

СЪСТАВ И АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ НА ПЛОДОВ СОК ОТ *ARONIA MELANOCARPA*

Стефка Вълчева-Кузманова¹, Петко Денев², Мария Крачанова²,
Андриана Сурлева³, Анна Белчева¹

¹Катедра по предклинична и клинична фармакология, Факултет по медицина,
Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна

²Институт по органична химия с център по фитохимия – БАН,
Лаборатория по биологично активни вещества – Пловдив

³Катедра по аналитична химия, Химикотехнологичен и металургичен
университет – София

COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *ARONIA MELANOCARPA* FRUIT JUICE

Stefka Valcheva-Kuzmanova¹, Petko Denev², Maria Krachanova², Andriana Surleva³,
Anna Belcheva¹

¹Department of Preclinical and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine,
Medical University “Prof. Paraskev Stoyanov” – Varna

²Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry – BAS,
Laboratory of Biologically Active Substances – Plovdiv

³Analytical Chemistry Department,
University of Chemical Technology and Metallurgy – Sofia

РЕЗЮМЕ

Aronia melanocarpa е храст от сем. Rosaceae. Плодовете се използват за консумация свежи или под формата на сок, конфитюр или вино. Целта на настоящото изследване е да се определят концентрациите на някои биологично активни вещества и антиоксидантната активност на две проби плодов сок от *Aronia melanocarpa* (ПСАМ). Сокът е получен от свежи плодове. Едната от пробите е приготвена чрез центрофуга за плодове и е консервирана с калиев сорбат. (1.0 g/l). Другата проба е приготвена чрез смачкване и изстискване на плодовете, след което сокът е филтриран и стерилизиран при 100 °C за 10 min. Съдържанието на биологично активни вещества е измерено чрез спектрофотометрични методи или с помощта на високоефективна течна хроматография. Антиоксидантната активност на двете проби сок е определена чрез абсорбционния капацитет на кислородния радикал – ORAC (oxygen radical absorbance capacity) и капацитета за предотвратяване на образуването на хидроксилни радикали – HORAC (hydroxyl

ABSTRACT

Aronia melanocarpa is a woody shrub of the Rosaceae family. Its fruits are used for consumption either fresh, or as juice, jam and wine. The aim of the present study was to measure the concentration of some biologically active substances and the antioxidant activity of two samples of *Aronia melanocarpa* fruit juice (AMFJ). The juice was prepared from fresh fruits. One of the samples was produced using a juice centrifuge and was preserved with potassium sorbate (1.0 g/l). The other sample was produced by crushing and squeezing of fruits after which the juice was filtered and sterilized at 100 °C for 10 min. The contents of biologically active substances in the juice samples were measured by spectrophotometric and high-performance liquid chromatography methods. The antioxidant activity of the two juice samples was measured by the ORAC (oxygen radical absorbance capacity) and HORAC (hydroxyl radical averting capacity) methods. The results showed that both samples were extremely rich in polyphenolic substances, amongst which the highest was the concentration of procyanidins followed by

radical averting capacity). Резултатите показват, че и двете проби са изключително богати на полифенолни съединения, сред които е най-висока концентрацията на процианидините, следвани от фенолните киселини (хлорогенова и неохлорогенова) и антоцианините. Проба 1 е с по-високо съдържание на всички полифенолни съединения с изключение на антоцианините. Тя съдържа също микро количества цианогени. Разликите в състава на двете проби може да се отдаде на различните методи за получаване и консервиране на сока. И двете проби сок имат много високи стойности на ORAC и HORAC, които са по-високи за проба 1 (пробата с по-висока концентрация на полифенолни съединения). Високата антиоксидантна активност на двете проби ПСАМ се дължи на техните полифенолни съставки.

Ключови думи: плодов сок от *Aronia melanocarpa*, полифенолни съединения, цианогени, ORAC, HORAC

ВЪВЕДЕНИЕ

Черноплодната арония с научно наименование *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot принадлежи към семейство Розоцветни, род Арония. Родина на аронията са гористите райони в източната част на Северна Америка. Преди Втората световна война аронията е отглеждана предимно като декоративно растение. *Aronia melanocarpa* придобива популярност и е култивирана в Източна Европа и бившия Съветски съюз в средата на миналия век. Отглежда се в Чехословакия, Скандинавските страни, Германия, Дания, Полша, Русия и др. От няколко десетилетия се отглежда и в България.

Плодовете се използват за консумация в прясно и сушено състояние, за производство на сок и вино, като добавка и оцветител на вина и напитки. Те са изключително богати на биологично активни вещества. Задорожний и др. (1) посочват следния химически състав на арониевите плодове: захари (до 10 %), ябълчна и други органични киселини (до 1.3 %), пектини (до 0.75 %) и дъбилни вещества (до 0.6 %). В тях има също (mg/100 g плодове): аскорбинова киселина – 15; фенолни съединения (предимно флавоноиди: антоцианини, катехини, рутин, кверцетин) – до 2000; каротин – около 2; рибофлавин – 0.13; фолиева киселина – 0.1; никотинова киселина – 0.5; токоферол – 1.5; филохинон – 0.8; пиридоксин – 0.06; цианин – 0.3; тиамин – 0.01 и др. В плодовете са открити също амигдалин, кумарин и други съеди-

phenolic acids (chlorogenic and neochlorogenic) and anthocyanins. Sample 1 had higher concentration of total phenolics and contained higher quantities of most polyphenolic substances with the exception of anthocyanins. It also contained micro-quantities of cyanogens. The variations in the composition of the two samples could be attributed to the different methods of juice production and conservation. Both juice samples showed very high ORAC and HORAC values which were higher for sample 1 (the sample with the higher concentration of polyphenolic substances). The high antioxidant activity of the two AMFJ samples could be attributed to their polyphenolic ingredients.

Keywords: *Aronia melanocarpa* fruit juice, polyphenolic substances, cyanogens, ORAC, HORAC

нения. От микроелементите особено се открояват желязо – 1.2 mg, манган – 0.5 mg и йод – 5-8 mg на 100 g плодове.

В последните години научният интерес към *Aronia melanocarpa* е изключително висок. Изследват се в експериментални и клинични проучвания множество ефекти на растението, които позволяват то да се причисли към едни от най-полезните медицински растения (17). Основната биологична активност на арониевите плодове се отдава на съдържанието на полифеноли, чието изключително високо съдържание корелира с висока антиоксидантна активност.

Целта на настоящото проучване е да се определи съдържанието на биологично активни вещества и антиоксидантната активност на две проби плодов сок от *Aronia melanocarpa* (ПСАМ).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Плодов сок от Aronia melanocarpa (ПСАМ)

Проба 1 от ПСАМ е приготвена чрез центрофуга за сок от твърди плодове и зеленчуци. Полученият сок е стерилизиран при 100°C за 10 min и съхраняван при стайна температура в продължение на 6 месеца до момента на изследването. Проба 2 от ПСАМ е приготвена чрез смилане, пресоване и изцеждане на свежи плодове. Така полученият сок е филтриран, консервиран с калиев сорбат (1.0 g/l) и съхраняван при стайна температура в продължение на 6 месеца.

Спектрофотометричен метод за определяне на общи феноли

За определяне на тоталното съдържание на фенолни съединения е използван спектрофотометричен метод, който се базира на способността на фенолните съединения да формират молибден-волфрамов син комплекс с реактива на Folin-Ciocalteu (14). Абсорбцията се отчита при 760 nm. Тоталното фенолно съдържание се определя чрез използване на стандарт галова киселина. Резултатите се представят като еквиваленти на галова киселина в 1 l сок (mg GAE/l).

Определяне на гликозиди на цианидин – HPLC (high-performance liquid chromatography, високоефективната течна хроматография)

Гликозидите на цианидин са определени чрез Agilent 1220 HPLC система (Agilent Technology, Palo Alto, Ca), оборудвана с бинарна помпа и UV-Vis детектор. Използва се дължина на вълната $\lambda = 520$ nm. Антоцианините се разделят чрез Agilent TC-18 колона (5 μm , 4.6 mm x 250 mm) при 25°C. Подвижните фази са 5% оцетна киселина (A) и 100% метанол (B) при скорост на потока от 1.0 ml/min. В условия на градиент се започва с 15% B и линейно се увеличава до 30% B за 20 min.

Определяне на фенолни киселини и флаван-3-оли – HPLC

HPLC анализът се извършва, като се използва същата HPLC система. Използва се дължина на вълната $\lambda = 280$ nm. Разделянето на фенолите става чрез Agilent TC-18 колона (5 μm , 4.6 mm x 250 mm) при 25°C. Подвижните фази са оцетна киселина 0.5% (A) и 100% ацетонитрил (B) при скорост на потока от 0.8 ml/min. В условия на градиент се започва с 14% B, между 6-та и 30-та минута линейно се увеличава до 25% B, а след това до 50% B на 40-та минута.

Изолиране и определяне на общи проантоцианидини – гравиметричен метод

Количеството на общите проантоцианидини в пробите е определено съгласно процедурата, описана от Howell et al. (5). Пробите ПСАМ се нанасят в 10-g C18 SepPak колона (Waters Corp.), която се промива първо с дестилирана вода и след това със смес вода:метанол. Полифенолната фракция, задържана в колоната, се елуира с разтвор на оцетна киселина в метанол. Получената фракция се нанася в колона, запълнена с 5 g Sephadex LH-20 (Sigma Chemicals). След това колоната се промива със смес етанол:вода, а проантоцианидиновата фракция се елуира с разтвор на ацетон във вода. Водно-ацетоновата смес се изпарява, замразява се и се лиофилизира. Получените сухи проантоцианидини се претеглят

и резултатът се изразява в mg проантоцианидини/l сок.

Спектрофотометричен метод за определяне на цианогени

Анализът е основан на хидролиза на цианогените в кисела среда и абсорбцията на отделения циановодород в алкална среда по метода на Naque и Bradbury (4). Пробите се подлагат на киселинна хидролиза (H_2SO_4) и отделеният циановодород се поглъща с Na_2CO_3 . Етапите на хидролиза и адсорбция се провеждат едновременно в съд на Conway. Аликвота от абсорбиращия разтвор се подлага на спектрофотометрично определяне чрез фотометричен реактив, съдържащ нинхидрин. Измерва се абсорбцията на разтвора при 490 nm. Концентрацията на цианогени се определя по метода на калибровъчната графика със стандартни разтвори, съдържащи KCN (16).

Абсорбиционен капацитет на кислородния радикал – ORAC (oxygen radical absorbance capacity)

Използван е методът, разработен от Ou et al. (11) с някои модификации. Чрез този метод се измерва способността на даден антиоксидант да неутрализира пероксилни радикали. Методът се основава на инхибирането в спада на флуоресценцията на флуоресцеин при окислението му в присъствие на антиоксидант. Като генератор на пероксилни радикали се използва термичното разлагане на AAPH [2,2'-азобис(2-амидино-пропан) дихидрохлорид]. За изразяване на антиоксидантната активност се използва сравнение с резултатите, получени за стандартни разтвори на Trolox, въз основа на които се построява стандартна крива. Концентрацията на антиоксидант в пробата е право пропорционална на площта под затихващата крива на флуоресценция. За една ORAC единица се приема площта под затихващата крива на флуоресценция на разтвор на Trolox с концентрация 1 μM . Резултатите се изразяват в μmol еквиваленти Trolox ($\mu\text{mol TE/l}$). Измерванията се извършват на FLUOstar OPTIMA флуориметър (BMG LABTECH, Offenburg, Germany). Използвани вълна на възбуждане 485 nm и вълна на излъчване 520 nm.

Капацитет за предотвратяване на образуване на хидроксилни радикали – HORAC (hydroxyl radical averting capacity)

Методът е разработен от Ou et al. (10) и измерва комплексобразуващата способност на даден антиоксидант в условия на реакция на Фентън, предизвикана от взаимодействие между Co(II) и H_2O_2 . Методът се базира на окислението на флу-

оресцеин от хидроксилни радикали, които се генерират от H_2O_2 , при което флуоресценцията намалява с времето. Антиоксидантите блокират това окисление на флуоресцеин. Площта под кривата на затихващата флуоресценция се използва за определяне на антиоксидантната активност на пробата. За построяване на стандартна права се използват разтвори на галова киселина. За една HORAC единица се приема площта под затихващата крива на флуоресценция на разтвор на галова киселина с концентрация 1 μM . Резултатите се изразяват в μmol еквиваленти на галова киселина (μmol GAE/l). Измерванията се извършват на FLUOstar OPTIMA флуориметър (BMG LABTECH, Offenburg, Germany). Използвани са вълна на възбуждане 485 nm и вълна на излъчване 520 nm.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Съдържание на изследваните биологично активни вещества в ПСАМ

Съдържанието на изследваните биологично активни вещества в двете проби ПСАМ е представено в Таблица 1.

Таблица 1. Съдържание на биологично активни вещества в ПСАМ (проба 1 и проба 2) и използван аналитичен метод

Вещества	Съдържание		Метод
	Проба 1	Проба 2	
Общи феноли	6652 mg GAE/l	5461 mg GAE/l	Спектрофотометричен Singleton and Rossi, 1965
Общи проантоцианидини	3926.2 mg/l	3122.5 mg/l	Гравиметричен Howell et al., 2005
Цианидин-галактозид	20.0 mg/l	143.7 mg/l	HPLC
Цианидин-арабинозид	8.2 mg/l	61.7 mg/l	HPLC
Цианидин-глюкозид	4.4 mg/l	4.4 mg/l	HPLC
Цианидин-ксилозид	0.6 mg/l	11.6 mg/l	HPLC
Хлорогенова киселина	691 mg/l	585 mg/l	HPLC
Неохлорогенова киселина	840 mg/l	830 mg/l	HPLC
Ферулова киселина	19.9 mg/l	Не се открива	HPLC
Галова киселина	6.9 mg/l	Не се открива	HPLC
Катехин	4.1 mg/l	Не се открива	HPLC
Цианогени	30 μg CN/l	Не се открива	Спектрофотометричен

GAE/l – еквиваленти на галова киселина/l

ORAC и HORAC на ПСАМ

Проведени са определяния на капацитета на проби 1 и 2 от ПСАМ да абсорбират кислород-

ния радикал (ORAC) и на капацитета им да предотвратяват образуването на хидроксилни радикали (HORAC). Резултатите са представени в Таблица 2.

Независимо от вариациите прави впечателни изключително високото съдържание на тотални феноли в ПСАМ. Данни на други изследователи също показват, че арониевите плодове са със забележително високо общо съдържание на полифеноли (2,6-9,12,20).

Проведените в настоящото проучване анализи показват известни вариации в съдържанието на индивидуалните полифенолни фракции в двете проби ПСАМ. Тези вариации могат да се обяснят с различieto в начина на приготвяне и на консервация на сока (проба 1 – чрез стерилизация, проба 2 – с калиев сорбат). Антоцианините претърпяват термично разграждане и се превръщат в други фенолни съединения (13). Това би могло да допринася за по-ниското съдържание на цианидин-гликозидите (основните антоцианини) в пробата ПСАМ, която е подложена на стерилизация.

Проба 1 от ПСАМ съдържа цианогени, макар

и в нищожни концентрации. В проба 2 не се детектира цианид (концентрацията на цианогени

Таблица 2. ORAC и HORAC на ПСАМ (проба 1 и проба 2)

Тест	ПСАМ проба	Проба 1	Проба 2
ORAC		74045 $\mu\text{mol TE/l}$	52045 $\mu\text{mol TE/l}$
HORAC		51661 $\mu\text{mol GAE/l}$	30560 $\mu\text{mol GAE/l}$

$\mu\text{mol TE/l}$ – $\mu\text{mol Trolox}$ еквиваленту/l; $\mu\text{mol GAE/l}$ – μmol еквиваленти на галова киселина/l

е под определяемия минимум на метода: $10\mu\text{g/l}$). Възможно е цианогените в проба 1 да се извличат от семената при получаване на сока чрез центрофуга за плодови сокове, която наранява семената. Известно е, че семената на сем. Розоцветни съдържат цианогени. При приготвяне на проба 2 чрез пресоване вероятно не се извличат вещества от семената.

Резултатите от настоящото изследване са в съответствие с данните на много други изследователи, показващи, че процианидините са групата фенолни съединения с най-висока концентрация в арониевите плодове (9), следвани от антоцианините и фенолните киселини: хлорогенова (3-О-кафеолилхиринова киселина) и неохлорогенова (5-О-кафеолилхиринова киселина) (15). Освен това в по-ниска концентрация присъстват флавоноли (гликозиди на кверцетин) (15) и флаван-3-оли (епикатехин) (9, 12).

Представените резултати показват силна антиоксидантна активност на двете проби, изразяваща се в много високи стойности на ORAC и HORAC. ORAC и HORAC на проба 1 са по-високи от тези на проба 2. Този резултат може да се обясни с по-високото общо съдържание на полифеноли в проба 1 (6652 mg GAE/l) в сравнение с проба 2 (5461 mg GAE/l). ORAC методът измерва способността на даден антиоксидант да неутрализира пероксилни радикали, които доказано са с най-голяма физиологична значимост. HORAC методът е показател за превантивното действие на антиоксидантите. Той отразява комплексобразуващите свойства на дадена проба в условията на реакция на Фентън и следователно способността да предпазва от образуване на хидроксилни радикали. Тъй като хидроксилните радикали са най-реактивоспособните форми на кислорода, от особено значение е да се оцени способността на даден антиоксидант или проба да предотвратява тяхното образуване.

В литературата липсват данни за ORAC и HORAC на сок от *Aronia melanocarpa*, но има данни за ORAC на плодове (19, 20) и екстракт (3), и за HORAC на екстракт (3). ORAC на арониевите плодове е много по-висок от този на други пло-

дове. По литературни данни ако ORAC на арония се приеме за 100%, тогава активността на боровинките е 77%, на къпините и касиса – около 35%, на ягодите – 9-13%, на малините – 13%, на червените боровинки – 11.6%, на гроздето – 2-5% (18,20).

Други автори изследват ORAC (20) на индивидуални фенолни фракции, изолирани от арониеви плодове (гликозиди на цианидин, гликозиди на кверцетин, хлорогенова киселина). В тези изследвания гликозидите на кверцетин показват най-високи стойности на ORAC, последвани от гликозидите на цианидин, а хлорогеновата киселина е на трето място (20). Изследванията на радикал-обезвреждащите активности на индивидуалните полифеноли директно потвърждава, че антиоксидантната активност на сока се дължи на неговите полифенолни съставки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изследването на състава на плодов сок от *Aronia melanocarpa* показва много високо съдържание на полифенолни съединения, преобладаващите от които са процианидини, фенолни киселини и атоцианини. Сокът има изключително висока антиоксидантна активност, измерена чрез ORAC и HORAC, която корелира с високото полифенолно съдържание. Различните начини на приготвяне и консервиране на сока могат да допринесат за вариации в съдържанието на биологично активни вещества.

ЛИТЕРАТУРА

1. Задорожний, А. М., А. Г. Кошкин, С. Я. Соколов, А. И. Шретер. Справочник по лекарственным растениям. Москва, Лесная промышленность, 1988, с. 40.
2. Benvenuti S, Pellati F, Melegari M, Bertelli D. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of Rubus, Ribes and Aronia. J. Food Sci. 2004;69:FCT164-FCT169.

3. Denev P, Ciz M, Ambrozova G, Lojek A, Yanakieva I, Kratchanova M. Solid phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chem.* 2010;123:1055-61.
4. Haque MR, Bradbury JH. Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods. *Food Chem.* 2002;77:107-14.
5. Howell AB, Reed JD, Krueger CG, Winterbottom R, Cunningham DG, Leahy M. A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. *Phytochemistry.* 2005;66(18):2281-91.
6. Hudec J, Bakos D, Mravec D, Kobida L, Burdova M, Turianica I, et al. Content of phenolic compounds and free polyamines in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) after application of polyamine biosynthesis regulators. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54(10):3625-8.
7. Jakobek L, Seruga M, Novak I, Medvidovic-Kosanovic M. Flavonols, phenolic acids and antioxidant activity of some red fruits. *Deut. Lebensml-Rundsch.* 2007;103(8):369-78.
8. Kolesnikov MP, Gins VK. Phenolic substances in medicinal plants. *Appl. Biochem. Micro.* 2001;37:392-9.
9. Oszmianski J, Wojdylo A. *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.* 2005;221:809-13.
10. Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan J, Deemer EK, Prior RL, Huang DJ. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50(10):2772-7.
11. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescence probe. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49(10):4619-26.
12. Rop O, Mlcek J, Jurikova T, Valsikova M, Sochor J, Reznicek V, et al. Phenolic content, antioxidant capacity, radical oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibiting activities of extracts of five black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) cultivars. *J. Med. Plant. Res.* 2010;4(22):2431-7.
13. Sadilova E, Reinhold CF, Stintzing C. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007;51(12):1461-71.
14. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 1965;16:144-58.
15. Slimestad R, Torskangerpoll K, Nateland HS, Johannessen T, Giske NH. Flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*. *J. Food Compos. Anal.* 2005;18:61-8.
16. Surleva A, Drochioiu G. A modified ninhydrin micro-assay for determination of total cyanogens in plants. *Food Chem.* 2013;141:2788-94.
17. Valcheva-Kuzmanova S, Belcheva A. Current knowledge of *Aronia melanocarpa* as a medicinal plant. *Folia Med.* 2006;48(2):11-7.
18. Wang H, Guohua C, Ronald LP. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 1996;44:701-5.
19. Wu XL, Gu LW, Prior RL, McKay S. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52(26):7846-56.
20. Zheng W, Wang SY. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51(2):502-9.

Адрес за кореспонденция:

С. Вълчева-Кузманова
 Катедра по предклинична и клинична
 фармакология, Факултет по медицина,
 Медицински университет
 „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна
 гр. Варна, 9002, ул. „Марин Дринов“ № 55
 e-mail: stefkavk@yahoo.com