозой экстракта и степенью ингибирования МДА ($r = 0,886$) (табл. 3). Степень ингибирования неуклонно возрастала вплоть до вводимой дозы 2,0 мг/кг, начиная с дозы 2,5 мг/кг наблюдалось некоторое снижение эффективности ингибирования.

Таблица 3. Зависимость степени ингибирования иницированной CCl_4 продукции малонового диальдегида (МДА) от вводимой дозы экстракта Аронии

Группа животных	Доза экстракта (мг/кг веса)	МДА (нмоль/г ткани)	Ингибирование (%)
Интактная	-	$8,62 \pm 0,44$	-
Контрольная	-	$23,12 \pm 0,68$	-
Опытная	0,5	$17,28 \pm 1,01$	40
	1,0	$14,77 \pm 0,89$	58
	1,5	$13,21 \pm 0,79$	68
	2,0	$12,18 \pm 0,94$	75
	2,5	$12,84 \pm 1,12$	71

Полученные результаты указывают на выраженное торможение экстрактом аронии свободнорадикальных реакций в печени, иницированных введением CCl_4 , что позволяет говорить о наличии гепатопротекторных свойств.

Многочисленными исследованиями установлено закономерное участие активации свободнорадикального окисления липидов в патогенезе развития повреждений органов гепатобилиарной системы [18]. В этом аспекте представляется перспективным использование экстракта аронии, обладающего антиоксидантными свойствами, для профилактики повреждений такого рода.

При исследовании защитного действия экстракта семян винограда, содержащего олигомерные проантоцианидины, эффективные против ПОЛ, индуцированного в ткани печени мышей, другие авторы также наблюдали дозозависимое ингибирование ПОЛ в интервале 25-100 мг/кг [19]. Степень ингибирования была сходна с наблюдаемой в наших экспериментах, но при использовали в 50 раз меньших доз экстракта.

Влияние экстракта аронии на устойчивость полиненасыщенного растительного масла к окислительным изменениям. В качестве полиненасыщенного растительного масла использовали льняное масло, в котором относительная доля полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) составляла 73%. Экстракт аронии добавляли в льняное масло в количестве 0,1%. Результаты измерений ХЛ-методом показали, что после обогащения масла экстрактом аронии суммарная эффективная концентрация антиоксидантов увеличивается почти в 4 раза, а величина константы k_7 возрастает в два раза и совпадает с величиной k_7 , измеренной для экстракта аронии (табл.4, рис. 4). Следует отметить, что увеличение содержания экстракта аронии в льняном масле с 0,1% до 0,5% приводит к снижению константы k_7 до $2,4 \times 10^4 \text{ (M} \cdot \text{c)}^{-1}$.

Таблица 4. Удельная эффективная концентрация ингибиторов и константа скорости их взаимодействия с пероксирадикалами кумола, измеренные ХЛ-методом в льняном масле и льняном масле, обогащенном экстрактом аронии (0,1%)

Образец масла	$\Sigma f[\text{InH}]_{(1+2)}$ моль/г масла*	$f[\text{InH}]_{(1)}$ моль/г масла	$k_7 \times 10^{-4} \text{ (M} \cdot \text{c)}^{-1}$	$f[\text{InH}]_{(2)}$ моль/г масла	$k_7 \times 10^{-3} \text{ (M} \cdot \text{c)}^{-1}$
льняное	$3,46 \times 10^{-3}$	$2,87 \times 10^{-3}$	2,75	$0,59 \times 10^{-3}$	3,7
+ экстракт аронии	$13,60 \times 10^{-3}$	$5,6 \times 10^{-3}$	5,6	$8,0 \times 10^{-3}$	1,7

* $d_{\text{масла}} = 0,932$

Исследование влияния экстракта аронии на устойчивость льняного масла к окислительным изменениям в условиях ускоренного окисления показало, что экстракт повышает устойчивость льняного масла, в значительной степени ингибируя рост перекисного числа (табл. 5). Исследование защитных свойств экстракта при длительном хранении масла при температуре 18°C показало, что за шестимесячный срок перекисное число льняного масла без экстракта аронии выросло с 1,8 до 2,85, тогда как льняного масла, обогащенного экстрактом аронии, до 2,34, т.е. степень ингибирования роста перекисного числа экстрактом аронии составляет 49%.

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА АРОНИИ ЧЕРНОПЛОДНОЙ

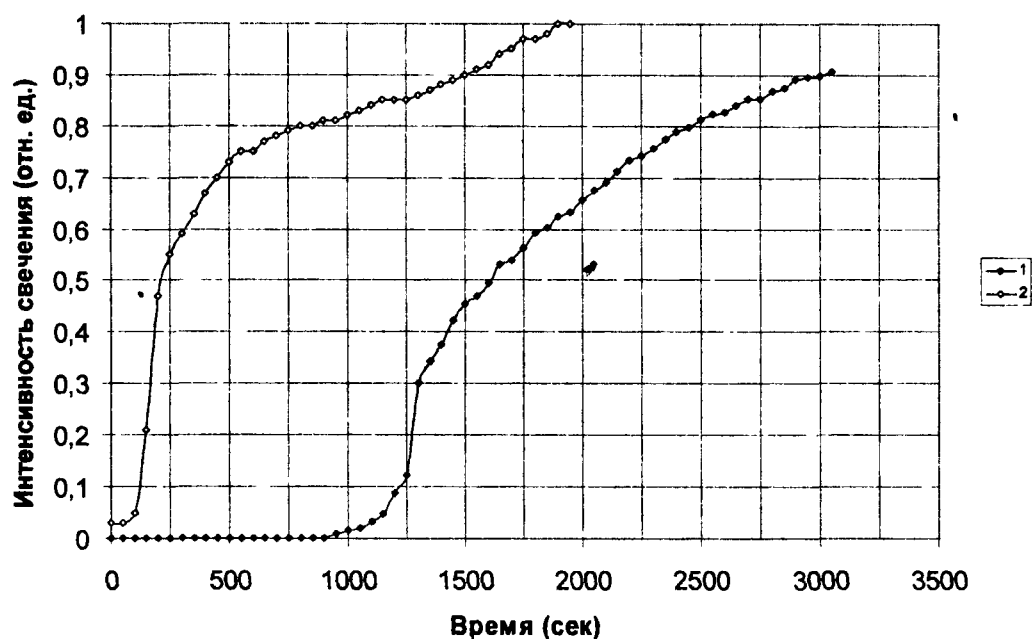


Рисунок 4.

Кинетические кривые свечения при введении льняного масла (1) и льняного масла, обогащенного экстрактом аронии (2). RH - кумол (50%); T = 60°C; инициатор - АИБН; Скорость инициирования: (1) $W_i = 2,22 \times 10^{-4} \text{ (M} \cdot \text{с}^{-1})$ и (2) $W_i = 2,78 \times 10^{-4} \text{ (M} \cdot \text{с}^{-1})$; активатор - ДБА; растворитель - хлорбензол.

Таблица 5. Ингибирование роста перекисного числа (ПЧ) экстрактом аронии, добавленным в льняное масло (0,1%), в условиях ускоренного окисления (60°C)

Срок обработки (сутки)	ПЧ Масло льняное	ПЧ Масло льняное + экстракт аронии	Ингибирование роста ПЧ (%)*
0	1,8	1,8	-
1	3,8	2,7	55
3	11,6	6,2	55
6	22,4	12,6	48
9	35,4	18,8	49
12	49,6	27,1	47

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В результате проведенных исследований установлено следующее:

1. В экстракте аронии присутствует композиция ингибиторов, различающихся по скорости их взаимодействия с пероксирадикалами в модельной реакции иницированного окисления углеводорода. Величина k_7 более сильных ингибиторов экстракта соразмерна с величиной k_7 таких ингибиторов как α -токоферол и его синтетический аналог хроман С.

2. При высоких концентрациях экстракта в реакционной смеси антирадикальная активность его снижается.

3. Экстракт аронии устойчив при хранении и сохраняет высокую антирадикальную активность по крайней мере в течение года.

4. Экстракт аронии обладает гепатопротекторными свойствами, значимо замедляя процесс липопероксидации в печени, о чем свидетельствуют результаты опытов с мощным инициатором перекисного окисления липидов - CCl_4 . Максимальный ингибирующий эффект достигается в дозе 2 мг/кг веса.

5. Экстракт аронии повышает устойчивость полиненасыщенного льняного масла к окислительным изменениям. При высоких концентрациях добавляемого экстракта (> 1 мг/мл) его защитный эффект резко ослабевает.

Таким образом, экстракт листьев аронии содержит фенольные соединения, являющиеся эффективными акцепторами пероксирадикалов, и обладает выраженными антиоксидантными свойствами. Он может быть использован в лечебно-профилактических целях, а также в масло-жировой и пищевой промышленности для повышения устойчивости продуктов к окислительным изменениям. При этом особое внимание следует обратить на используемые дозы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Packer L., Rimbach G., Virgili F. (1999) Free Rad. Biol. Med., **27**, 704-724.
2. Noda Y., Anzai K., Mori A., Kohno M., Shnmei M., Packer L. (1997) Biochem. Mol. Biol. Int., **42**, 35-44.
3. Hemingway R.W., Karchesy J.J. (eds) (1989) Chemistry and Significance of Condensed Tannins, Plenum Press, New York.
4. Waterman P.G., Mole S. (1994) Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
5. Петрова В.П. (1987) Дикорастущие плоды и ягоды. М., с. 96-100.
6. Максютин Н.П., Комиссаренко Н.Ф., Прокопенко А.П., Погодина Л.И., Липкан Г.Н. (1985) Растительные лекарственные средства. Киев, Здоров'я, с. 218.
7. Румянцева Ж.Н., Гудивок Я.С. (1993) Раст. Ресурсы, **1**, 88-97
8. Патент "Экстракт листьев аронии, обладающий биологической активностью, и способ его получения. Решение о выдаче от 9 апреля 2001 г. по Заявке 2000111125/14.
9. ТУ 9317-009-01897373-99. Экстракт Аронии сухой.
10. Bates-Smith E.C. (1975) Phytochemistry, **14**, 1107-1113.
11. Русина И.Ф., Морозова И.С., Гагарина А.Б., Зоз Н.Н., Ципруш Р.Я., Лукьян Л.С., Лойко Р.Э., Будкевич А.А., Урютина Т.Л., Слепухина Л.В., Радюк В.А. (1990) Известия Академии Наук СССР, Серия биологическая, N 3, 399-405.
12. Шляпникох В.Я., Карпунин О.Н., Постников Л.М., Захаров И.В., Вичутинский А.А., Цепалов В.Ф. (1966) Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов. М., Наука, с.34-44.
13. Методические указания. (1999) Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище: М., Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, с. 49-50.
14. Орехович В.Н. (ред) (1977) Современные методы в биохимии. М., "Медицина", с. 62-68.
15. ГОСТ 26593-85. Масла растительные. Метод определения перекисного числа.
16. Бурлакова Е.Б., Крашаков С.А., Храпова Н.Г. (1998) Биологические мембраны, **15**, 137-167.
17. Гуреева Н.В., Сторожок Н.М., Крысин А.П., Храпова Н.Г., Бурлакова Е.Б. (2002) Биоантиоксидант. Материалы VI Международной конференции, Москва (16-19 апреля 2002 года). с. 139-141.
18. Николаев С.М. (1992) Растительные лекарственные препараты при повреждениях гепатобилиарной системы. Новосибирск.

19. Bagchi D., Garg A., Krohn R.L., Baghchi M., Balmoori J., Stohs S.J. (1998) Gen. Pharmacol., **30**, 771-776.

Поступила 05.03.02

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF A PROCYANIDIN-CONTAINING EXTRACT FROM ARONIA (*ARONIA MELANOCARPA*) LEAVES

O.M. Ipatova¹, N.N. Prozorovskaya¹, I.F. Rusina², V.N. Prozorovskii²

¹Orechovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, 10 Pogodinskaya Str., Moscow 119121, Russia

²Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 4 Kosygin Str., Moscow 117977, Russia

Antioxidant capacity of a procyanidin-containing extract from *Aronia melanocarpa* leaves has been studied *in vitro* and *in vivo*. Using the chemiluminescence technique, the effective content of antioxidants and its reactivity towards peroxy radicals have been measured in a model reaction of initiated oxidation of hydrocarbon for the whole extract and two of its chromatographic fractions separated by HPLC. The results indicate that the extract contains a combination of antioxidants with different radical scavenging activities. The value of the rate constant of the reaction with peroxy radicals (constant k_7) for the extract strong inhibitors is of the same order of that for α -tocopherol and its synthetic analog chroman C. A decrease in antiradical activity directly related to the high concentrations of this extract in reactive mixture has been observed. This extract significantly reduced in dose-dependent fashion the CCl_4 -induced hepatic lipid peroxidation. The extract also inhibited flaxseed oil peroxidation. The present study indicates significant antioxidant capacity of the extract from *Aronia melanocarpa* leaves.

Key words: *Aronia melanocarpa*, procyanidins, antioxidant properties, antiradical activity, chemiluminescence technique.