УДК 615.32:543.427.4

ВИЗНАЧЕННЯ ORAC У ПЛОДАХ З ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ *in vitro*

Казарян В.К., Стремоухов О.О.

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

Вступ. Тема вільних радикалів і реакційно-здатних кисневмісних часток продовжує привертати підвищену увагу з боку наукового співтовариства і все більшою мірою зацікавлює широкий загал. Яку ми споживаємо їжа і стан навколишнього середовища впливають на біологічне виробництво вільних радикалів. Вільним радикалом вважається хімічна сполука, що має один або більше неспарених електронів, утворене в результаті якої втрати, або придбання одного електрона. Неспареним вважається електрон, що займає в однині молекулярну або атомну орбіталь. Висока реакційна здатність радикалів призводить до фізіологічних умовах до прискорення процесів окислення, що руйнують молекулярну основу клітини, і викликає в результаті численні патологічні стани [1].

Кисень є потужним окиснювачем, реакції окислення з його участю – джерело енергії для багатьох живих організмів. З іншого боку, в процесі метаболізму утворюються сполуки кисню, які руйнують структуру і речовини клітини. В результаті в клітині і в усьому організмі порушується обмін речовин. Роль антиоксидантів - зв'язати і вивести з організму вільні радикали [2].

Сполуки, здатні зв'язувати містять неспарені електрони частки з утворенням менш активних або зовсім неактивних радикалів, називають антиоксидантами. Антиоксиданти відіграють важливу роль в регуляції протікання вільно-радикальних перетворень в організмі, істотно впливаючи на його стан, тому антиоксиданти і дослідження антиокисних властивостей з'єднань останнім часом набули широкого поширення. Найбільш перспективними джерелами антиоксидантів вважаються рослинні об'єкти. Велика увага в даний час приділяється биофлавоноидам - великій групі сполук з поліфенольної структурою. Є відомості про їх антиоксидантної активності. Антиоксиданти рослинного походження широко використовують в медицині і харчовій промисловості у вигляді екстрактів [3].

Мета дослідження – визначення антиоксидантної активності у свіжих плодах лікарських рослин.

Методи дослідження. Метод визначення адсорбційної ємності по відношенню до кисневих радикалів («Oxygen Radical Absorption Capacity» – ORAC), є одним з найбільш вживаних в даний час. Цей метод використовує флуоресцеїну в якості флуоресцентного агенту зв’язку у аналізі як гідрофільних так ліпофільних антиоксидантів. Аналітичні дані з літератури, засновані на методах, які використовували β-фікоеритрин (β-PE) в якості зонда були використані в цьому збірнику, як β-PE може привести до порушення цілісності [4].

Плоди спочатку подрібнювали в млині для отримання дрібнодисперсної суміші. Потім 0,5 г порошку точно зважують, і додавали 20 мл 50 % спирту.Екстракційнусуміш струшують при 400 обор./хв при кімнатній

температурі на орбітальному шейкері протягом 1 ч. Екстракти центрифугировали при 14000 обор./хв протягом 15 хв, і супернатант розбавили 75 мМ калій-фосфатного буфера (pH 7,4) для подальшого аналізу.

Реагент і стандарт підготовки. Точну навіску 0,414 г 2,2′-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорид (ААПД), повністю розчиняли в 10 мл 75 мМ фосфатного буфера (pH 7,4) до кінцевої концентрації 153 мМ, і витримували в холодильнику при 5 °С. Невикористаний розчин ААРН відкидали протягом 8 годин. Флюоресцеіновий розчин β-PE ($4{,}19x0^{-3}$мМ) було зроблено в 75 мМ фосфатному буфері (pH 7,4) і витримували при 4 °С в темному стані (вихідного розчину). Розчин β-PE в такому стані може тривати кілька місяців. Свіжої робочий розчин β-PE у концентрації $8{,}16x0^{-5}$ мМ робили щодня, шляхом подальшого розведення вихідного розчину у фосфатному буфері (pH 7,4). Стандарт Trolox отримували наступним чином: 0,250 г Trolox розчиняли в 50 мл 75 мМ фосфатного буфера (pH 7,4) з отриманням 0,02 М розчину, подалі цей розчин розбавляли тим же фосфатним буфером до 50, 25, 12,5 і 6,25 мкМ для отримання робочих розчинів [2].

Аналіз ORAC проводили, за методом Хуенга [2], для цьогобув використаний «FL600 microplatefluorescencereader» (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT) з флуоресцентних фільтрів для довжини хвилі збудження 485±20 нм і довжиною хвилі випромінювання 530±25 нм, з програмним забезпеченням KC4 3.0 (редакція 29). Розведення зразка здійснювалося за допомогою системи автоматичного піпетування «Precision 2000» (Bio-Tek Instruments, Inc.)під керуванням програмного забезпечення (версія 1.0).

Основні результати. Метод заснований на вимірюванні інтенсивності флуоресценції певного з'єднання і її зміні від часу протікання реакції. У присутності сполук, що зв'язують кисневі радикали, збільшується час флуоресценції внаслідок захисної дії антиокислювачів. Кількісне визначення антиоксидантної активності (АОА) здійснюється по площі між двома кривими – вільної реакції і з додаванням антиоксидантів (рис. 1).

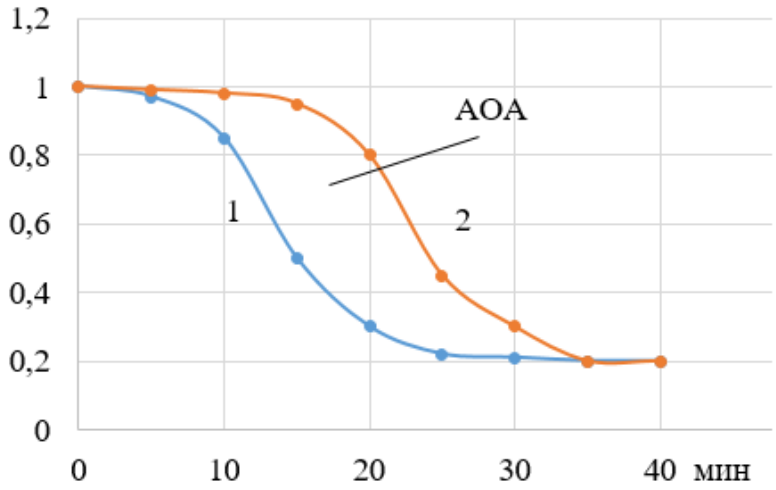

Рис. 1. Принцип визначення АОА: 1 – кінетика флуоресценції в відсутність антиоксидантів; 2 – в присутності антиоксидантів

Ступінь зменшення флуоресценції є міра ступеня деградації флуоресціюючого з'єднання під впливом кисневих радикалів. Значення ORAC у

таблиці 1 наведені для гідрофільно-ORAC (H-ORAC), ліпофільного-ORAC (L-ORAC), загальна-ORAC (T-ORAC) та вмісту фенольних сполук (TP).

Таблиця 1

Значення ORAC для свіжих плодів

Сировина	H-ORAC	L-ORAC	T-ORAC	TP
Аронії плоди	15874±82	249±12	16539±81	2010±10
Бузина плоди	14292±75	197±10	14697±74	1950±10
Журавлина плоди	9660±47	208±10	9868±48	739±4
Чорниця плоди	6714±33	36±5	6746±33	531±3
Ожина плоди	5401±26	103±10	5506±27	660±3,5
Малина плоди	4886±24	142±7	4027±26	502±3
Полуниця плоди	3646±18	36±5	3683±18	368±1,85
Аґрус плоди	3689±18	23±5	3374±17	518±3
Грейпфрут плоди	1557±2	35±5	1594±8	214±1,1
Ківі плоди	883±43	24±5	908±4	267±1,35

Діапазон значень H-ORAC для плодів коливалися від 883 до 15874 мкМ; тоді як значення L-ORAC були майже у 40 разів менші і знаходились у діапазоні від 23 до 249 мкМ. Загальна антиоксидантна здатність була розрахована шляхом об'єднання L-ORAC і H-ORAC. Відмінності значень ORAC в різній сировині відносно невеликі. Згідно з даними таблиці, найбільший показник значення ОРАК для гідрофільних речовин містить плоди аронії і бузини. Вони ж і мають більший показник в загальному аналізі ORAC. Для ліпофільних речовин вищі значення є в плодах аронії і журавлини. Вміст фенольних сполук був найбільший у плодах аронії та бузіни.

Висновки.

Визначили антиоксидантну активність у свіжих плодах лікарських рослин, для ліпофільних і гідрофільних сполук, за здатністю до абсорбції кисневих радикалів з флуоресцеїном. Встановлено, що плоди аронії мають високу антиоксидантну властивість порівняно з іншими зразками завдяки вмісту фенольних сполук.

Список літератури

1. Awika J. M. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (Sorghum bicolor) and sorghum products. / J. M. Awika, L. W. Rooney, X. Wu // J. Agric. Food Chem., 2003, 51:6657-6662.

2. Huang D. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β-cyclodextrin as the solubility enhancer / Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M. et al // J. Agric. Food Chem. 2002, 50:1815-1821

3. Prior R. L. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples / Prior R. L., Hoang H., Gu L. et al // J. Agric. Food Chem., 2003, 51:3273-3279.

4. Wu X. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States / Wu X., Beecher G. R., Holden J. M. et al // J. Agric. Food Chem., 2004, 52:4026-4037.