БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2004, том 30, № 4, с. 429–435

УДК 547.638.1

ВЛИЯНИЕ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ ГЕНИСТЕИНА И ДАЙДЗЕИНА, ПОЛУЧЕННЫХ КИСЛОТНЫМ ГИДРОЛИЗОМ ИХ ГЛИКОЗИДОВ

© 2004 г. Е. А. Уткина*#, С. В. Антошина*, А. А. Селищева**, Г. М. Сорокоумова*, Е. А. Рогожкина*, В. И. Швец*

*Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, 117571, Москва, просп. Вернадского, 86;

*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию 07.05.2003 г. Принята к печати 17.09.2003 г.

Смесь изофлавонов получена кислотным гидролизом изофлавоновых гликозидов, которые выделены из продуктов переработки сои последовательной экстракцией водным ацетоном и метанолом. Адсорбционной хроматографией из смеси агликонов выделены индивидуальные изофлавоны (генистеин и дайдзеин), идентифицированные спектральными и хроматографическими методами. Изучено влияние обоих изофлавонов в различных концентрациях на процесс перекисного окисления фосфолипидов сои в виде мультиламеллярных везикул. Показано, что минимальная концентрация агликонов, в которой они ингибируют образование гидроперекисей липидов и малонового диальдегида, равна 1 мМ.

Ключевые слова: генистеин; дайдзеин; изофлавоны сои; ЯМР-спектроскопия; перекисное окисление фосфолипидов.

ВВЕДЕНИЕ

Изофлавоны представляют собой гидроксилированные гетероциклические соединения дифенилпропанового ряда. Они содержатся в растениях семейства бобовых (фасоль, горох, соя) (Leguminosae Papilionoideae) в основном в виде гликозидов, которые в организме человека гидролизуются до агликонов. Ниже представлена структура двух природных изофлавонов генистеина (**I**) и дайдзеина (**II**), которые в наибольших количествах содержатся в сое и поступают в организм человека с пищей [1]. Первый из них в настоящее время применяется как ингибитор тирозиновых протеинкиназ [2].

Интерес исследователей к этому классу соединений обусловлен тем, что изофлавоны обладают широким спектром фармакологического действия. Они понижают уровень холестерина в крови [3], замедляют рост злокачественных новообразований [4, 5]. Изофлавоны проявляют антиоксидантные свойства, ингибируя окисление соединений различных классов: липопротеинов низкой плотности (ЛНП) *in vitro* [6, 7] и *in vivo* [8, 9], фосфолипидов *in vitro* [10] и ДНК [11].

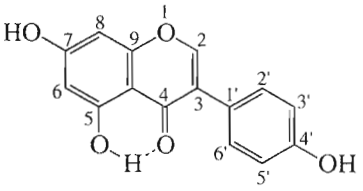
В норме окислительные процессы в клетке протекают по свободнорадикальному механизму с низкой скоростью, так как существуют специальные механизмы защиты: преобразование активных форм кислорода и продуктов перекисного окисления под действием антиоксидантов и ферментов. Нарушение регуляции между процессами окисления и их ингибированием сопровождается окислительным стрессом, который является составным элементом целого ряда патофизиологических процессов [12]. Поэтому остается актуальным поиск новых антиоксидантов, нетоксичных и эффективных в низких концентрациях.

Антиоксидантная способность изофлавонов изучена в основном на примере инициированного ионами Cu^{2+} окисления ЛНП [6, 7]. Также исследовано влияние ряда синтетических изофлавонов на перекисное окисление фосфолипидов, индуцированное системой железо–аскорбат [13]. Однако таких данных о природных изофлавонах (генистеине и дайдзеине) нет.

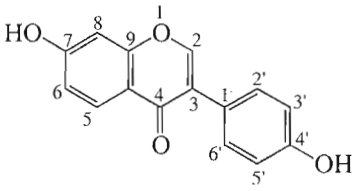
Задачей данной работы явилось препаративное получение генистеина и дайдзеина и исследование зависимости их антиоксидантного действия от концентрации. Перекисное окисление фосфолипидов в виде мультиламеллярных везикул (МЛВ) индуцировали системой железо(III)–аскорбат.

Сокращения: ИФ – изофлавоны; ЛНП – липопротеины низкой плотности; МЛВ – мультиламеллярные везикулы; MDA – малоновый диальдегид.

#Автор для переписки (тел.: (095) 434-83-55; эл. почта: utkelena@yandex.ru).



(I)



(II)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы были оптимизированы условия получения изофлавонов (**I**), (**II**). Ранее предложенная схема их получения из соевой муки включала: 1) экстракцию смеси ИФ-гликозидов из соевой муки [14, 15]; 2) их очистку адсорбционной хроматографией [14, 15]; 3) получение агликонов из гликозидов кислотным или ферментативным гидролизом [15, 16]. В связи с низким содержанием изофлавонов в сое (0.2%), для их препаративного получения на первых стадиях схемы требовались большие количества материалов (растворителей, адсорбента). В настоящей работе в качестве источника выделения использована соевая пищевая добавка Nova Soy, а стадии получения 1 и 3 модифицированы, что позволило получить смесь ИФ-гликозидов с 18%-ным выходом (от исходного препарата).

Смесь ИФ-гликозидов получали последовательной экстракцией препарата Nova Soy кислым ацетоном (pH 3.0) и 90%-ным метанолом. После выделения из экстракта их идентифицировали по данным ТСХ, ЯМР-спектрометрии и УФ-спектроскопии. Все полученные физико-химические характеристики совпадали с данными, полученными для соответствующих ИФ-гликозидов из соевой муки [14].

В описанных ранее методиках изофлавоны получали из смеси ИФ-гликозидов кислотным [15] или ферментативным гидролизом [14, 16]. Мы испытали несколько способов гидролитического расщепления β-гликозидной связи в молекулах ИФ-гликозидов: гидролиз ИФ-гликозидов под действием препарата гликозидаз из *Aspergillus heteromorphous* 3010; кислотный гидролиз спиртового раствора гликозидов; кислотный гидролиз порошкообразных гликозидов.

Первоначально, согласно работам [14, 16], мы провели ферментативный гидролиз. Как отмечалось в работе [14], гидролиз β-глюкозидазой смеси природных соевых ИФ-гликозидов, углеводные фрагменты которых представлены глюкозой и ее ацетил- и малонилпроизводными, проходил не полностью. Поэтому мы использовали смесь гликозидаз из *A. heteromorphous* 3010. Полностью гидролизовать гликозиды (данные ТСХ) не удалось. Далее мы проводили гидролиз как спиртового раствора, так и порошка ИФ-гликозидов 1 н. HCl в течение 2 ч при 100°C. Однако и в данных условиях гидролиз проходил не полностью. Поэтому мы отдали предпочтение кислотному гидролизу порошкообразных ИФ-гликозидов 6 н. HCl в течение 5 ч при 100°C; при этом образуется в основном смесь изофлавонов при обугливании сахарных составляющих. Выход изофлавонов составил 90% от их содержания в гликозидах, что значительно превышает выход продуктов при ферментативном гидролизе и кислотном гидролизе спиртовых растворов гликозидов.

Полученная смесь изофлавонов идентифицировалась методом ТСХ в различных системах [15]. ^{1}H-ЯМР и УФ-спектры соответствовали спектрам, описанным ранее [14, 17]. По данным ВЭЖХ, она состояла из генистеина и дайдзеина, соотношение 1 : 8, времена удерживания соответственно 21 и 19 мин [17].

Смесь была разделена хроматографией на силикагеле [14] и были получены дайдзеин и генистеин (R_f в системе Б соответственно 0.12 и 0.4). Индивидуальность выделенных изофлавонов была подтверждена методами ТСХ, ^{1}H-ЯМР и ВЭЖХ [17, 18]. Полученный генистеин имел чистоту 98%, что превышает чистоту коммерческого препарата (93.7%).

Коэффициент распределения липид/водная фаза K_P генистеина и дайдзеина определяли в водном растворе МЛВ фосфолипидов сои при мольных соотношениях фосфолипидов и изофлавонов 100 : 1, 20 : 1, 10 : 1. Коэффициенты распределения генистеина и дайдзеина равны 200 ± 50 и 260 ± 50 соответственно, что свидетельствует о значительной гидрофобности изофлавонов.

Влияние генистеина и дайдзеина на перекисное окисление фосфолипидов

Известно, что синтетические изофлавоны ингибируют перекисное окисление фосфолипидов в концентрации 10^{-3} M [13, 19]. Согласно требованиям, предъявляемым к истинным антиоксидантам [12], концентрация окисляемого субстрата должна как минимум на порядок превышать концентрацию антиоксиданта. Поэтому концентрация фосфолипидов не могла быть меньше 1×10^{-2} M. Так как для йодометрического титрования требуют-

Накопление MDA и пероксидов в различных системах окисления фосфолипидов в зависимости от концентрации индукторов

Номер системы	$[Fe^{3+}]$, М	[Аскорбиновая кислота], М	[Фосфолипиды], М	[MDA], нмоль/мл	Содержание пероксидов, мкмоль/г
1	2×10^{-4}	3.6×10^{-5}	0.125	14.00	9.1
2	5×10^{-4}	1×10^{-4}	0.030	14.66	0
3	1×10^{-3}	1×10^{-3}	0.100	0	Не определяли
4	1×10^{-2}	1×10^{-3}	0.125	0	Не определяли
5	1×10^{-3}	1×10^{-2}	0.125	0	Не определяли
6*	1×10^{-3}	1×10^{-3}	0.125	27	0

* Система содержит 0.14 М H_2O_2.

ся большие количества липидов (около 100–200 мг на одно измерение) [20], мы использовали концентрации фосфолипидов порядка 1×10^{-1} М.

Добавление изофлавонов к мультиламеллярным везикулам фосфолипидов в концентрации 10^{-3} М возможно только в спиртовом растворе из-за их низкой растворимости в воде. Поэтому в системе присутствует 10% этанола, что, по данным ^{31}P-ЯМР-спектроскопии, не влияет на структурную организацию фосфолипидов, образующих ламеллярную фазу (данные не приводятся).

Для ускорения окисления липидов применяют такие окислители, как пероксид водорода или индукторы окисления – ионы железа и аскорбиновую кислоту [12, 21]. Нами было исследовано шесть систем окисления, которые различались концентрациями индукторов окисления (аскорбиновой кислоты и ионов Fe^{3+}) или наличием пероксида водорода. Из представленных в таблице результатов видно, что при концентрации аскорбиновой кислоты 1 мМ и выше (системы № 3–5) окисления не происходит, что, как считают [11], связано с антиоксидантным действием аскорбиновой кислоты в таких концентрациях. В системе с добавлением пероксида водорода (№ 6), предложенной Фенгом и др. [21], наблюдалась наибольшая степень окисления фосфолипидов ([MDA] 27 нмоль/мл), но при этом не удалось зафиксировать образование гидропероксидов. Измерение концентрации гидропероксидов оказалось возможным только в системе № 1, содержащей аскорбиновую кислоту (3.6×10^{-5} М), ионы Fe^{3+} (2×10^{-4} М), при концентрации фосфолипидов 0.125 М. При снижении концентрации фосфолипидов (система № 2) накопление пероксидов зафиксировать не удалось. Система № 1 была использована далее для исследования антиоксидантной активности изофлавонов; было показано, что присутствие 10% спирта не влияет на накопление гидропероксидов (данные не приводятся).

Исследование антиоксидантной активности изофлавонов проводили в диапазоне концентраций 0.1–10 мМ. В качестве эталонного вещества был выбран ионол [12], концентрации которого были равны концентрациям изофлавонов в каждой серии экспериментов. Контроль (МЛВ фосфолипидов сои) не содержал индукторов окисления.

Согласно представленным на рис. 1 результатам, изофлавоны в концентрации 1 и 10 мМ инги-

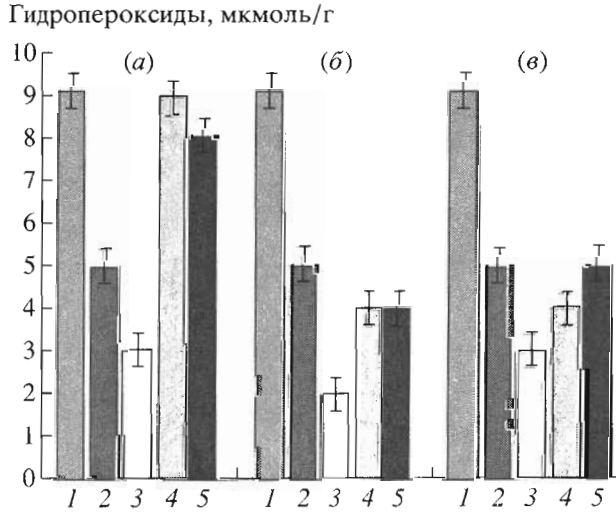


Рис. 1. Содержание гидропероксидов при окислении фосфолипидов (0.1 М) через 30 мин инкубации при 37°C в среде с индукторами окисления (2×10^{-4} М Fe^{3+} и 3.6×10^{-5} М аскорбат) в отсутствие антиоксидантов (*1*) и в присутствии ионола (*3*), генистеина (*4*), дайдзеина (*5*) в концентрации 0.1 (*а*), 1 (*б*) и 10 мМ (*в*). В системе (*2*) отсутствуют индукторы окисления и антиоксиданты.

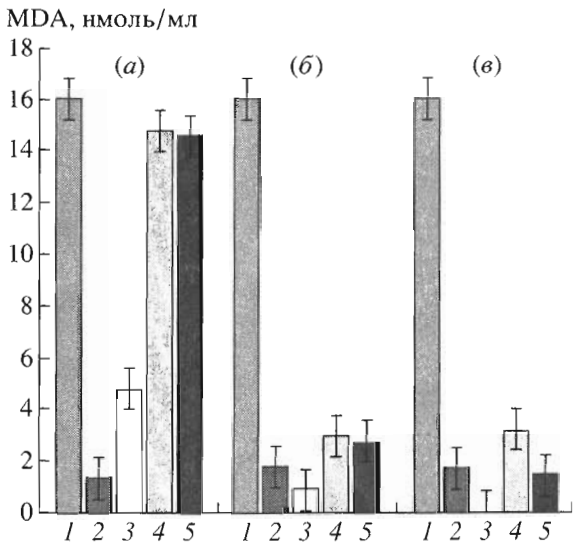


Рис. 2. Содержание MDA при окислении фосфолипидов (0.1 М) через 30 мин инкубации при 37°C в среде с индукторами окисления (2×10^{-4} М Fe^{3+} и 3.6×10^{-5} М аскорбат) в отсутствие антиоксидантов (*1*) и в присутствии ионола (*3*), генистеина (*4*), дайдзеина (*5*) в концентрации 0.1 (*а*), 1 (*б*) и 10 мМ (*в*). В системе (*2*) отсутствуют индукторы окисления и антиоксиданты.

бируют накопление пероксидов, а в концентрации 0.1 мМ не оказывают заметного действия на этот процесс. Ионол ингибировал образование пероксидов во всем исследованном диапазоне концентраций, причем в каждом отдельном случае его действие было более значительным по сравнению с действием генистеина и дайдзеина. Сопоставление действия обоих агликонов не выявило существенных различий в их эффективности, хотя для ряда синтетических изофлавонов, среди которых не было генистеина и дайдзеина, найдена зависимость антиоксидантной активности от структуры [13].

При изучении действия изофлавонов на конечную стадию перекисного окисления липидов – процесс образования MDA – были выявлены те же закономерности (рис. 2). Из рис. 2 видно, что изофлавоны проявляют антиоксидантную активность при концентрациях 1 и 10 мМ. Как и в случае с накоплением гидропероксидов, изофлавоны в концентрации 0.1 мМ не оказывали какого-либо действия, в то время как ионол в данной концентрации ингибировал образование MDA.

Итак, полученные данные свидетельствуют о способности природных изофлавонов (генистеина и дайдзеина) в концентрации не менее 1 мМ ингибировать процесс перекисного окисления фосфолипидов, который регистрировали по образованию пероксидов и по накоплению MDA. Величина минимальной ингибирующей концентрации изофлавонов, которая хорошо согласуется с таковой для ряда синтетических изофлавонов [13], была на два порядка меньше концентрации окисляемого субстрата фосфолипидов (0.125 М). Это позволяет рассматривать изофлавоны в качестве истинных антиоксидантов, что, впрочем, не исключает того, что они, в силу способности хелатировать ионы железа [22], могут выступать и в качестве косвенных антиоксидантов. Не было найдено существенных различий в антиоксидантной эффективности генистеина и дайдзеина, хотя в молекуле первого есть дополнительная HO-группа в 5-м положении кольца A. Возможно, это обусловлено прочностью водородной связи между протоном этой группы и карбонильным кислородом [23].

Известно, что антиоксидантное действие фенолов обусловлено их взаимодействием с пероксидными радикалами окисляющегося субстрата [23]. Для изофлавонов, которые являются полиядерными фенолами, методом ЭПР-спектроскопии доказано, что они в концентрации не менее 1 мМ взаимодействуют с радикалами липидов и гидропероксидов, а также активных форм кислорода (например, супероксидный анион-радикал), с образованием феноксильных радикалов [24]. Следует еще раз подчеркнуть, что именно в этой концентрации изофлавоны способны ингибировать перекисное окисление фосфолипидов. В настоящее время неизвестно, как соотносятся антирадикальная и антиокислительная активность флавонов данного класса в липидной системе. Однако большие значения коэффициентов распределения изофлавонов, полученные в данной работе, говорят о том, что они являются гидрофобными веществами. При соотношении фосфолипиды–изофлавоны, 100 : 1, при котором изучалась антиоксидантная активность, они полностью переходят в липидную фазу, где могут контактировать с радикалами липидов. Это предположение согласуется с результатами исследований флуоресцентными методами, показавшими, что в модельных мембранах изофлавоны располагаются в области атомов углерода C_6–C_{12}-жирнокислотных остатков и замедляют их подвижность, в результате чего уменьшается жидкостность модельных мембран [22].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали препарат фосфолипидов сои, содержащий 70% фосфатидилхолина, 10% фосфатидилэтаноламина и 3% лизофосфатидилхолина ("Lipoid S75", Германия), пищевую добавку Nova Soy фирмы "ADM" (США), содержащую 46% смеси ИФ-гликозидов и их малонил- и ацетилпроизводных. В качестве стандартов использовали генистеин и дайдзеин (SIGMA–ALDRICH, Германия). Препарат гликозидаз (лиофилизиро-

ванная смесь из культуральной среды *A. heteromorphous* 3010) любезно предоставлена Синицыным А.П. (МГУ им. М.В. Ломоносова).

Применяли растворители и реактивы квалификации "х.ч.".

ТСХ проводили на пластинках Сорбтон-диол с УФ-индикатором (Хромдет-экология, Россия) в системах А (хлороформ–метанол–вода, 65 : 25 : 4) и Б (эфир–петролейный эфир, 7 : 3), обнаружение изофлавонов УФ-облучением при 254 нм. Гликозилированные производные обнаруживали α-нафтолом с прогреванием до 200°С.

ИФ-гликозиды и агликоны анализировали ВЭЖХ на приборе "KNAUER" (Германия) на колонке Separon C_{18} (10 × 150 мм), элюирование – градиентной системой от 10 до 40% ацетонитрила в воде за 30 мин с добавлением 0.1 мл CH_3COOH на 100 мл системы; детектирование при λ 254 нм. УФ-спектры отдельных фракций получали на спектрофотометре DU-6 (Beckman, США).

^{1}Н-ЯМР-спектры регистрировали на импульсном Фурье-спектрометре MSL-200 (Bruker, ФРГ) в DMSO-d_6. Центрифугирование проводили на центрифуге "Beckman J2-21", США.

Получение ИФ-гликозидов. Препарат Nova Soy последовательно экстрагировали кислым ацетоном (pH 3.0) и 90%-ным метанолом (препарат–растворитель, 1 : 10, по массе) 2 ч при комнатной температуре. Осадок отделяли фильтрацией, объединенные экстракты упаривали досуха. Остаток растворяли при 50°С в сухом метаноле и выдерживали 12 ч при –10°С, после отделения образовавшегося осадка фильтрованием на вакуумном фильтре оставшийся раствор упаривали и еще раз высаживали смесь гликозидов. Объединенный осадок еще трижды растворяли-высаживали для дополнительной очистки. Выход смеси ИФ-гликозидов составил 18% по массе от исходного препарата. Значения R_f гликозидов дайдзеина и генистеина в системе А были равны 0.45 и 0.52 соответственно.

Спектры ^{1}Н-ЯМР гликозидов генистеина и дайдзеина (δ, м.д.) содержат следующие сигналы: фенольных колец – 6.4 (с, H8); 6.79–6.83 (сс, H3', H5'); 7.35–7.39 (сс, H2', H6'), 8.00 (д, *J* 2.0 Гц, H5), 8.38 (с, H2), 9.6 (с, 7-OH); а также сигналы: 8.0, характерный для H5 дайдзеина, и 12.93, который относится к протону 5-OH и характерен для генистеина; сигналы в области 4.5–5.5 принадлежат протонам глюкозы, сигнал 5.3, относящийся к аномерному протону остатка глюкозы, указывает на β-конфигурацию гликозидной связи.

УФ-спектр смеси в этаноле имеет максимум поглощения в области 258–260 нм и плечо в области 330 нм.

Получение агликонов. *1. Ферментативный гидролиз*: 250 мг смеси ИФ-гликозидов в 5 мл 0.2 М ацетатного буфера, pH 5.0 инкубировали с 25 мг гликозидаз (КФ 3.2.1) из *A. heteromorphous* 3010 в течение 1 ч при 50°С [17]. Выход смеси агликонов составил ~5–10% (по данным ТСХ).

2. Кислотный гидролиз спиртового раствора ИФ-гликозидов: к раствору 500 мг ИФ-гликозидов в 5 мл этанола добавляли 45 мл 1.1 н. HCl. Раствор выдерживали на кипящей водяной бане 2 ч с обратным холодильником. Выход смеси изофлавонов составил ~5–10% (данные ТСХ).

3. Кислотный гидролиз порошкообразной смеси ИФ-гликозидов проводили двумя способами. *Первый способ*: 500 мг гликозидов нагревали в 10 мл 1 н. HCl в течение 2 ч на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Гидролиз проходил не полностью: по данным ТСХ, в системе Б оставалось много негидролизованных ИФ-гликозидов (R_f 0), выход изофлавонов (R_f 0.12 и 0.4) составил ~5–10%. *Второй способ*: 500 мг смеси ИФ-гликозидов и 10 мл 6 н. HCl выдерживали 5 ч при 100°С, контролируя ход гидролиза ТСХ. После гидролиза порошок агликонов отфильтровывали на стеклянном фильтре под вакуумом, затем, не удаляя с фильтра, нейтрализовали 0.1 н. раствором $NaHCO_3$ и высушивали. Выход изофлавонов от теоретического составил 90%.

Получение индивидуальных изофлавонов. Генистеин и дайдзеин выделяли из их смеси адсорбционной хроматографией на колонке с силикагелем (20 × 220 мм) в системе Б при соотношении вещество–сорбент, 1 : 300; контроль ТСХ в этой же системе. R_f генистеина равен 0.4, дайдзеина 0.12 (ср. [14]).

Спектры ^{1}Н-ЯМР генистеина и дайдзеина содержат те же сигналы, что определены для агликонового фрагмента ИФ-гликозидов.

Определение коэффициента распределения липид/водная фаза. Сухую пленку фосфолипидов сои (24 мг) диспергировали при механическом встряхивании в 10 мл водных растворов генистеина (3×10^{-5}, 1.5×10^{-4} и 3×10^{-4} М) так, что концентрация фосфолипидов во всех образцах составила 3×10^{-3} М. После троекратного замораживания и оттаивания образцы центрифугировали 50 мин при 18000 об/мин (30000 *g*). Осадок липидной фазы растворяли в этаноле (96%). По УФ-поглощению при λ 258 для генистеина (ε 3.70×10^4 M^{-1} $см^{-1}$) и при λ 260 для дайдзеина (ε 2.75×10^4 M^{-1} $см^{-1}$) водной и липидной фаз определяли концентрации изофлавонов в обеих фазах.

Коэффициент распределения рассчитывали по формуле [25]:

$$K_p = (C_L/C_W) = (n_L/V_L)/(n_W/V_W),$$

где C_L и C_W – концентрации изофлавонов в липидной и водной фазах соответственно; n_L и n_W – содержание изофлавонов в липидной и водной фазах соответственно; V_L и V_W – объемы этих фаз.

Объем липидной фазы рассчитывали по формуле:

$$V_L = v_L[\mathrm{L}]V_W,$$

где [L] – концентрация липидов, М; v_L – уд. молярный объем липидов, 0.8 $М^{-1}$ [25].

Перекисное окисление фосфолипидов. Водные растворы $FeCl_3$ (1 мМ) и аскорбиновой кислоты (0.18 мМ) готовили в день эксперимента.

К 50 мг смеси фосфолипидов добавляли 50 мкл раствора антиоксиданта (1–100 мМ ионол, генистеин и дайдзеин в 96% этаноле), 100 мкл 1 мМ раствора $FeCl_3$, 100 мкл 0.18 мМ аскорбиновой кислоты и добавляли 150 мкл дистиллированной воды. Контрольные образцы без индукторов окисления содержали 50 мг фосфолипидов в 50 мкл этанола и 350 мкл дистиллированной воды. Конечный объем проб составлял 0.5 мл.

Окисление проводили перемешивая магнитной мешалкой при температуре 37°C в течение 30 мин, после чего определяли содержание пероксидов и MDA йодометрическим титрованием и реакцией с тиобарбитуровой кислотой соответственно [20, 26].

Определение гидропероксидов проводили по методике [20] с последующим расчетом перекисного числа:

$$C\ (\text{ммоль/г}) = NV/2P,$$

где N – нормальность тиосульфата натрия; V – объем раствора тиосульфата натрия (мл), израсходованного на титрование пробы за вычетом объема раствора тиосульфата натрия "слепой" пробы; P – навеска пробы в граммах; 2 – эквивалент тиосульфата натрия в реакции с йодом.

Определение MDA. К 0.5 мл инкубационной липидной среды добавляли 3 мл препарата тиобарбитуровой кислоты (раствор 15 г CCl_3COOH и 0.67 г тиобарбитуровой кислоты в 100 мл воды) и выдерживали на кипящей водяной бане 40 мин. После охлаждения отбирали верхний прозрачный слой и измеряли поглощение образцов при двух длинах волн: 532 нм и 580 нм; содержание MDA рассчитывали по формуле [26]:

$$C\ (\text{нмоль/мл}) = ((A_{532}–A_{580})V_т)/(V_L\varepsilon l),$$

где A – оптическое поглощение при соответствующей длине волны; $V_т$ – объем тиобарбитуровой кислоты; V_L – объем липидной инкубационной среды; ε – молярный коэффициент поглощения MDA (1.55×10^5 $М^{-1}$ $см^{-1}$) [27], l = 1 см.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Минобразования России по фундаментальным исследованиям в области естественных и точных наук, № E02-6.0-135.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Naim M., Gestetner B., Zilkah S., Birk Y., Bondi A.* // J. Agr. Food. Chem. 1976. V. 22(5). P. 806–810.
2. *Nishio M., Habuch Y., Tanaka H., Morikava J., Okanoue T., Kasshima K.* // FEBS Lett. 1999. V. 445. P. 87–91.
3. *Kirk E.A., Sutherland P., Wang S.A., Chait A., Le Boeuf R.C.* // J. Nutr. 1998. V. 128(6). P. 954–959.
4. *Akiyama T., Ishida J., Nakadava S.* // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 5592–5596.
5. *Lamartinniere C.A., Zhang J.X., Cotroneo M.S.* // Am. J. Clin. Nutr. 1998. V. 68(S). P. 1400–1405.
6. *Meng Q.H., Levis P., Wahala K., Adlercreutz H., Tikkanen M.J.* // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1438. P. 369–376.
7. *Kerry N., Abbey M.* // Atherosclerosis. 1998. V. 140(2). P. 341–347.
8. *Mitchell J.H., Gardner P.T., McPhail D.B., Morrice P.C., Collins A.R., Duthie G.G.* // Arch. Biochem. Biophys. 1998. V. 360(1). P. 142–148.
9. *Anderson J., Diwadkar V.A., Bridges S.R.* // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1998. V. 218(4). P. 376–381.
10. *Toda S., Shirataki Y.* // Phytother. Res. 1999. V. 13(2). P. 163–165.
11. *Wei H., Ca Q., Rahn R., Zhang X., Wang Y., Lebwohl M.* // Biochemistry. 1998. V. 37(18). P. 6485–6490.
12. *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б.* Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК "Наука/Интерпериодика", 2001.
13. *Пивоваренко В.Г., Туганова А.В., Осинская Л.Ф., Холодова Ю.Д.* // Хим.-фарм. журн. 1997. № 3. С. 14–18.
14. *Murphy P.A.* // J. Agric. Food. Chem. 1985. V. 33. P. 385–389.
15. *Wang G., Kuan S.S., Francis O.J., Ware G.M., Carman A.S.* // J. Agric. Food. Chem. 1990. V. 38. P. 185–190.
16. *Pandjaitan N., Hettiarachchy Z.Y., Crandall P., Sneller C., Dombek D.* // J. Food. Science. 2000. V. 65(4). P. 591–595.
17. *Franke A.A., Custer L.G., Tanaka Y.* // Am. J. Clin. Nutr. 1998. V. 68(S). P. 1466–1473.
18. *Setchell K.D.R., Zimmer-Nechemias L., Cai J., Heubi J.E.* // Am. J. Clin. Nutr. 1998. V. 68(S). P. 1453S–1461S.
19. *Gu Q., Rimbach G., Moini H., Weber S.* // Toxicology. 2002. V 179(1–2). P. 171–180.
20. *Шишкина Л.Н.* // Исследование синтетических и природных антиоксидантов *in vitro* и *in vivo* / Ред. Бурлакова Е.Б. М.: Наука, 1992. С. 26–30.
21. *Feng N.K., Chen C.C., Chun N.L., Chia C.C., Che M.T.* // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1389. P. 81–90.
22. *Arora A., Byrem T.M., Nair M.G., Strasburg G.M.* // Arch. Biochem. Biophys. 2000. V. 1. P. 102–109.
23. *Рогинский В.А.* Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность. М.: Наука, 1988. С. 53.
24. *Guo Q., Rimbach G., Moini H., Weber S., Packer L.* // Toxicology. 2002. V. 179(1–2). P. 171–180.
25. *Heymann S.B., Zakharov S.D., Zang Y.-L., Cramer W.A.* // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 2717–2725.

26. *Ланкин В.З., Гуревич С.М., Бурлакова Е.Б.* Биоантиокислители. Труды МОИП. Т. 52. М.: Наука, 1975. С. 338.

27. *Afanas'ev I.B., Dorozhko A.I., Brodskii A.V., Kostyuk V.A., Potapovitch A.I.* // Biochemical Pharmacology. 1989. V. 38. P. 1763–1769.

Isoflavones Genistein and Daidzein: Preparation by Acid Hydrolysis of Their Glycosides and the Effect on Phospholipid Peroxidation

E. A. Utkina*#, S. V. Antoshina*, A. A. Selishcheva, G. M. Sorokoumova*, E. A. Rogozhkina*, and V. I. Shvets***

#Phone: +7 (095) 434-8355; e-mail: utkelena@yandex.ru
**Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia*
***Faculty of Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia*

A mixture of isoflavones was obtained by acid hydrolysis of isoflavone glycosides isolated from the products of soybean processing by a successive extraction with aqueous acetone and methanol. Homogeneous isoflavones genistein and daidzein were isolated from the aglycone mixture by adsorption chromatography and identified by spectral and chromatographic methods. The effect of both isoflavones on lipid peroxidation of soy phospholipids in multilamellar vesicles was studied at various concentrations. These aglycones were found to inhibit the formation of lipid hydroperoxides and malonic dialdehyde at the concentrations as low as 1 mM. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 4; see also http: // www.maik.ru.

Key words: daidzein, genistein, NMR spectroscopy, phospholipid peroxidation, soy isoflavones