

Н. В. Демина, А. А. Кочетов, Я. А. Шевченко,
И. Н. Сметанская, А. В. Канарский, З. А. Канарская

ПОЛИФЕНОЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА ЭКСТРАКТОВ СТЕВИИ

Ключевые слова: генотипы стевии, температура экстракции, полифенольные вещества.

Установлено, что эффективной температурой экстракции полифенолов из листьев стевии водно-метанольной смесью является температура в 80 - 90 °С. Показано существенное различие по полифенольным компонентам между некоторыми образцами генотипов стевии, выращенными из семян компании «Richters», Канада (более 10 %).

Keywords: genotypes stevia extraction temperature, polyphenolic substances.

Found that the effective temperature of extracting polyphenols from the leaves of stevia methanol-water mixture is the temperature at 80 - 90 °C. A significant difference in polyphenolic components of genotypes between samples Stevia grown from seed company «Richters», Canada (10 %).

Актуальность. В последнее десятилетие значительно интенсифицировались исследования стевии - новой культуры из Южной Америки, в листьях которой содержится комплекс сладких веществ - дитерпеновых гликозидов, являющихся диетическими сахарозаменителями. Их сладость превышает сладость сахарозы в сотни раз и они, как и другие компоненты листьев стевии, безопасны для человека при длительном употреблении [1, 2]. Помимо исследования сладких гликозидов стевии большое внимание уделяется изучению других соединений, содержащихся в ее листьях и определяющих ряд полезных свойств этого растения. Среди этих свойств - антиоксидантная, иммуномоделирующая, противовирусная, гипогликемическая и гастропротекторная активность, влияние на кровяное давление и функцию почек, а также ряд других биологических свойств, подробно рассмотренных в обзоре [2].

Среди различных групп химических соединений, содержащихся в листьях стевии, полифенолы являются одними из наиболее важных. Полифенолы - собирательное название целого класса органических соединений, молекулы которых имеют в своем составе фенольные группы. По химической природе они разделяются на три основных группы: терпены (терпеноиды, изопреноиды), фенилпропаноиды и их производные (флавоноиды, танины, лигнаны, гликозиды), а также азотсодержащие соединения (алкалоиды и гетероциклические ароматические молекулы). Растительные полифенолы, являясь мощными антиоксидантами, защищают клетки организма человека от повреждающего действия свободных радикалов и поддерживают их нормальные функции, замедляя старение. Кроме того, полифенолы обладают гепато- и радиопротекторной, желчегонной активностью, усиливают регенеративные процессы [3]. Широкий спектр биологических эффектов растительных полифенолов реализуется через неспецифические взаимодействия с различными мишенями — от белков до низкомолекулярных веществ и даже ионов.

В листьях стевии обнаружено высокое содержание одного из полифенолов - хлоргеновой кислоты [4, 5]. Эта кислота относится к семейству производных коричной кислоты и обладает сильными антиоксидантными, противовирусными, антибактериаль-

ными и антигрибковыми свойствами, проявляет гипогликемическое, гипохолестеринемическое, противораковое и гепатопротекторное действие. Установлены ее пребиотические свойства [6].

Целью настоящей работы являлось изучение содержания полифенолов в экстрактах листьев стевии разных генотипов и их возможная связь с антиоксидантной активностью, которая была изучена в нашем предыдущем исследовании [7].

Материалы и методы

Образцы стевии различных генотипов были выращены в условиях светокультуры и открытого грунта Северо-Запада России. Их морфологические особенности и продуктивность описаны в предыдущей работе [7]. Для анализа использовали среднюю пробу из сухих листьев 5 - 6 растений одного генотипа.

Получение экстракта из листьев стевии

Предварительно измельченные до порошкообразного состояния образцы листьев стевии взвешивали и засыпали в пробирки объемом 2 мл и добавляли по 1,5 мл 70 % метанола. Масса навески составляла около 0,1 г. Затем пробирки с образцами устанавливали в водяной термостат - экстрактор Stuart SBH 130D. Экстракцию проводили в течение 5 минут при температурах 60 °С, 70 °С, 80 °С, 90 °С и 100 °С.

Разделение экстракта и шрота стевии в пробирках проводили центрифугированием в течение 10 мин. при 10000 об/мин. Фугат сливали, к осадку добавляли 700 мкл метанола. Затем экстракцию повторяли в течение 5 минут при тех же температурах. Разделение экстракта и шрота стевии в течение 10 мин., при 10000 об/мин. Фугат после двух экстракций смешивали в пробирке объемом 2 мл.

Определение содержания полифенолов в экстракте листьев стевии

Определение содержания полифенолов в экстракте листьев стевии проводили по ГОСТ Р ИСО 14502-1-2010 Чай. Метод определения общего содержания полифенолов [8].

20 мкл экстракта из листьев стевии доводили до метки 2,0 мл дистиллированной водой, добавляли 1 мл разведенного реагента Folin-Ciocalteu.

Через 8 минут добавляли 800 мкл раствора Na_2CO_3 , хорошо перемешивали и через 60 минут готовый экстракт помещали в кювету для измерения оптической плотности при длине волны 765 нм (контроль: вода). Количество полифенолов определяли в расчете на сухую массу образца формуле:

$$w_T = \frac{(D_{\text{sample}} - D_{\text{intercept}}) \cdot V_{\text{sample}} \cdot d \cdot 100}{S_{\text{std}} \cdot m_{\text{sample}} \cdot 10000 \cdot w_{DM, \text{sample}}},$$

где D_{sample} - оптическая плотность раствора; $D_{\text{intercept}}$ - оптическая плотность, соответствующая точке пересечения калибровочной зависимости с осью; S_{std} - тангенс угла наклона градуировочной прямой; m_{sample} - масса пробы, г; V_{sample} - объем экстракта, см³; d - коэффициент разбавления, используемый до колориметрического анализа; $w_{DM, \text{sample}}$ - массовая доля сухого вещества в пробе, %.

Калибровочный график создают по галловой кислоте.

Результаты и обсуждение

Влияние температуры экстракции на содержание полифенолов в различных образцах стевии было сходным. Наибольшее количество полифенолов экстрагировалось из листьев всех вариантов при температурах 80 – 90 °С. В интервале температур от 60 до 90 °С наблюдали постепенное увеличение содержания полифенолов в экстрактах, которое затем резко падало при 100 °С (рис.1).

Наблюдаемая тенденция аналогична обнаруженной нами зависимости влияния температуры на экстракцию веществ с антиоксидантной активностью (АА) из листьев стевии [7]. Возможное объяснение этому факту сходно с тем, что нами предложено при изучении АА. При низкой температуре происходит неполная экстракция полифенолов; при увеличении температуры экстракции до 80 – 90 °С увеличивается выход экстрактивных веществ.

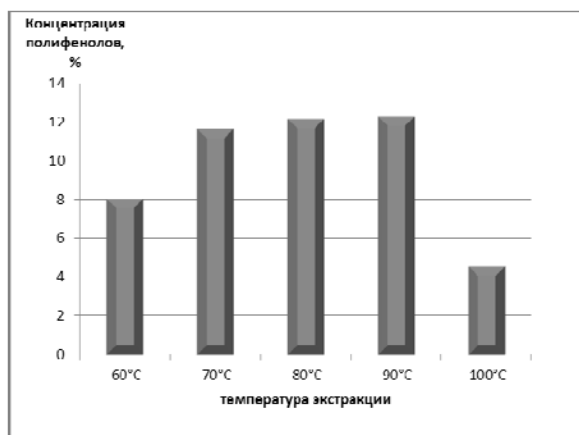


Рис. 1 - Содержание полифенолов (среднее по всем образцам) в экстрактах листьев стевии при разных температурах экстракции

При 100 °С уменьшение содержания полифенолов в экстрактах, видимо, связано с их разложением. Наблюдаемая закономерность может подтверждать тот факт, что полифенолы составляют значительную часть веществ с АА, и аналогичны им по физико-химическим свойствам [9].

В результате проведенных исследований обнаружены различия в содержании полифенолов у образцов стевии с разными генотипами, которые в целом не оказались значимыми (кроме образца 10). Эти различия сильнее проявлялись при температуре экстракции 80 – 90 °С, слабее - по среднему показателю в интервале 60 – 100 °С. Наименьшее содержание полифенолов в листьях стевии выявлено у образцов № 4 и 9, наибольшее – у образца № 10. Ранжирование генотипов стевии по содержанию полифенолов не совпадало с их ранжированием по АА (рис. 2).

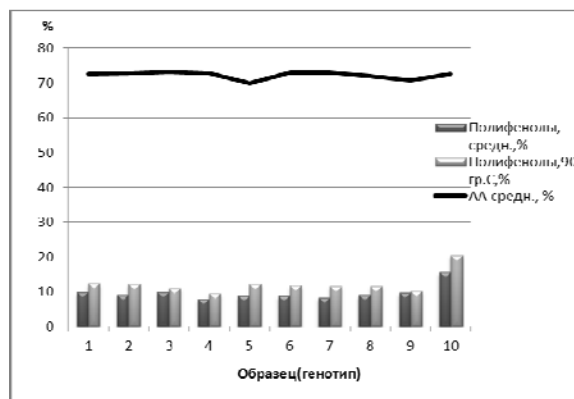


Рис. 2 - Содержание полифенолов и АА в метанольных экстрактах из сухих листьев разных генотипов стевии, выращенных в светокультуре

Это может свидетельствовать о том, что содержание полифенолов не является определяющим в АА образца и имеется группа других соединений, влияющих на общую АА метанольной вытяжки из листьев стевии.

Выводы

1. Эффективной температурой экстракции полифенолов из листьев стевии водно-метанольной смесью является температура в 80-90 °С.

2. Различия по содержанию полифенолов в экстрактах листьев стевии у изученных образцов в целом не сильно выражены. Однако, существенное различие по этим компонентам между некоторыми образцами, позволяет предположить, что поиск генотипов стевии с повышенным содержанием полифенолов может быть перспективен.

Литература

1. Brandle J.E., Telmer P.G. Steviol glycoside biosynthesis // *Phytochemistry*. 2007. № 68. 1855– 1863.
2. Madan et al. Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni – Review // *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 2010. V. 1 (3). P. 267 – 286.

3. *Запрометов М.Н.* Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М. 1993. 272 с.
4. *Храмов В.А., Дмитренко Н.В.* Хим.-фарм. журн. 2000. № 11. С. 34 – 35.
5. *Подпорина Г.К., Жужжалова Т.П., Верзилина Н.Д., Полянский К.К.* Сахарная свекла. 2007. №6. С. 36 – 37.
6. *Левицкий А.П., Вертикова Е.К., Селиванская И.А.* Мікробіологія і біотехнологія. 2010. № 2. С. 6 – 20.
7. *Демина Н.В., Кочетов А.А., Шевченко Я.А., Сметанская И.Н., Канарский А.В., Канарская З.А.* Вест. Казан. технол. универ. Т. 16. № 20. 2013. 144 – 148.
8. ГОСТ Р ИСО 14502-1-2010 Чай. Метод определения общего содержания полифенолов <http://docs.cntd.ru/document/1200084833>.
9. *М.А. Сысоева, О.Ю. Кузнецова, В.С. Гамаюрова, П.П. Суханова, Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников* Структурная организация и свойства полифенолов чаги. Вест. Казанс. Технол. универ. – 2005. – № 1. – С. 244 - 250.

Н. В. Демина – асп. каф. пищевой инженерии малых предприятий КНИТУ, raxona@rambler.ru; **А. А. Кочетов** - зав. лаборатории экофизиологии растений, Агрофизический НИИ РАСХН, kochetoval@yandex.ru; **Я. А. Шевченко** - University of Allipedschences Weihenstephan Triesdorf, Agricultural Faculty, Triesdorf, yaroslav_shevchenko@yahoo.com; **И. Н. Сметанская** - University of Allipedschences Weihenstephan Triesdorf, Agricultural Faculty, Triesdorf, iryna.smetanska@hswt.de; **А. В. Канарский** - профессор каф. пищевой биотехнологии, alb46@mail.ru; **З. А. Канарская** - доцент каф. пищевой биотехнологии, КНИТУ, zosya_kanarskaya@mail.ru.