

О ВОЗМОЖНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОФЛАВОНОИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Карлов Вадим Александрович

студент, Калининградский государственный технический университет, РФ, г. Калининград

Степанцова Галина Егоровна

научный руководитель, канд. техн. наук, доц., Калининградский государственный технический университет, РФ, г. Калининград

Фенольные соединения (ФС) или биофлавоноиды – это одна из крупнейших и значимых групп биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения. Разнообразные по своей структуре, они способны проявлять различные фармакологические свойства, например, антиоксидантные, противовоспалительные, антиаллергические и антикарциногенные [1]. Подобные свойства определили широкое применение ФС в таких областях как: пищевая промышленность, медицина и фармакология, сельское хозяйство [2].

В последнее время можно наблюдать возросший спрос к растительным добавкам, в том числе содержащим биофлавоноиды – так как они считаются более безопасными и эффективными альтернативами синтетическим препаратам. Все это привело к повышенному интересу ученых (Любимова Е.С. [3], Мещерякова Н.В. [4]) к способам выделения, определения, а также применения биофлавоноидов из различного растительного сырья.

Целью данной работы является исследования возможности определения соединений группы биофлавоноидов в растительном сырье методами ИК-спектроскопии, спектрофотометрии и пермарганатометрии.

Как уже упоминалось выше к группе биофлавоноидов относятся большое количество различных по своему строению соединений. На сегодняшний день к данной группе относятся около 5000 различных ФС [5]. Подобное разнообразие объясняется их распространением в природе. Биофлавоноиды можно обнаружить практически во всех растениях: в листьях, цветках, плодах, корнях. Большинство из биофлавоноидов являются пигментами растений (рутин, кверцетин), а также участвуют в обменных процессах, происходящих в растениях (регулируют транспорт растительных гормонов ауксинов).

Отдельно стоит выделить такую группу (подгруппу) биофлавоноидов как катехины. Это наиболее восстановленная форма флавоноидов, которая обладает ярко выраженной антиоксидантной активностью, которая в 40 раз сильнее, чем у одного из самых известных антиоксидантов – витамина Е (токоферола) [6]. Также соединения данной группы способны проявлять антиаллергические, противовоспалительные и противовирусные свойства. Все это показывает перспективность использования данных ФС в пищевой промышленности как растительных антиоксидантов и консервантов.

Что же является сырьем для выделения катехинов? Данная группа широко распространена в разнообразном растительном сырье: фрукты и овощи, лечебные растения и т.д. Стоит также выделить рекордсменов по содержанию катехинов – это чай (в особенности зеленый и белый), яблоки, какао бобы, виноград и черная смородина.

К широко применяемым методам определения катехинов из растительного сырья относятся - высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), тонкослойная хроматография (ТСХ), спектрофотометрия, гравиметрические измерения.

Остановимся по подробнее на каждом из этих методов. ВЭЖХ, пожалуй, один из самых распространенных методов при определении биофлавоноидов в растительном сырье. Позволяет разделить и идентифицировать как отдельные соединения в образце (биофлавоноиды в свободной форме), так и их комплексы (различные по длине полимеры).

Тонкослойная хроматография. Данный метод позволяет разделить, а также количественно определить катехины с использованием различных растворителей и хроматографических сред.

Спектрофотометрия – метод, который основан на измерении спектральных характеристик биофлавоноидов (катехинов, антоцианидов) в ультрафиолетовой и видимой области спектра. Спектрофотометрию используют для быстрого определения общего содержания катехинов в сырье. Данный метод в основном применяется в совокупности с другими аналитическими методами. Для различных биофлавоноидов, например катехинов, существуют различные модификации метода – например, метод Фолина-Денниса [7], позволяющий определять соединения данной группы в чае.

Гравиметрический метод. Метод основан на формировании комплекса между солями железа (III) и катехинами в кислой среде, с определением массы последнего. Сложность метода состоит – сложная и тщательная пробоподготовка. Однако при этом метод является довольно точным и надежным при определении общего содержания катехинов в образце.

Перечисленные методы представляют самые распространенные способы по определению катехинов в растительном сырье. Существуют также и менее используемые методы: спектроскопия, капиллярный электрофорез, масс – спектрометрию – все они применяются на практике, но куда реже нежели вышеописанные методы. Также стоит отметить, что выбор метода определения напрямую зависит от выбранного сырья, цели исследования и, конечно, доступного оборудования.

Необходимо остановиться на последнем пункте. Учебные заведения, небольшие частные производства и малобюджетные лаборатории далеко не всегда могут позволить себе сложное и дорогостоящее оборудование. Исходя из этого необходимо рассматривать применение и других методов определения, которые требуют меньшего количества дорогостоящего оборудования и тем не менее позволяют получать точные и достоверные результаты.

В качестве экспериментальной части была рассмотрена возможность определения катехинов в образцах чая (черного и зеленого). В качестве используемых методов были выбраны: ИК-спектроскопия, спектрофотометрия, а также пермарганатометрия. Все эксперименты проводились на базе Калининградского государственного университета (КГТУ).

Выбор сырья основывался на теоретических данных о количественном содержании катехинов в различных растительных продуктах. Так полифенольные соединения чая в большинстве своем представлены различными соединениями группы катехинов – как в свободной форме, так и в виде различных полимеров (танины) [8].

Однако для определения катехинов, последние надо «извлечь» из сырья. В основном все методы выделения катехинов сводятся к различным вариантам экстракции – с помощью ультразвука, различных растворителей (вода, спирт, реже иные), применение ферментов – и иных способов, главной задачей которых является максимизировать выход катехинов. В представленной работе был выбран метод описанный Г.В. Лазурьевским [9] – выделение чайных танинов (полимеров катехинов и галловой кислоты).

В результате экстракции, дальнейшей очистки и сушки были получены порошки: черного цвета (черный чай) и коричневого цвета (зеленый чай). Различие цвета объясняется степенью окисленности полифенольных соединений. Черный чай подвергается большей обработке в следствии чего происходит более сильное окисление ФС.

После чего были проведены качественные реакции с хлоридом железа (III), со смесью концентрированной азотной и серной кислот. В первом случае наблюдалось появление черно-синего окрашивание, что указывало на повышенное содержание эпикатехин галлата. Во

втором же случае наблюдалось образование коричнево-красного аморфного осадка флобафена.

Далее полученный порошок был использован для ИК-спектроскопии. Полученные спектры представлены на рисунках 1 (черный чай) и 2 (зеленый чай). Биофлавоноиды группы катехина имеют следующие пики: 1580, 1470, 1450, 1378, 1350, 1250, 1230, 1180, 1140, 1100, 1070, 1050, 1010, 970, 905, 870, 830, 800, 755, 700, 620, 582, 560, 510, 475, 460 cm^{-1} [10]. Как видно из полученных спектров в образце черного чая присутствуют эпикатехин и эпикатехин галлат (спектры данных веществ практически полностью совпадают). Также стоит отметить, что в черном чае катехины находятся в более окисленной форме, что можно понять по сдвигу спектров.



Рисунок 1. Инфракрасные спектры образца черного чая

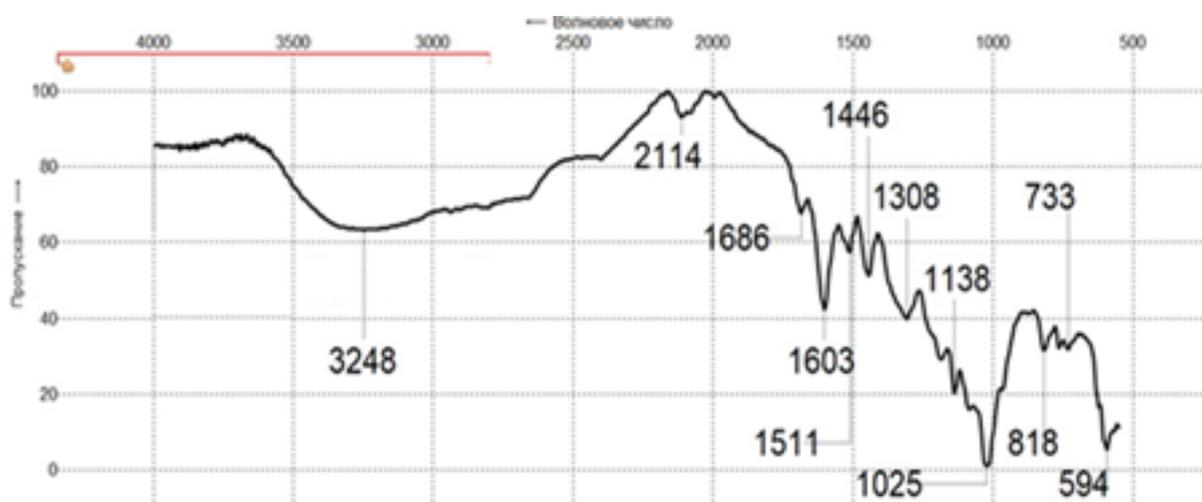


Рисунок 2. Инфракрасные спектры образца зеленого чая

Для спектрофотометрического метода были сначала получены спиртовые экстракты образцов чая (растворитель – 95% этанол). После чего растворы были разбавлены в 100 раз. Измерения проводились на спектрофотометре УФ-1200 при длине волны: 310 нм, 320 нм и 380 нм. Экспериментальные данные, а также расчет концентрации катехинов с использованием коэффициентов молекулярной экстинкции [11], представлены в таблице 1 и 2.

Таблица 1.

Результаты спектрофотометрического анализа образца черного чая

Длина волны, нм	Оптическая плотность	Разведение	К-нт молекулярной экстинкции, М ⁻¹ см ⁻¹	Сод. катех
310	1,640	1:100	34000	1,7
	1,639			
	1,641			
320	0,782		32000	0,7
	0,784			
	0,781			
380	0,105	12500	0,2	

Таблица 2.

Результаты спектрофотометрического анализа образца зеленого чая

Длина волны, нм	Оптическая плотность	Разведение	К-нт молекулярной экстинкции, М ⁻¹ см ⁻¹	Сод. катех
310	1,578	1:100	34000	1,7
	1,576			
	1,580			
320	0,734		32000	0,6
	0,734			
	0,736			
380	0,079	12500	0,1	

Для пермарганатометрического метода были получены водные экстракты образцов чая. После внесения индикатора - индигокармина, образцы титровали 0,01 н раствором перманганата калия. Формула пересчета (1) представлена ниже, экспериментальные данные и результаты расчетов представлены в таблице 3.

$$X = \frac{(a-b) \cdot K \cdot 0.728 \cdot V_1 \cdot 100}{m \cdot V_2} \quad (1)$$

Таблица 3.

Результаты пермарганатометрического анализа образцов чая

№ опыта	Кол-во перманганата	Объем экстракта на титрование, мл	К-нт пересчета	Содержание катехинов, мг/г
Черный чай				
1	2,0	10	0,728	3,64
2	2,2			4,37
Зеленый чай				
1	5,9	10	0,728	17,83
2	5,6			16,74

Выводы

В результате проведенных исследований была установлена возможность определения биофлавоноидов, на примере катехинов, в растительном сырье с применением методов ИК-спектроскопии, спектрофотометрии и пермарганатометрии. С помощью данных методов

экспериментально было установлено качественно и количественно содержание катехинов в образцах черного и зеленого чая.

По данным проведенных экспериментов в составе зеленого чая количество менее окисленных форм катехинов намного выше: в 4 – 5 раз относительно образцов черного чая. Это является результатом более серьезных процессов обработки, которые проходит черный чай.

Используемые в исследовании методы являются перспективными для внедрения и применения на малых предприятиях и в небольших лабораториях, которые специализируются на переработке растительного сырья. Данные методы позволяют получать результаты о качественном и количественном содержании катехинов в короткие сроки и с высокой точностью и достоверностью.

Список литературы:

1. Зайцева Л.В. Фармакологические свойства биофлавоноидов и их использование в медицине. // Тихоокеанский медицинский журнал. - 2012. - № 2. - 102-105 с
2. Федорова Л.А. Биофлавоноиды в промышленности и медицине // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Химия. - 2010. - Т. 8. - № 2. - 9-17 с
3. Любимова Е.С. Биофлавоноиды как новая группа лекарственных препаратов // Медицинский совет. - 2015. - № 10. - 34-37 с
4. Мещерякова Н.В. Антиоксиданты и здоровье человека // Медицинский совет. - 2019. - № 12. - 42-47 с
5. Ширшов В.Н., Ковалев В.А. Биофлавоноиды и их роль в организме человека. Вестник Московского университета. Биология. - 2016. - №16. - 48-57 с
6. Yang C.S., Zhang J. Mechanisms of body weight reduction and metabolic syndrome alleviation by tea// Molecular Nutrition & Food Research. – 2019. – Т. 63, № 10. – С
7. Slinkard K., Singleton V.L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture. – 1977. - № 28. - 49-55 p
8. Бубнова М.Г., Бузина О.И. Полифенолы чая: влияние на здоровье человека // Вестник Северо-Восточного федерального университета имени М. К. Аммосова. - 2011. - Т. 8. - № 4. - 4-10 с
9. Лазурьевский Г.В., Терентьева И.В. Практические работы по химии природных соединений / Г.В. Лазурьевский, И.В. Терентьев – М.: «Высшая школа», 1966. – 248 – 250 с
10. Yang C.S., Landau J.M. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. Annual Review of Nutrition. – 2009. - № 19. - 21-46 p
11. Sanna D., Delogu G. Simple spectrophotometric methods for determination of total polyphenol and tannin contents in artichoke extracts. Molecules. – 2014. - № 19. - 7195-7206 p