

3. Калитка В.В. Антиоксидантові властивості продуктів взаємодії амінокислот з вуглеводами за умов реакції Майларда / В.В. Калитка, Г.В. Донченко // Укр. біохім. журн. - 1995. - Т. 67, №2. - С.80 – 85.
4. Колесніков М.О. Роль антиоксидантної системи в адаптації качок до умов постнатального розвитку / М.О. Колесніков, В.В. Калитка // Укр. біохім. журн. - 2002. - Т. 74, №2. - С.123 – 127.
5. Данченко О.О. Особливості антиоксидантного гомеостазу печінки гусей в ранньому постнатальному онтогенезі / О.О. Данченко, В.В. Калитка // Укр. біохім. журн. - 2002. - Т. 74, №2. - С. 69 –72.
6. Рахманов А.И. Фазановые: содержание и разведение / А.И. Рахманов, Б.Ф. Бессарабов. - Москва : Агропромиздат, 1991. - 176 с.
7. Антонова Б.И. Лабораторные исследования в ветеринарии: биохимические и микологические / Б.И. Антонова. - Москва : Агропромиздат, 1991. - 278 с.
8. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. - Москва : Наука, 1972. - 252 с.
9. Методы исследования липидов в организме и тканях животных / Метод. указания. - Львов, 1983. - 22 с.
10. Двинская Л.М. Жирорастворимые витамины и методы их определения в биологических субстратах / Л.М. Двинская. - Боровск, 1979. - 89 с.
11. 11. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, А.И. Иванова // Лаб. дело. - 1988. - №1. - С.16 – 19.
12. Гаврилова О.Г. Определение активности глутатионпероксидазы эритроцитов при насыщающих концентрациях субстрата / О.Г. Гаврилова, П.Ф. Хмара // Лаб. дело. - 1986. - №12. - С. 712 – 723.
13. Дубинина Е.Е. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека / Е.Е. Дубинина, Л.А. Сальникова, Л.Ф. Ефимова // Лаб. дело. - 1983. - №10. - С. 30 – 33.
14. Lowry O.N. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.N. Lowry, N.V. Rosenbrough, A.L. Farr // J. Biol. Chem. - 1951. - 193, №1. - P. 265 – 275.
15. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. - М.: Высшая школа, 1990. - 352 с.

УДК 634.26:547.56

ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСТРАКТОВ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ФЕНОЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ЛИСТЬЕВ НЕКТАРИНА

Корнильев Г.В., младший научный сотрудник

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр УААН

В листьях 8 сортов нектарина селекции НБС – ННЦ проведено изучение содержания фенольных веществ в период сентябрь-ноябрь. Из листьев с наибольшим значением данного показателя (сорт Сувенир Никитский; собраны 12.11.08) путем варьирования 5 факторами на 4 уровнях значений определены оптимальные режимы получения экстрактов с повышенным содержанием фенольных веществ: температура – 65 °С; продолжительность настаивания – 168 ч.; соотношение листья:этанол – 1:3; концентрация этанола – 60 % об.; степень измельчения листьев – 2-3 мм.

Ключевые слова: нектарин, листья, фенольные вещества, получение экстрактов.

Корнильєв Г.В. ОТРИМАННЯ ЕКСТРАКТІВ ІЗ ПІДВИЩЕНИМ ВМІСТОМ ФЕНОЛЬНИХ РЕЧОВИН З
ЛИСТКІВ НЕКТАРИНА / Нікітський ботанічний сад – Національний науковий центр УААН, Україна

У листах 8 сортів нектарина селекції НБС – ННЦ проведено вивчення вмісту фенольних речовин у період вересень-листопад. З листків із найбільшим значенням цього показника (сорт Сувенір Нікітський; зібрано 12.11.08) шляхом варіювання 5 факторами на 4 рівнях значень визначені оптимальні режими отримання екстрактів із підвищеним вмістом фенольних речовин: температура – 65 °С; тривалість настоювання – 168 год.; співвідношення листя:етанол – 1:3; концентрація етанолу – 60 % об.; ступінь подрібнення листків – 2-3 мм.

Ключові слова: нектарин, листки, фенольні речовини, отримання екстрактів.

Kornilyev G.V. OBTAINING OF EXTRACTS WITH THE HIGHEST PHENOLIC SUBSTANCES CONTENTS FROM NECTARINE LEAVES / Nikitsky Botanical Garden – National Scientific Centre, Ukraine.

In nectarine leaves of 8 varieties bred in NBG – NNC bred phenolic substances contents had been studied. From the leaves with the highest content (the ‘Souvenir Nikitsky’ variety; collected in 2008.11.12) the optimal regimes of obtaining extracts with the highest phenolic substances contents have been determined by 5 factors on 4 score levels variations: temperature – 65 °C; infusion time – 168 h.; the leaves-ethanol correlation – 1:3; ethanol concentration – 60 % vol.; the leaves crumbling degree – 2-3 mm.

Keywords: nectarine, leaves, phenolic substances, extract obtaining

ВВЕДЕНИЕ

Важное влияние на жизнедеятельность человеческого организма оказывают биологически активные вещества (БАВ), в частности так называемые “фенольные вещества”, к которым относят гидроксикоричные кислоты, кумарины, флавоноиды. Последние имеют особое значение. Среди них с точки зрения биологической активности наиболее изучены флавоноиды. В литературе описана их Р-активность (улучшают состояние капиллярной системы, снижая ее проницаемость и хрупкость), нормализующее действие на лимфоток, способность регулировать эритропоэз, радиозащитное, антирадикальное, антимикробное действие и др. [1 – 3].

В процессе поиска новых источников БАВ (в т.ч. фенольных веществ) все большее внимание уделяется новым и нетрадиционным культурам, в частности южным плодовым. Одной из перспективных для Украины является нектарин – *Persica vulgaris subsp. nectarina* (Ait.) Shof. – персик голоплодный [4]. В литературе (например [5, 6, 7]) у персика опушенного и нектарина изучен в основном химический состав плодов. Вместе с тем представляет интерес также сравнительно немногочисленная информация, касающаяся содержания БАВ в их вегетативных органах, в частности листьях. Так, А.А. Садыковым и А.С. Садыковым [8] из листьев персика выделены кемпферол-3-β-D-диглюкопиранозид и кверцетин-3-β-D-диглюкопиранозид. Л.В. Упыр и А.Н. Комисаренко [9] идентифицировали в побегах и листьях персика 4 вещества кумариновой природы (кумарин, скополетин, скополин, умбеллиферон). Также в литературе [10] упоминается “Олексин” – лекарственный препарат из листьев персика.

Большая работа по исследованию вегетативных органов плодовых культур, в частности персика и нектарина, проводится в отделе биотехнологии и биохимии НБС – ННЦ. Так установлено, что в листьях нектарина накапливается в 1,8 раза больше полифенолов (проантоцианидинов), чем в плодах [11]. Также выявлено [12], что антиоксидантная активность листьев персика, обусловленная преимущественно наличием фенольных веществ, составляет 70% (контроль – ионол), что превышает значения показателя в листьях алычи, граната, зизифуса, инжира, киви, маслины европейской и сливы. Имеющиеся данные послужили предпосылкой для проведения исследований возможности получения спиртовых экстрактов из листьев нектарина с повышенной антиоксидантной активностью [13].

Вместе с тем, по-прежнему актуальным остается вопрос о способах выделения веществ, обладающих биологической активностью, из различных источников (в т.ч. листьев плодовых культур), особенно в связи с возможностью использования при производстве лечебно-профилактической продукции. Для комплекса фенольных веществ одним из таких способов является получение водно-спиртовых экстрактов.

Целью настоящей работы являлась оптимизация режимов получения экстрактов из листьев нектарина для достижения максимального содержания фенольных веществ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований явились листья 8 сортов нектарина селекции НБС – ННЦ, принадлежащие к различным группам созревания: ранние (I – II декады июля – ‘Никитский 85’), раннесредние (III декада июля – ‘Рубиновый 4’), средние (I – III декады августа – ‘Аметист’, ‘Крымчанин’, ‘Рубиновый 7’, ‘Сувенир Никитский’), поздние (I – III декады сентября – ‘Евпаторийский’, ‘Рубиновый 8’) [14]. Листья анализировались на содержание фенольных веществ после сбора плодов, в период сентябрь-ноябрь. В определении оптимальных по содержанию фенольных веществ сортов и сроков сбора листьев для приготовления экстрактов использовались данные, полученные в 2005-07 гг. Содержание фенольных веществ определялось спектрофотометрически с использованием реактива Фолина – Чокальтеу с пересчетом полученных значений на галловую кислоту [15]. В качестве экстрагента выбран 1 %-ный раствор соляной кислоты в этаноле. Для оптимизации режимов получения экстрактов, обогащенных фенольными веществами, был составлен многофакторный многоуровневый план (ДФЭ₄⁵), который предполагал получение 16 водно-этанольных экстрактов путем варьирования 5 параметрами на 4 уровнях значений:

- температура – 20 ... 35 ... 50 ... 65 °C;
- продолжительность настаивания – 72...120...168...216 ч;
- соотношение листья:этанол – 1:3...1:5...1:7...1:9;
- концентрация этанола – 40 ... 50 ... 60 ... 70 % об.;
- степень измельчения листьев – < 2 ... 2-3 ... 3-5 ... > 5 мм.

При составлении ортогональной матрицы планирования выбор уровней значений параметров производили по таблице случайных чисел [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа листьев нектарина, собранных после уборки плодов (сентябрь-ноябрь) (табл. 1), установлено увеличение содержания в них фенольных веществ в течение всего исследуемого периода.

Таблица 1 – Среднее содержание фенольных веществ (в пересчете на сырую массу) в листьях нектарина в осенний период (по данным за 2005-07 гг.)

Сорт	Дата анализа		
	13.09	13.10	12.11
Аметист	2510 ± 162	2420 ± 156	2860 ± 198
Евпаторийский	2210 ± 218	3140 ± 344	3520 ± 178
Крымчанин	1820 ± 225	2190 ± 368	3140 ± 175
Никитский 85	2480 ± 174	2830 ± 215	3350 ± 215
Рубиновый 4	1870 ± 150	1760 ± 175	3510 ± 308
Рубиновый 7	2260 ± 246	2370 ± 198	2710 ± 298
Рубиновый 8	1740 ± 189	1790 ± 194	3270 ± 186
Сувенир Никитский	2370 ± 165	2380 ± 159	4610 ± 167

Наиболее резкий прирост значений данного показателя отмечен в период октябрь-ноябрь и у ряда сортов ('Крымчанин', 'Рубиновый 7', 'Рубиновый 8', 'Сувенир Никитский') достигал 40-100 %. При этом четко выраженной связи между принадлежностью сорта к определенной группе созревания и содержанием в его листьях фенольных веществ не выявлено. Максимальное количество фенольных веществ отмечено в листьях сорта 'Сувенир Никитский', собранных в середине ноября. Именно эти листья использовались для приготовления серии экстрактов.

На втором этапе исследований путем варьирования 5 параметрами (температура, продолжительность настаивания, соотношение листья:этанол, концентрация этанола, степень измельчения листьев) было приготовлено 16 водно-этанольных экстрактов (табл. 2). Полученные данные позволяют заключить, что в зависимости от выбранных режимов экстрагирования можно получить экстракты с содержанием фенольных веществ от 594 до 1700 мг/дм³. Наибольшее содержание фенольных веществ отмечено в опыте 8, который характеризовался следующими условиями: температура – 50 °С, продолжительность настаивания – 72 ч, соотношение листья:этанол – 1:3, концентрация этанола – 60 % об., степень измельчения листьев < 2 мм.

Таблица 2 – Содержание фенольных веществ в экстрактах из листьев нектарина (сорт 'Сувенир Никитский'; собраны 12.11.08) в зависимости от режимов экстрагирования

Вариант опыта	Уровни режимов экстрагирования					Содержание фенольных веществ, мг/дм ³
	Температура °С	Продолжительность настаивания, ч.	Соотношение листья:этанол	Концентрация этанола, % об.	Степень измельчения листьев, мм	
1	65	120	1:9	70	2-3	1160
2	65	120	1:7	40	2-3	1390
3	65	168	1:5	60	2-3	1190
4	65	168	1:3	50	2-3	1250
5	50	216	1:9	40	< 2	594
6	50	216	1:7	70	< 2	783
7	50	72	1:5	50	< 2	1390
8	50	72	1:3	60	< 2	1700
9	35	168	1:9	70	> 5	1220
10	35	168	1:7	40	> 5	1150
11	35	120	1:5	50	> 5	1130
12	35	120	1:3	60	> 5	838
13	20	72	1:9	40	3-5	1240
14	20	72	1:7	70	3-5	1390
15	20	216	1:5	50	3-5	795
16	20	216	1:3	60	3-5	764

Для оценки вклада уровня каждого фактора в значение содержания фенольных веществ и подбора оптимального сочетания уровней факторов с точки зрения максимального перехода компонентов в экстракт был рассчитан эффект выхода (табл. 3).

Таблица 3 – Зависимость эффекта выхода от уровня факторов

Фактор и его значение	Среднее содержание фенольных веществ, мг/дм ³	Эффект выхода
Фактор 1 – температура, °С		
20	1050	-70
35	1080	-40
50	1120	0
<u>65</u>	<u>1250</u>	<u>130</u>
Фактор 2 – продолжительность настаивания, ч		
72	1140	20
120	1130	10
<u>168</u>	<u>1180</u>	<u>60</u>
216	1050	-70
Фактор 3 – соотношение листья:этанол		
<u>1:3</u>	<u>1430</u>	<u>310</u>
1:5	1130	10
1:7	1200	80
1:9	734	-386
Фактор 4 – концентрация этанола, % об.		
40	1090	-30
50	1070	-50
<u>60</u>	<u>1200</u>	<u>80</u>
70	1140	20
Фактор 5 – степень измельчения листьев, мм		
< 2	1120	0
<u>2-3</u>	<u>1250</u>	<u>130</u>
3-5	1050	-70
> 5	1080	-40

Установлено, что наибольший эффект выхода фенольных веществ в экстракт имеет место при температуре 65 °С. Это объясняется увеличением скорости диффузии компонентов. При этом, учитывая увеличение эффекта выхода по мере роста уровня фактора, можно заключить, что в рассматриваемом диапазоне температур (20-65 °С) ощутимого окисления фенольных веществ не происходит.

При увеличении продолжительности настаивания наблюдается, с одной стороны, рост количества вещества, перешедшего в экстракт, с другой – начало его окисления и выпадения в осадок вследствие полимеризации. По нашим данным 168 ч является оптимальной продолжительностью настаивания.

Увеличение соотношения листья:этанол (1:3...1:9), наряду с ростом степени извлечения фенольных веществ экстрагентом, приводит также к снижению их концентрации вследствие разбавления. В связи с этим оптимальным является соотношение 1:3.

С ростом концентрации этанола степень извлечения фенольных веществ возрастает до определенного предела (60 % об.), после чего наблюдается снижение растворимости полимерных форм.

Степень измельчения, от которой зависит площадь контакта между фазами, также влияет на степень перехода компонентов в экстракт. При этом при чрезмерном измельчении листьев (< 2 мм) эффект выхода снижается, по-видимому, по причине происходящего в этом случае окисления фенольных веществ. Оптимальным в нашем случае являлось измельчение листьев до 2-3 мм.

Таким образом, при сравнении табл. 2 и 3 видно, что расчет эффектов выхода позволил уточнить оптимальные значения температуры экстрагирования и степени измельчения сырья.

На следующем этапе работы с целью подтверждения данных результатов (табл. 4) был получен экстракт при установленных оптимальных значениях параметров. Полученное максимальное значение фенольных веществ (1940 мг/дм³) экспериментально подтвердило оптимальность режима получения экстракта.

Перспективой дальнейшей работы является практическое использование полученных результатов.

Таблица 4 – Оптимальный режим получения экстракта с повышенным содержанием фенольных веществ из листьев нектарина

Фактор		Значение	Содержание фенольных веществ, мг/дм ³
1	Температура, °С	65	1940
2	Продолжительность настаивания, ч	168	
3	Соотношение листья:этанол	1:3	
4	Концентрация этанола, % об.	60	
5	Степень измельчения листьев, мм	2-3	

ВЫВОДЫ

1. Проведенное изучение содержания фенольных веществ в листьях 8 сортов нектарина различных групп созревания (в период сентябрь-ноябрь) свидетельствует об отсутствии связи между значениями данного показателя и сроком созревания плодов.
2. На основании данных за 2005-07 гг. установлено, что наибольшим содержанием фенольных веществ отличаются листья сорта 'Сувенир Никитский', собранные в середине ноября.
3. Проведена оптимизация режимов получения экстрактов с повышенным содержанием фенольных веществ из листьев нектарина. Установлено, что оптимальными параметрами являются: температура – 65 °С; продолжительность настаивания – 168 ч.; соотношение листья:этанол – 1:3; концентрация этанола – 60 % об.; степень измельчения листьев – 2-3 мм.
4. Полученные данные позволяют рассматривать листья нектарина в качестве источника БАВ (в частности комплекса фенольных веществ), в т.ч. для получения экстрактов, которые представляют интерес для использования в лечебно-профилактических целях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барабой В.А. Биологическое действие растительных фенольных соединений. – К.: Наукова думка, 1976. – 260 с.
2. Рогинский В.А. Фенольные антиоксиданты. – М.: Наука. – 1988. – 243 с.
3. Hagerman A.E. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants / Hagerman A.E., Riedl K.M., Jones G.A., Sovik K.N., Ritchard N.T., Hartzfeld P.W., Riechel T.L. // J. Agr. And Food Chem. – 1998. – V. 46. – N. 5. – P. 1887-1892.
4. Шоферистов Е.П. Происхождение, генофонд и селекционное улучшение нектарина: Автореф. дис...д-ра биол. наук / Госуд. никит. ботан. сад – Ялта, 1995. – 56 с.
5. Рихтер А.А. Совершенствование качества плодов южных культур. – Симферополь: Таврия, 2001. – 426 с.
6. Drogoudi P.D., Tsiouridis C.G. Effects of cultivar and rootstock on the antioxidant content and physical characters of clingstone peaches of clingstone peaches / Sci. Hort. – 2007. – V. 115 (1) – P. 34-39.
7. Andreotti C. Phenolic compounds in peach (*Prunus persica*) cultivars at harvest and during fruit maturation / Andreotti C., Ravaglia D., Ragaini A., Costa G. // Annals of appl. biol. – 2008. – N 153(1). – P. 11-23.
8. Садыков А.А., Садыков А.С. Полифенольные соединения *Persica vulgaris* // Химия природных соединений, 1979. – №3. – С. 316-318.
9. Упыр Л.В., Комисаренко А.Н. Кумарины *Persica vulgaris* // Химия природных соединений, 2002. – №. 1. – С. 79.
10. Петров В.Ф. "Олексин" - лекарственное средство, получаемое из листьев персика / Петров В.Ф., Сафонова Г.М., Перевозчиков А.Б. // Четверта міжнародна конференція з медичної ботаніки: Тези доповідей. – К., 1997. – С. 518.
11. Полонская А.К. Биологически активные вещества листьев некоторых плодовых культур в связи с перспективой их использования в пищевых продуктах / Полонская А.К., Ежов В.Н., Корнильев Г.В., Гребенникова О.А. // Ученые записки ТНУ им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2007. – Т. 20 (59). – № 3. – С. 122 - 127.
12. Полонская А.К. Биопотенциал листьев некоторых плодовых культур в связи с перспективами его использования в лечебно-профилактической продукции // Лікарські рослини: традиції та перспективи досліджень: Мат. міжнар. наук. конф., присвяч. 90-річчю Дослідної станції лікарських рослин УААН. Березоточа, 12-14 липня 2006 р. – К., 2006. – С. 325-329.

13. Корнильев Г.В., Ежов В.Н. Об антиоксидантной активности листьев некоторых сортов нектарина // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2008. – Вып. 97. – С. 68-71.
14. Каталог сортов нектарина коллекции Государственного Никитского ботанического сада / Сост. Шоферистов Е.П., Орехова В.П., Овчаренко Г.В. – Ялта, 1988. – 16 с.
15. Методы технохимического контроля в виноделии / Под ред. Гержиковой В.Г. – Симферополь: Таврида. – 2002. – 259 с.
16. Грачев Ю.П. Математические методы планирования экспериментов. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 118 с.