

Антиоксиданты в пряных растениях

Исследовательский проект

Автор: Заряев Никита,

10 класс, МБОУ «СОШ № 121 г. Челябинск»,

Научный руководитель:

Лисун Наталья Михайловна,

Учитель биологии МБОУ «СОШ № 121 г.

Челябинск», к.п.н., доцент ЮУрГГПУ

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение .....	3
ГЛАВА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИОКСИДАНТОВ КАК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ.....	5
1.1 Общая характеристика антиоксидантов .....	5
1.2 Биологическая роль природных антиоксидантов.....	9
ГЛАВА 2. ВЫДЕЛЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ.....	11
2.1 Выделение антиоксидантов из растительного сырья.....	11
2.2 Количественное определение общего содержания фенольных веществ в экстракте, полученном из растительного сырья .....	11
2.3 Количественное определение общего содержания флавоноидов в экстракте, полученном из растительного сырья .....	12
2.3 Выводы по экспериментальной части.....	13
Заключение .....	14
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
Приложение 1.....	1
Приложение 2.....	4
Приложение 3.....	6

## Введение

Кислород является мощным окислителем, реакции окисления с его участием – источник энергии для многих живых организмов. С другой стороны, в процессе метаболизма образуются соединения кислорода, которые разрушают структуру и вещества клетки. В результате в клетке и во всем организме нарушается обмен веществ. Роль антиоксидантов - связать и вывести из организма свободные радикалы. В организме имеется собственная система борьбы с излишним количеством свободных радикалов, но она ослабляется под воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды. Неправильное питание, стрессы, выхлопные газы автотранспорта, продукты переработки различных производств, деятельность ТЭЦ и многие другие факторы негативно влияют на нас и нашу антиоксидантную систему.

Однако известно, что многие растения содержат вещества, обладающие антиоксидантной активностью. Употребление в пищу «правильных» продуктов может восстанавливать антиоксидантную систему организма и значительно улучшать общее состояние организма: самочувствие, настроение и многое другое. Добавление в пищевые продукты пряностей помимо того, что придает интенсивный и характерный аромат свежим и готовым продуктам, вносит натуральные антиоксиданты. К преимуществам пряностей как антиоксидантных добавок к пищевым продуктам можно отнести и хорошую устойчивость их противooksидительных свойств при нагревании и изменении pH, что особенно важно при приготовлении пищевых продуктов.

Целью моей работы является установление количественного содержания антиоксидантов в пряных растениях.

Для достижения цели мною были поставлены следующие задачи:

1. Составить общую характеристику антиоксидантов, на основании литературных источников;
2. Охарактеризовать механизм действия антиоксидантов;
3. Изучить влияния антиоксидантов на организм человека;

4. Количественно определить содержание антиоксидантов в различных пряных растениях;
5. Провести сравнительный анализ количественного содержания антиоксидантов в различных пряных растениях;
6. Обработка и интерпретация результатов.

Объект: пряные растения.

Предмет: антиоксиданты.

Гипотеза: пряные растения обладают высокими показателями антиоксидантной активности.

Для достижения поставленных задач были использованы следующие методы: анализ литературных источников; спектрофотометрический метод; статистический метод.

# ГЛАВА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИОКСИДАНТОВ КАК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

## 1.1 Общая характеристика антиоксидантов

По наиболее общему определению, антиоксидантом является любое вещество, которое, присутствуя в низких по сравнению с субстратом концентрациях, существенно замедляет его окисление [5]. Такому определению соответствует большое количество соединений органической природы, которые способны реагировать с пероксидными радикалами и другими активными формами кислорода. В присутствии антиоксидантов замедляется окисление многих биологически активных веществ таких, как липиды, белки и многие другие субстраты, – как в условиях *in vivo*, так и в *in vitro*.

Растущий интерес к антиоксидантам объясняется их способностью блокировать вредное воздействие свободных радикалов и, таким образом, защищать организм человека от многих опасных заболеваний. Специалисты в областях биологии, медицины, фармакологии и многие другие уделяют большое внимание моделированию противорадикальной и противоокислительной активности биоантиоксидантов [8, 9, 11]. Еще большее внимание уделяется количественной оценке антиоксидантной активности пищевых продуктов, биообъектов и лекарственных препаратов, чей анализ весьма важен, так как значительное количество антиоксидантов не синтезируются в организме, а попадают в него лишь в составе пищевых продуктов и лекарственных средств [1, 14-16].

На сегодняшний день среди природных антиоксидантов максимальное практическое использование приобрели производные фенола, неорганические соединения серы, токоферолы, лецитины, каротин и фосфолипидные соединения. Обширно используются хиноны, аскорбиновая, фосфорная, лимонная кислоты, гваяковая смола, фосфатиды, госсипол, сезамол, витамин К, фермент каталаза и другие [33\*]. К антиоксидантам относятся также кверцетин, кверцитрин, рутин, обнаруженные в различных растениях [12].

Как правило, антиоксиданты задерживают процесс окисления биологически активных веществ только в течение определенного промежутка времени. Чем

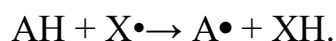
продолжительнее этот период, вызываемый присутствием антиоксиданта, тем эффективнее данный антиоксидант [3].

На практике выбор антиоксиданта находится в зависимости от его назначения, физической, химической и биологической природы [4]. Анализ существующих литературных данных дает возможность систематизировать антиоксиданты непосредственного действия в пять основных категорий: доноры протона; полиены; катализаторы; ловушки радикалов; комплексообразователи.

Такая классификация предусматривает основные структурные элементы молекул, отвечающие за проявление веществом антиоксидантных свойств.

#### 1. Доноры протона

Это вещества с легкоподвижным атомом водорода. Они перехватывают свободные радикалы по реакции:



Радикалы  $A\bullet$ , в зависимости от соотношений концентраций реагирующих соединений и условий протекания реакции, могут при взаимодействии с радикалами  $X\bullet$  или  $A\bullet$  приводить к обрыву цепи либо вступают в побочные реакции продолжения цепи свободнорадикального окисления [14]. Доноры протона - наиболее обширная категория антиоксидантов, которая нашла свое применение в медицине.

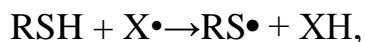
*1. Фенолы.* Главным механизмом антиоксидантного действия веществ данной категории считается взаимодействие с образующимися в ходе перекисного окисления липидов перокси- ( $ROO\bullet$ ) и алкокси-радикалами ( $RO\bullet$ ) [14] за счет легкоподвижного атома водорода фенольных групп в составе молекулы антиоксиданта. С радикальными активными формами кислорода фенольные антиоксиданты взаимодействуют очень слабо [14], однако эффективно подавляют реакции перекисного окисления липидов, при этом практически неспособны защищать белки от окислительного повреждения.

Основными представителями фенольных антиоксидантов являются токоферолы, инол, пробукол, производные фенолов и нафтолов, флавоноиды, катехины, фенолкарбоновые кислоты, эстрогены.

2. *Азот-содержащие гетероциклические вещества.* Их механизм действия аналогичен таковому фенольных антиоксидантов. Высокой подвижностью в молекуле таких веществ обладает атом водорода, который находится в связи с азотом в составе ароматического гетероцикла.

Основными представителями азот-содержащих гетероциклических веществ являются мелатонин, производные 1,4-дигидропиридина, 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин, производные пирролопиримидина.

3. *Тиолы.* Механизм действия тиолов имеет двойственный характер: тиоловые антиоксиданты могут выступать как в роли доноров протона (с образованием тиольных радикалов)



так и в роли хелаторов катионов переходных металлов. Тиолы более эффективно проявляют свое антиоксидантное действие, по сравнению с фенольными антиоксидантами, в предотвращении окислительного повреждения белков [17].

Основными представителями тиолов являются глутатион, цистеин, гомоцистеин, N-ацетилцистеин, эрготионеин, дигидролипоевая кислота.

4.  *$\alpha,\beta$ -Диенолы.* Главный представитель данной группы – аскорбиновая кислота, для которой установлен механизм действия - она легко отдает протоны, превращаясь в дегидроаскорбиновую кислоту, при этом процесс является обратимым. Аскорбиновая кислота во многих случаях проявляет прооксидантные свойства.

5. *Порфирины.* Механизм действия порфиринов множественный: они являются донорами протонов, комплексообразователями, катализаторами [7]. Основной представитель: билирубин.

## 2. Полиены

Полиены – это вещества с несколькими ненасыщенными связями. Легко окисляются, конкурируя за активные формы кислорода и радикалы с биомолекулами и тем самым защищая последние от окисления. Способны взаимодействовать с различными свободными радикалами, ковалентно присоединяя

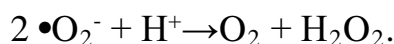
их по двойной связи.Полиеновые антиоксиданты защищают белки и нуклеиновые кислоты гораздо слабее, чем липиды.

Основные представители: ретиноиды (ретиноль, ретиноевая кислота, ретинол и его эфиры) и каротиноиды (каротины, ликопин, спириллоксантин, астацин, астаксантин и др.) [2].

### 3. Катализаторы

Вещества, способные катализировать элиминацию активных форм кислорода и промежуточных продуктов свободнорадикального окисления без образования новых свободных радикалов. Антиоксиданты-катализаторы эффективны в значительно более низких концентрациях и не расходуются в ходе реакций элиминации активных форм кислорода и продуктов свободнорадикального окисления. Это значит, что они могут быть использованы в гораздо меньших дозах, их эффект в организме будет сохраняться дольше, а вероятность проявления побочного действия у них гораздо меньше.

1. *Имитаторы* супероксиддисмутазы. Супероксиддисмутаза является ферментом, катализирующим дисмутацию супероксид-анион-радикала ( $\bullet\text{O}_2^-$ ):



Из органических соединений известны две группы веществ, способных катализировать дисмутацию  $\bullet\text{O}_2^-$  по различным механизмам: нитроксилы и аминоксилы. Из всех антиоксидантов действие имитаторов супероксиддисмутазы наиболее универсально, поскольку их мишенью является супероксид-анион-радикал - один из видов первичных активных форм кислорода, в больших количествах образующихся в клетках.

2. *Имитаторы* глутатионпероксидазы. Глутатионпероксидаза катализирует превращение опасных для организма органических гидропероксидов ( $\text{ROOH}$ ) и  $\text{H}_2\text{O}_2$  в инертные гидроксисоединения ( $\text{ROH}$ ) и воду соответственно при участии особого тиол-содержащего пептида глутатиона.

### 4. Ловушки радикалов

К этой группе антиоксидантов относятся вещества, образующие при взаимодействии со свободными радикалами аддукты радикальной природы с

ограниченной реакционной способностью. Типичными представителями ловушек радикалов являются нитроны, в частности, фенил-трет-бутилнитрон, эффективно связывающие супероксидные и гидроксильные радикалы. Могут ингибировать все звенья свободнорадикального окисления за счет элиминации первично продуцирующихся активных форм кислорода.

## 5. Комплексообразователи

Комплексообразователи, или хелаторы, ингибируют только металло-зависимые реакции свободнорадикального окисления за счет связывания катионов металлов переходной валентности, катализирующих реакции образования активных форм кислорода.

Основные представители: ЭДТА и ее соли (трилон Б, версен, комплексон III), десфероксамин, 1,10-батофенантролин, карнозин, изоникотиноильные соединения, некоторые флавоноиды, карведилол.

### 1.2 Биологическая роль природных антиоксидантов

Последние годы характеризуются бурным развитием новой, близкой к науке о питании и фармакологии области знаний, которую назвали фармаконутрициологией.

Системы антиоксидантной защиты имеют исключительно важное значение для предотвращения повреждений, вызываемых чужеродными и агрессивными для организма агентами: радионуклидами, солями тяжелых металлов, химическими выбросами, пестицидами и др. Действительно, повсеместно выявляемый дефицит таких природных антиоксидантов, как витамины С, Е, бета-каротин, минеральных элементов - селена, кальция, железа, фтора, цинка, органических компонентов растительных тканей - проантоцианидов, биофлавоноидов и др. не может не влиять на защитный потенциал организма человека. Тем более что потребность в этих веществах в настоящее время значительно повышена [10].

Достижение оптимальной обеспеченности антиоксидантами практически возможно лишь при широком использовании специализированных продуктов, содержащих биологически активные вещества, обладающие антиоксидантными свойствами.

Природные фенольные соединения часто проявляют высокую биологическую активность. В качестве примера можно указать на то, что те немногие фенольные соединения, которые характерны для организма животных и человека, являются либо гормонами (адреналин, норадреналин, тироксин, серотонин), либо кофакторами важнейших биохимических процессов (убихиноны, витамин К1) [8].

Обнаружение капилляроукрепляющего действия фенолов растений открыло наличие у этого важного класса органических соединений высокой и важной биологической активности, пробудило интерес к их изучению и использованию.

Как показали клинические исследования, недостаточность антиокислительных реакций в организме приводит к развитию таких заболеваний, как рак, атеросклероз, инсульт, диабет и катаракта. Между окислением биополимеров и возникновением заболеваний, а также общими процессами старения существуют определенные связи.

В большинстве научных исследований было показано, что флавоноиды обладают антимуtagenными и антиканцерогенными свойствами. Возможно, они играют защитную роль в канцерогенезе, снижая канцерогенное действие различных факторов. В исследованиях финских ученых была установлена четкая взаимосвязь между приемом флавоноидов и снижением риска заболевания раком. Предполагается, что они влияют на клеточный и внеклеточный потенциал.

Флавоноиды, присутствующие практически во всех растениях в различной концентрации в разнообразной форме, являются активными биологическими веществами, обладающими антиканцерогенными, антиоксидантными, антивирусными, антиаллергенными и антимуtagenными свойствами.

## ГЛАВА 2. ВЫДЕЛЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

### 2.1 Выделение антиоксидантов из растительного сырья

Фенольные вещества и флавоноиды экстрагируются спиртами и водой. Однако несмотря на то, что они легко выделяются водой, получить чистый препарат без посторонних веществ очень затруднительно. Эти затруднения обусловлены тем, что вода извлекает из растительного сырья также дубильные вещества, аминокислоты, водорастворимые углеводы. Наиболее оптимальным вариантом является выделение биологически-активных веществ этанолом.

Для экстракции фенольных веществ использовали 50% этанол. Масса навески растительного сырья для экстракции – 2 г. Смесь выдерживали в термостате при 36°C в течение 2 ч. Извлечение флавоноидов из образцов проводили путем однократной экстракции этанолом (70%) при нагревании на кипящей водяной бане в течение 45 мин. Для спектрофотометрических определений использовали извлечение с соотношением сырье – экстрагент 1 : 100.

В качестве объектов исследования были использованы следующие образцы: петрушка обыкновенная сушеная, лавровый лист, кардамон молотый, мускатный орех молотый, ваниль стручковая.

Растительное сырье, используемое для анализа, было приобретено в магазине.

### 2.2 Количественное определение общего содержания фенольных веществ в экстракте, полученном из растительного сырья

Определение фенольных веществ основано на их способности связываться с белковыми веществами, осаждаться солями металлов, окисляться и давать цветные реакции. Колориметрический метод определения общего содержания фенольных веществ основан на окислении фенольных групп спиртового экстракта исследуемого образца реактивом Фолина-Чокальтеу в среде насыщенного карбоната натрия. В щелочной среде реактив Фолина-Чокальтеу восстанавливается при окислении фенолов до смеси синих оксидов  $WO_2 \cdot nWO_3$  или  $MoO_2 \cdot nMoO_3$ . Образующаяся голубая окраска пропорциональна количеству фенольных веществ.

Концентрация фенольных соединений рассчитывали по калибровочной кривой (Приложение 3), исходя из оптической плотности реакционных смесей, и выражали в мг ГК/л. Полученные данные общего содержания фенольных веществ в экстракте приведены в таблице 1.

Таблица 1. Общего содержания фенольных веществ в экстракте

Объект	Общее содержание ФВ, мг/ 100 г
Петрушка обыкновенная	233±5
Лавровый лист	11012±23
Кардамон молотый	415±10
Мускатный орех молотый	1037±24
Ваниль стручковая	935±21

2.3 Количественное определение общего содержания флавоноидов в экстракте, полученном из растительного сырья

В основу количественного определения флавоноидов в сырье положен метод дифференциальной спектрофотометрии, основанный на способности флавоноидов образовывать окрашенные хелатные комплексы со спиртовым раствором (95%) алюминия хлорида. Содержание флавоноидов определяли спектрофотометрическим методом на приборе КФК-3. Спектр поглощения снимали при длине волны 408±4 нм в кювете с толщиной слоя жидкости 10 мм. Количественное содержание суммы флавоноидов определяли в пересчете на рутин. Полученные данные общего содержания флавоноидов в экстракте приведены в таблице 2.

Таблица 2. Общего содержания флавоноидов в экстракте

Объект	Общее содержание Фл, мг/ 100 г
Петрушка обыкновенная	51±1
Лавровый лист	136±3
Кардамон молотый	27±1
Мускатный орех молотый	132±3
Ваниль стручковая	379±8

### 2.3 Выводы по экспериментальной части

При изучении химического состава и антиоксидантных свойств образцов были получены данные, представленные в таблице.

Таблица 3. Содержание фенольных веществ пряных трав и пряностей

Объект	ФВ, мг/100 г	Фл, мг/100 г
Сушеная зелень		
Петрушка обыкновенная	233±5	51±1
Лавровый лист	1012±23	136±3
Плоды		
Кардамон молотый	415±10	27±1
Мускатный орех молотый	1037±24	132±3
Ваниль стручковая	935±21	379±8

По результатам экспериментальной части можно сделать следующие выводы:

1. Данные группы объектов содержат фенольные вещества и флавоноиды, придающие данным продуктам высокие противорадикальные, противоокислительные и восстанавливающие свойства.
2. Анализ данных показывает, что наибольшим содержанием фенольных веществ среди изученных объектов отличается мускатный орех, а наименьшим – петрушка обыкновенная.
3. Самым высоким содержанием флавоноидов среди образцов отличается экстракт ванили стручковой, а меньшим – петрушка обыкновенная сушеная.
4. В совокупности лучшими показателями антиоксидантной активности отличаются лавровый лист и ваниль стручковая.

## Заключение

Таким образом, при выполнении работы по определению антиоксидантам в пряных растениях, по материалам литературного анализа и полученным экспериментальным результатам, можно сделать следующие выводы:

1. Антиоксидантами являются любые вещества, которые, присутствуя в низких по сравнению с субстратом концентрациях, существенно замедляет его окисление. Применение в пищу продуктов с высоким содержанием антиоксидантами повышает устойчивость организма к неблагоприятными факторам внешней среды.
2. Группы объектов, исследуемых в данной работе, содержат фенольные вещества и флавоноиды, придающие данным продуктам высокие противорадикальные, противоокислительные и восстанавливающие свойства, что может свидетельствовать о благоприятной роли в питании человека пряных трав и пряностей.
3. Анализ данных показывает, что наибольшим содержанием фенольных веществ среди изученных объектов отличается мускатный орех, а наименьшим – петрушка обыкновенная. Самым высоким содержанием флавоноидов среди образцов отличается экстракт ванили стручковой, а меньшим – петрушка обыкновенная сушеная. В совокупности лучшими показателями антиоксидантной активности отличаются лавровый лист и ваниль стручковая.
4. По материалам литературного анализа, установлено, что при практическом применении пряностей их антиоксидантное действие может быть как усилено за счет синергизма с другими антиоксидантами и ферментными комплексами, так и ослаблено, причем возможно проявление прооксидантного эффекта.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуллин, И.Ф. Органические антиоксиданты как объекты анализа / И.Ф. Абдуллин, Е.Н. Турова, Г.К. Будников // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2001. – Т. 67, № 6. – С. 3–13.
2. Волков В.М., Олейников В.И. Биологически активные добавки в специализированном питании спортсменов. Москва. 2001.- 79 с.
3. Вышемирский Ф.А. Производство сливочного масла: Справочник. -М.: Агропромиздат. 1988. -С. 127.
4. Вышемирский Ф.А., Гордеева Е.Ю., Смирнова О.И. и др. Пути повышения стойкости сливочного масла при хранении // Тез. докл. ВНТК «Прогрессивные технологии и оборудование пищевых производств». -СПб.: СПбГАХПТ. 1999. - С. 31-32.
5. Гудков, С.В. Биоантиоксиданты / С.В. Гудков, В.И. Брусков, А.В. Куликов, А.Г. Бобылёв, Д.А. Куликов, А.В. Молочков // Альманах клинич. медицины. – 2014. – № 31. – С. 61–69.
6. Дудкин И.С, Щелкунов Л.Ф. Новые продукты питания. -М.: Наука. - 1998.-303 с.
7. Дудник Л.Б., Храпова Н.Г., Биол. мембраны, 15(2), 184 - 190 (1998)
8. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений: Учеб. пособие для биологических специальностей университетов. -М.: Высшая школа, 1974.-211 с.
9. Костюк, В.А. Биорадикалы и биоантиоксиданты / В.А. Костюк, А.И. Потапович. – Минск: БГУ, 2004. – 179 с.
10. Левицкий Е.Л. Антиоксиданты и питание // Мед. Вестн.-1998.- 2.-С.16-17.
11. Рогинский, В.А. Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность / В.А. Рогинский. – М.: Наука, 1988. – 247 с.
12. Росивал Л., Энгст Р., Соколай А. Посторонние вещества и пищевые добавки в продуктах / пер. с нем. Д.Б.Меламеда. —М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. -246 с.
13. Хасанов, В.В. Методы исследования антиоксидантов / В.В. Хасанов, Г.Л. Рыжова, Е.В. Мальцева // Химия растительного сырья. – 2004. – № 3. – С. 63–75.

14. Яшин, Я.И. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и их влияние на здоровье и старение человека / Я.И. Яшин, В.Ю. Рыжнев, А.Я. Яшин, Н.И. Черноусова. – М.: ТрансПит, 2009. – 200 с.
15. Antolovich, M. Methods for testing antioxidant activity / M. Antolovich // Analyst. – 2002. – Vol. 127. – P. 183–198.
16. Арак, R. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay / R. Арак // Molecules. – 2007. – Vol. 19, № 7. – P. 1496–1547.
17. Asbeck B.S. (1991) Appl. Cardiopulmonary Pathophys. 4, 127-137.

## Приложение 1

### Методика определения общего содержания фенольных веществ

#### *Приготовление реактива Фолина-Чокальтеу:*

100 г вольфрамвокислого натрия ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), 25 г молибденово-кислого натрия ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) и 700 мл дистиллированной воды поместить в круглодонную колбу.

Добавить 50 мл концентрированной ортофосфорной кислоты (85%) и 100 мл концентрированной соляной кислоты (38%), кипятить с обратным холодильником в течение 10 часов. Последовательно добавить 150 г сульфата лития ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ), 50 мл воды, несколько капель жидкого брома ( $\text{Br}_2$ ) и продолжать кипятить ещё 15 минут для удаления излишков брома. Охладить, довести объём до 1 л и профильтровать.

Полученный реактив должен иметь соломенно-жёлтый цвет без оттенка зелёного. Наличие зелёного оттенка означает присутствие в нём продуктов реакции восстановления голубого цвета.

Реактив должен храниться хорошо защищённым от пыли, в тёмной склянке.

#### *Ход работы:*

1. Подготовить растительные экстракты для определения суммы фенольных соединений.
2. Развести реактив Фолина-Чокальтеу, в соотношении 1 часть реактива и 9 частей дистиллированной воды. Хранить в бутылке из темного стекла.
3. Приготовить раствор 80%-ного этанола. Количество 96% этанола для получения необходимого объема 80% этанола рассчитывается по формуле:

$$V_{96\%} = (V_{80\%} * 80) / 96, \text{ где:}$$

$V_{96\%}$  - объем этанола, необходимый для получения нужного объема 80% этанола,

$V_{80\%}$  - необходимый объем этанола.

4. Приготовить водный раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5%).
5. Построить калибровочную кривую для определения концентрации

фенольных соединений в экстракте дячего:

5.1. Приготовить сток-раствор галловой кислоты (5 мг галловой кислоты растворить в 10 мл 80%-ногоэтанола).

5.2. В соответствии с таблицей в пробирки внести определенные объемы сток-раствора галловой кислоты и добавить 80% раствор этанола в объемах, необходимых для получения нужной концентрации. В первой пробирке – контроль на реактивы (см. Таблицу1).

5.3. В каждую из пробирок внести 1,25 мл разведенного реактива Фолина-Чокальтеу. Через 3 минуты (точно) добавить 1 мл 7,5% раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

После добавления раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  реакционная смесь приобретает синюю окраску, интенсивность которой пропорциональна концентрации галловой кислоты в растворе. Построение калибровочной кривой выполняется как минимум в трёх повторностях. Пробирки с реакционной смесью хорошо встряхнуть и оставить на 2 часа.

5.4. По истечению времени провести измерение оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 765 нм. По результатам измерения оптической плотности растворов построить калибровочный график, откладывая по оси абсцисс концентрацию галловой кислоты в мг/л, по оси ординат – оптическую плотностьраствора.

Таблица 1 Соотношения реактивов для построения калибровочной кривой по флавоноидам методомФолина-Чокальтеу

Концентрация, мг/л	Объем сток-раствора галловой кислоты для приготовления пробы, мкл	Объем 80% этанола для приготовления пробы, мкл
Контроль, 0	0,0	250
25	12,5	237,5
50	25	225

100	50	200
150	75	175
200	125	125

Для измерения концентрации флавоноидов в экстрактах:

В пробирку поместить 0,25 мл исследуемого спиртового экстракта, в контрольную пробирку – 0,25 мл 80%-ного этанола и затем во все пробирки добавить по 1,25 мл разведенного реактива Фолина-Чокальтеу, а через 3 минуты по 1,0 мл Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Пробирки с реакционной смесью хорошо встряхнуть и оставить на 2 часа, после чего провести измерение оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 765 нм. В качестве стандартного раствора использовать пробу «контроль».

Содержание фенольных соединений в экстракте определить с помощью калибровочной кривой: графика проходящего через начало координат и отражающего зависимость оптической плотности (ось ординат) полученных реакционных смесей от концентрации (ось абсцисс) содержащейся в них галловой кислоты.

Содержание внутриклеточных фенольных соединений в экстрактах рассчитать по формуле:

$$F = (C_F \times V \text{ экстракта}) / (m \times 1000), \text{ где:}$$

F – общее содержание внутриклеточных фенольных соединений, мг-экв галловой кислоты/ 100 г сухого веса;

C<sub>F</sub> – концентрация фенольных соединений, рассчитанная по калибровочной кривой, исходя из оптической плотности реакционных смесей, мг-экв галловой кислоты/л;

V экстракта – общий объем экстракта, мл;

m – масса навески, г;

10 – коэффициент пересчета.

## Приложение 2

### Методика определения общего числа флавоноидов

Извлечение флавоноидов из листьев стевии проводили путем однократной экстракции этанолом (70%) при нагревании на кипящей водяной бане в течение 45 мин. Для спектрофотометрических определений использовали извлечение с соотношением сырье – экстрагент 1 : 100.

Испытуемый раствор готовили следующим образом: 2 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл алюминия хлорида раствора 3% в спирте 95% и через 10 мин 2 капли разведенной кислоты уксусной. Объем раствора доводили спиртом этиловым 95% до метки и оставляли на 30 мин (раствор Б). В качестве раствора сравнения использовали раствор, приготовленный при тех же условиях, но без  $AlCl_3$ .

Содержание флавоноидов определяли спектрофотометрическим методом на приборе КФК. Спектр поглощения снимали при длине волны  $408 \pm 4$  нм в кювете с толщиной слоя жидкости 10 мм.

Содержание суммы флавоноидов рассчитывали по стандартному образцу рутина.

*Приготовление ГСО рутина.* Около 0,05 г (точная навеска) ГСО рутина, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 95% спирте этиловом и доводят объем раствора до метки тем же растворителем (раствор А').

2 мл раствора А' переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, приливают 2 мл 2% раствора алюминия хлористого в 95% спирте этиловом, 1 каплю 5% кислоты уксусной и доводят объем раствора 95% спиртом этиловым до метки.

Для приготовления раствора сравнения 2 мл раствора А' переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, приливают 1 каплю 5% кислоты уксусной и доводят объем раствора 95% спиртом этиловым до метки.

Содержание суммы флавоноидов в процентах (X) в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 100 \times 25 \times 1 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 2 \times 1 \times 50 \times 25 \times (100 - W)}, \text{ где:}$$

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора ГСО рутина;

m<sub>0</sub> – масса ГСО рутина, г;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

### Приложение 3

Калибровочная кривая. Содержание галловой кислоты

