

УДК 615.322:582.711.31:615.373.3

**АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ,
ПЛОДОВ И СТЕБЛЕЙ КРЫЖОВНИКА ОТКЛОНЕННОГО
(GROSSULARIA RECLINATA (L) MILL.)****Аджихметова С.Л., Андреева О.А., Оганесян Э.Т.***Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава
России, Пятигорск, e-mail: similla503@mail.ru*

В настоящей статье обсуждаются результаты исследования антиоксидантной активности экстрактов из надземной части крыжовника отклоненного (*Grossularia reclinata* (L) Mill.). С использованием жидкостного хроматографа «Цвет Яуза-01-АА» изучено суммарное содержание антиоксидантов в полученных извлечениях из листьев, плодов и стеблей различных сортов крыжовника отклоненного. Использован амперометрический метод измерения массовой концентрации антиоксидантов. Количество антиоксидантов определяли по градуировочному графику зависимости выходного сигнала от концентрации кверцетина и галловой кислоты. Выявлено содержание антиоксидантов в спиртовых, водно-спиртовых и водных извлечениях из перечисленных органов надземной части. Установлено, что в извлечении, полученном спиртом этиловым 40% из листьев крыжовника отклоненного сорт «Московский красный» содержание антиоксидантов максимально. Эти данные явились обоснованием для выбора спирта этилового 40% в качестве оптимального экстрагента при получении извлечений.

Ключевые слова: надземная часть крыжовника отклоненного, антиоксидантная активность, галловая кислота, кверцетин

**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACTS FROM THE LEAVES,
THE FRUIT AND STEMS GOOSEBERRY REJECTED
(GROSSULARIA RECLINATA (L) MILL.)****Adzhiakhmetova S.L., Andreeva O.A., Oganesyanyan E.T.***Piatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute, branch GBOU VPO «Volograd State Medical
University», Pyatigorsk, e-mail: similla503@mail.ru*

This article discusses the results of a study of antioxidant activity of extracts from the aerial parts of Gooseberry rejected (*Grossularia reclinata* (L) Mill.). The total content of antioxidants in the extracts obtained from leaves, stems and fruits of different varieties of Gooseberry rejected was studied with the help of the liquid chromatography «Color Jauza-01-AA». Amperometric method of measure the mass concentration of antioxidants was used. The amount of antioxidants was determined by a calibration curve according to an output signal from the concentration of gallic acid and quercetin. Quantity of antioxidants in alcoholic, hydro-alcoholic and aqueous extracts of the aerial parts of these bodies was found. It was determined that the quantity of antioxidants in the extraction with 40% ethyl alcohol from the leaves of gooseberry rejected grade «Moscow red» was maximum. These data were the rationale for the choice of 40% ethyl alcohol as the best extractant for obtaining extractions.

Keywords: aerial part of Gooseberry rejected, antioxidant activity, gallic acid, quercetin

Известно, что в развитии многих патохимических процессов определенную роль играют активные формы кислорода (АФК). Снижение активности естественной антиоксидантной системы организма связано со многими неблагоприятными факторами: это влияние ксенобиотиков, различные виды излучения, ухудшение экологической обстановки, широкое распространение социальных заболеваний, постоянные стрессы, потребление загрязненной пищи, неконтролируемый прием лекарственных препаратов. Понятно, что поиск новых источников антиоксидантов является актуальной задачей [8].

В 2004 году НИИ питания РАМН на основании изучения ежедневного рациона питания опубликовал рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ [6]. В качестве одного из альтернативных источников полифеноль-

ных соединений, в том числе флаван-3-олы (катехин, эпикатехин, галлокатехин, эпигаллокатехин) или янтарной кислоты предложено использовать крыжовник отклоненный (*Grossularia reclinata* (L) Mill.) [7].

Обладая широким спектром фармакологической активности, флавоноиды применяются в медицине как желчегонные, гипозотемические, гепатозащитные, противоязвенные, капилляроукрепляющие средства [9]. Широкий спектр действия флавоноидов объясняется их избирательностью по отношению к активным формам кислорода (АФК): при гиперпродукции АФК они проявляют антиоксидантные свойства, а при низком уровне генерации АФК – прооксидантные. Удачное сочетание низкой токсичности с высокой фармакологической активностью делает их чрезвычайно перспективными для профилактики и лечения многих заболеваний [8].

Целью настоящего исследования является изучение антиоксидантной активности крыжовника отклоненного.

Химический состав крыжовника отклоненного по сравнению с другими садовыми культурами зависит от сорта, возраста, почвенных и климатических условий, поэтому данные по химическому составу крыжовника в разных источниках отличаются между собой сильнее, чем по другим садовым культурам.

Следует также отметить, что из-за невысокого спроса этой ягоды со стороны большинства населения его полезные качества изучены слабее, чем у других ягод. Но даже то, что известно о крыжовнике, привлекает к себе внимание и дает основание считать его полезной и целебной ягодой [1, 4].

В народной медицине используются плоды, листья, цветки и семена всех видов рода *Grossularia* Mill. [1, 3].

Отвар из ягод крыжовника используется при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта, обладает болеутоляющим, слабительным и диуретическим действием [3]. Настой листьев рекомендуют при туберкулезе легких [1]. Спелые ягоды, благодаря наличию серотонина, обладают противоопухолевыми свойствами. Крыжовник способствует защите от радиации, что объясняют свойством пектина связывать и выводить из организма тяжелые металлы и радионуклиды. Сок крыжовника используется для лечения лучевых поражений, а сырой джем – для профилактики гипертонии, склероза сосудов (закупорки сосудов тромбами) и инфарктов [3].

По данным литературы, химический состав различных надземных органов крыжовника отклоненного представлен флавоноидами, катехинами, фенолокислотами, кумаринами, антоцианами, которые являются основными природными антиоксидантами [3, 4].

Материал и методы исследования

Для исследования были выбраны три сорта наиболее распространенных на Северном Кавказе: «Московский красный», «Юбилейный ярко-желтый» и «Огни Краснодара без шипов». Сырьё собрано в период плодоношения в июле 2011 г.

Структурное многообразие фенольных антиоксидантов делает трудным их разделение на индивидуальные вещества и их количественное определение. Поэтому суммарное содержание антиоксидантов, присутствующих в образце, часто является более информативным параметром [8].

Определение общего содержания антиоксидантов в различных извлечениях из исследуемых видов сырья проводили на жидкостном хроматографе «Цвет Яуза-01-АА».

Массовую концентрацию антиоксидантов измеряют, используя градуировочный график зависимости выходного сигнала от концентрации кверцетина и/или галловой кислоты.

Сущность амперометрического метода измерения массовой концентрации антиоксидантов заключается в измерении силы электрического тока, возникающего при окислении молекул антиоксиданта на поверхности рабочего электрода при определенном потенциале, который после усиления преобразуется в цифровой сигнал. Величина возникающей при этом силы электрического тока будет зависеть как от природы и концентрации анализируемых веществ, так и от типа материала рабочего электрода и потенциала, приложенного к электроду [5].

Результаты исследования и их обсуждения

Спиртовые и водно-спиртовые извлечения антиоксидантов определяли исходя из площадей пиков дифференциальных кривых соответствующих экстрактов [2]. Площади пиков, а также концентрации антиоксидантов в пересчете на кверцетин и галловую кислоту представлены в табл. 1.

Исходя из экспериментальных данных, представленных в табл. 1, можно сделать вывод о том, что максимальное содержание антиоксидантов выявлено в экстракте из листьев крыжовника отклоненного сорта «Московский красный», полученном спиртом этиловым 40 %.

Методика выполнения измерений содержания антиоксидантов в напитках и пищевых продуктах, биологически активных добавках, экстрактах лекарственных растений амперометрическим методом, разработанная ОАО НПО «Химвтоматика», аттестована ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы» в соответствии с ГОСТ Р 8.563-96, ГОСТ Р ИСО 5725-2002 (свидетельство об аттестации МВИ № 31-07).

При соблюдении всех регламентированных условий и проведении анализа в точном соответствии с данной методикой (и ее составляющих) результатов измерений не должны превышать значений, представленных в табл. 2.

Методика получения анализируемых извлечений: точную навеску измельченного сырья (около 1 г) помещали в колбу вместимостью 100 мл, добавляли примерно 30 мл спирта этилового соответствующей концентрации или воды и кипятили на водяной бане в течение 30 минут. Для приготовления экстрактов из ягод их предварительно измельчали и растирали в ступке. Содержимое колбы фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Извлечение вышеуказанным способом повторяли еще 2 раза, фильтр промывали экстрагентом и доводили объем фильтрата до метки. В случае необходимости пробу разбавляли [2].

Таблица 1

Содержание антиоксидантов (в пересчете на кверцетин и галловую кислоту), полученных из крыжовника отклоненного

Объект исследования крыжовник отклонённый	Используемые экстрагенты	Площадь пика ($S_{п}$ нА/с)	Содержание антиоксидантов (в пересчете на кверцетин, мг/г)	Содержание антиоксидантов (в пересчете на галловую к-ту, мг/г)
Сорт «Московский красный»				
Листья	спирт этиловый 96%	1228,02	0,482 ± 0,004	0,292 ± 0,011
	спирт этиловый 70%	2667,73	1,134 ± 0,015	0,727 ± 0,016
	спирт этиловый 40%	3965,20	1,715 ± 0,021	1,101 ± 0,023
	вода	2739,62	1,167 ± 0,018	0,746 ± 0,021
Ягоды	спирт этиловый 96%	1068,17	0,413 ± 0,006	0,243 ± 0,009
	спирт этиловый 70%	1285,99	0,515 ± 0,007	0,315 ± 0,013
	спирт этиловый 40%	1818,41	0,754 ± 0,011	0,474 ± 0,007
	вода	1048,28	0,392 ± 0,003	0,256 ± 0,006
Стебли	спирт этиловый 96%	1110,57	0,167 ± 0,002	0,132 ± 0,007
	спирт этиловый 70%	1337,52	0,213 ± 0,003	0,161 ± 0,004
	спирт этиловый 40%	1509,17	0,303 ± 0,004	0,193 ± 0,005
	вода	945,79	0,182 ± 0,005	0,106 ± 0,003
Сорт «Юбилейный ярко-жёлтый»				
Листья	спирт этиловый 96%	1101,81	0,433 ± 0,005	0,257 ± 0,011
	спирт этиловый 70%	2601,74	1,102 ± 0,015	0,692 ± 0,016
	спирт этиловый 40%	3062,42	1,305 ± 0,012	0,845 ± 0,023
	вода	2716,80	1,201 ± 0,013	0,747 ± 0,019
Ягоды	спирт этиловый 96%	996,11	0,389 ± 0,005	0,222 ± 0,006
	спирт этиловый 70%	1140,83	0,445 ± 0,007	0,273 ± 0,005
	спирт этиловый 40%	1635,11	0,676 ± 0,009	0,412 ± 0,008
	вода	1390,75	0,567 ± 0,007	0,348 ± 0,011
Стебли	спирт этиловый 96%	1300,96	1,032 ± 0,017	0,164 ± 0,007
	спирт этиловый 70%	2117,16	1,763 ± 0,019	0,282 ± 0,012
	спирт этиловый 40%	2345,46	1,978 ± 0,023	0,319 ± 0,013
	вода	1940,92	1,605 ± 0,020	0,255 ± 0,009
Сорт «Огни Краснодар без шипов»				
Листья	спирт этиловый 96%	1307,11	0,521 ± 0,009	0,313 ± 0,005
	спирт этиловый 70%	2699,87	1,115 ± 0,018	0,732 ± 0,010
	спирт этиловый 40%	3181,04	1,369 ± 0,026	0,878 ± 0,014
	вода	2939,59	1,255 ± 0,021	0,804 ± 0,011
Ягоды	спирт этиловый 96%	1103,15	0,427 ± 0,016	0,256 ± 0,007
	спирт этиловый 70%	1442,25	0,583 ± 0,011	0,351 ± 0,008
	спирт этиловый 40%	1769,73	0,728 ± 0,013	0,452 ± 0,006
	вода	1022,15	0,392 ± 0,006	0,221 ± 0,007
Стебли	спирт этиловый 96%	1005,36	0,199 ± 0,003	0,113 ± 0,002
	спирт этиловый 70%	1125,78	0,224 ± 0,012	0,138 ± 0,003
	спирт этиловый 40%	1432,58	0,292 ± 0,010	0,175 ± 0,005
	вода	861,02	0,167 ± 0,009	0,096 ± 0,004

Примечание. Извлечения, содержащие максимальное количество антиоксидантов выделены полужирным курсивом.

Перед выполнением каждого цикла анализируемых проб проводили контроль чистоты аналитической системы. Для этого после выхода прибора на рабочий режим в него в качестве пробы вводили

элюент. Если дрейф фонового тока не превышает 5%, система считается чистой. Для каждой из проб проводили по пять последовательных измерений выходного сигнала (площади пика) анализируемого

антиоксиданта. Массовую концентрацию антиоксидантов исследуемого образца, эквивалентную кверцетину, определяли по

градуировочному графику кверцетина. При расчете результата учитывали разбавление пробы.

Таблица 2

Метрологические характеристики, приведенные в аттестованной ФГУП ВНИИМС методике

Диапазон измерений массовой концентрации (массовой доли), мг/г (по кверцетину)	Показатель точности (границы относительной погрешности) $\pm \delta, \%$, при $P = 0,95$	Показатель повторяемости (относительное среднее квадратическое отклонение повторяемости), $\sigma r, \%$	Показатель воспроизводимости (относительное среднее квадратическое отклонение воспроизводимости), $\sigma R, \%$	Предел повторяемости, $r, \%$, $P = 0,95$, $n = 2$
От 0,2 до 4000 вкл.	28	10	14	28

Массовую концентрацию X , мг/г, определяли по формуле

$$X = \frac{X_r \cdot V_n \cdot N}{m_n \cdot 1000},$$

где X_r – массовая концентрация антиоксидантов, найденная по градуировочному графику, мг/л; V_n – объем раствора (экстракта) анализируемой пробы, мл; m_n – навеска анализируемого вещества, г; N – кратность разбавления анализируемого образца.

Если выполняется условие приемлемости, за результат измерений принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений:

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \leq r,$$

где X_1, X_2 – результаты параллельных определений массовой концентрации (массовой доли) антиоксидантов, (мг/г); r – значение предела повторяемости, в данном случае равно 10.

Если условие, представленное выше, не выполняется, то получают еще по два результата в полном соответствии с приведенной МВИ. Тогда за результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов четырех определений, если выполняется условие (8).

$$\frac{4 \cdot |X_{\max} - X_{\min}| \cdot 100}{(X_1 + X_2 + X_3 + X_4)} \leq CR_{0,95},$$

где X_{\max}, X_{\min} – максимальное и минимальное значения из полученных четырех результатов параллельных определений массовой концентрации (массовой доли) антиокси-

дантов, мг/г; $CR_{0,95}$ – значение критического диапазона для уровня вероятности $P = 0,95$ и n – результатов определений, равно:

$$CR_{0,95} = f(n) \cdot \sigma r,$$

где $f(n)$ – коэффициент критического диапазона, для $n = 4$ равен 3,6; σr – относительное среднее квадратическое отклонение повторяемости, равное в данном случае 10% (табл. 2).

Таким образом, условие примет для данного метода следующий вид:

$$\frac{4 \cdot |X_{\max} - X_{\min}| \cdot 100}{(X_1 + X_2 + X_3 + X_4)} \leq 36.$$

Если данное условие не выполняется, выясняют причины превышения критического диапазона, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями МВИ.

Результаты анализа в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде:

$$\bar{X} \pm 0,01 \cdot \delta \cdot \bar{X}, \quad \text{при } P = 0,95,$$

где \bar{X} – среднее арифметическое значение результатов n определений, признанных приемлемыми по неравенствам (8) или (10); $\pm \delta$ – границы относительной погрешности, %, (табл. 2).

Выводы

Установлено содержание антиоксидантов в спиртовых и водно-спиртовых, водных извлечениях надземной части. В извлечении из листьев крыжовника отклоненного сорт «Московский красный», полученного спиртом этиловым 40%, содержание антиоксидантов оказалось максимальным и составляет в пересчете на кверцетин и на галловую кислоту. Эти данные явились обоснованием для выбора спирта

этилового 40% в качестве оптимального экстрагента при получении извлечения, содержащего максимальное количество антиоксидантов.

Список литературы

1. Брежнев Д.Д. Дикие сородичи культурных растений флоры СССР / Д.Д. Брежнев, О.Н. Коровина – Л., 1981. – 376 с.
2. Короткова Е.И. Новый вольтамперометрический способ определения активности антиоксидантов / Е.И. Короткова, Ю.А. Корбаинов // Биоантиоксидант: тез. докл. VI Междунар. конф. 16-19 апр. – 2002. – М., 2002. – С. 298–299.
3. Кьосев П.А. Полный справочник лекарственных растений. – М.: ЭКСМО – Пресс, 2000. – С. 437–438.
4. Поплевая Е.А. Ягодные культуры в вашем саду. – М.: ЗАО «Фитон+», 2000. – 144 с.
5. Пат. 2238554 Российская Федерация, МКИ G01 N33/15 N27/26. Способ определения суммарной антиоксидантной активности биологически активных веществ / В.П. Пахомов [и др.] (РФ). – № 2003123072/15; заявл. 25.07.03; опубл. 20.10.04, Бюл. № 15. – 3 с.
6. Рекомендуются уровни потребления пищевых и биологически активных веществ (Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации). – М., 2004. – 36 с.
7. Полифенольный состав листьев крыжовника отклоненного и шелковицы черной / С.Л. Пеливанова, И.И. Селина, Э.Т. Оганесян и др. // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. – 2012. – № 22. – С. 170–174.
8. Яшин А.Я. Прибор для определения антиоксидантной активности растительных лекарственных экстрактов и напитков / А.Я. Яшин, Я.И. Яшин // Междунар. информационная система по резонансным технологиям. – 2004. – № 34. – С. 10–14.
9. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning) // Free Radic. Res. – 1999. – Vol. 31, № 4. – P. 261–272.

References

1. Brezhnev D.D. Wild relatives of cultivated plants of flora USSR. D.D. Brezhnev, O.N. Korovina. L., 1981. 376 p.

2. Korotkova E.I. A new voltammetric method for determining the activity of antioxidants / E.I. Korotkova, Ju.A. Korbaiov, O.A. Avramchik // Bioantioxidant : tez. report VI Int. Conf. 16-19 apr. 2002. M., 2002. pp. 298–299.
3. K'osev P.A. Complete Handbook of medicinal plants. M.: EKSMO Press, 2000. pp. 437–438.
4. Poplevaja E.A. Berry plants in your garden. M.: ЗАО«Фитон+», 2000. 144 p.
5. Pat. 2238554 Russian Federation, Ministry of Culture and G01 N33/15 N27/26. A method for determining the total antioxidant activity of biologically active substances / VP Pakhomov [etc.] (Russian Federation). № 2003123072/15; appl. 25.07.03, publ. 20.10.04, Bull. Number 15. 3 p.
6. Recommended levels of food consumption and biologically active substances (Approved by the Head of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare. State sanitary-epidemiological regulation of the Russian Federation). M., 2004. 36.
7. Polyphenolic composition of gooseberry rejected and black mulberries leaves./ S.L. Pelivanova, I.I. Selina, E.T. Oganeyan [etc.] // Scientific Statement BSU. Series: Medicine. pharmacy 2012. no. 22. pp. 170–174.
8. Jashin A.Ja. / Device for determining the antioxidant activity of herbal extracts and drinks / A.Ja. Jashin, Ja.I. Jashin // Zh. Intern. Information System resonance technology. 2004. no. 34. pp. 10–14.
9. Halliwell, B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning) // Free Radic. Res. 1999. Vol. 31, no. 4. pp. 261–272.

Рецензенты:

Кодониди И.П., д.фарм.н., доцент кафедры органической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск;
 Попова О.И., д.фарм.н., профессор кафедры фармакогнозии, Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.

Работа поступила в редакцию 20.09.2013.