

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАНА
ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи

УДК: 575.23:.85:. 662

ТАИРОВ АНВАРЖОН БАХТИЕРОВИЧ
ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ
РАСТЕНИЙ

Специальность 5А320501-биотехнология (производство пищевых продуктов
и биопрепараты для сельского хозяйства)

ДИССЕРТАЦИЯ

На соискание академической степени
магистра

Научный руководитель:

к.б.н., доц. Артикова Р.М.

Научный руководитель:

к.х.н. с.н.с. Маликова М.Х.

СОДЕРЖАНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ	3
Глава I	ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	9
1.1	Антиоксиданты растительных материалов	9
1.1.1	Аскорбиновая кислота как антиоксидант	15
1.2	Биофлавоноиды-первое семейство растительных антиоксидантов	19
1.3	Разнообразие флавоноидов	24
1.4	Роль флавоноидов в растениях	25
1.5	Антиоксидантная активность флавоноидов	27
1.6	Противоопухолевая активность флавоноидов	32
Глава II	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	34
2.1	Объекты исследования (Биологическое описание растений, обладающих антиоксидантной активностью)	35
2.1.1	Лимон обыкновенный (<i>Citrus limon</i>)	36
2.1.2	Шиповник коричный (<i>Rosa majalis</i>)	36
2.1.3	Малина	38
2.2	Приготовление растворов	38
2.3	Методы исследования	39
2.3.1	Определение влажности плодов	39
2.3.2	Метод определения витамина С в исследуемых материалах	40
2.3.3	Экстрагирование флавоноидов из растительного сырья	40
Глава III	РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	42
3.1.	Изучение антиоксидантной активности растений	43
3.1.1.	Определение антиоксидантной активности лимона обыкновенного и шиповника коричневого	44
3.1.2	Определение содержания витамина С в составе некоторых фруктов и овощей	45
3.2.1	Определение витамина С в свежавыжатом соке яблока	45
3.2.2	Определение витамина С в свежавыжатом соке красного перца.	45
3.2.3	Определение витамина С в свежавыжатом соке цветной капусты.	46
3.2.4	Определение витамина С в цветной капусте после термической обработки.	47
3.3.1	Изучение полифенольных соединений	49
3.3.2	Количественная оценка содержания флавоноидов в плодах боярышника, вишни и шиповника различными способами консервации	54
3.3.3.	Количественная оценка содержания антоцианов в плодах малины различными способами консервации.	
	Выводы	64
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	65
	ПРИЛОЖЕНИЕ	

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проявляется большой интерес к определению антиоксидантной активности различных продуктов питания и напитков, так как антиоксиданты – обширная группа биологически активных соединений, которые выполняют главную защитную функцию, выраженную в способности нейтрализовать негативное воздействие свободных радикалов.

Несколько последних десятилетий свободные радикалы являются объектом многочисленных исследований. Существуют доказательства, что они причастны к возникновению и развитию более чем 50 различных заболеваний человека и животных.

Антиоксиданты (АО) – вещества, способные тормозить процессы радикального окисления органических и высокомолекулярных соединений, тем самым снижая выход продуктов этого окисления: гидроперекисей, спиртов, альдегидов, кетонов, жирных кислот и т.д.. Это является очень важным, так как свободные радикалы в организме человека становятся причиной преждевременного старения, лучевой болезни, токсикозов, заболеваний сердечно-сосудистой системы, различных видов злокачественных опухолей, нейродегенеративных заболеваний (паркинсонизм, болезнь Альцгеймера и др.) [1].

Способность АО нейтрализовать СР зависит не только от их общей концентрации, но и от скорости реакций. В зависимости от структуры АО могут захватывать радикалы с различной скоростью и поэтому они проявляют различную активность. Среди АО можно выделить соединения, имеющие в своей структуре ароматические кольца, связанные одной или несколькими гидроксильными группами (витамины А, D, Е, К, F; убихиноны, триптофан, фенилаланин, флавоноиды, каротины и каротиноиды); вещества, имеющие в своем составе SH-группы (глутатион, эрготеин, серосодержащие аминокислоты: цистеин, цистин, метионин). Кроме того, антиоксидантные свойства проявляют многие химические соединения, в том числе и

низкомолекулярные, относящиеся к различным химическим классам, а именно аскорбиновая кислота (витамин С), мочевины, мочевая кислота, церуплазмин, ликопен, большинство пигментов (каротиноиды, флавоноиды, билирубин). Все эти вещества являются либо «ловушками» АФК, либо разрушают перекисные соединения. Витамин С или аскорбиновая кислота $C_6H_8O_6$ играет важную роль в жизнедеятельности человека и животных. Аскорбиновая кислота является мощным антиоксидантом, который задерживает процесс старения, препятствует возникновению рака и сердечных нарушений. Она необходима для поддержания здоровых зубов, десен, костей, хрящей, соединительной ткани, кровеносных сосудов и стенок капилляров.

Этот витамин нужен для образования коллагена – основного структурного материала организма. Работает как антиоксидант и охраняет другие антиоксиданты (такие как витамин Е и бета-каротин) от разрушения свободными радикалами. Предотвращает образование в желудке канцерогенных веществ из нитратов и нитритов, попадающих туда с водой или с консервированной пищей. Витамин С укрепляет иммунную систему. Иммунные клетки накапливаются в количестве, в сто раз превышающем его содержание в крови.

В отличие от многих животных организм человека не способен синтезировать витамин С, поэтому мы должны постоянно получать его с пищей. Наиболее богаты аскорбиновой кислотой следующие продукты: киви, шиповник, красный перец, цитрусовые, чёрная смородина, лук, томаты, листовые овощи (салат, капуста, брокколи, брюссельская капуста, цветная капуста, и т.д.), печень, почки, картофель. В результате дефицита витамина С наблюдается ослабление иммунной системы, замедление регенерации тканей, кровоточивость десен, выпадение зубов, варикозное расширение вен, излишний вес, повышенная утомляемость и раздражительность, плохая концентрация внимания, депрессии, бессонница, раннее образование морщин, выпадение волос, ухудшение зрения. Суточная потребность

человека в витамине С-100мг. Витамин С легко разрушается при термической обработке продуктов и действии света.

Таким образом, хорошее средство для поддержания бодрости, молодости и здоровья – употребление в пищу продуктов, богатых витамином С.

В последнее время большой интерес уделяется флавоноидам, часто называемым биофлавоноидами, образование которых происходит только в растительных тканях. Установлено, что они являются важными компонентами пищи человека и животных и защищают их от оксидативного стресса [2].

К основным классам флавоноидов относятся флавоны, флаваноны, дигидрохалконы, халконы, антоцианидины, флаванолы (дигидрофлавонолы), флавонолы, и изофлавоноиды. Интерес к природным флавоноидам связан с их выраженными антиоксидантными свойствами, для ряда флавоноидов показаны их антиаллергенные, противовоспалительные, противовирусные, антибактериальные свойства и другие типы биологической активности [3].

Регулярное профилактическое потребление соответствующего количества антиоксидантов с пищей позволит восстановить до нормы антиоксидантный статус организма и сохранить здоровье и продолжительность полноценной жизни [4].

Эффективными перехватчиками СР являются и другие ароматические соединения. Их действующим началом, позволяющим проявлять данные свойства, является гидроксильная группа, присоединенная к ароматическому кольцу. Отмечено противовоспалительное действие полифенолов, вырабатываемых растениями, благодаря способности к улавливанию СР [5]. Найдено около 800 видов полифенолов, которые содержатся в корнях, стеблях, цветах и листьях растений в виде фенольных кислот, флавоноидов, изофлавоноидов, танинов и т.д., которые могут быть использованы при лечении сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, а также при производстве косметических препаратов и БАД к пище.

Богаты полифенольными соединениями ягоды и плоды, различные соки, красные вина, лук, чеснок, чай, кофе, оливковое масло, пиво и т.п., которые постоянно и в значительном количестве поступают в организм человека как пищевые компоненты. В целом, потребность человека в данных соединениях, принятая условно как временная норма в ряде стран, на уровне 100 мг (в пересчете на кверцетин) в сутки может быть удовлетворена за счет овощей и чая; фрукты и ягоды являются важным сезонным источником поступления их в организм [6]. Определение суммарной концентрации и активности антиоксидантов в пищевых продуктах [7].

Почти во всех растительных источниках полифенолы присутствуют вместе и часто с аскорбиновой кислотой. Совместно с аскорбиновой кислотой они участвуют в окислительно-восстановительных процессах.

Аскорбиновая кислота (витамин С, γ -лактон-2, 3-дегидро-L-гулоновой кислоты) является основным АО среди других низкомолекулярных водорастворимых соединений; она обладает чрезвычайно широким набором АО-свойств: снижает уровень супероксиданион-радикала, синглетного кислорода, гидроксильного радикала, органических радикалов, перекисного радикала, гипогалоидов и восстанавливает окисленную форму витамина Е и глутатиона, тем самым возвращая им АО-свойства. Витамин принимает участие в синтезе коллагена и эластина, образовании гликозоамингликанов, в обмене холестерина, гистамина и ацетилхолина [8].

Аскорбиновая кислота обладает способностью восстанавливать промежуточные радикалы, образующиеся из других АО в их реакциях с радикалами. Так, она восстанавливает α -токоферильный радикал, а также арилоксифлавоноидные и урацильные радикалы. Эти свойства аскорбиновой кислоты позволяют ей регенерировать другие АО [9.], но в определенных условиях она способна проявлять и прооксидантные свойства. Это согласуется с результатами исследований [8], которые предполагают, что аскорбиновая кислота выступает, прежде всего, как фактор защиты от радикальных продуктов восстановления кислорода. Возможно, механизм ее

действия в этом случае связан с тем, что благодаря наличию в этой ее форме диенольной группировки аскорбиновая кислота обладает сильно выраженными восстановительными свойствами и, как хороший донор электронов, способствует превращению гидроксильных радикалов в гидроксид-ионы, выполняя таким образом антиоксидантную функцию, снижая уровень СР в системе. Механизм действия аскорбиновой кислоты в биосистемах в большей мере зависит от ее концентрации. Так, при концентрациях, меньше чем $9 \cdot 10^{-4}$ моль/л, она может проявлять прооксидантные свойства.

Механизм регенерирования одного АО другим может играть важную роль *in vivo*. Полифенолы и другие соединения могут служить первичными акцепторами радикалов и образовывать менее опасные СР, которые могут восстанавливаться аскорбиновой кислотой. Таким образом, при нормальных физиологических условиях АО могут и не уничтожаться радикалами в стехиометрических количествах. В этом случае полифенолы можно рассматривать как пример своеобразных катализаторов окисления аскорбиновой кислоты радикалами.

Таким образом, последовательность, в которой АО расходуются, присутствуя в смеси, может сильно отличаться от той последовательности, в которой они располагаются в соответствии со своей реакционной способностью по отношению к радикалам-окислителям. Это приводит к тому, что суммарный защитный эффект смеси различных АО может быть значительно выше величины, рассчитанной как сумма активностей индивидуальных компонентов с учетом их концентраций. С этой точки зрения регулярное употребление в пищу, даже в малых дозах, разнообразных природных АО может быть гораздо более выгодным, чем употребление одного, даже очень активного АО. Многие пищевые продукты содержат как большое количество, так и большое разнообразие активных АО.

Сложность определения активности АО-систем заключается в том, что активности каждого АО существенно зависит от среды и условий его

функционирования. В разных экспериментальных системах выявляемые АО-свойства препаратов различны, что зависит как от типа окислительных реакций, так и от условий их протекания. Ярким примером служит убихинон, который в митохондриях является как основным АО, так и прооксидантом; ионы металлов переменной валентности в окисленном состоянии (Fe^{3+} , Al^{3+} , La^{3+}) ингибируют СР, а в некоторых случаях сами «активированные кислородные метаболиты», такие как NO и O_2^- , выступают в качестве АО.

Актуальность темы: На сегодняшний день изучение антиоксидантных свойств природных веществ и биообъектов, а также создание объективного, надежного и воспроизводимого экспресс-метода определения антиоксидантной активности пищевых продуктов и напитков, растительного сырья, фитопрепаратов на его основе, биологически активных добавок является одной из актуальных проблем.

Актуальность задач определяется и тем, что в настоящее время в ведущих странах широко дискутируется вопрос о нормировании показателя содержания АО при сертификации и использовании его в качестве объективного критерия, как положительного влияния антиоксидантных веществ на здоровье человека, так и показателя высокого качества поступающих на рынок продуктов питания и напитков.

В связи с вышепредставленными материалами определена актуальность проблемы.

Целью нашей работы явилось изучение антиоксидантной активности растений (плоды шиповника коричневого и лимона обыкновенного,).

Для реализации цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить особенности лимона, шиповника их антиоксидантную активность;
2. Определить содержание аскорбиновой кислоты в плодах лимона обыкновенного, шиповника коричневого;
3. Определить содержание полифенольных соединений в составе винограда;

5. Определить содержания антиоксидантов в составе некоторых фруктов и овощей.

Гипотеза работы – если исследуемые растения обладают антиоксидантной активностью, то количество антиоксидантов зависит от вида растения.

Теоретическая значимость - в результате проделанной работы определено содержание аскорбиновой кислоты в лимоне обыкновенном, шиповнике коричном, в некоторых овощах и фруктах, определена полифенольные соединения винограда.

Исследуемые растения обладают антиоксидантной активностью, то количество антиоксидантов зависит от вида растения. Теоретическая значимость - в результате проделанной работы определено содержание аскорбиновой кислоты в лимоне обыкновенном, шиповнике коричном, в некоторых овощах и фруктах, определена полифенольные соединения винограда.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Антиоксиданты растительных материалов

Антиоксиданты — вещества, замедляющие или предотвращающие окисление органических соединений. Они защищают организм от негативных воздействий свободных радикалов. Антиоксидант соединяется со свободным радикалом и ставит заслон разрушительному действию лишнего электрона. С помощью ферментной защитной системы организм преобразует клеточный оксидант в воду и кислород (нерадикал) [10].

В организме имеется собственная система борьбы с излишним количеством свободных радикалов, но она ослабляется под воздействием загрязненной среды, курения, прямых солнечных лучей и нуждается в поддержке. Было обнаружено, что многие растения содержат вещества флавоноиды – большую группу соединений с полифенольной структурой, которые связывают свободные радикалы, т.е. являются антиоксидантами.

В организме постоянно образуются свободные радикалы, поэтому от них должна существовать антиоксидантная защита, являющаяся одним из важнейших компонентов иммунитета в целом. Важно дополнять свой пищевой рацион природными веществами – антиоксидантами, которые усиливают защиту от свободных радикалов, повышают тем самым иммунитет, устойчивость организма к воздействию неблагоприятных внешних факторов, замедляют процессы старения [11].

Оксиданты или окислители - это очень активные обрывки молекул, которые имеют неспаренный электрон и стремятся вступить в химическую реакцию со всем, что встречается им на пути. В небольших количествах свободные радикалы играют полезную роль в поддержании здоровья, принимая участие в миллионах химических реакций, каждую секунду происходящих в клетках. Они помогают усваивать пищу и бороться с болезнетворными бактериями, грибами и вирусами. Однако воздействие интенсивной физической нагрузки, а также загрязненной питьевой воды, курения, радиации приводит к сбоям природных механизмов контроля. Тогда

активность свободных радикалов резко возрастает, разрушая наш организм. Выходя из-под контроля организма, свободные радикалы наносят заметные повреждения. Они разрушают клетки, повреждая клеточные мембраны. Или, вызывая мутации, изменяют структуру ДНК клетки.

Свободные радикалы (оксиданты) - побочный продукт обмена веществ в организме. Известно пять основных оксидантов: супероксидные радикалы, перекись водорода, гидроксильные радикалы, жирные пероксирадикалы и атомарный кислород. В первую очередь свободные радикалы опасны тем, что разрушают оболочки наших клеток, а также наносят повреждение Святой - молекуле ДНК, хранительнице всей генетической информации. Словом, свободные радикалы (оксиданты, окислители) разрушают или окисляют всё, что попадает им «под руку»: молекулы, клетки, органы и весь организм целиком. Признано, что именно свободные радикалы являются основной причиной старения! Итак, свободные радикалы - это агрессивные формы кислорода, которые окисляют различные вещества в нашем организме. Продолжительность жизни лабораторных животных, получающих сильные вещества антиокислители (антиоксиданты), увеличивается на 60%. Если ученые найдут хорошее и безопасное противooksидлительное средство, то вполне возможно будет продлить жизнь без серьёзных болезней до 100 и более лет.

Подобно другим антиоксидантам катехины, найденные в зеленом чае, избирательно подавляют специфическую активность ферментов, которая приводит к раку. Они также могут определять и восстанавливать изменения ДНК, вызванные оксидантами. В настоящее время в качестве антиоксидантов используют:

Витамины-антиоксиданты: бета-каротин (про-витамин) и другие каротиноиды (астаксантин, ликопен, лютеин и др.), А, С, Е. Каждый витамин выполняет свою собственную функцию. Поэтому необходимо, чтобы каждый из них присутствовал в ваших продуктах питания.

- **Бета-каротин.** Каротиноидный предшественник витамина А. Связывает атомарный кислород и пероксильные радикалы. Защищает уязвимую (липидную) оболочку клетки. Содержится в яркоокрашенных зеленых, оранжевых, желтых фруктах и овощах. Например, в моркови, тыкве, абрикосах, манго, папайе, красном перце, шпинате, капусте, репе, дыне, сладком картофеле и темно-зеленых овощах, например, в брокколи [50. www.antioxidant-of-food.bessmertie.ru].

- **Витамин С.** Содержится в красном и зеленом перце, киви, апельсинах, грейпфрутах, томатах, картофеле, капусте, клубнике и т. д.

- **Витамин Е (d-альфа токоферол).** Главный жирорастворимый антиоксидант. Защищает жирные кислоты внутри и вокруг клеток от свободных радикалов и липидного окисления. Также известный как токоферол содержится в любой растительной пище, но особенно богаты им растительные масла (естественно растительного отжима) оливковое, кукурузное, арахисовое, кунжутное, миндальное, масло пшеничных зародышей, в пшеничных ростках, [50]

Микроэлементы-антиоксиданты: Селен. Основной минеральный антиоксидант и дезактиватор свободных радикалов. Участвует в синтезе фермента глутатионной пероксидазы. Рекомендуемая доза — 200-400 мг в день (I-селенометионинная форма), цинк, медь, хром, марганец и др.

Натуральные (растительные) антиоксиданты или биофлавоноиды: экстракты из косточек или кожуры красного винограда, коры деревьев, черники, зелёного чая и т.п.

Аминокислоты-антиоксиданты: метионин, тирозин, цистеин, таурин и др. Альфа-липоидная кислота. Липоидная кислота не является витамином, но она существенна для жизнедеятельности организма. Она защищает клетки и преобразует окисленный глутатион в его более функциональную форму. Рекомендуемая доза — 50-100 мг в день. Сильными и популярными антиоксидантами являются также янтарная и липоевая кислоты, коэнзим Q10, мелатонин и др.

Ликопен. Мощный каротиноид, связывающий атомарный кислород и пероксильные радикалы. Защищает липидную оболочку клетки. Содержится в помидорах. Рекомендуемая доза — 5-10 мг в день[50].

Растительные экстракты. Экстракт китайского лимонника. Растение с ярко выраженной способностью защищать печень и обладающее антиоксидантным свойством. Рекомендуемая доза — 200-300 мг в день, Экстракт виноградных косточек. Мощный антиоксидант, содержащий 95% процианидов (полифеноловые олигомеры), которые обладают свойством связывать свободные радикалы и подавлять активность коантиновой оксидазы, фермента, включающего цепное производство кислородных радикалов. Экстрагируется из косточек красного винограда. Рекомендуемая доза 50-100 мг в день.

Экстракт гингко билоба. Защищает клеточные мембраны от липидного окисления, особенно миелиновую оболочку нервов и клеток мозга. Экстракт, полученный из листьев дерева гингко билоба, содержит 24 процента флавогликозидов. Рекомендуемая доза — 120мг в день. Экстракт чертополоха морского. Главный защитник печени. Экстракт должен содержать 70 или больше процентов силимарина. Рекомендуемая доза — 300-600 мг в день. Экстракт зеленого чая. Полифеноловый антиоксидант, богатый катехинами, связывает анионные радикалы, супероксиды, перекись водорода. Экстракт должен содержать как минимум 50 процентов катехинов и полифенолов. Рекомендуемая доза — 300-700 мг в день[50].

Антиоксиданты вырабатываются нашим организмом, однако с возрастом их становится все меньше и меньше. Теряем мы их и во время стрессов, неправильно питаясь, из-за курения, экологически загрязненной атмосферы. Тормозить свободные радикалы становится некому, и организм раньше времени стареет. Впрочем, по последним научным данным, весь комплекс антиоксидантов можно получить, съедая за день десять виноградных косточек (только их нужно хорошо разжевывать). Наиболее перспективные из антиоксидантов — натуральные биологически активные

продукты, в частности продукты пчеловодства: мед гречишный, липовый, донниковый, полифлерный, цветочная пыльца, перга, нативное маточное молочко, прополис (прополисное масло). Наибольший антиоксидантный эффект дают прием мёда, маточного молочка и прополиса.

Многие врачи рекомендуют приём добавок с антиоксидантами, однако, еще не изучены побочные эффекты длительного приема подобных добавок, поэтому лучше всего придерживаться политики здорового питания.

В растениях было обнаружено около 5000 флавоноидов – антиоксидантов с широким спектром целебного воздействия. Они обладают сосудорасширяющими, противоопухолевыми, противовоспалительными, бактерицидными, иммуностимулирующими и противоаллергическими свойствами [12].

Среди антиоксидантов растений есть и полифенолы. Многие травяные добавки — сибирский женьшень (адаптоген), гингко билоба (стимулятор умственной деятельности), чертополох морской (защищает печень), куркума длинная (противовоспалительное действие) и черника (зрение, ревматоидный артрит) — помимо своих основных свойств, являются еще и антиоксидантами. В травяных экстрактах биоактивные ингредиенты освобождены от клеточных стенок – за счет этого они легче усваиваются организмом. Чтобы добавка давала максимальный эффект, она должна содержать строго стандартизированное количество биоактивных веществ: сибирский женьшень — 0,5% элеутерозида E, гингко билоба — 24% флавогликозидов, морской чертополох – 80% силимарина, куркума длинная — как минимум 80% куркуминоидов, черника — 25% антоцианидинов. Необходимо выбирать только такие травяные добавки, в которых точно соблюдены все эти показатели [12.].

Любой организм можно рассматривать как образец работы сбалансированной и отлаженной антиоксидантной системы, состоящей из многих компонентов - это и витамины (витамины C, E, P), и ферменты (глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза), и микроэлементы (селен,

цинк), и полифенольные соединения (флавоноиды), и серосодержащие аминокислоты (цистеин, метионин), а также трипептид глутатион. Это только некоторые соединения, обладающие антиокислительным действием. Химическая природа этих соединений разнообразна, среди них есть как водорастворимые и жирорастворимые компоненты. Основным принципом, на котором строится действие антиоксидантной системы живого организма - это синергизм. Он заключается в том, что компоненты системы работают сообща, восстанавливая друг друга и усиливая эффективность действия [13].

Природные антиоксидантные системы, выработанные в ходе эволюции, прошли испытание "на прочность" в течение многих миллионов лет. Поэтому выглядит вполне логичным учесть опыт природы и использовать в косметических средствах естественные антиоксидантные комплексы, выделенные, например, из растений. Причин тому несколько: широкий выбор растений, обладающих не только антиоксидантным действием, но и другими полезными для кожи свойствами. Поэтому из растительного сырья можно готовить полифункциональные препараты; При использовании растений нет риска инфекционного заражения, как в случае использования животного сырья.

1.2. Аскорбиновая кислота как антиоксидант

Витамин С - мощный антиоксидант. Он играет важную роль в регуляции окислительно-восстановительных процессов, участвует в синтезе коллагена и проколлагена, обмене фолиевой кислоты и железа, а также синтезе стероидных гормонов и катехоламинов. Аскорбиновая кислота также регулирует свертываемость крови, нормализует проницаемость капилляров, необходима для кроветворения, оказывает противовоспалительное и потивоаллергическое действие [14].

Витамин С является фактором защиты организма от последствий стресса. Усиливает репаративные процессы, увеличивает устойчивость к

инфекциям. Уменьшает эффекты воздействия различных аллергенов. Имеется много теоретических и экспериментальных предпосылок для применения витамина С с целью профилактики раковых заболеваний.

Известно, что у онкологических больных из-за истощения его запасов в тканях нередко развиваются симптомы витаминной недостаточности, что требует дополнительного их введения [41].

Витамин С улучшает способность организма усваивать кальций и железо, выводить токсичные медь, свинец и ртуть. Важно, что в присутствии адекватного количества витамина С значительно увеличивается устойчивость витаминов В1, В2, А, Е, пантотеновой и фолиевой кислот. Витамин С предохраняет холестерин липопротеидов низкой плотности от окисления и, соответственно, стенки сосудов от отложения окисленных форм холестерина[14].

Способность успешно справляться с эмоциональным и физическим стрессом в большей степени зависит от витамина С, чем от какого-либо другого витамина. Надпочечники, которые выделяют гормоны, необходимые, чтобы действовать в стрессовых ситуациях, содержат больше аскорбата, чем любая другая часть тела. Витамин С помогает выработке этих стрессовых гормонов и защищает организм от токсинов, образующихся в процессе их метаболизма.

Организм человека не может запастись витамином С, поэтому необходимо постоянно получать его дополнительно. Поскольку он водорастворим и подвержен действию температуры, приготовление пищи с термической обработкой его разрушает [15].

Растительные источники витамина С: цитрусовые, овощи листовые зеленые, дыня, брокколи, брюссельская капуста, цветная и кочанная капуста, черная смородина, болгарский перец, земляника, помидоры, яблоки, абрикосы, персики, хурма, облепиха, шиповник, рябина, печеный картофель в "мундире"[41. www.GardenDigger.com].

Травы, богатые витамином С: люцерна, коровяк, корень лопуха, песчанка, очанка, семя фенхеля, пажитник сенной, хмель, хвощ, ламинария, мята перечная, крапива, овес, кайенский перец, красный перец, петрушка, сосновые иглы, тысячелистник, подорожник, лист малины, красный клевер, плоды шиповника, шлемник, листья фиалки, щавель [16].

Полное и длительное отсутствие витамина С в рационе или прекращение его усвоения вследствие болезни ведет к возникновению заболевания, известного под названием цинги. Возникновению С-авитаминоза способствуют энергетическая и белковая недостаточность питания, суровые климатические условия и изнуряющий, непосильный труд. Начальные формы дефицита витамина С явление достаточно распространенное. Чаще и в большей степени при аскорбиновом гиповитаминозе отмечаются утомление, снижение устойчивости к холоду и возрастание подверженности к заболеваниям верхних дыхательных путей.

Обнаруживается кровоточивость десен при чистке зубов. На коже голени, бедер и спины возникают мелкие кровоизлияния вокруг волосяных фолликулов, отмечается их приподнятость, что воспринимается как гусиная кожа при ознобе. Состояние С-витаминозного дефицита может длительно протекать в скрытой форме, создавая благоприятный фон для формирования атеросклероза, астенического состояния, невротических, стрессовых реакций. Имеются наблюдения, свидетельствующие о том, что скрытая форма С-витаминовой недостаточности является предрасполагающим фактором формирования избыточной массы тела. Возникающие в таком состоянии болезни протекают более тяжело и длительно, чаще возникают осложнения [17.].

Важнейшие источники витамина С приведены в таблице 2. Нормы содержания витамина С в некоторых пищевых продуктах (в мг на 100 г).

Таблица 2.

Содержание витамина С в некоторых пищевых продуктах (в мг на 100 г)

Наименование пищевых продуктов	Количество аскорбиновой кислоты	Наименование пищевых продуктов	Количество аскорбиновой кислоты
Овощи		Фрукты и ягоды	
Баклажаны	5	Абрикосы	10
Горошек зеленый консервированный	10	Апельсины	50
Горошек зеленый свежий	25	Арбуз	7
Кабачки	10	Бананы	10
Капуста белокочанная	50	Брусника	15
Капуста квашеная	20	Виноград	4
Капуста цветная	75	Вишня	15
Картофель лежалый	10	Гранат	5
Картофель свежесобранный	25	Груша	8
Лук зеленый	27	Дыня	20
Морковь	8	Земляника садовая	60
Огурцы	10	Клюква	15
Перец зеленый сладкий	125	Крыжовник	40
Перец красный	250	Лимоны	50
Редис	50	Малина	25
Редька	20	Мандарины	30
Репа	20	Персики	10
Салат	15	Слива	8
Томатный сок	15	Смородина красная	40
Томат-паста	25	Смородина черная	250
Томаты красные	35	Черника	5
Хрен	110-200	Шиповник сушеный	До 1500
Чеснок	Следы	Яблоки, антоновка	30
Шпинат	30	Яблоки северных сортов	20
Щавель	60	Яблоки южных сортов	5-10
Молочные продукты			
Кумыс	20	Молоко кобылье	25
Молоко козье	3	Молоко коровье	2

Ученые говорят, что уже давно известно, что для растений витамин С очень важен - он выступает как антиоксидант, помогающий растениям противостоять засухе, озону и активному ультрафиолетовому излучению. Однако до сих пор было неизвестно, что витамин С также форсирует и рост растительных культур [18].

При длительном хранении овощей, фруктов и ягод их витаминная ценность снижается. Сохранность витамина С зависит также от способа кулинарной обработки продуктов [15]. Суточная потребность взрослого здорового человека в аскорбиновой кислоте колеблется в пределах 70-100 мг[41].

1.2 Биофлавоноиды - первое семейство растительных антиоксидантов

Флавоноидами называется группа природных биологически активных веществ (БАВ) – производных бензо- γ -пирона (рис. 1.1), в основе которых лежит фенилпропановый скелет, состоящий из $C_6-C_3-C_6$ углеродных единиц. Это гетероциклические соединения с атомом кислорода в кольце [19].

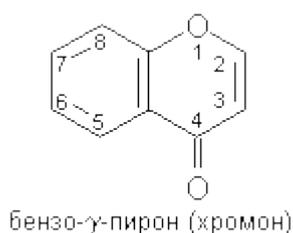


Рис. 1.1 – Структура бензо- γ -пирона

При замещении в хромоне атома водорода в α -положении на фенильную группу образуется 2-фенил-(α)-бензо- γ -пирон или флавоон (рис. 1.2), который состоит из 2 ароматических остатков А и В и трехуглеродного звена (пропановый скелет)

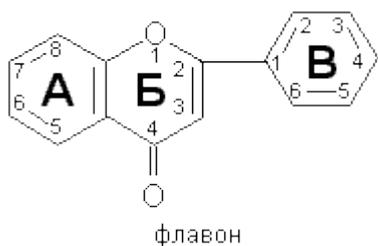


Рисунок 1.2 – Структура флавоона

В зависимости от степени окисления и гидроксирования пропанового скелета $C_6-C_3-C_6$ и положения фенильного радикала флавоноиды делятся на несколько групп (схема 1.1) [20].

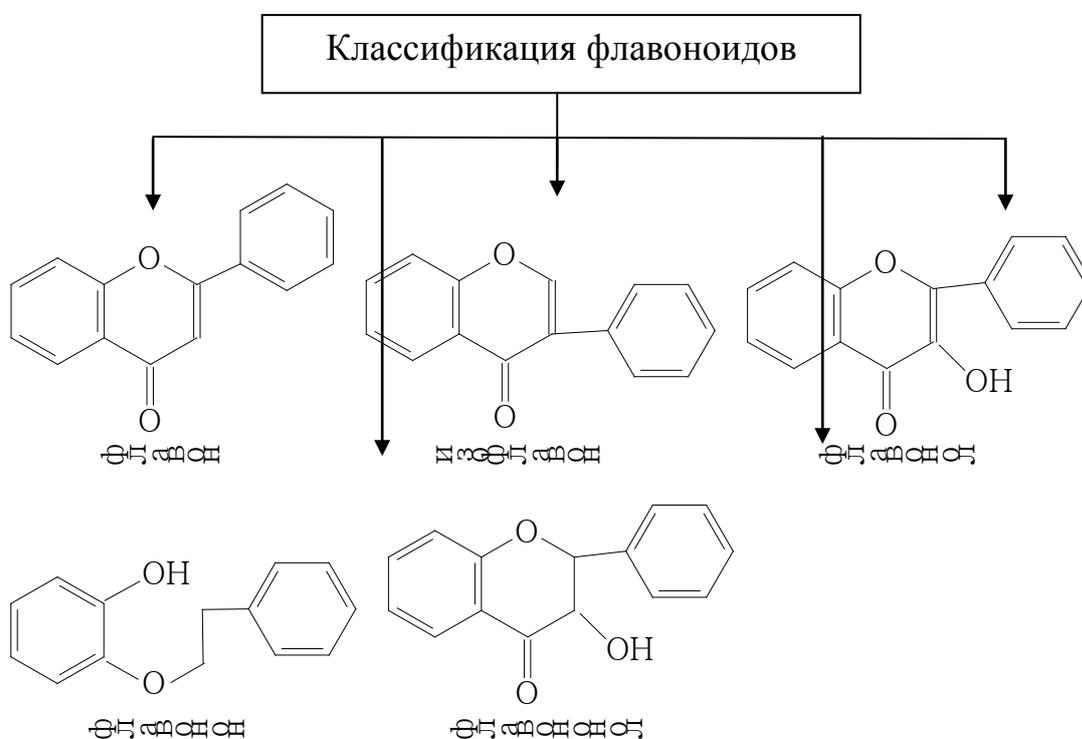


Схема 1.1 – Классификация флавоноидов

Флавоны – органические соединения гетероциклического ряда, фенильная группа находится во 2-м положении. Содержатся в цветках пижмы, ромашки.

Изофлавоны – фенильная группа находится в 3-м положении. Содержатся в корнях стального полевого.

Флавонолы – отличаются от флавонов наличием группы ОН в 3-м положении, наиболее распространенными представителями являются кверцетин, кемпферол. У высших растений, особенно часто встречается кверцетин, у однодольных преобладают производные кемпферола.

Флавононы – гидрированное производное флавона, в отличие от флавона не имеют двойной связи между углеродами во 2-м и 3-м положениях. Известно свыше 30 представителей этой группы флавоноидов. Они обнаружены в семействах Rosaceae, Fabaceae и Asteraceae.

Флавононолы отличаются от флавонола отсутствием двойной связи между углеродами во 2-м и 3-м положениях. ОН-группа, как и у флавонола, находится в 3-м положении. Скелет флавонола составляет гликозид аромандендрин, содержащийся в листьях эвкалипта.

Флавоноиды, которые связаны с одной или более молекулой сахара называют гликозидами флавоноидов. Гликозиды – это сложные безазотистые органические соединения, при гидролизе распадающиеся на сахаристую часть – гликон и несакхаристую – агликон или генин. Большинство из флавоноидов находятся в клетках в виде гликозидов (О-гликозидов – основная группа и С-гликозидов (гликофлавоноиды)) или находятся в виде соединений с органическими кислотами [20].

По физическим свойствам флавоноиды являются кристаллическими веществами с определенной температурой плавления, без запаха, имеющие жёлтый цвет (флавоны, флавонолы), бесцветные (изофлавоны, флаваноны). К группе флавоноидов относятся также антоцианы (природные красящие вещества растений), которые окрашиваются по-разному в зависимости от рН среды: в кислой среде они имеют красный цвет (соли катионов), в щелочной – синий (соли анионов).

Агликоны флавоноидов, как правило, растворимы в ацетоне, спиртах, органических растворителях и нерастворимы в воде. Гликозиды плохо растворимы в воде, за исключением гликозидов, имеющих в своей молекуле

более трёх остатков сахара, не растворимы в органических растворителях (эфире и хлороформе).

Флавоноидные гликозиды обладают оптической активностью, для них характерна способность к кислотному и ферментативному гидролизу. Скорость гидролиза и условия его проведения различны для различных групп флавоноидов.

По химическим свойствам О-гликозиды (цианогенные гликозиды, агликоновый компонент которых образован из α -циангидринов) при действии разбавленных минеральных кислот и ферментов легко гидролизуются до агликона и углеводного остатка. С-гликозиды с трудом расщепляются под действием концентрированных кислот (HCl или CH_3COOH) или их смесей при длительном нагревании.

Примерами флавоноидов, значимых для человека являются рутин и квертецин [21].

Рутин – органическое соединение из группы флавоноидов, обладающее витаминной активностью. По химической структуре рутин представляет собой 5,7,3',4'-ОН-3-рамноглюкозид (рисунок 1.3) [3. Биологически активные вещества растительного происхождения / Б.Н. Головкин, Р.Н. Руденская, И.А. Трофимова, А.И. Шретер. – М.: Наука, 2002,5. Беликов, В.Г. Фармацевтическая химия: учебник для высш. шк. / В.Г.Беликов – М.: МЕДпресс-информ, 2007. – 624 с.].

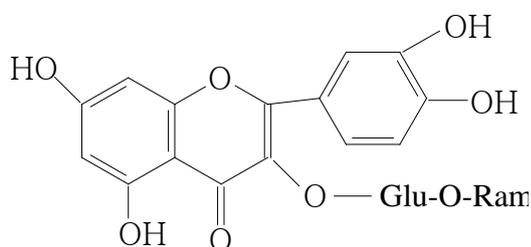


Рисунок 1.3 – Химическая структура рутина

Основные функции рутина: антиоксидантные, противовоспалительные, антиканцерогенные, антитромбические, противоязвенные, антиаллерги-

ческие, противоотечные, спазмолитические, сахароснижающие, желчегонное действие; коррекция микроциркуляции крови и лимфы; укрепление стенок капилляров, защита от кровоизлияний; уменьшение венозного отека; сдерживание агрегации тромбоцитов; защита от токсинов; увеличение плотности костной ткани; ингибирование альдолазы, трансаминазы, C – реактивного белка; ингибирование перекисного окисления липидов; увеличение активности адреналина; снижение активности щитовидной железы.

В организме человека рутин не вырабатывается. К основным природным источникам рутина относятся: листья гречихи, листья чайного куста, черная смородина, шиповник, клюква, соки черники и рябины, можжевельник (ягоды), боярышник (бутоны), ромашка (цветы), календула [2. 3].

Кверцетин (рисунок 1.4) является агликоном рутина. По химической структуре кверцетин представляет собой 3,5,7,3'4'-Пентаоксифлавонон [3.5].

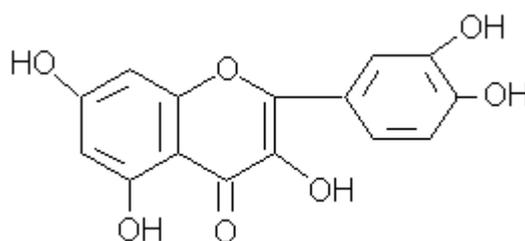


Рисунок 1.4 – Химическая структура кверцетина

К основным функциям кверцетина относятся: антиоксидантное, противоотечное, спазмолитическое, антигистаминное, противовоспалительное, диуретическое, противоязвенное, гипотензивное, иммуностимулирующее, противодиабетическое, гипогликемическое, противовирусное, ранозаживляющее, геропротекторное, анаболическое действия; снижение проницаемости стенок капилляров; повышение тонуса сосудов; блокада синтеза лейкотриенов и других воспалительных медиаторов; процессы

ремоделирования костной ткани; эстрогено-подобное действие; нормализация выработки кортизона и инсулина; защита ЛНП-холестерина от окисления; улучшение реологии крови; угнетение синтеза тромбосана; поддержка миокарда; стабилизация клеточных мембран; стимуляция ферментных систем; улучшение функций фагоцитов, Т- и В-лимфоцитов; транспорт калия и натрия; адаптация к гипоксии; апоптоз раковых клеток.

В организме человека кверцетин, как и рутин, не вырабатывается. К основным источникам кверцетина природного происхождения относятся: брусника, черная смородина, малина, ежевика, клюква, черника, рябина, облепиха [2.3].

1.3. Разнообразие флавоноидов

Флавоноиды широко распространены в растительном мире. Особенно богаты флавоноидами высшие растения, относящиеся к семействам розоцветных (различные виды боярышников, черноплодная рябина), бобовых (софора японская, стальник полевой, солодка), гречишных (различные виды горцев - перечный, почечуйный, птичий: гречиха), астровых (бессмертник песчаный, сушеница топяная, пижма), яснотковых (пустырник сердечный) и др. Более часто флавоноиды встречаются в тропических и альпийских растениях. Обнаружены и у низших растений: зеленые водоросли (ряски), споровые (мхи, папоротники), хвощи (хвощ полевой), а также у некоторых насекомых (мраморно-белая бабочка).

Находятся флавоноиды в различных органах, но чаще в надземных: цветках, листьях, плодах; значительно меньше их в стеблях и подземных органах (солодка, шлемник байкальский, стальник полевой). Наиболее богаты ими молодые цветки, незрелые плоды. Локализуются в клеточном соке в растворенном виде. Содержание флавоноидов в растениях различно (Таблица 2): в среднем 0,5-5%, иногда достигает 20% (в цветках софоры японской). В растениях флавоноиды встречаются в виде гликозидов и в

свободном виде. Во многих фруктах и ягодах биофлавоноиды более или менее равномерно распределены в кожице и мякоти. Поэтому слива, вишня, черника имеют ровную окраску. В противоположность этому, в плодах некоторых других растений флавоноиды содержатся, в основном, в кожице, и, в меньшей степени, - в мякоти. А в яблоках, например, они имеются только в кожице.

Таблица 2.

Содержание флавоноидов в растениях.

	Кемпферол	Кверцетин		Кемпферол	Кверцетин
Яблоки	0-7	20-263	Чёрный виноград	0-2	15
Айва	0	63	Белый виноград	0-2	12
Абрикосы	0-2	25-53	Огородная капуста	210-250	50-110
Груши	0-12	3-28	Краснокочанная капуста	0-2	5-6
Кислая вишня	5-17	23-80	Белокочанная капуста	0-2	0-1
Сладкая вишня	0-6	6-24	Цветная капуста	0-2	0-1
Слива	0-2	0-15	Лук-порей	30-200	0-25
Персики	0-2	0-4	Лук-резанец	10	300
Бузина	0	105-237	Лук репчатый (цветной)	0-2	347
Черника	0-6	105-160	Цикорий	46	1-2
Чёрная смородина	0-10	33-68	Французская фасоль	12	39
Белая смородина	0-2	3-28	Стручковая фасоль	0-2	29
Красная смородина	0-2	2-27	Томаты	0-2	7-8
Ежевика	14	33	Морковь	0-1	0-2
Земляника	12	9	Картофель	0-1	0-2
Малина	0-1	29			

1.4 Роль флавоноидов в растениях

Биологическая роль флавоноидов заключается в их участии в окислительно-восстановительных процессах, происходящих в растениях. Они выполняют защитные функции, предохраняя растения от различных

неблагоприятных воздействий окружающей среды. Многие флавоноиды — пигменты, придающие разнообразную окраску растительным тканям. Так, антоцианы определяют красную, синюю, фиолетовую окраску цветов, а флавоны, флавонолы, ауроны, халконы — жёлтую и оранжевую. Они принимают участие в фотосинтезе, образовании лигнина и суберина, в качестве защитных агентов в патогенезе растений, вовлечены в регуляцию процессов прорастания семян, а также пролиферации и отмирания (путем апоптоза) клеток удлиняющихся растущих частей растений. Их многообразие объясняется тем, что в растениях большинство из них присутствует в виде соединений с сахарами — гликозидов. Сахарные остатки могут быть представлены моносахаридами — глюкозой, галактозой, ксилозой и др., а также различными ди-, три- и тетрасахаридами. К сахарным остаткам нередко присоединены молекулы оксикоричных и оксибензойных кислот. Катехины и лейкоантоцианы бесцветны. Они являются родоначальниками конденсированных дубильных веществ.

Под влиянием ферментов флавоноиды расщепляются на сахара и агликоны. В качестве сахаров встречаются D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза, LT-рамноза и LT-арабиноза, D-глюкуровая кислота.

Естественные функции флавоноидов мало изучены. Предполагалось, что благодаря способности поглощать ультрафиолетовое излучение (330—350 нм) и часть видимого света (520—560 нм) они защищают растительные ткани от избыточной радиации. Окраска цветочных лепестков помогает насекомым находить нужные растения и тем самым способствовать опылению. Флавоноиды являются фактором устойчивости растений к поражению некоторыми патогенными грибами.

Суммарное содержание флавоноидов изменяется в ряду различных место-обитаний; на накопление флавоноидных соединений влияние оказывают такие факторы, как степень освещенности и обеспеченности элементами минерального питания, фитоценотическое окружение [21].

1.5 Антиоксидантная активность флавоноидов

Одно из более известных свойств флавоноидов – это их превосходная антирадикальная активность, что и используется при снижении действия АФК при инфекциях, воспалении, ожогах или лучевом поражении. Реакция флавоноидов с АФК характеризуется высокими скоростями, составляющими для ОН-радикала – $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, для пероксидного радикала липидов – $0,18 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (кверцетин), несколько ниже для супероксид аниона – $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (катехин).

Флавоноиды легко и необратимо окисляются до п-гидрохиноновой формы, которая далее обратимо может окисляться до п-хинона. Последний легко полимеризуется в не растворимое соединение. Окисление флавоноидов катализируется ионами тяжелых металлов и под действием света. Промежуточные формы окисления флавоноидов могут являться токсичными для клеток, а в процессе их взаимопревращения в ряде случаев образуются АФК (рис. 4).

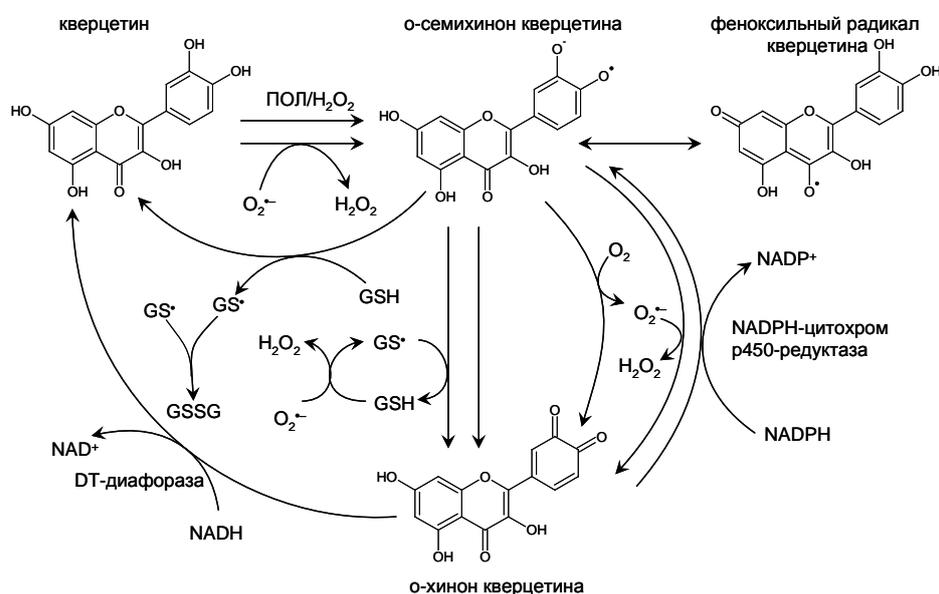


Рис.4 Окислительно-восстановительные превращения кверцетина (Metodiewa D, et.al., 1999; Меньшикова Е.Б., и др., 2006).

Тем не менее, флавоноиды считают одними из наиболее значимых антиоксидантов, антиоксидантная активность которых возрастает в присутствии аскорбиновой кислоты. Другой причиной высокой

антиоксидантной активности флавоноидов, может быть их ингибирующая активность ряда ферментов, включая гидролазы, например фосфолипазы, оксидоредуктазы, например, избирательно ингибируют COX1 или COX2, связанные с воспалительным и репарационным ответами соответственно, ДНК-синтетазы, РНК-полимеразы, фосфатазы, фосфокиназы, оксигеназы, и оксидазы аминокислот. В некоторых случаях, тип ингибирования конкурентный, но чаще это аллостерическое ингибирование. Многие флавоноиды также способны ингибировать цАМФ и цГМФ фосфодиэстеразы, в результате чего увеличивается уровень цАМФ, участвующего в различных каскадах.

Многочисленные экспериментальные исследования в водных системах позволили выявить следующие наиболее важные для антирадикальной активности структурные элементы молекул флавоноидов: 1) две ОН-группы в положениях C_{3'} и C_{4'}, 2) двойная связь между 2 и 3 атомами углерода, желательно совместно с карбонильной группой в положении C₄ и 3) ОН-группы в положениях C₃ и C₅ совместно с карбонильной группой [35].

В молекулах флавоноидов ОН-группа в положении C_{4'} представляет собой наиболее предпочтительную мишень для радикальной атаки, при этом наличие ОН-групп у соседнего атома углерода C_{3'} (катехоловая структура) или C_{3'} и C_{5'} (галловая структура) облегчает отрыв атома водорода. Между соседними гидроксилами кольца В образуются водородные связи, поэтому соединения, имеющие такие структуры, характеризуются низким окислительным потенциалом и относительно легко образуют радикалы [22].

Кроме того, присутствие орто-дигидроксильной структуры приводит к большей делокализации неспаренного электрона и повышает стабильность феноксильного радикала [23].

Синтезированные на структурной основе флавоноиды соединения, не содержащие ОН-групп в В-кольце, не проявляли существенной антиоксидантной активности в отношении окисления липидных липосом при

индукции ионами Fe^{2+} , Fe^{3+} и 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлоридом [24.].

Катехоловые структуры также эффективно связывают ионы металлов переменной валентности, препятствуя тем самым их вовлечению в реакции разложения гидроперекисей. Прежде всего это касается катехоловых структур В-кольца, однако при Fe^{+} и Fe^{3+} -индуцированном окислении, так же, как в отношении ОН-радикалов в реакции Фентона и пероксинитрита, выраженный ингибирующий эффект дают соединения, содержащие ОН-группы в положениях С7 и С8 или С5 и С6 [25]. Замена ОН-групп в положениях С5, С7 или С3 на О-Д-глюкозу приводила к снижению способности флавоноидов ингибировать перекисные и ОН-радикалы, а также $ONOO^-$.

Важность двойной связи С2-С3 для антиоксидантного действия флавоноидов, повидимому, определяется образованием диеновой структуры между атомом кислорода в положении С4 и электронной структурой В-кольца, что приводит к делокализации электронной плотности по всей молекуле при образовании радикала. Кроме того, наличие двойной С2-С3-связи ограничивает подвижность В-кольца и способствует формированию планарной структуры молекулы, что важно для ингибирования ферментативной продукции АКМ, в частности, в ксантин-ксантинооксидазной реакции [26].

Несмотря на большое количество исследований *in vitro* и несомненный факт наличия флавоноидов в рационе питания человека и животных, убедительных доказательств доминирующего антиоксидантного действия флавоноидов в каких-либо процессах в организме *in vivo* нет.

Металлсвязывающая способность флавоноидов. Флавоноиды также могут действовать как хелаторы ионов металла с радикалами O^{\cdot} и OH^* , так и на стадии продолжения цепи, выступая донорами атомов водорода для перекисных радикалов. Многие флавоноиды действуют как хелаторы ионов металлов переменной валентности и способны, таким образом, ингибировать

процессы ПОЛ на стадии разветвления цепей, когда ионы металлов индуцируют гомолиз органических перекисей. Для связывания ионов металлов важно наличие в молекулах дигидроксильной структуры в В-кольце (предпочтительна катехоловая структура с ОН-группами в С3'- и С4'-положениях), а также кетогруппы в положении С4 совместно с С3- или С5-гидроксильной группой [27, 28, 29.].

Структурный анализ и экспериментальные данные свидетельствуют о прямой взаимосвязи между антиоксидантной эффективностью флавоноидов и количеством фенольных ОН-групп в их молекулах [30,31,32]. Исследование разных по структуре флавоноидов показало, что соединения без ОН-заместителей или с одной гидроксильной группой в положении С5 флавонового ядра не проявляют сколько-нибудь значимой активности в отношении перекисных радикалов, возникающих при разложении 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида; эффективность флавонов с одним ОН-заместителем в положениях С3, С6, С2', С3' или С4' составляла меньше 60 % эффективности тролокса [33].

Таблица 2.

Константы ингибирования радикалов флавоноидами и эфирами галловой кислоты [11].

	Число реакционно-способных ОН-групп	Константы скорости ингибирования		
		ОН (x 10 ⁹ М ⁻¹ с ⁻¹)	N ₃ (x 10 ⁹ М ⁻¹ с ⁻¹)	O ₂ ⁻ (x 10 ⁴ М ⁻¹ с ⁻¹)
(-)Эпикатехин	2	1,0	4,0	6,8
(+)Катехин	2	2,2	5,0	6,4
Пикногенол	2	1,8	1,75	43
(-) Эпигаллокатехин	3	4,7	4,7	41
(-)Эпикатехина галлат	5	5,8	4,7	43
(-) Эпигаллокатехинаина галлат	6	7,1	4,8	65
Пропилгаллат	3	3,1	4,2	26
Р-Глюкогаллин	3	4,4	6,3	65
Пентагаллоил-глюкоза	15	71	20	103
Галлодубильная кислота (танин)	25	31	22	-

Таблица 3.

Ингибирование основными флавонами и катехинами чая продукции O_2^- ксантинооксидазой [6].

Катехин, флавор	Тип ингибирования	IC ₅₀ (мкМ)
Катехин	неконкурентное	303,95
Эпикатехин	смешанное	20,48
Эпигаллокатехин	смешанное	10,66
Эпикатехина галлат	смешанное	2,86
Эпигаллокатехина галлат	конкурентное	0,76

Многие флавоноиды, такие как кверцетин, мирицетин, лютеолин, рамнетин, силибинин, не только обладают антиоксидантной активностью, но и способны ингибировать циклооксигеназы 1 и 2 типа, липоксигеназы и тем самым снижать продукцию провоспалительных медиаторов: лейкотриенов, простагландинов и активных форм кислорода [34]

Исследование на культурах клеток сетчатки эмбрионов цыплят показало, что в отношении Fe^{2+} -индуцированного окисления в присутствии аскорбата, восстанавливающего ионы железа (III), защитная роль флавоноидов (кверцетин, лютеолин, таксифолин, эриодиктиол) не зависела от наличия двойной связи C₂-C₃ (эриодиктиол и таксифолин с насыщенной связью C₂-C₃ были более активны, чем кверцетин и лютеолин), также не выявлялось зависимости от наличия гидроксильной группы в C₃-положении; в наибольшей степени эффективность флавоноидов в данной экспериментальной системе определялась способностью молекул проникать в липидный слой мембран и образовывать водородные связи [35].

Помимо того, что флавоноиды обладают антирадикальной активностью и могут связывать ионы металлов переменной валентности, они аналогично токоферолу и холестерину стабилизируют мембраны и выступают в качестве структурных антиоксидантов. Проникая в гидрофобную область мембран, молекулы флавоноидов значительно снижают подвижность липидов, что в свою очередь, снижает эффективность взаимодействия пероксильных

радикалов с новыми липидными молекулами ($RO_2^* + RH \longrightarrow ROOH + R^*$); так как в большинстве биологических мембран данная стадия цепных процессов является лимитирующей, то, соответственно, снижается скорость всего процесса окисления [4].

1.6 Противоопухолевая активность флавоноидов.

Синтетические производные флавоноидов, например, флавоноуксусная кислота на данный момент уже прошли 1 фазу клинических испытаний, и уже скоро могут быть использованы в качестве цитостатических препаратов [36]

Ингибирование роста опухолевых клеток флавоноидами в моделях *in vivo* и *in vitro* встречается во многих работах [37, 38]

Эти исследования проводились как на химически-индуцированных опухолях. Тем не менее эффекты, оказываемые флавоноидами на опухолевые клетки столь разнообразны, что поиск механизмов действия продолжается до сих пор [36,37]

Изобилие эффектов флавоноидов на метаболизм опухолевых клеток разделяют на несколько основных, определенных механизмов.

Флавоноиды вовлекаются в большое количество регулирующих путей, таких как рост, энергетический метаболизм, апоптоз, дифференцировка клетки, транскрипция, репарация ДНК, передача нервных импульсов, воспаление, и окислительный стресс [30].

Таким образом, флавоноиды могут действовать как антиоксиданты, ловушки свободных радикалов, ингибиторы ферментов, гормоны (в том числе и как медиаторы) или индукторы экспрессии генов.

Высокая подвижность электронов в ароматическом ядре флавоноидов объясняет их антиоксидантные свойства, тогда как структурное сходство флавоноидов со многими соединениями, участвующими в жизнедеятельности клетки, объясняет их ингибирующее действие на ферменты, связывание с цитоплазматическими и ядерными рецепторами

гормонов и медиаторов, а так же на индукцию экспрессии генов. Высокая аффинность флавоноидов с ионами тяжелых металлов обеспечивает дополнительные возможности их влияния на работу ферментов. Рассмотрим некоторые из биологических активностей флавоноидов.

Другая возможность - влиять на рост опухолевых клеток была обнаружена при изучении работы Na^+/K^+ -АТФазы.

Потребность опухолевых клеток в АТФ довольно высока и в итоге начинает превышать возможности его наработки клеткой. Главным источником АТФ, в условиях недостатка кислорода, что сопровождается бурным ростом опухолевых клеток, становится гликолиз. В процессе работы гликолитических ферментов концентрация молочной кислоты повышается, что приводит к снижению рН, положительно влияя на работу лизосомальных ферментов, но при этом ингибируются многие ферменты. Снижение концентрации АТФ может приводить к тому, что активность Na^+/K^+ -АТФазы будет снижаться [38.], что приведет к возрастанию в цитоплазме концентрации ионов Na^+ . Таким образом, интенсивность транспорта глюкозы в клетку, которая является зависимой от градиента ионов Na^+ , снижается и эффективность фосфорилирования АДФ падает. транспортная Na^+/K^+ -АТФаза линии опухолевых клеток (HELA), в отличие от фермента в нормальных клетках, фосфорилируется по тирозиновому остатку регуляторной β -цепи. Ими было определено, что кверцетин дефосфорилирует фенольную группу тирозина в β -цепи транспортной Na^+/K^+ -АТФаза (рис. 5). Это фактически ведет к ингибированию Na^+/K^+ -АТФазы опухолевых клеток и снижение транспорта глюкозы.

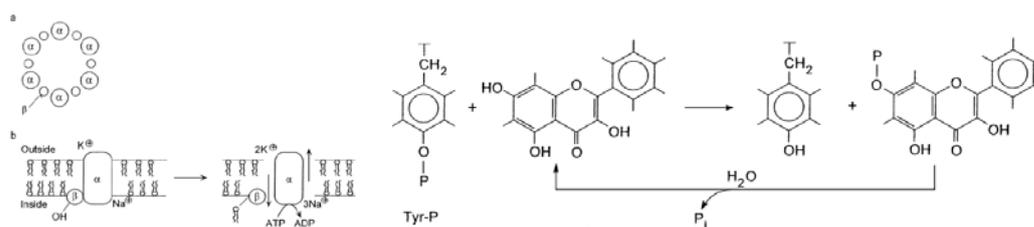


Рис.5 Предположительный механизм действия кверцетина на работу Na^+/K^+ -АТФазы. (из обзора Havsteen В.Н., 2002) а. Контур гексамерного агрегата α - и β -цепей Na^+/K^+ -АТФазы (по данным РСА). б. Регулирование Na^+ -насоса фосфорилированием β -субъединицы, катализируемое фосфокиназой (слева) и работа насоса, запускаемая гидролизом АТФ (справа). в. Предположительный механизм дефосфорилирования тирозина β -субъединицы.

Ингибирование флавоноидами транспортера глюкозы в плазматической мембране опухолевых клеток было обнаружено и другими авторами. Учитывая то, что регулирующая β -цепь митохондриального протонного насоса структурно схожа с β -цепью Na^+/K^+ -АТФазы, можно предполагать, что протонный насос, вероятно, также регулируется реакцией фосфорилирования/дефосфорилирования и, соответственно, является чувствительным к флавоноидам. Итог статический эффект флавоноидов по отношению к опухолевым клеткам, наблюдаемый Рэкером частично был приписан им к индукции этими соединениями апоптоза.

Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Объекты исследования (Биологическое описание растений, обладающих антиоксидантной активностью)

2.1.1 Лимон обыкновенный (*Citrus limon*)

Лимон - хорошо известное культурное растение, выращиваемое уже несколько тысячелетий. Происхождение его неизвестно; некоторые ученые считают, что его родина - Северо-Западная Индия. Примерно в начале III века н.э. лимон начали выращивать на юге Италии, в VIII веке - в Египте и Ираке, в конце первого тысячелетия - в Китае. К началу второго тысячелетия арабы распространили его по всему средиземноморскому региону. Христофор Колумб в одной из своих экспедиций привез семена этого растения в Новый Свет. Сейчас лимоны выращиваются во многих странах мира. [4].

Селекционерами выведено множество культиваров и получены гибриды с родственными видами. Они отличаются размером и формой, цветом кожуры и мякоти, балансом сладкого и кислого вкуса, количеством семян или их отсутствием, лежкостью и некоторыми другими свойствами.

Вечнозеленое дерево семейства рутовых высотой до 5 м. Крона раскидистая, пирамидальная. Листья темно-зеленые, овальной формы, длиной 7-15 см, плотные и кожистые, с короткими черешками. На просвет можно увидеть светлые точки - железки, выделяющие эфирные масла. Если слегка потереть поверхность листьев, можно почувствовать легкий цитрусовый запах. Ветви искривленные, листья глянцевые овальной формы, цветы очень душистые, белого или розового цвета. Белые цветы диаметром 2-3 см появляются в пазухах листьев или на кончиках ветвей, одиночные или собраны в соцветия. Лепестки, а их бывает 4 или 5, обычно слегка закручиваются назад. Запах цветов похож на жасминовый и имеет специфический оттенок, агрессивный у некоторых экземпляров. Каждый цветок держится несколько дней. Опавшие лепестки продолжают пахнуть, поэтому их можно собирать и использовать для ароматизации. Плоды, у

некоторых культиваров достигающие диаметра 10 см, окрашены в цвета зеленоватых или желтоватых оттенков. Кожура может быть тонкой или толстой (до 10 мм), с железками, выделяющими эфирные масла.

Используют лимон в пищевой и кондитерской промышленности. Соком мякоти лимона выводят пятна на одежде и других вещах, им чистят ножи, металлические ложки и вилки. Из плодов готовят соки и безалкогольные напитки, применяют в качестве приправы к диетическим блюдам. В косметической практике применяют для удаления веснушек и пигментных пятен, в парфюмерии - для отдушки лосьонов и мазей.

Лекарственным сырьем служат свежие плоды.

Из плодов лимона получают эфирное масло, в состав которого входят лимонен (90%), альфа-пинен, гамма-терпинен, фалландерн, метилгептенон, а также октиловый, каприловый и нониловый альдегиды. Лимонный сок содержит лимонную кислоту, сахара, витамины С, А, В и D. В мякоти плода обнаружены пектиновые вещества, соли калия, меди и другие микроэлементы. В кожуре содержатся витамин Р, флавоновые гликозиды, кумарины и ситостерол [10,14].

2.1.2 Шиповник коричный (*Rosa majalis*)

С конца мая до июля на лесных опушках среди кустарниковых зарослей и по речным поймам зацветает привлекающий нас крупными душистыми цветками шиповник. Название растения уже говорит о том, что оно покрыто шипами. Особенно много шипов на молодых ветвях, которые этим защищаются от поедания их травоядными животными. На одревеневших стеблях шиповника шипов меньше, так как он достаточно хорошо защищен корой [5].

Шиповник был первым растением, которое еще в глубокой древности человек стал разводить для красоты и за многие века вырастил из него большое количество видов роз [11].

В России произрастает свыше 60 видов шиповника. Шиповник представляет собой красивый колючий кустарник. Для заготовок большое значение имеют два вида: шиповник иглистый и шиповник коричный [12].

Шиповник иглистый имеет буроватые ветви, густо усаженные тонкими, прямыми, равномерными щетинками. Цветет в июне — июле розовыми цветками. Плоды яйцевидной формы, гладкие, блестящие. Шиповник иглистый произрастает в лесной зоне, заходит в тундру от Тихого океана до Ленинграда, но к западу, от Онежского озера, изреживается [11].

Шиповник коричный в отличие от шиповника иглистого растет по поймам рек, среди кустарников и в лесах. Ветви блестящие, красно-коричневые. Цветоносные стебли снабжены загнутыми книзу шипами, расположенными попарно у основания черешка, а листоносные побеги, кроме того, усажены тонкими прямыми шипами неравной длины. Шиповник коричный произрастает почти по всей Европейской территории России, особенно на севере [21].

Неприхотливый колючий кустарник — дикая роза.

В плодах шиповника витамина С больше, чем в смородине и лимоне. Имеются витамины группы В, К, Р, каротин, сахара, дубильные вещества, органические кислоты, пектины, микроэлементы. В семенах содержится витамин Е. Препараты плодов этого природного поливитаминного концентрата используют для профилактики и лечения цинги, куриной слепоты и других авитаминозов, при малокровии, хлорозе, атеросклерозе, гипертонии, различных кровотечениях, других заболеваниях. Собирают плоды шиповника до заморозков [20,34].

В корнях много дубильных веществ, поэтому их используют в качестве вяжущего средства.

Из семян шиповника получают масло, содержащее жирные кислоты и витамины. Оно обладает противовоспалительными и ранозаживляющими свойствами [22].

Объектом изучения являются плоды, шиповника коричневого и лимона обыкновенного, помидор и капуста (белокачанная и цветная). Предметом изучения является антиоксидантная активность исследуемых материалов.

2.1.3 Плоды малины (*fructus Rubi idaeus*)

Сырье заготавливают от дикорастущего или культивируемого кустарника малины обыкновенной (*Rubus idaeus* L.).

Плоды представляют собой сложные костянки (состоят из большого числа (30-60) отдельных, сросшихся между собой костянок) округлой или конусовидной формы, не слипшиеся в комки. Размеры плода от 7,5 до 12 мм. Отдельные костянки мелкие, шаровидные или эллипсовидные, внутри с косточкой, имеющие ямчатую поверхность. Цвет поверхности – серовато-малиновый, мякоти – розовый, косточек – темно-желтый. Запах специфический, приятный. Вкус кисловато-сладкий .

В качестве лекарственного растительного сырья используют зрелые плоды малины (заготовку проводят в июле – августе).

После предварительного подвяливания плоды малины сушат в сушилках при температуре 50 – 60 °С рассыпав на бумаге, ткани или сетках. Возможна сушка в печах .

2.2 Приготовление растворов

Реактивы и оборудование: бюксы, эксикатор, ступка с пестиком, вата, стеклянная воронка, установка для титрования, дистиллированная вода, 0,5% раствор крахмала, раствор 0,003 Н йода.

1. 0,5 % раствор крахмала. В дистиллированную воду объемом 30 мл прибавили 0,5 г порошка крахмала, тщательно перемешали и нагрели до кипения. В полученный раствор прилили 70 мл холодной дистиллированной воды и охладили.

2. Раствор 0,003 н йода. К 97 мл дистиллированной воды прилили 3 мл 0,1 н раствора йода.

3. Подготовка пробы чая к анализу для определения содержания танина. 2,5 г предварительно измельченной навески чая, взятой из средней пробы, с погрешностью взвешивания не более 0,0002 г, помещают в колбу вместимостью 250 см³, приливают 200 см³ кипящей дистиллированной воды и ставят на водяную баню. Экстракцию ведут в течение 45 минут. Экстракт фильтруют под вакуумом через воронку Бюхнера в колбу вместимостью 500 см³, фильтрат переносят в мерную колбу вместимостью 250 см³, охлаждают и доводят дистиллированной водой до метки.

2.3 Методы исследования

2.3.1 Определение влажности плодов

Растереть в ступке 2 г плодов. Полученную массу поместить в бюкс, массу которого определить заранее. Бюкс поставить в эксикатор при температуре 70°C на сутки. По истечении времени измерить массу бюкса. Вычислить абсолютно сухое вещество по формуле:

$$\text{Ма.с.в.} = m_1 - m_2,$$

Где: Ма.с.в- - масса абсолютно сухого вещества;

m₁ – масса пустого бюкса;

m₂ – масса бюкса с плодами после высушивания.

Влажность вычислить по формуле:

$$W = \left(\frac{a_1 - a_2}{a_1} \right) \cdot 100\%,$$

Где:

W- влажность,%;

a₁ - масса навески до высушивания,г;

a₂ - масса навески после высушивания,г[33].

2.3.2 Метод определения витамина С в исследуемых материалах

2 г плодов растереть в ступке. Полученную массу перенести в стаканчик и добавить 10 мл 2% раствора HCl. Тщательно перемешать и отфильтровать через стеклянную воронку с ватой в коническую колбу на 50-100 мл. Массу на фильтре промыть несколькими каплями воды. В фильтрат прилить 1 мл 0,5% раствора крахмала и оттитровать рабочим раствором 0.003 N йода до появления синего окрашивания.

При расчете содержания витамина С в продукте использовать формулу определения массы:

$$M = ((n \cdot \varepsilon) \setminus 1000) \cdot V,$$

Где : n- молярная концентрация эквивалента йода;

Э- молярная концентрация эквивалента витамина С, равная 88 г;

V- объем пошедшего на титрование йода, мл.

Для более точного количественного определения витамина С проводить параллельные опыты[33].

2.3.3 Экстрагирование флавоноидов из растительного сырья

Следующим этапом при изучении состава и получения лекарственных средств заключается в извлечении (экстрагировании) флавоноидов, к которому также предъявляются требования соблюдения сохранности нативного состава веществ.

Для флавоноидных гликозидов подходящими экстрагентами являются спиртосодержащие смеси: метанол – вода (70:30) и чаще этанол – вода с разным соотношением компонентов. Спиртосодержащие экстрагенты выполняют еще и важную роль ингибирования ферментных систем растений и тем самым способствуют сохранению нативности состава.

Для агликонов, как для менее полярных соединений, можно применить и такие экстрагенты, как этилацетат и диэтиловый эфир.

Для количественного анализа процедуру извлечения повторяют дважды или трижды (до максимального «истощения» экстрагируемого материала). Если растительный материал (листья, трава и т. п.) обогащен хлорофиллом, то для освобождения от него проводят преэкстракцию неполярным растворителем (хлороформом, диэтиловым эфиром). Или же обрабатывают этими растворителями уже полученные экстракты, как правило, после практически полного удаления из них спирта.

Для флавоноидов, как и для других веществ, не существует способа выделения, универсального для всех растительных материалов. В каждом конкретном случае прибегают к наиболее подходящему методу или сочетанию методов, с учётом в основном свойств веществ и особенностей растительного сырья. Наиболее часто используются избирательная экстракция, осаждение с помощью солей тяжёлых металлов и хроматографические методы [9].

Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изучение антиоксидантной активности растений

3.1.1. Определение антиоксидантной активности лимона обыкновенного и шиповника коричного

В связи с тем, что антиоксидантная активность находится в прямой зависимости от содержания витаминов, одной из задач стало их определение в изучаемом материале.

Используя метод йодиметрического титрования, определили содержание витамина С в каждой пробе согласно методике

Антиоксидантную активность растительных материалов определяли по содержанию витамина С методом йодиметрического титрования. Для исследования были взяты следующие растительные материалы: лимон обыкновенный и шиповник коричный.

Полученные результаты представлены на рисунках 3 .

Количество Витамина С 100г.

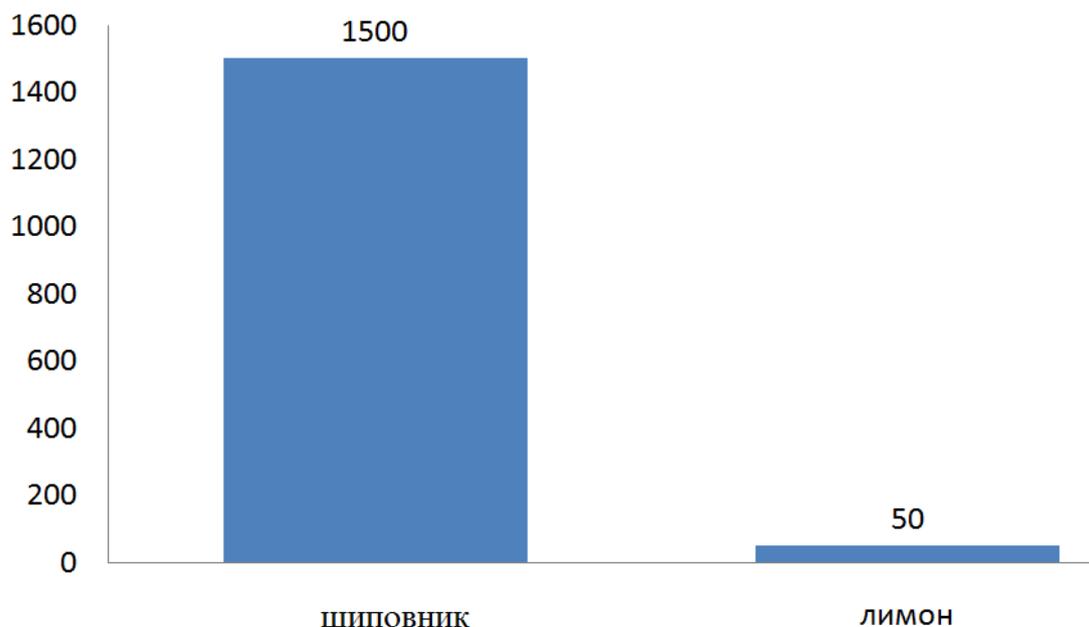


Рис. 3.1.1.- Антиоксидантная активность растительных материалов

Из полученных результатов видно, что самое высокое содержание витамина С в шиповнике. Его содержание составляет 1,2 г/ 100 г а.с.в. Содержание аскорбиновой кислоты в лимоне обыкновенном – 0,04 г/ 100 г а.с.в., что по значению меньше, чем содержание витамина шиповнике.

Еще один метод определения антиоксидантной активности материала заключалась в измерении катодного восстановления кислорода с помощью анализатора АОА “Антиоксидант” (производитель аппарата - ООО «НПП Полиант» г.Томск).

Сначала отбирали пробы по схеме:

- 1) брали аликвоту исследуемого образца по 0.1 мл, 0.5, 1.0 мл.;
- 2) делали 3 параллельных определения кислорода из каждого образца и
- 3) рассчитывали средний коэффициент антиоксидантной активности, результаты представлены в таблице.

Антиоксидантная активность исследуемых препаратов оценивалась по кинетическому критерию антиоксидантной активности К (мкмоль/л*мин), который отражает количество прореагировавших с образцом кислородных форм.

Таблица 3.1.1.

Коэффициенты суммарной антиоксидантной активности растительных экстрактов, К мкмоль/л*мин

Наименование образца	Объем пробы, мл		
	0.1	0.5	1.0
№5	0,630	0,599	0,546
№9	0,133	0,115	0,082

В таблице приведены две наиболее типичные пробы № 5 и № 9. Трижды определили концентрацию кислорода в них и представили средний показатель. Как описывается в литературе, такими аликвотами обрабатывали живые ткани и наблюдали восстановление структуры печени, а также нормализацию процессов желчеобразования, желчевыделения и препятствует

образованию желчных камней. Растительная проба № 5 вызывает выраженный противовоспалительный эффект, наблюдаемый в заживлении слизистой оболочки желудка и кишечника, нормализации состава микрофлоры кишечника, а также стимуляции естественных механизмов очищения организма от шлаков, токсинов и аллергенов.

Установлено, что все изученные образцы в большей или меньшей степени проявили антиоксидантную активность. Выявлено, что ряд экстрактов обладают антиоксидантной активностью сравнимой с параметром аскорбиновой кислоты, $K = 0,68$ мкмоль/л*мин. Проведенные исследования позволяют выделить экстракт растительный № 11.

Согласно обзору литературы существует несколько методов оценки антиоксидантной активности. И каждый из них имеет свои преимущества и недостатки (как физиологические, так и химические методы). На сегодня пока нет метода, позволяющего надежно определять суммарно в сложной смеси растительного происхождения антиоксиданты разных классов или полифункциональные антиоксиданты. Методы определения антирадикальной активности *in vitro* основаны на определении свободных радикалов (пероксидные радикалы, перекиси липидов, синглетный кислород, супероксидный анионрадикал и др.) Считается, что основным повреждающим свободным радикалом в биологических системах является гидроксильный радикал. Действие его изучается по флуориметрическому определению продуктов взаимодействия диацилпроизводных флуоресцеина с гидроксильным радикалом. В этих работах изучена антирадикальная активность флавоноидов и их комбинаций в условиях появления гидроксильных радикалов в присутствии плазмы крови.

Один из способов определения антиоксидантной активности окислением раствором 0,05 н перманганата калия в среде 0,24 н серной кислоты запатентован А.П. Арзамасцевым, В.П. Пахомовым и др.

3.1.2. Определение содержания витамина С в составе некоторых фруктов и овощей

Для выполнения количественного анализа витамина С были выбраны свежесжатые соки яблоки, цветной капусты и красного перца. Количественный анализ проводится методом йодометрии, титриметрическим методом анализа, основанным на окислении исследуемого вещества иодом. Включает методы прямого (раствором I_2 в водном растворе KI) и обратного (избыток I_2 оттитровывают раствором $Na_2S_2O_3$) титрования.

3.2.1 Определение витамина С в свежесжатом соке яблока.

В ходе работы возникали такие трудности, как в яблоках высокое содержание фермента Аскорбиноксидаза, в присутствии которого аскорбиновая кислота быстро окисляется на воздухе.

Чтобы этого не произошло, анализ нужно проводить в кислой среде.

1. Взвешивалось яблоко, 260 г (до эксперимента)
2. Из предварительно взвешенного яблока тонким ножом из нержавеющей стали вырезалось пробу (30 г) в виде ломтика, от кожуры до сердцевинки с семечками
3. Ломтик переносим в фарфоровую ступку с разбавленной соляной кислотой и тщательно растираем пестиком.

В свежесжатом соке яблока определяли наличие витамина С методом йодометрии:

Расчёты: . 1 мл р-ра йода – 28 капель раствора йода

X мл р-ра йода - 4 капли раствора йода.

Отсюда следует, что на окисление аскорбиновой кислоты потребовалось 0,14 мл йода.

1 мл 5 % р-ра йода - 35 мг аскорбиновой кислоты

0,14 мл 5 % р-ра йода – X мг аскорбиновой кислоты => $X = 0,14 \times 35 = 4,9$ мг

4,9 мг аскорбиновой кислоты - 30 г яблока

X мг аскорбиновой кислоты – 100г. яблока, тогда в 100 г яблока содержится 17 мг аскорбиновой кислоты, а в целом яблоке массой 260 г – 42 мг.

3.2.2. Определение витамина С в свежавыжатом соке красного перца.

1. Взвешиваем красный сладкий перец $m=130\text{г}$ (до эксперимента).
2. Тонким ножом из нержавеющей стали вырезаем из предварительно взвешенного перца пробу (35г) в виде ломтика, от кожуры до сердцевины с семечками.

3. Ломтик переносим в фарфоровую ступку тщательно растираем пестиком.

Определяем содержание витамина С в свежавыжатом соке красного перца методом йодометрии.

Расчёты: . 1 мл р-ра йода – 28 капель раствора йода

X мл р-ра йода - 40 капель раствора йода, отсюда следует, что на окисление аскорбиновой кислоты потребовалось 1.4 мл йода.

1 мл 5 %р-ра йода - 35 мг аскорбиновой кислоты

1.4 мл 5 % р-ра йода – X мг аскорбиновой кислоты $\Rightarrow X = 1,4 \times 35 = 49$ мг

49 мг аскорбиновой кислоты - 35 г перца

X мг аскорбиновой кислоты – 100 г перца, тогда в 100 г содержится 140 мг, 1 в целом перце ($m=130\text{г}$) содержится 182 мг аскорбиновой кислоты.

3.2.3. Определение витамина С в свежавыжатом соке цветной капусты.

1. Взяли навеску в 30г цветной капусты.
2. Перенесли её в фарфоровую ступку и тщательно растирали пестиком. Содержание витамина С определяли в свежавыжатом соке цветной капусты методом йодометрии.

Расчёты: . 1 мл р-ра йода – 28 капель раствора йода

X мл р-ра йода - 11 капель раствора йода, отсюда следует, что на окисление аскорбиновой кислоты потребовалось 0,39 мл йода.

1 мл 5 %р-ра йода - 35 мг аскорбиновой кислоты

0,39 мл 5 % р-ра йода – X мг аскорбиновой кислоты => $X = 0,39 \times 35 = 13,7$
мг

13,7 мг аскорбиновой кислоты - 30 г цветной капусты

X мг аскорбиновой кислоты – 100 г капусты, тогда в 100 г содержится 46 мг.

Так как цветную капусту не все употребляют в сыром виде, то я решила узнать, сколько витамина С содержится в цветной капусте после термической обработки.

3.2.4.. Определение витамина С в цветной капусте после термической обработки.

1. Берём 30г цветной капусты и пропариваем.

2. Переносим пропаренную капусту в фарфоровую ступку и тщательно растираем пестиком.

Определяем содержание витамина С в цветной капусте методом йодометрии.

Расчёты: . 1 мл р-ра йода – 28 капель раствора йода

X мл р-ра йода- 6 капель раствора йода, отсюда следует, что на окисление аскорбиновой кислоты потребовалось 0,21 мл йода.

1 мл 5 %р-ра йода - 35 мг аскорбиновой кислоты

0,21 мл 5 % р-ра йода – X мг аскорбиновой кислоты => $X = 0,21 \times 35 = 7,5$ мг

7,5 мг аскорбиновой кислоты - 30 г цветной капусты

X мг аскорбиновой кислоты – 100 г капусты, тогда в 100 г содержится 25 мг.

Содержание витамина С в некоторых пищевых продуктах

№	Наименование пищевых продуктов	Количество аскорбиновой кислоты (в мг на 100 г)
1	Перец болгарский (сладкий, красный)	250
2	Перец болгарский (сладкий, желтый)	125
3	Капуста белокачанная свежая	75
4	Яблоко(сорт Семиренко)	50

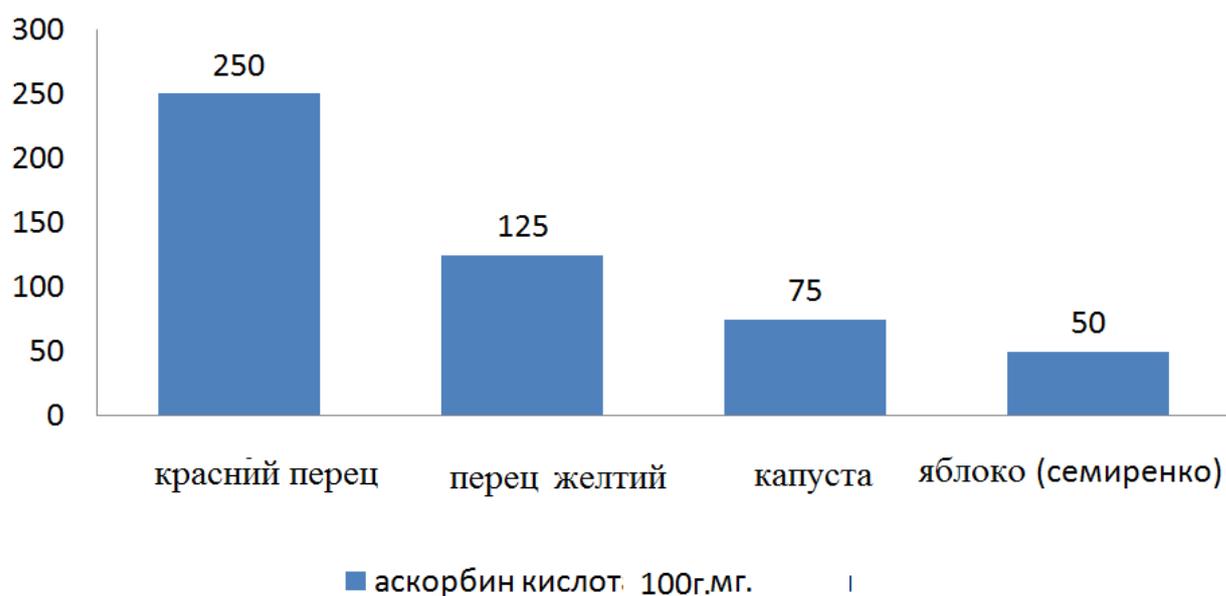


Рис. 3.1.2- Диаграмма показания содержание витамина С в некоторых пищевых продуктах

Из полученных результатов видно, что в растительных продуктах питания наибольшее количество витамина С содержится в красном перце (250 мг) по отношению к желтому перцу. А далее содержание витамина С немного снижается. Так в цветной капусте определили 70 мг на 100 г навески, и яблоках - 50 мг.

На основании полученных данных исследования, можно сделать вывод, что наиболее богатые витамином С являются овощи (красный перец - 250мг, цветная капуста - 75мг, яблоко - 50мг).

Аналогичные работы по определению содержания витамина С в плодах, овощах, цитрусовых и ягодах, приобретенные в близлежащем магазине и рынке, а так же выращенные на собственном приусадебном участке, проведены с использованием хроматографического метода определения. Полученные данные согласуются с литературными данными.

Но по разным причинам (материальным, сезонным, объективным) мы не всегда можем употреблять в пищу круглый год свежие фрукты и овощи, в этом случае можно заменить данные продукты соками и нектарами. Проводя эксперименты, доказывая наличие витамина С в продуктах, была подтверждена выдвинутую мною гипотезу и в связи с этим можно рекомендовать активно употреблять вышеперечисленные овощи и фрукты. А также для постоянного поддержания потребности организма человека в витамине С можно воспользоваться свежесжатые соки.

3.3 Изучение полифенольных соединений винограда

Антиоксиданты — вещества, замедляющие или предотвращающие окисление органических соединений. Они защищают организм от негативных воздействий свободных радикалов. Антиоксидант соединяется со свободным радикалом и ставит заслон разрушительному действию лишнего электрона. Одним из наиболее перспективных источников полифенольных соединений является виноград, содержащий несколько классов полифенолов: антоцианы, флавонолы, танины и др. Определение суммы полифенольных окисляемых соединений (ПОС) осуществляли титриметрически [6], используя в качестве рабочего раствора перманганат калия 0,1н . Титрование осуществляли до перехода окраски от фиолетовой к золотисто-желтой.

Определение суммы полифенольных окисляемых соединений (ПОС) осуществляли титриметрически [6], используя в качестве рабочего раствора перманганат калия 0,1н и в качестве индикатора индигосульфокислоту. Титрование осуществляли до перехода окраски от фиолетовой к золотисто-желтой.

Определение суммы флавоноидов осуществляли спектрофотометрически на спектрофотометре СФ – 46. Измерение оптической плотности проводят через 30 мин при длинах волн от 365 нм до 430 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Для чего 1 мл полученного экстракта помещают в мерную колбу вместимостью 50мл, доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 40% (раствор А). К 5мл раствора «А» переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 1 мл 2% раствора хлорида алюминия, объем полученного раствора доводят до 25мл 40% раствором этилового спирта. В качестве раствора сравнения используют 5 мл подкисленного соляной кислотой раствора А [2]. Параллельно в тех же условиях измеряют оптическую плотность ГСО рутина.

При получении фенольных извлечений чаще всего используют спиртовые растворы. Для извлечения БАВ полифенольных соединений нами были использованы подкисленные соляной кислотой водно-спиртовые растворы с содержанием этилового спирта 30%, 50%, 70% и 90%. В ходе работы было установлено, что степень экстракции флавоноидов зависит от растворителя, от его полярности, и максимальная степень экстракции наблюдалась при использовании 70%-ного водно-спиртового экстрагента (рис.3.2).

Один из факторов, влияющих на оптимизацию параметров выделения БАВ является время экстракции, которое мы выдерживали от 30 до 120 минут. Экспериментально было установлено, что максимальное содержание флавоноидов в растворе 1,19 мг/л, наблюдалось при экстрагировании образцов в течение 60 минут. Увеличение времени экстрагирования не

приводило к улучшенным результатам и оказалось нецелесообразным. Количественное содержание БАВ практически не менялось со временем.

Мы варьировали также и температуру экстракции от 20 до 60 °С. Температурный оптимум был достигнут при 50 °С для свежих ягод и при 40 °С – для замороженных. Более высокие температуры приводят к разрушению полифенол-белкового комплекса, так как известно, что фенольные вещества обладают специфическим сродством к ряду белков и протеинов (например, к белкам, богатым пролином). Реакции между белками и полифенолами и используют для экстракции полифенолов и белков из растительного материала.

Как известно из литературы, в растениях было обнаружено около 5000 флавоноидов – антиоксидантов с широким спектром целебного воздействия. Они обладают сосудорасширяющими, противоопухолевыми, противовоспалительными, бактерицидными, иммуностимулирующими и противоаллергическими свойствами. Они же оказывают спазмолитический и противовоспалительный эффект. Защищают от вредных воздействий желудок и печень. Обладают мягким диуретическим и желчегонным действием, способствуют выведению из организма солей тяжелых металлов, радионуклидов, снижают риск развития онкологических заболеваний. Словом, виноградные экстракты очень важны для продления жизни.

Косточки и кожура винограда также содержат одни из самых мощных из всех растительных антиоксидантов. Данные вещества укрепляют стенки капилляров, улучшают микроциркуляцию крови, препятствует образованию тромбов. Как следствие, выраженная профилактика инфаркта и инсульта. Определение антоциановых пигментов осуществляли на спектрофотометре СФ - 46 (Ломо) при длине волны 540нм в кювете с длиной оптического пути 10мм. Предварительно водно-спиртовые пробы имеющие рН 1,2 центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 минут. Суммарную концентрацию пигментов определяли относительно мальвидина-3-

моногликозида. Для расчета концентрации мальвидина - 3 - моногликозида и его производных использовали коэффициент молярной экстинкции равный 28000 л/моль ·с.

Определение суммы флавоноидов (в пересчете на рутин) осуществляли спектрофотометрически на спектрофотометре СФ – 46. Измерение оптической плотности проводят через 30 мин при длинах волн от 365 нм до 430 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Для чего 1 мл полученного экстракта помещают в мерную колбу вместимостью 50мл, доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 40% (раствор А). К 5мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 1 мл 2% раствора хлорида алюминия, объем полученного раствора доводят до 25мл 40% раствором этилового спирта.

В качестве раствора сравнения используют 5 мл подкисленного соляной кислотой раствора А. Параллельно в тех же условиях измеряют оптическую плотность ГСО рутина.

Для извлечения БАВ полифенольных соединений нами были использованы подкисленные соляной кислотой водно-спиртовые растворы с содержанием этилового спирта 30%, 50%, 70%, 95%. В результате было установлено, что степень экстракции флавоноидов зависит от полярности растворителя, и максимальная степень экстракции наблюдалась при использовании 70%-ного водно-спиртового экстрагента.

Немаловажным фактором влияющим на оптимизацию параметров выделения БАВ является время экстракции, которое варьировалось нами от 30 до 120 минут.

Экспериментально было установлено, что максимальное содержание флавоноидов в растворе 1,19 мг/л, наблюдалось при экстрагировании образцов в течение 60 минут. Увеличение времени экстрагирования оказалось нецелесообразным, т.к. количественное содержание БАВ практически не менялось со временем. Температуру экстракции варьировали от 20 до 60 оС. Температурный оптимум был достигнут при 50 оС для свежих ягод и при

40 °С – для замороженных. Более высокие температуры приводят к разрушению полифенол-белкового комплекса, так как известно, что фенольные вещества обладают специфическим сродством к ряду белков и протеинов (например, к белкам, богатым пролином). Реакции между белками и полифенолами и используют для экстракции полифенолов и белков из растительного материала. Известно существование четырех типов полифенол-белкового взаимодействия: водородное, гидрофобное, ионное и ковалентное; и относительно высокие температуры приводят к разрушению некоторых связей, что соответственно приводит к снижению концентрации флавоноидов в экстракте.

Не менее важно было выявить и количественное содержание различных групп полифенолов в виноградных выжимках в пересчете на сухую массу (табл.1).

Таблица 3.1.2

Определение содержания полифенольных соединений винограда

Сырье	Содержание, %		
	ПОС	флавоноиды	антоцианы
Свежее	7,3 ± 0,3	3,1 ± 0,2	0,6 ± 0,03
Замороженное	6,1 ± 0,4	2,9 ± 0,1	0,4 ± 0,02

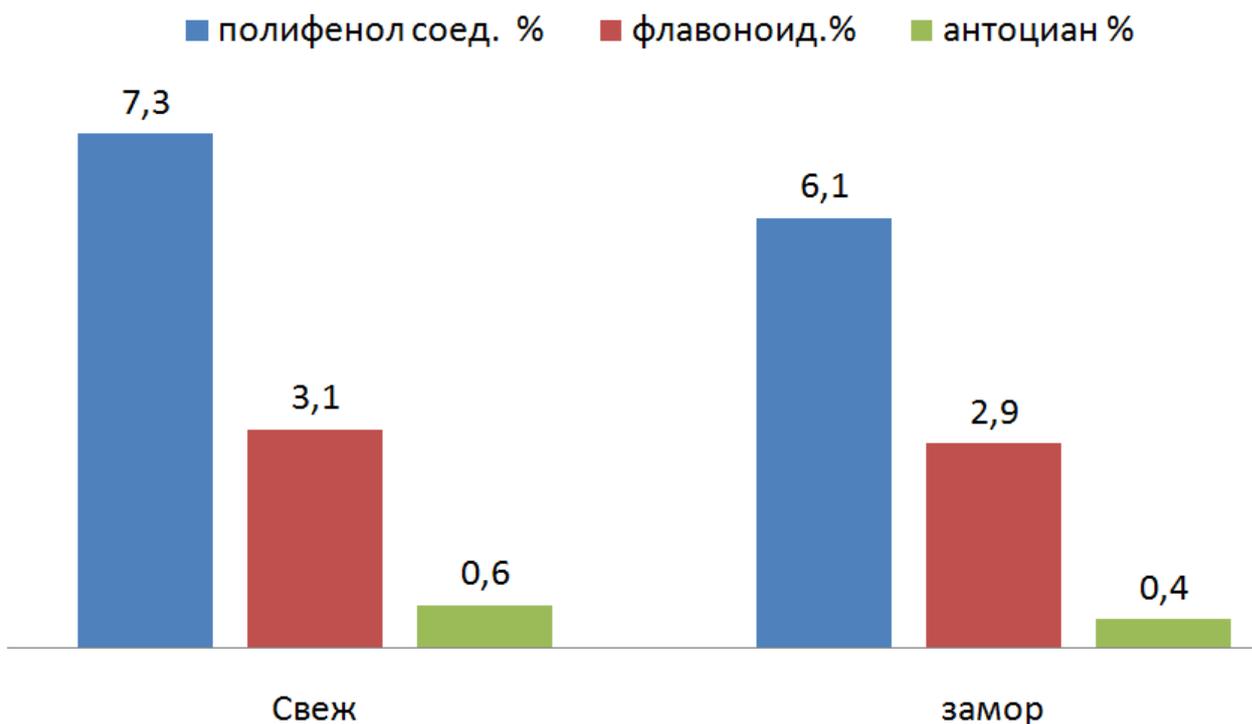


Рис.3.1.3- Диаграмма показания содержания полифенольных соединений винограда

Различие в результатах количественного определения можно объяснить неспецифичностью титранта, способного вступать в реакцию не только с флавоноидами, но и с другими веществами, содержащими в своей структуре лабильные группировки, например ОН-группу (фенольные кислоты, моно- и дигликозиды, ароматические спирты и т.д.).

Вследствие чего результат определения завышается. По полученным данным установлено, что оптимальная температура экстракции 50°C, время экстракции 60 минут, концентрация экстрагента 70%.

Проведена количественная оценка содержания различных групп полифенолов: антоцианов, флавоноидов и ПОС в жмыхе свежего и замороженного винограда.

3.3.1. Количественная оценка содержания флавоноидов в плодах боярышника, вишни и шиповника различных способов консервации

Количественное содержание флавоноидов в плодах боярышника, вишни и шиповника проводили методом дифференциальной спектрофотометрии. Аналитическую пробу свежих или замороженных плодов боярышника измельчают до кашицеобразного состояния, а высушенных плодов – до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 10 г (точная навеска) измельченного свежего или замороженного сырья (или около 5 г высушенного сырья) помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 60 мл спирта этилового 70%, и, присоединив к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 минут. После охлаждения до комнатной температуры содержимое колбы профильтровывают через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. В круглодонную колбу со шротом прибавляют 40 мл спирта этилового 70%, и как ранее нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 15 минут. После охлаждения раствор фильтруют через тот же фильтр в ту же колбу. Объем раствора в колбе доводят до метки. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 6 мл раствора алюминия хлорида, и на 3 минуты помещают в кипящую водяную баню. После чего колбу быстро охлаждают, прибавляют 2 мл буферного раствора с рН 4,0 и доводят спиртом этиловым 70% до метки.

Таблица 3. 2.1.

Количественное содержание флавоноидов в плодах боярышника различных способов консервации

Вид сырья	X, %	P, %	t(P, f)	S	Sx	ΔX	E, %
Свежие плоды	0,192	95	2,45	0,0087	0,0033	0,008	4,17
Замороженные плоды	0,164	95	2,45	0,0063	0,0024	0,006	3,66

Высушенные плоды	0,152	95	2,45	0,0069	0,0026	0,006	3,94
---------------------	-------	----	------	--------	--------	-------	------

Как видно из таблицы содержание флавоноидов в свежих плодах составило $0,192 \pm 0,008$ %, в замороженных плодах – $0,164 \pm 0,006$ % и в высушенных плодах – $0,152 \pm 0,006$ %. Полученные данные свидетельствует об уменьшении количества флавоноидов в сырье, как при сушке, так и замораживании.

Описанная ранее методика определения содержания суммы флавоноидов в плодах боярышника основана на использовании реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом в присутствии ионизирующей добавки ацетата натрия. Одновременное использование комплексообразующих и ионизирующих реагентов вызывает более значительное батохромное смещение полос поглощения флавоноидов по сравнению с использованием только комплексообразующего реагента, что позволяет вести определение флавоноидного комплекса в длинноволновой части спектра, свободной от поглощения фенолкарбоновых кислот.

На рис. представлены УФ-спектры продуктов реакции флавоноидов и фенолкарбоновых кислот плодов вишни с алюминия хлоридом в присутствии ацетата натрия и без него. Как видно из представленных данных использование ацетата натрия позволяет разделить максимумы поглощения флавоноидов и фенолкарбоновых кислот, тем самым, исключая влияние последних на итоговый результат определений.

В качестве стандартного вещества для пересчета нами был выбран рутин, поскольку максимум поглощения комплекса флавоноидов рябины с алюминия хлоридом (409 нм) совпадает с максимумом поглощения продукта реакции рутина с указанным комплексообразующим реагентом (рис.3.2.2.1).

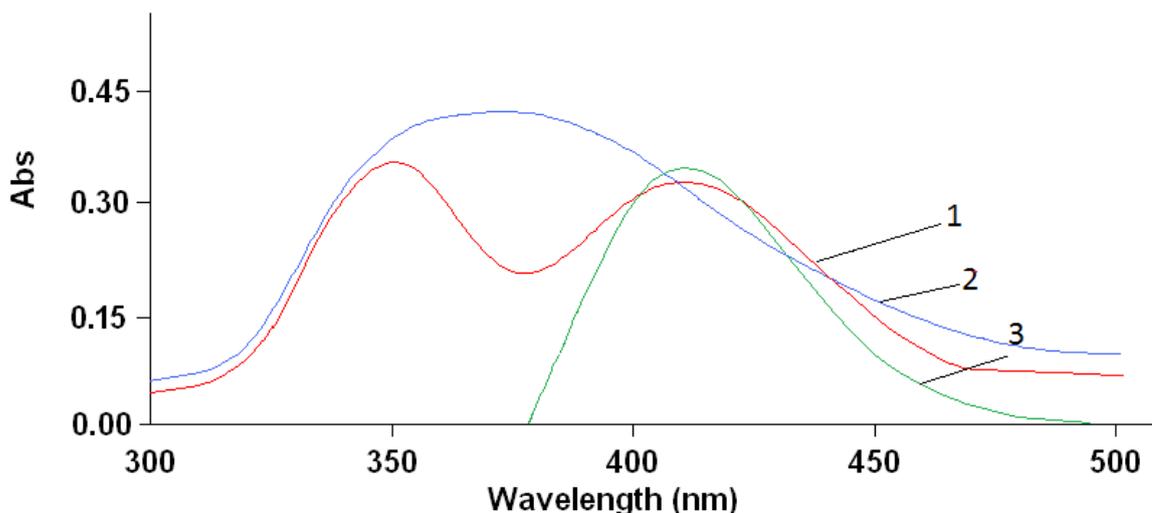


Рис.3.2.2. УФ-спектры комплексов флавоноидов плодов вишни обыкновенной с алюминия хлоридом.

- 1 – в присутствии ацетата натрия, 2 – без добавления ацетата натрия,
3 – комплекс рутина с алюминия хлоридом.

Через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 409 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл извлечения, 1 капли разведенной уксусной кислоты и доведенный 95% спиртом этиловым до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность СО рутина, приготовленного аналогично испытуемому раствору.

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

$$X = \frac{D \times m_0 \times 100 \times 1 \times 100 \times 100}{D_0 \times a \times 100 \times 25 \times (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого образца; где D – оптическая плотность испытуемого образца;

D_0 – оптическая плотность раствора РСО рутина;

m_0 – масса навески рутина, в граммах;

a – масса навески сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Таблица 3.2.2.

Количественное содержание флавоноидов в плодах вишни различных способов консервации

Вид сырья	X, %	P, %	t (P, f)	S	S _x	ΔX	E, %
Свежие плоды	0,242	95	2,45	0,0063	0,0024	0,006	2,48
Замороженные плоды	0,218	95	2,45	0,0097	0,0037	0,009	4,05
Высушенные плоды	0,193	95	2,45	0,0047	0,0018	0,004	2,07

Результаты определения суммы флавоноидов в плодах шиповника представлены в таблице 3.2.3.

Как видно из представленных данных, замораживание и высушивание приводит к незначительным изменениям количественного содержания флавоноидов в плодах шиповника.

Таблица 3.2.3.

Количественное содержание флавоноидов в плодах шиповника различных способов консервации

Вид сырья	X, %	P, %	t (P, f)	S	S _x	ΔX	E, %
Свежие плоды	0,207	95	2,45	0,0045	0,0017	0,004	1,93
Замороженные плоды	0,195	95	2,45	0,0058	0,0022	0,005	2,56
Высушенные плоды	0,182	95	2,45	0,0077	0,0029	0,007	3,85

Количественное содержание флавоноидов в плодах шиповника различных способов консервации.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что плоды боярышника, шиповника и вишни характеризуются схожими значениями суммы флавоноидов – 0,192 %, 0,242 % и 0,207% (в свежих плодах) соответственно (рис.3.2.2.2).

Вероятно, данное явление объясняется ботаническим родством исследуемых видов лекарственных растений, которое заключается в принадлежности их к одному семейству. температур на плоды шиповника составляют 6% и 12% соответственно, что практически в 2 раза ниже, чем в других объектах.

Можно предположить, что наблюдаемые различия связаны с более близким компонентным составом фенольных соединений плодов боярышника и рябины, как представителей одного подсемейства, в отличие от плодов шиповника.

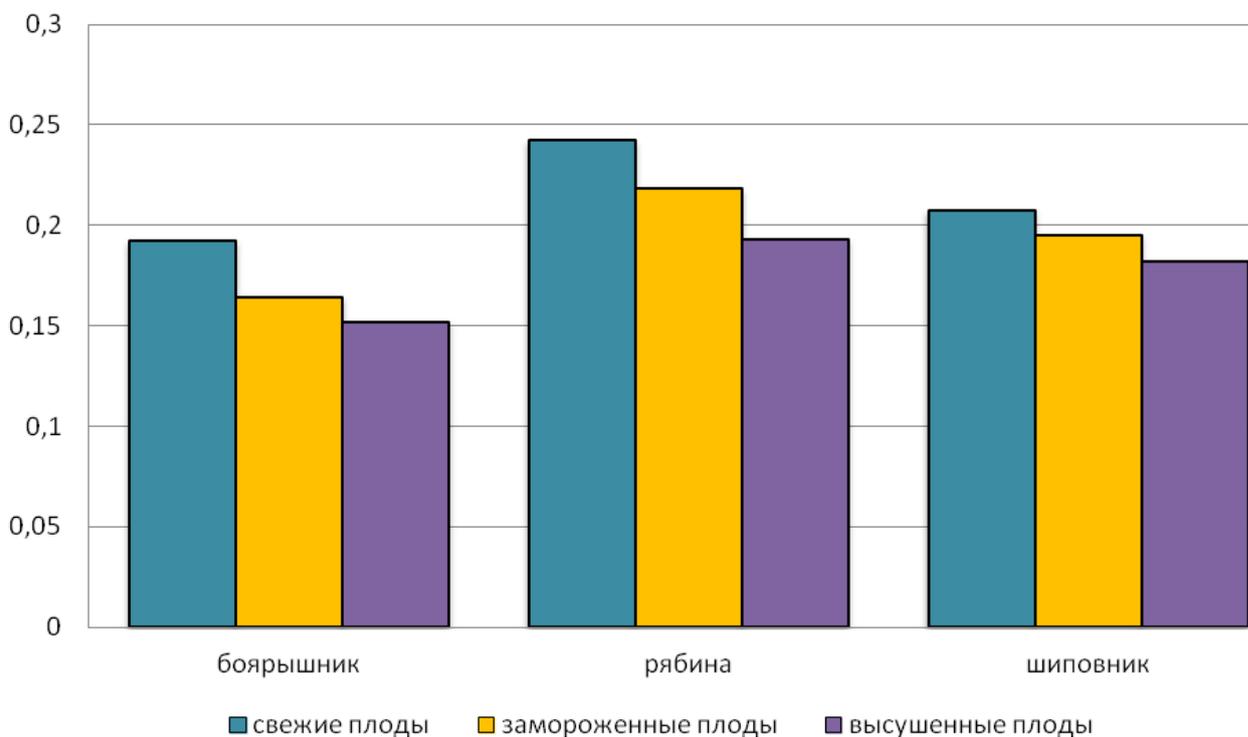


Рис. 3.2.2 Количественная оценка содержания антоцианов в плодах малины различных способов консервации.

Из литературных источников известно, что основная доля флавоноидных соединений в плодах малины приходится на антоцианы [6, 121, 130, 137]. В связи с этим количественную оценку содержания флавоноидов в свежих, замороженных и высушенных плодах малины проводили по сумме антоцианов.

Для исследования был выбран метод прямой спектрофотометрии. Пересчет вели на цианидин-3,5-диглюкозид поскольку, максимум спектра поглощения извлечений из плодов малины совпал с максимумом спектра поглощения стандартного образца - цианидин-3,5-диглюкозида (рис.3.2.3.1).

Определение проводили по следующей методике. Методика. Аналитическую пробу свежих или замороженных плодов малины измельчают до кашицеобразного состояния, а высушенных плодов – до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 5 г (точная навеска) свежих или замороженных (или около 2 г высушенных) измельченных плодов помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 1% раствора хлористоводородной кислоты, колбу выдерживают на водяной бане при температуре 40-45 °С в течение 15 мин. Извлечение фильтруют через вату в мерную колбу вместимостью 250 мл. Вату с сырьем снова помещают в колбу, прибавляют 100 мл 1% раствора хлористоводородной кислоты, предварительно смывая частицы сырья с воронки в колбу, и повторяют экстрагирование указанным выше способом. Затем содержимое колбы фильтруют через вату в ту же мерную колбу. Сырье на фильтре промывают 40 мл.

Таблица .3.2.4.

Количественное содержание антоцианов в плодах малины.

Вид сырья	X, %	P, %	t(P, f)	S	Sx	ΔX	E, %
Свежие плоды	0,903	95	2,45	0,0119	0,0045	0,011	1,22
Замороженные	0,717	95	2,45	0,0085	0,0032	0,008	1,12

плоды							
Высушенные плоды	0,094	95	2,45	0,0048	0,0018	0,004	4,26

Как видно из таблицы содержание флавоноидов в свежих плодах составило $0,192 \pm 0,008$ %, в замороженных плодах – $0,164 \pm 0,006$ % и в высушенных плодах – $0,152 \pm 0,006$ %. Полученные данные свидетельствует об уменьшении количества флавоноидов в сырье, как при сушке, так и замораживании.

Таким образом, проведенное сравнительное изучение состава биологически активных веществ свежих, замороженных и высушенных плодов боярышника, вишни, малины и шиповника с использованием тонкослойной хроматографии свидетельствует о том, что во всех исследуемых объектах обнаружены яблочная кислота, лимонная кислота, аскорбиновая кислота, галловая кислота. В плодах боярышника также идентифицированы рутин, в плодах рябины – сорбиновая кислота, рутин, кверцетин, хлорогеновая кислота, в плодах шиповника – рутин, кверцетин, лютеолин, в плодах малины – янтарная кислота, салициловая и кофейная кислоты.

Установлено, что способ консервации не влияет на компонентный состав биологически активных веществ в изучаемых объектах.

Установлено, что содержание свободных органических кислот в свежих, замороженных и высушенных образцах сырья составляет – $2,61 \pm 0,02$ %; $2,57 \pm 0,03$ %; $0,90 \pm 0,02$ % для плодов боярышника; $5,90 \pm 0,03$ %; $5,78 \pm 0,04$ %; $3,35 \pm 0,03$ % для плодов рябины; $4,62 \pm 0,04$ %; $4,77 \pm 0,06$ %; $2,15 \pm 0,03$ % для плодов шиповника; $7,40 \pm 0,04$ %; $6,00 \pm 0,04$ %; $5,38 \pm 0,08$ % для плодов малины (соответственно).

Содержание флавоноидов в свежих, замороженных и высушенных образцах сырья составляет – $0,192 \pm 0,008$ %; $0,164 \pm 0,006$ %; $0,152 \pm 0,006$ %;

для плодов боярышника; $0,242 \pm 0,006\%$; $0,218 \pm 0,009\%$; $0,193 \pm 0,004\%$; для плодов рябины; $0,207 \pm 0,004\%$; $0,195 \pm 0,005\%$; $0,182 \pm 0,007\%$; для плодов шиповника (соответственно).

Содержание суммы антоцианов в свежих, замороженных и высушенных плодах малины составляет $0,903 \pm 0,011\%$; $0,717 \pm 0,008\%$; $0,094 \pm 0,004\%$ (соответственно).

5 мл извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 6 мл раствора алюминия хлорида, и на 3 минуты помещают в кипящую водяную баню. После чего колбу быстро охлаждают, прибавляют 2 мл буферного раствора с рН 4,0 и доводят водой очищенной до метки.

Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 409 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения раствор, состоящий из 5 мл извлечения, 2 мл буферного раствора с рН 4,0, помещенный в мерную колбу вместимостью 25 мл и доведенный водой до метки.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора, содержащего 1 мл СО рутина, обработанного аналогично испытуемому раствору, начиная со слов «помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл...», используя в качестве раствора сравнения раствор, состоящий из 1 мл СО рутина и 2 мл буферного раствора с рН 4,0, помещенный в мерную колбу вместимостью 25 мл и доведенный водой до метки.

Содержание суммы флавоноидов (X) в пересчете на рутин в водных извлечениях, в процентах, рассчитывают по формуле:

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

0,00002 – содержание рутина в 1 мл раствора СО;

a – количество водного извлечения, взятого для анализа, г

Приготовление раствора СО рутина: около 0,05 г рутина, предварительно высушенного при температуре от 130 до 135 °С в течение 3 ч, растворяют в 50 мл воды в мерной колбе вместимостью 100 мл при

нагревании на кипящей водяной бане, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Приготовление раствора алюминия хлорида: 2 г алюминия хлорида (ГОСТ 3759-75) растворяют в 50 мл воды в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают

Приготовление буферного раствора с рН 4,0: 10 мл 1М раствора натрия едкого помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 57 мл раствора уксусной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают

ВЫВОДЫ

В результате проделанной работы были сделаны следующие выводы:

1. Определено содержание аскорбиновой кислоты в плодах лимона обыкновенного и шиповника коричного. Выявлено, что содержание витамина С в шиповнике коричном – 1,2 г/ 100 г а.с.в., в лимоне обыкновенном – 0,04 г/ 100 г а.с.в. Установлено, что в наибольшем количестве аскорбиновая кислота содержится в шиповнике..

2. При сравнении содержания витамина С содержится в красном перце (250 мг) по отношению к желтому перцу. А далее содержание витамина С немного снижается. Так в цветной капусте определили 70 мг на 100 г навески, и яблоках - 50 мг.

3. Определено содержание полифенолов, флавоидов и антоцианов в составе свежего и замороженного винограда. Установлено, что наибольшее содержание антиоксидантов содержится в свежем винограде.

4. Установлено, что термическая обработка тоже влияет на содержание витамина С.

5. Проведено сравнительное изучение состава биологически активных веществ свежих, замороженных и высушенных плодов боярышника, рябины, малины и шиповника с использованием тонкослойной хроматографии. Установлено, что содержание свободных органических кислот в свежих, замороженных и высушенных образцах сырья составляет – $2,61 \pm 0,02\%$; $2,57 \pm 0,03\%$; $0,90 \pm 0,02\%$ для плодов боярышника; $5,90 \pm 0,03\%$; $5,78 \pm 0,04\%$; $3,35 \pm 0,03\%$ для плодов рябины; $4,62 \pm 0,04\%$; $4,77 \pm 0,06\%$; $2,15 \pm 0,03\%$ для плодов шиповника; $7,40 \pm 0,04\%$; $6,00 \pm 0,04\%$; $5,38 \pm 0,08\%$ для плодов малины (соответственно).

6. Содержание флавоноидов в свежих, замороженных и высушенных образцах сырья составляет – $0,192 \pm 0,008\%$; $0,164 \pm 0,006\%$; $0,152 \pm 0,006\%$; для плодов боярышника; $0,242 \pm 0,006\%$; $0,218 \pm 0,009\%$; $0,193 \pm 0,004\%$; для плодов рябины; $0,207 \pm 0,004\%$; $0,195 \pm 0,005\%$; $0,182 \pm 0,007\%$; для плодов шиповника (соответственно).

7. Содержание суммы антоцианов в свежих, замороженных и высушенных плодах малины составляет $0,903 \pm 0,011\%$; $0,717 \pm 0,008\%$; $0,094 \pm 0,004\%$ (соответственно).

На основе полученных данных рекомендуется использовать в ежедневном рационе питания по продуктам питания:

Лучше всего употреблять в пищу свежие овощи и фрукты. Но в зимнее время приходится в основном питаться продуктами их заготовки. Важно уметь правильно приготовить овощи и фрукты на зиму, чтобы они не теряли витаминную ценность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Янковский О.Я. Токсичность кислорода и биологические системы (эволюционные, экологические и медико-биологические аспекты)/О.Я. Янковский. //С-Пб.: «Игра», 2000. -294 с.
2. . Загоскина Н.В. Биофлавоноиды высших растений– биологически активные вещества для фармацевтической и пищевой промышленности / Н.В. Загоскина //Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными природными ресурсами и создания функциональных продуктов(4-5 июня2007 г.): МатериалыIV Российской научно-практической конференции. – М.:РАЕН. 2007.-С. 99.
3. Кошечкина А.С. Разработка методов анализа флавонов как индикаторных компонентов лекарственного растительного сырья/А.С. Кошечкина// Автореф. дис. канд. фарм. наук. Москва.2007. -24 с.
4. Пахомов В.П. Способ определения суммарной антиоксидантной активности биологически активных соединений/ В.П. Пахомов, Я.И. Яшин, А.Я. Яшин, В.Л.Багирова, А.П. Арзамаева, В.Г. Кукес, Е.В. Ших// Патент РФ №2238554. G 01N 33/15, G 01N 27/26. Приоритет от25.07. 2003 г.
5. Цыбулько У. И. Об антиоксидантной и антирадикальной активности *Saroparia officinalis* L. флоры Приморского края/ У. И. Цыбулько, Т. А. Ершова, Т. П. Юдина, Ю. В. Бабин// Хранение и перераб. с/х сырья. – 2004, - №2. – С. 32-34.
6. . Яшин А.Я. Экспрессный электрохимический метод анализа антиоксидантной активности пищевых продуктов/ А.Я. Яшин, Я.И.Яшин, Н.И. Черноусова, В.П.Пахомов. // Пиво и напитки. – 2004, №6. – С.32-36.
7. Ю.В. Гелетий, Ж.Ж.А. Балавуэн, О.Н. Ефимов, В.С. Куликова// Биоорганическая химия, 2002, Т. 28, №6, -С. 551-566.
8. Шанин Ю.Н. Антиоксидантная терапия в клинической практике/ Ю. Н. Шанин, В. Ю. Шанин, Е. В. Зиновьев.- Изд-во С-Пб. - 2003. – 120 с.

9. Гуревич П.А., Докучаева И.С., Герасимов М.К. Технологические и биохимические основы алкогольсодержащих напитков (Учебное пособие) – Спб.: Изд-во ООО«Перспектив науки»– 2007. – 448 с.
10. Абдулин И.Ф. Органические антиоксиданты как объекты анализа / И.Ф. Абдулин, Е.Н. Турова, Г.К. Будников // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2001. – Т.167. № 6. – С.3-13.
11. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в живых системах Биофизика. Итоги науки и техники / Ю.А. Владимиров и др.– М.: ВИНТИ АН СССР, 1991. – 252 с.
12. Рогинский В.А. Фенольные антиоксиданты: реакционная способность и эффективность / В.А. Рогинский – М.: Наука, 1988. – 247 с.
13. Абдулин И.Ф. Органические антиоксиданты как объекты анализа / И.Ф. Абдулин, Е.Н. Турова, Г.К. Будников // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2001. – Т.167. № 6. – С.3-13.
14. Березовский В.М. Химия витаминов / В.М. Березовский. – М.: Пищевая промышленность, 1973. – 632 с.
15. Русина И.Ф. Биохимия хранения овощей и плодов / И.Ф. Русина, И.С. Морозова. – М.: Наука, 1990. – 116 с.
16. Решетняк Л.П. Пути улучшения качества и сохранности пищевых продуктов / Л.П. Решетняк, Н.И. Пилипенко. – Л.: ЛИСТ, – 1988. – 329 с.
17. «Медицинская популярная энциклопедия. Человек и здоровье» / Г.И. Билич, Л.А. Назарова; Под ред. Г.И. Билич. - Москва, 1998. – 753с
18. Либберт Э. В. Физиология растений / Э.В. Либберт – М. : Мир, 1976. – 271с.
19. Яковлева, Г.П. Лекарственное сырье животного и растительного происхождения.
20. Биологически активные вещества растительного происхождения / Б.Н. Головкин, Р.Н. Руденская, И.А. Трофимова, А.И. Шретер. – М.: Наука, 2002

21. Ломбоева С.С., Танхаева Л.М., Оленников Д.Н. Динамика накопления флавоноидов в надземной части ортилии однобокой (*orthilia secunda* (L.) house) // Химия растительного сырья. 2008. №3. С.83-88/
22. Cotelle N., Bernier J.L., Catteau J.P. et al. Antioxidant properties of hydroxy-flavones // *Free Radic. Biol. Med.*- 1996.- Vol. 20.- P. 35-43. 425. , 76
23. Биологически активные вещества растительного происхождения / Б.Н. Головкин, Р.Н. Руденская, И.А. Трофимова, А.И. Шретер. – М.: Наука, 2002ждения. Фармакогнозия./ Г.П. Яковлева – Спб.: Спецлит, 2006. – 845с.
24. Arora A., Nair M.G., Strasburg G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system // *Free Radic. Biol. Med.*- 1998.- Vol. 24,- P. 1355— 1363.
25. Jung H.A., Jung M.J., Kim J.Y. et al. Inhibitory activity of flavonoids from *Prunus davidiana* and other flavonoids on total ROS and hydroxyl radical generation // *Arch. Pharm. Res.*- 2003- Vol. 26.-P. 809-815.
26. Beyer G., Melzig M.F. Effects of selected flavonoids and caffeic acid derivatives on hypoxanthine-xanthine oxidase-induced toxicity in cultivated human cells // *Planta Med.*- 2003- Vol. 69- P. 1125-1129.
27. Brown J.E., Khodr H., Hider R.C., Rice-Evans C.A. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties // *Biochem. J.*- 1998.- Vol. 330.-P. 1173-1178.
28. Cheng I.F., Breen K. On the ability of four flavonoids, baicalein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex // *BioMetals.*- 2000.- Vol. 13.-P. 77-83.
29. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds // *Trends Plant Sci.*- 1997.- Vol. 2.-P. 152-159.
30. Arora A., Nair M.G., Strasburg G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system // *Free Radic. Biol. Med.*- 1998.- Vol. 24,- P. 1355— 1363.
31. Kim D.O., Lee C.Y. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free

radical and its structural relationship // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*- 2004.- Vol. 44.- P. 253-273.

32. Lien E.J., Ren S., Bui H.H., Wang R. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants // *Free Radic. Biol. Med.*- 1999.- Vol. 26.- P. 285-294.

33. Cao G., Sofic E., Prior R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships // *Free Radic. Biol. Med.*- 1997.- Vol. 22.- P. 749-760.

34. Sugihara N., Arakawa T., Ohnishi M., Furuno K. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with α -linolenic acid // *Free Radic. Biol. Med.*- 1999.- Vol. 27.- P. 1313-1323.]

35. Areias F.M., Rego A.C., Oliveira C.R., Seabra R.M. Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/ Fe^{2+} -induced oxidative stress in cultured retinal cells // *Biochem. Pharmacol.*- 2001.- Vol. 62.-P. 111-118.].

36. Zhu B.T., Liehr J.G. Quercetin increases the severity of estradiol-induced tumorigenesis in hamster kidney // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1994. V. 125. P. 149–158.]

37. Fang N., Casida J.E. Anticancer action of cube insecticide: correlation for rotenoid constituents between inhibition of NADH:ubiquinone oxidoreductase and induced ornithine decarboxylase activities // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 3380–3384.].

38. Umarova F.T., Khushbactova Z.A., Batirov E.H., Mekler V.M. Inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase by flavonoids and their inotropic effect. Investigation of the structure-activity relationship. // *Membr. Cell Biol.* 1998. V. 12. P. 27–40.

39. Агрохимия / Б. А. Ягодин и др.; Под ред. Б. А. Ягодина. – М. : Агропромиздат, 1989. – 156 с.

40. Березовский В.М. Химия витаминов / В.М. Березовский. – М.: Пищевая промышленность, 1973. – 632 с.

41. Бабин Д. М. Энциклопедия цветоводства / Д.М. Бабин – Минск:Миринда, 2000. – 480с.
42. Боброва Т. А. Ботаника: Учебное пособие / Т.А. Боброва – М. :ТЕРРА, 2000. – 304с.
43. Ващенко И. М. Калина – интересный биологический объект / И. М. Ващенко, И. В. Трофимова // Биология в школе. – 1989. -№ 6 – с. 5-9.
44. Верзилин Н. М. Общая методика преподавания биологии/ Н. М. Верзилин, В. М. Корсунская – М.: Просвещение, 1976.
45. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в живых системах Биофизика. Итоги науки и техники / Ю.А. Владимиров и др.– М.: ВИНТИ АН СССР, 1991. – 252 с.
46. ГОСТ 19885-74. Методы определения содержания танина и кофеина. Введено 01.07.75. – М.: Изд-во стандартов, 1975. – С.77.
47. Генкель П. А. Физиология растений / Генкель П. А. – М. :Просвещение, 1985. – 335с.
48. Гроздова А. Б. Деревья, кустарники и лианы / Гроздова А. Б.– М. : Лесная промышленность, 1986.-354 с.
49. Дары природы / Н. В. Третьякова и др.; Под ред.Н. В. Третьяковой – М.: ТЕРРА - Книжный клуб, 1998. – 288с.
50. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта(с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. –М. : Колос, 1968. - 230 с.
51. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений. / А.И. Ермаков, В.В. Арасенович . -Л.: Агропромиздат, 1987. – 430 с.
52. Елизарова Л.Г. Алкогольные напитки / Л.Г. Елизарова, М.А. Николаева.-М.: ОАО «Издательство «Экономика», 1997.
53. Жолобова З. П. Калина / З. П. Жолобова – Мичуринск, 1994. – 174 с.
54. Зверев И. Д. . Общая методика преподавания биологии: Пособие для учителя /И. Д Зверев, А. Н. Мягкова – М. :Просвещение, 1985.-205с.

55. Калинова Г. С. Задания для самостоятельной работы учащихся по биологии / Г. С. Калинова, А. Н. Мягкова – М. : Школа – Пресс, 1999.
56. Комаров И. А. Деревья и кустарники / И. А. Комаров – М. : изд-во Академии наук СССР, 1959. – 164с.
57. Кортиков В. Н. Лекарственные растения / В. Н. Кортиков, А. В. Кортиков – М. : АЙРИС ПРЕСС РОЛЬФ, 1999. – 768с.
58. Кузнецова М. А. Сказания о лекарственных растениях / М. А. Кузнецова, А. С. Резникова – М. : Высшая школа, 1992. – 372с.
59. Лаптев Ю. П. Растения от А до Я / Ю. П. Лаптев – М. : Колос, 1992. – 538с.
60. Либберт Э. В. Физиология растений / Э. В. Либберт – М. : Мир, 1976. – 271с.
61. Мягкова А. Н. Методика обучения общей биологии / А. Н. Мягкова, Б. Д. Комиссаров – М. : Просвещение, 1985. – 260с.
62. . «Медицинская популярная энциклопедия. Человек и здоровье» / Г. И. Билич, Л. А. Назарова; Под ред. Г. И. Билич. – Москва, 1998. – 753с.
63. Надиров Н. К. Токоферолы и их использование в медицине и сельском хозяйстве / Н. К. Надиров – М. : Наука, 1991. – 336 с.
64. «Популярная медицинская энциклопедия. Большая медицинская энциклопедия» / Б. В. Петровский и др.; Под ред.: Б. В. Петровского. Москва, 1979. – 489с.
65. Похлебкин В. В. Чай / В. В. Похлебкин. – М. : Центрполиграф, 1997. – 264с.
66. Рычин Ю. В. Древесно-кустарниковая флора / Ю. В. Рычин – М. : Просвещение, 1972. – 264с.
67. Решетняк Л. П. Пути улучшения качества и сохраняемости пищевых продуктов / Л. П. Решетняк, Н. И. Пилипенко. – Л. : ЛИСТ, – 1988. – 329
68. Рогинский В. А. Фенольные антиоксиданты: реакционная способность и эффективность / В. А. Рогинский – М. : Наука, 1988. – 247 с.

69. Русина И.Ф. Биохимия хранения овощей и плодов / И.Ф. Русина, И.С. Морозова. – М.: Наука, 1990. – 116 с.
70. Сборник описаний лабораторных работ по курсу «Биологическая химия» / Сост.: Избранова С.И. – Славянск – на – Кубани: Идательский центр СГПИ, 2006. – 44 с.
71. Тукачев С. Н. Лекарственные растения юга России / С. Н. Тукачев – М. , 1992. – 160с.
72. Хессайон Д. Г. Все о комнатных растениях / Д. Г. Хессайон – М. :Кладезь-Букс, 2000. – 256с.
73. Цоциашвили И.И. Химия и технология чая. / И.И. Цоциашвили, И.А. Бокучава. – М.: Агропромиздат, 1989. – 379 с.
74. Якушкина Н. И. Физиология растений / Н. И. Якушкина– М. : Просвещение, 1980. – 389с.
75. WWW.TEA.4YOU.RU
76. www.mate.ru
77. www.mariamm.ru.files
78. www.GardenDigger.com
79. teatips.ru,.
80. <http://www.tks.ru/>
81. <http://www.tea.ru/>
82. <http://www.okp.ru/>
83. <http://www.coffeetea.ru/>
84. <http://www.tea&coffee.ru/>
85. http://www.teainfo.ru/article_tmarket.html
86. http://www.teainfo.ru/article_tmarket.html
87. www.antioxidant-of-food.bessmertie.ru