

© Коллектив авторов, 2012

Н. К. Уткина, Н. И. Кулеш

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИФЕНОЛОВ И ПОЛИФЕНОЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО РАСТЕНИЯ *Maackia amurensis*

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток, Россия

Полифенольный комплекс (максар) из дальневосточного растения *Maackia amurensis* и фенольные метаболиты, входящие в его состав, исследованы на способность: 1) улавливать 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил радикалы, 2) восстанавливать реактив Фолина-Чокальте, 3) восстанавливать радикал-катионы 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) и 4) ингибировать окисление линолевой кислоты, индуцированное пероксильными радикалами. Показано, что наибольший вклад в антиоксидантный потенциал препарата максар вносят основные компоненты стильбены резвератрол, пицеатаннол, сцирпусин А, сцирпусин В, маакиазин, мааколин, изофлавоноиды ретузин, текторигенин, генистеин, а также минорные изофлавоноиды каликозин, веститол, стильбен дигидрорезвератрол, халконы изоликвиритигенин и $\alpha,2',4',4'$ -тетрагидрокси-дигидрохалкон.

Ключевые слова: максар; фенольные метаболиты; антиоксиданты; *Maackia amurensis*.

Maackia amurensis Rupr. et Maxim. (сем. Legumino-sae) — древовидное растение, широко распространенное на территории российского Дальнего Востока. Полифенольный комплекс, полученный из ядровой древесины *M. amurensis* (препарат максар), зарегистрирован в Российской Федерации как гепатопротекторное средство [1]. В состав препарата максар входят изофлавоны генистеин (I), даидзеин (II), ретузин (III), афромозин (IV), формонетин (V), текторигенин (VI), каликозин (VII), 5-метоксидаидзеин (VIII); изофлаван веститол (IX); изофлаванон 3-гидроксивеститон (X); флаваноны нарингенин (XI) и ликвиритигенин (XII); халконы изоликвиритигенин (XIII) и $\alpha,2',4',4'$ -тетрагидрокси-дигидрохалкон (XIV); птерокарпаны маакиаин (XV) и медикарпин (XVI); мономерные стильбены резвератрол (XVII), пицеатаннол (XVIII) и дигидрорезвератрол (XIX); олигомерные стильбены сцирпусин А (XX), сцирпусин В (XXI), маакинин, маакинин А; изофлавоно-стильбен маакиазин (XXII); стильбенолигнан мааколин (XXIII) [1–7].

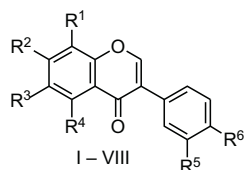
Известно, что большинство растительных полифенолов обладает антиоксидантными свойствами [8]. Оценка антиоксидантной активности некоторых растительных фенолов, обнаруженных позднее в *M. amurensis*, уже проводилась на различных моделях [2, 9–11]. К сожалению, результаты разрозненных данных сложно сравнить. Целью данной работы является оценка антиоксидантных свойств препарата максар и индивидуальных фенольных компонентов, входящих в его состав, с использованием одинаковых модельных химических систем, а также оценка вклада индивидуальных компонентов в антиоксидантный потенциал препарата максар.

Экспериментальная химическая часть

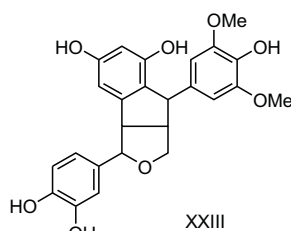
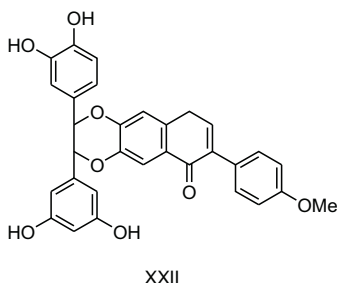
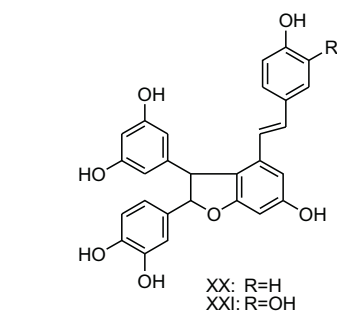
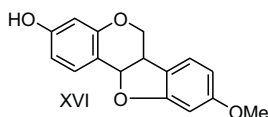
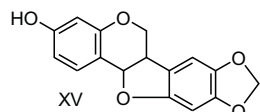
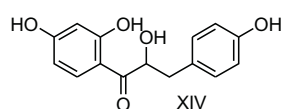
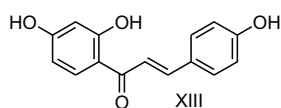
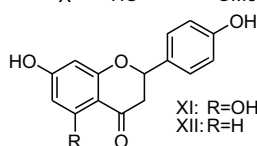
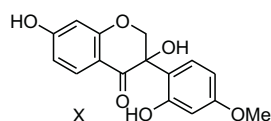
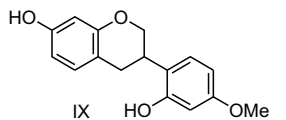
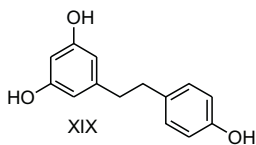
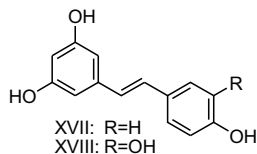
Использован полифенольный комплекс из *M. amurensis*, являющийся субстанцией препарата максар [1]. Соединения I – XXIII были выделены из ядровой древесины *M. amurensis* [4–9]. В работе использовали следующие реактивы: 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ; Fluka), 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота) (АБТС, Sigma-Aldrich), Тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота; Sigma-Aldrich), линолевая кислота, 99 % (Sigma-Aldrich), 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорид (ААРН; Sigma-Aldrich). Абсорбцию измеряли на спектрофотометре UV mini (Shimadzu).

Определение антирадикальной активности методом ДФПГ

Определение антирадикальной активности проводили по модифицированной методике [12]. К 1,3 мл раствора соединений в MeOH с различной концентрацией (5, 10, 20, 50, 100, 200 мкМ и 5, 8, 10, 20 мкг/мл для максара) добавляли 0,7 мл MeOH раствора ДФПГ (6 мг/50 мл; 0,1 мМ конечная концентрация) до общего объема 2 мл, через 30 мин измеряли абсорбцию при 517 нм. Процент ингибирования рассчитывали по формуле: $\text{ингибирование (\%)} = 100 - (A_{\text{образец}} / A_{\text{контроль}}) \times 100$. Значение ИК₅₀ получали из кривой зависимости процента ингибирования от концентрации. ИК₅₀ обозначает концентрацию соединения, необходимую для улавливания 50 % радикалов ДФПГ. Тролокс использовали как контрольный стандарт. Для каждого соединения измерение проводили трижды.



I: R¹=R³=R⁵=H, R²=R⁴=R⁶=OH
 II: R¹=R³=R⁴=R⁵=H, R²=R⁶=OH
 III: R³=R⁴=R⁵=H, R¹=R²=OH, R⁶=OMe
 IV: R¹=R⁴=R⁵=H, R²=OH, R³=R⁶=OMe
 V: R¹=R³=R⁴=R⁵=H, R²=OH, R⁶=OMe
 VI: R¹=R⁵=H, R³=OMe, R²=R⁴=R⁶=OH
 VII: R¹=R³=R⁴=H, R²=R⁵=OH, R⁶=OMe
 VIII: R¹=R³=R⁴=H, R²=R⁶=OH, R⁵=OMe



Определение антиоксидантной активности методом АБТС^{•+}

Для определения антиоксидантной активности соединений использовали метод обесцвечивания раствора радикал-катионов АБТС^{•+} [13] с небольшой модификацией. К 4,713 мл исходного 7 мМ раствора АБТС в воде добавляли 0,2 мл 60 мМ раствора K₂S₂O₈ (конечная концентрация 2,45 мМ) и выдерживали в темноте при комнатной температуре 16 ч. Полученный раствор радикал-катиона АБТС^{•+} разбавляли EtOH до получения абсорбции 0,70 (± 0,02) при 734 нм. К 20 мкл раствора тестируемого соединения в EtOH в различной концентрации (конечная концентрация 3, 6, 9, 12, 15 мкМ) добавляли 1,98 мл раствора АБТС^{•+} и через 6 мин измеряли абсорбцию при 734 нм в 1-см кювете. Реакцию проводили при комнатной температуре (20 °С). Процент ингибирования рассчитывали по формуле: ингибирование (%) = 100 - (A_{образец} × 100/A_{контроль}) и строили график зависимости ингибиро-

вания от концентрации антиоксиданта. Различные концентрации тролокса были использованы как стандарт. Антиоксидантную активность соединений выражали в эквивалентах тролокса (ЭТ) в ммоль/л. ЭТ обозначает концентрацию тролокса, имеющую антиоксидантную активность, эквивалентную 1 мМ раствору исследуемого соединения. Для вычисления антиоксидантной активности в ЭТ градиент графика процента ингибирования от концентрации исследуемого соединения делили на соответствующий градиент для тролокса. Измерения проводились трижды для каждого соединения.

Ингибирование инициированного окисления линолевой кислоты (метод ИОЛК). Использовали известные методы [14, 15] с небольшой модификацией [16]. Реакционная смесь содержала 3,58 мл 0,1 М фосфатного буфера, 20 мкл 20 мМ раствора тестируемого соединения (0,1 мМ конечная концентрация, для максара 5, 10, 20 мкг/мл конечная концентрация) или 20 мкл MeOH в контроле, 200 мкл 0,1 М мицеллевого раствора линолевой кислоты (5,0 мМ конечная концентрация) в 0,1 М растворе твина-40. Окисление инициировали добавлением 200 мкл 20 мМ раствора ААРН (1,0 мМ конечная концентрация). Реакционную смесь (общий объем 4 мл) выдерживали при постоянной температуре (50 °С) в ультразвуковой ванне в течение 1 ч, отбирая каждые 10 мин 400 мкл раствора для измерения абсорбции. Абсорбцию измеряли при 234 нм в 1-мм кювете. Скорость образования диеновых гидропероксидов рассчитывали по формуле: скорость окисления (V, мкМ/мин) = [(A_к - A₀) / (T_к - T₀) · ε⁻¹b⁻¹] · 10⁶, где ε — молярный коэффициент экстинкции диеновых гидропероксидов линолевой кислоты при 234 нм (ε = 27000 М⁻¹см⁻¹) [14]; b = 0,1 см, толщина кюветы; A₀ — абсорбция в начальное время окисления; A_к — абсорбция в конечное время окисления. Процент ингибирования рассчитывали по формуле: ингибирование (%) = 100 - (V_{образец} · 100/V_{контроль}). Измерения проводились трижды для каждого соединения.

Определение восстанавливающей способности полифенолов и общего содержания фенолов (метод с использованием реактива Фолина — Чокальте (РФЧ))

Восстанавливающую способность индивидуальных соединений и общее содержание фенолов в максаре определяли согласно описанной процедуре [17] с небольшой модификацией [16]. К 20 мкл 20 мМ раствора исследуемого соединения (1,0 мМ конечная концентрация, 50 мкг/мл конечная концентрация для максара) добавляли 300 мкл дистиллированной воды и 20 мкл РФЧ. Через 1 мин к смеси добавляли 60 мкл 20 % раствора Na₂CO₃ и оставляли стоять при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем измеряли абсорбцию при 750 нм. Восстанавливающую способность соединений выражали в эквивалентах галловой кислоты (ЭГК) в ммоль/л (общее содержание фенолов в максаре в мг/мл), основываясь на стандартной кривой зависимости абсорбции при 750 нм от концентрации галловой кислоты. Измерения проводили трижды для каждого соединения.

Спектрофотометрическое определение общего содержания фенолов в препарате максар с использованием РФЧ показало, что оно составляет $549,9 \pm 7,3$ мг ЭГК на 1 г максара. Известно, что наблюдается прямая зависимость между общим содержанием фенолов и антиоксидантной активностью суммарных экстрактов [18]. Действительно, способность препарата максар улавливать ДФПГ радикалы (ИК₅₀ 8,5 мкг/мл) не очень значительно уступает активности стандартного антиоксиданта тролокс (ИК₅₀ 4 мкг/мл). Активность максара в ингибирование окисления линолевой кислоты превышает активность тролокса. В концентрации 20 мкг/мл тролокс снижает скорость образования диеновых гидропероксидов в 3,3 раза, ингибируя окисление на 70 %. Максар в той же концентрации снижает скорость окисления в 18,5 раз, ингибируя окисление на 94,6 % (табл. 1).

Оценка способности индивидуальных компонентов максара улавливать ДФПГ радикалы показала, что наиболее активными являются соединения III (ИК₅₀ 10,9 мкМ), XVIII (ИК₅₀ 15,6 мкМ), XX (ИК₅₀ 16,6 мкМ), XXI (ИК₅₀ 14,4 мкМ), XXII (ИК₅₀ 20,6 мкМ) и XXIII (ИК₅₀ 19,5 мкМ), имеющие в своей структуре катехиновые гидроксильные группы, их активность сравнима с активностью тролокса (ИК₅₀ 16,0 мкМ). Антирадикальная активность остальных исследованных соединений значительно уступает активности тролокса (табл. 2). Ранее показано [1, 4, 5], что основными компонентами препарата максар являются мономерные фенолы генистеин (I), ретузин (III), текторигенин (VI), формонетин (V), резвератрол (XVII), пицеатаннол (XVIII) [1] и олигомерные полифенолы сцирпусин А (XX), сцирпусин В (XXI), маакиазин (XXII) и мааколин (XXIII) [4, 5]. Таким образом, высокая активность препарата максар в улавливании ДФПГ радикалов обусловлена наличием активных соединений III, XVIII, XX, XXI, XXII и XXIII.

Восстановительная способность фенольных метаболитов является важным критерием их антиоксидантной активности. Для оценки антиоксидантной активности фенольных метаболитов, входящих в состав

Таблица 1
Ингибирование инициированного окисления линолевой кислоты (ИОЛК) препаратом максар

Антиоксидант	Скорость окисления, мкМ/мин ^б	Ингибирование, %
Максар		
5 мкг/мл	7,20	39,2
10 мкг/мл	1,35	88,6
20 мкг/мл	0,64	94,6
Тролокс		
20 мкг/мл	3,56	70,0
25 мкг/мл	1,83	84,5
Контроль ^а	11,85	

^а Контроль — окисление линолевой кислоты без антиоксидантов.

^б Каждое значение представляет среднее значений 3 независимых измерений, которые не отличались более чем на 2 – 5 %.

максара, были использованы методы восстановления РФЧ и радикал-катионов АБТС^{•+}. Из основных компонентов максара метаболиты III, XVII, XVIII, XX – XXIII показали высокие значения антиоксидантной активности как в эквивалентах тролокса, так и в эквивалентах галловой кислоты (ЭТ и ЭГК > 1 ммоль/л) (табл. 2). Активность основных компонентов, оцененная этими методами, уменьшается в ряду пицеатаннол (XVIII) > сцирпусин В (XXI) > сцирпусин А (XX) > мааколин (XXIII) > маакиазин (XXII) > ретузин (III) > резвератрол (XVII) > генистеин (I) > текторигенин (VI). Значительный вклад в антиоксидантную активность вносят минорные компоненты каликозин (VII), веститол (IX), дигидрорезвератрол (XIX), изоликвиригенин (XIII) и $\alpha,2',4',4$ -тетрагидроксидигидрохалкон (XVI), показавшие значения ЭТ и ЭГК выше 0,5 ммоль/л (табл. 2). Формонетин (V), входящий в состав главных компонентов препарата максар, а также минорные метаболиты афромозин (IV) и медикарпин (XVI) практически не активны в восстановлении АБТС^{•+} и РФЧ (ЭТ и ЭГК < 0,1 ммоль/л). Низкую ак-

Таблица 2
Антиоксидантная активность соединений I – XXIII в различных методах

Соединение	ДФПГ	АБТС ^{•+}	РФЧ	ИОЛК	
	ИК ₅₀ , мкМ*	ЭТ, ммоль/л*	ЭГК, ммоль/л*	скорость, мкМ/мин *	ингибирование, %
	Изофлавоноиды				
I	> 200	0,66	0,76	3,32	72,0
II	> 200	0,26	0,29	7,58	36,0
III	10,9	1,21	1,18	1,57	86,7
IV	> 200	0,05	0,07	11,85	н/а
V	> 200	0,05	0,06	11,85	н/а
VI	> 200	0,63	0,75	3,44	71,0
VII	> 200	0,52	0,70	3,67	69,0
VIII	> 200	0,40	0,28	9,36	21,0
IX	> 200	0,81	0,83	4,99	57,9
X	> 200	0,73	0,56	7,11	40,0
	Флаваноиды				
XI	> 200	0,48	0,67	8,09	31,7
XII	> 200	0,19	0,54	8,89	25,0
	Халконы				
XIII	> 200	0,52	0,89	3,86	67,4
XIV	> 200	0,50	0,76	5,17	56,4
	Птерокарпаны				
XV	> 200	0,14	0,24	10,29	13,1
XVI	> 200	0,07	0,09	11,33	4,4
	Стильбены				
XVII	> 200	1,04	1,06	2,51	78,8
XVIII	15,6	1,99	1,37	0,52	95,6
XIX	> 200	0,72	1,00	3,15	73,4
XX	16,6	1,75	1,28	0,99	91,6
XXI	14,4	1,77	1,31	0,83	93,0
XXII	20,6	1,43	1,19	1,35	88,6
XXIII	19,5	1,59	1,24	1,24	89,5
Тролокс	16,0	1,00	0,70	1,83	84,5
Контроль**				11,85	

* Каждое значение представляет среднее значение 3 независимых измерений, которые не отличались более чем на 2 – 5 %.

** Контроль — окисление линолевой кислоты без антиоксидантов.

тивность также показал маакиаин (XV) (ЭТ и ЭГК < 0,25 ммоль/л).

Как известно, антиоксидантная активность фенольных соединений зависит от наличия катехиновых гидроксильных групп, количества гидроксильных групп и их расположения, наличия сопряжения между фенольными кольцами [10]. Соединения IV, V, XV и XVI, имеющие 1 гидроксильную группу, показали очень низкую активность не только в улавливании радикалов ДФПГ, в восстановлении РФЧ и радикал-катионов АБТС^{•+}, но и в ингибировании окисления линолевой кислоты. Так, результаты, представленные в табл. 2, показывают, что соединения IV и V не ингибируют окисление линолевой кислоты, а соединения XV и XVI замедляют его не очень значительно (13,1 и 4,4 % соответственно).

Остальные главные и минорные компоненты полифенольного комплекса вносят значительный вклад в активность препарата максар в ингибирование окисления линолевой кислоты. Наиболее активными компонентами в методе ИОЛК (табл. 2) являются стильбены XVII – XXIII, ингибирующие окисление линолевой кислоты в пределах 95,6 – 73,4 %, изофлавоноиды I, III, VI, VII, IX, и халконы XIII, XIV, ингибирующие окисление в пределах 86,7 – 56,4 %. Меньшую ингибирующую активность в пределах 40 – 21 % показали соединения II, VIII, X – XII.

Стильбены пицеатаннол (XVIII, 2 OH), сцирпусин В (XXI, 7 OH), сцирпусин А (XX, 6 OH), мааколин (XXIII, 5 OH), маакиазин (XXII, 4 OH) и изофлавоноид ретузин (III, 2 OH) показали наиболее высокую антиоксидантную активность в 4 методах, которая превышает активность стандартного антиоксиданта тролокс. Антиоксидантная активность резвератрола (XVII), генистеина (I) и текторигенина (VI), также входящих в состав главных компонентов, не значительно ниже активности тролокса в методах АБТС^{•+}, РФЧ и ИОЛК, но существенно меньше активности тролокса в улавливании радикалов ДФПГ. Таким образом, наличие в соединениях III, XVIII, XX – XXIII нескольких гидроксильных групп (от 2 до 7), из которых, по крайней мере, 2 катехиновые, является основной структурной чертой, определяющей их наиболее высокую активность среди главных компонентов полифенольного комплекса.

В результате проведенного исследования показано, что наиболее активными компонентами препарата

максар являются входящие в его состав главные метаболиты генистеин (I), ретузин (III), текторигенин (VI), резвератрол (XVII), пицеатаннол (XVIII), сцирпусин А (XX), сцирпусин В (XXI), маакиазин (XXII) и мааколин (XXIII). Кроме того, значительный вклад в антиоксидантный потенциал препарата максар вносят минорные метаболиты каликосин (VII), веститол (IX), дигидрорезвератрол (XIX), изоликвиригенин (XIII) и $\alpha,2',4',4'$ -тетрагидрокси-дигидрохалкон (XIV).

Исследование поддержано грантами 11-04-00770 (РФФИ), 09-III-A-05-145 (ДВО РАН) и Программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

ЛИТЕРАТУРА

1. S. A. Fedoreev, N. I. Kulesh, L. I. Glebko, et al., *Pharm. Chem. J.*, **38**(11), 605 – 610 (2004).
2. O. B. Maksimov, O. E. Krivoshchekova, L. S. Stepanenko, L. V. Boguslavskaya, *Chem. Nat. Comp.*, **21**(6), 735 – 740 (1985).
3. O. E. Krivoshchekova, L. S. Stepanenko, O. B. Maksimov, *Chem. Nat. Comp.*, **22**(1), 35 – 38 (1986).
4. N. I. Kulesh, V. V. Isakov, O. B. Maksimov, *Chem. Nat. Comp.*, **28**(5), 407 – 414 (1992).
5. N. I. Kulesh, V. A. Denisenko, O. B. Maksimov, *Phytochemistry*, **40**(3), 1001 – 1003 (1995).
6. N. I. Kulesh, O. B. Maksimov, V. A. Denisenko, V. P. Glazunov, *Chem. Nat. Comp.*, **37**(1), 29 – 31 (2001).
7. N. I. Kulesh, N. A. Vasilevskaya, M. V. Veselova, et al., *Chem. Nat. Comp.*, **44**(6), 712 – 714 (2008).
8. C. Rice-Evans, *Cur. Med. Chem.*, **8**(7), 797 – 897 (2001).
9. S. Z. Dziedzic, B. J. F. Hudson, *Food Chem.*, **11**(3), 161 – 166 (1983).
10. G. Cao, E. Sofic, R. L. Prior, *Free Radic. Biol. Med.*, **22**(5), 749 – 760 (1997).
11. D. G. Soares, A. C. Andreazza, M. Salvador, *J. Agric. Food Chem.*, **51**(4), 1077 – 1080 (2003).
12. B. Pejin, C. Iodice, G. Tommonaro, S. De Rosa, *J. Nat. Prod.*, **71**(11), 1850 – 1853 (2008).
13. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **26**(9/10), 1231 – 1237 (1999).
14. W. A. Pryor, J. A. Cornicelli, J. L. Devall, et al., *J. Org. Chem.*, **58**(13), 3521 – 3532 (1993).
15. S. Yamauchi, Y. Hayashi, Y. Nakashima, et al., *J. Nat. Prod.*, **68**(10), 1459 – 1470 (2005).
16. N. K. Utkina, *Chem. Nat. Comp.*, **45**(6), 849 – 853 (2009).
17. S. N. Lim, P. C. K. Cheung, V. E. C. Ooi, P. O. Ang, *J. Agric. Food Chem.*, **50**(13), 3862 – 3866 (2002).
18. M. Kosar, A. Altintas, N. Kirimer, K. H. C. Baser, *Chem. Nat. Comp.*, **39**(6), 531 – 535 (2003).

Поступила 16.06.11

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF POLYPHENOLS AND POLYPHENOL COMPLEX FROM THE FAR-EASTERN TREE *MAACKIA AMURENSIS*

N. K. Utkina and N. I. Kulesh

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

A polyphenolic complex (maksar) from the Far-Eastern tree *Maackia amurensis* and its phenolic constituents have been tested for their ability to (1) scavenge 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals (DPPH), (2) reduce Folin – Ciocalteu reagent (FCR), (3) reduce radical cations of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}), and (4) inhibit peroxy-induced oxidation of linoleic acid (LA). It is established that the main components of maksar, which contribute to the antioxidant potential of this polyphenolic complex, are stilbenes (XVII, XVIII, XX – XXIII), isoflavonoids retusine (III), tectorigenin (VI), genistein (I) and minor isoflavonoids kalikosin (VII) and vestitol (IX), stilbene dihydroresveratrol (XIX), and chalcones isoliquiritigenin (XIII) and $\alpha,2',4',4'$ -tetrahydroxydihydrochalcone (XIV).

Key words: maksar; phenolic metabolites; antioxidants; *Maackia amurensis*