

Научно-исследовательская работа

Биология

**Биологическая активность плодов *Vaccinium vitis-idaea* L.**

*Авторы:*

***Гвоздева Валерия***

*Ученица 10 класса*

***Кашуба Елизавета***

*ученица 10 класса*

*Руководитель:*

***Абрамова Эльвира Александровна***

*к.б.н., педагог дополнительного образования*

*ГОО ДО ТО «ОЭБЦУ», Тула*

## Введение

Одной из основных причин снижения иммунитета организма, преждевременного старения, развития многих заболеваний является недостаток в организме антиоксидантов и избытка свободных радикалов.

В настоящее время тема свободных радикалов и реакционноспособных кислородосодержащих частиц привлекает повышенное внимание современную медицину и фармацию. Это связано с условиями усиливающихся экологопроизводственного прессинга и некачественного питания.

Регулирование процессов свободно радикального окисления и уровня накапливающихся перекисных радикалов осуществляет защитная антиоксидантная система организма человека. Концентрация свободных радикалов в клетках организма может достичь уровня, при котором его собственная антиоксидантная система не справляется с дезактивацией повреждающих агентов. В этом случае возникает «окислительный стресс», который является одной из причин предотвращающей старение организма и развития патологического состояния.

Поиск дезинтоксикационных лекарственных средств является актуальной задачей современной медицины. С каждым годом увеличивается перечень известных токсических соединений всех категорий, в том числе сохраняется высокая частота встречаемости интоксикации лекарственными веществами. Следовательно, весьма актуальным становится поиск новых, легкодоступных и нетоксичных источников природных антиоксидантов и антиоксидантов.

Организм человека постоянно вырабатывает оксиданты или свободные радикалы (форма кислорода) – молекулы, имеющие один неспаренный, свободный электрон и за счёт этого обладающие повышенной химической активностью. Они участвуют во многих процессах, ежесекундно происходящих в клетках тела человека. Без них невозможно нормальное

усвоение пищи, борьба с болезнетворными бактериями, вирусами и грибами. Однако под воздействием неблагоприятных факторов, таких как – загрязненная экологическая обстановка, неправильное питание, стрессы, не здоровый образ жизни и прочее, в организме происходит сбой, и он производит избыточное количество оксидантов, которые начинают разрушать совершенно здоровые клетки, органы и ткани. Здесь и выходят на помощь антиоксиданты - вещества, способные связывать и тем самым обезвреживать оксиданты.

**Целью** настоящей работы являлось исследование флавоноидного состава плодов *Vaccinium vitis-idaea L* (*брусника обыкновенная*), а также изучение влияния условий их хранения на стабильность флавоноидов.

Исходя из этого, нам предстояло решить следующие **задачи**:

1. Оценить качественный состав флавоноидов и аскорбиновой кислоты в бруснике обыкновенной.
2. Определить количество флавоноидов в свежих, высушенных и замороженных плодах *Vaccinium vitis-idaea L*.

## Глава 1 Литературный обзор

Флавоноиды (лат. flavus – желтый) представляют собой полифенолы или красящие пигменты. Соединения присутствуют во всех представителях флоры – в бобовых, розоцветных, гречишных и зонтиковых. Наиболее богаты ими надземные части трав и растений: незрелые плоды, молодые листья, цветки. Ученые считают флавоноиды сложными формулами со множеством групп. Первый, кто описал этот класс растительных метаболитов, был американский биохимик Альберт де Сент-Дьерди в 1936 году. В ходе исследования влияния некоторых продуктов на человека ученый выделил необычное вещество, обладающее свойством укреплять стенки венозных сосудов и регулировать их проницаемость. Он предложил назвать соединение витамином Р, однако термин не прижился. И лишь в 1952 году Т. Гейссман и Е. Гинрейнер ввели в обиход новое наименование полифенольной группы – флавоноиды. Тогда же стало понятно, что уникальное вещество состоит из множества биологически активных соединений, обладающих сходными характеристиками.

**Все флавоноиды проявляют Р-витаминное (ангиопротекторное) действие, однако между ними есть и разница.** Они разделены на 10 групп:

1. *Катехины.* Самые биологически активные вещества. Накапливаются в листьях зеленого чая, косточках винограда.
2. *Лейкоантоцианидины.* Относятся к дубильным веществам, не соединяются с сахарами.
3. *Антоцианы.* Окрашивают растения в синий, пурпуровый, темно-фиолетовый цвет. Содержатся в ягодах черники, мякоти и кожуре винограда, траве аютины глазки.
4. *Флаваноны.* Небольшая группа полифенолов. Обнаружены у представителей бобовых, розоцветных и астровых.

5. *Флавоны*. Содержат более 20 агликонов (неуглеводная часть молекулы). Присутствуют в плодах боярышника, траве хвоща и фиалки, листьях брусники и др.

6. *Флаванолы*. Отличаются от флавонов присутствием гидроксогруппы.

7. *Флавонолы*. Наиболее многочисленный класс биофлавоноидов. Самые известные из них кемпферол, кверцетин, рутин, авикулярин, гиперозид, кверцитрин.

8. *Халконы и дигидрохалконы*. В растениях могут присутствовать в свободном виде и в качестве гликозидов. Наибольший интерес из этой группы представляет арбутин.

9. *Ауроны*. Встречаются среди бобовых, сложноцветных и норичниковых растений. Больше всего этого вещества содержит трава череды.

10. *Изофлавоны*. Их принято выделять в отдельную группу, поскольку они отличаются от флавоноидов положением бокового фенильного радикала и производят эстрогеноподобный эффект. К изофлавоноидам относят генистеин, формонетин, птерокарпаны.

**Известно, что растительные флавоноиды являются самыми сильными антиоксидантами.** Встречаясь со свободными радикалами, полифенолы восстанавливают их до целой молекулы, сохраняя свою структуру. Флавоноиды цитрусовых, виноградных косточек и листьев защищают от варикоза вен и подкожных кровоизлияний. Антоцианы улучшают зрение, стимулируют мозговую деятельность, предупреждают развитие инсульта.

Флавоноиды также применяются при заболеваниях сердца, аллергии, бронхиальной астме, синуситах. Так, кверцетин способен блокировать приступы сенной лихорадки, ослаблять воспаление дыхательных путей. Этот же нутриент помогает при укусах насекомых, дерматитах, тормозит разрастание раковых клеток, влияет на уровень холестерина в крови.

Непигментированные флавоноиды – катехины – предупреждают разрушение коллагена, оказывают гепатопротекторное действие, улучшают обмен веществ и способствуют снижению массы тела. Нередко их используют и для лечения суставных патологий – артритов, фибромиалгии, подагры. Катехинами особенно богаты сырые какао-бобы и китайский чай. 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.

Ранее других биологических свойств флавоноидов было обнаружено их действие на стенки кровеносных капилляров и свойство замедлять сердечный ритм. Большое значение придается противовоспалительному действию флавоноидов, с которым связаны их противоязвенное, ранозаживляющее, жаропонижающее и вяжущее действие. Обладают они и эстрогенным действием, могут воздействовать на воспроизводительную функцию организма, влияют на половой цикл, вес тела и внутренних органов. Привлекают внимание антимикробные свойства флавоноидов. Выявлено отрицательное влияние на стафилококк, стрептококк. Флавоноиды проявляют обезболивающее действие, воздействуют на ферментные системы, иммунные и обменные процессы в организме. Кверцетин, кемпферол, изорамнетин оказывают влияние на белковый обмен. Доказано их свойство стимулировать синтез и тормозить распад белков.

Об уровне содержания конкретного компонента флавоноидов в организме можно узнать из анализа крови, показывающего количество самого соединения и его метаболитов. **При сбалансированном рационе концентрация полифенолов в плазме крови редко превышает 1 мкМ.** В случае потребления продуктов, богатых биофлавоноидами, уровень вещества поднимается через 2-3 часа после еды, а почти через сутки возвращается к первоначальной цифре.

Уровень полифенолов во многом зависит от индивидуальных особенностей организма. Так, в группе из 10 человек, одновременно употребивших одинаковое количество флавоноидов, содержание веществ в крови колебалось от 25 до 145 нМ. Подобный разброс концентраций не позволяет установить точную суточную потребность человека в фитонутриенте.

Ученые предполагают, что оптимальная дозировка растительных соединений для мужчин и женщин составляет 50-400 мг в день. В отношении детей никаких исследований не проводилось. Для лучшего усвоения растительных фенолов следует пить больше чистой воды – не менее 1,5 литров в сутки.

Избыток флавоноидов никак не влияет на организм человека, излишки веществ выводятся с мочой. Поэтому травы, овощи и фрукты можно употреблять в неограниченном количестве.

Основной причиной недостатка Р-витаминных веществ является скудный рацион. Поэтому дефицит полифенольных соединений чаще всего наблюдается зимой и весной. К тому же количество флавоноидов в тканях быстро уменьшается под воздействием никотина и алкоголя, а также некоторых лекарственных средств: Аспирина, Кортизона, большинства антибиотиков, обезболивающих.

В редких случаях дефицит Р-витаминного вещества может быть вызван заболеваниями желудочно-кишечного тракта, ухудшающими всасываемость полифенолов.

О недостатке флавоноидов говорят такие признаки:

- боль в мышцах во время ходьбы;
- появление синяков от малейшего прикосновения к телу;
- кровоточивость десен;
- плохое кровообращение в конечностях;
- синюшность кожных покровов;
- угревая сыпь, вялость и дряблость кожи лица;

- поредение, сечение волос;
- пигментация.

При появлении подобных симптомов следует обратиться к врачу, сдать анализы, которые либо подтвердят, либо опровергнут наличие в организме дефицита флавоноидов.

Для проведения опытов на определение флавоноидов мы решили взять бруснику обыкновенную.



**Рис.1.Брусника обыкновенная.**

Брусника обыкновенная – это вечнозеленый кустарник высотой 5-25 см с ползучим корневищем. Листья – многолетние, короткочерешковые, очередные, эллиптические, плотные, кожистые, голые. Край листа несколько загнут к нижней стороне, сверху листья темно-зеленые, блестящие, снизу более бледные и тусклые, усеянные темно-бурыми точечными железистыми волосками булавовидной формы. Листья зимуют под снегом. Брусника содержит углеводы, полезные органические кислоты (лимонная, салициловая, яблочная и др.), пектин, каротин, дубильные вещества, витамины А, С, Е. В ягодах до 10-15% сахаров (глюкоза, сахароза, фруктоза), а так же калий, кальций, магний, марганец, железо и фосфор. Благодаря большому количеству бензойной кислоты, ягоды брусники хорошо сохраняются и обладают консервирующими свойствами.

В листьях брусники содержатся дубильные вещества, арбутин, гидрохинон, танин и карбоновые кислоты. Так же галловая, хинная, винная кислоты и витамин С.



В составе семян брусники обнаружены жирные карбоновые кислоты: линолевая и линоленовая.

Ягоды брусники богаты сахарами, органическими кислотами, витаминами. В медицине они используются как вспомогательное средство при лечении гипертонической болезни и гастритов с пониженной кислотностью. Водный настой ягод (морс) хорошо утоляет жажду: его часто рекомендуют больным с высокой температурой. Кроме того, настой ягод брусники оказывает легкое слабительное действие.

Это холодостойкое растение в дикой природе предпочитает регионы с суровой зимой и прохладным летом. И почвы ягода предпочитает более кислые и бедные. Произрастает она обычно в хвойных сухих и смешанных лесах, среди кустарников, а иногда и на торфяных болотах (большой частью на торфяниках высохших).

Витамин С (Аскорбиновая кислота) - противощелочный витамин, который выполняет биологические функции восстановителя и коферментанекоторых метаболических процессов, является антиоксидантом. Биологически активен только один из изомеров— *L*-аскорбиновая кислота, который называют витамином С. В химическом отношении является гексурановой кислотой, названной позже аскорбиновой. Аскорбиновая кислота широко распространена прежде всего в растениях. Организм человека не способен синтезировать аскорбиновую кислоту и должен получать ее с пищей. Аскорбиновая кислота играет важную роль в окислительно-восстановительных процессах, происходящих в организме. Этот витамин существует в двух формах - аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот. Первая легко окисляется, а вторая при восстановлении легко превращается в аскорбиновую кислоту. Кислоту аскорбиновую можно выделить из растительного сырья, в частности из плодов брусники.

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**2.1.** Объектами исследования являлись: свежие, свежемороженые и высушенные плоды *Vaccinium vitis-idaea* L. (БРУСНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ)

Сушку образцов осуществляли в естественных условиях (воздушно-теневая сушка). Образцы свежесготовленных плодов хранили в замороженном состоянии при  $t = -18^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2 Методы исследования для флавоноидов**

Для флавоноидов не существует универсального способа выделения из растительного сырья. В каждом конкретном случае прибегают к наиболее подходящему методу или сочетанию методов. При этом необходимо учитывать, как свойства веществ, так и особенности растительного сырья. В связи с этим мы пристальное внимание уделили приготовлению экстрактов. Нами были проанализированы различные литературные источники по проведению экстрагирования. В ходе работы обращали внимание на вид экстрагента, его концентрацию, массовое соотношение сырье/экстрагент, степень измельчения сырья, время экстракции. При этом основным показателем эффективности метода являлось содержание суммы флавоноидов в экстракте в пересчете на рутин [8].

Нами были испытаны два способа экстракции:

1. Ступенчатая трехкратная экстракция с нагреванием;
2. Однократная экстракция при комнатной температуре (настаивание).

Для качественного определения использовали цианидовые пробы (проба Чинода – Chinoda, химизм которой состоит в восстановлении флавоноидов атомарным водородом в кислой среде в присутствии магния или цинка).

Реакция основана на способности окисленных форм флавоноидов восстанавливаться водородом в момент выделения до антоцианидинов. В кислой среде образуются оксониевые соли, окраска которых зависит от

структуры флавоноида. Флавоны дают оранжево-красные, флавонолы от розовой до малиновой окраски соли.

На основании анализа литературных данных были выбраны следующие особенности методов экстракции флавоноидов из растительного сырья (табл. 1).

**Таблица 1. Условия проведения экстрагирования биологически активных веществ из растительного сырья**

Кратность экстрагирования	Степень измельчения сырья	Вид экстрагента	Концентрация экстрагента	Соотношение сырье-экстрагент	Время реакции
3	0,1 мм	Водный раствор этанола	95%	1:30	24 ч

Для количественного определения флавоноидов использовали наиболее распространенный спектрофотометрический метод анализа, основанный на реакции комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия. Количественное определение флавоноидов проводили по методике, основанной на работе В.В. Беликова [6]. Фотометрический метод определения без предварительного разделения компонентов включает аддитивное (суммарное) значение оптической плотности всех компонентов смеси при одной длине волны. Метод достаточно прост в исполнении, является высокочувствительным и относительно недорогим, что делает его предпочтительным для использования в контрольно-аналитических лабораториях. Использование такого метода позволяет определить сумму флавоноидов в присутствии других полифенольных соединений, не образующих комплекса с хлоридом алюминия в среде 30-96% спирта. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре УФ-1200 в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

### **Количественное определение флавоноидов**

К 60 мкл этанольного экстракта в пробирку поочередно добавлять: 60 мкл 96%-ного этанола; 120 мкл 2%-ного спиртового раствора хлористого алюминия ( $AlCl_3$ ); 1,26 мл 96%-ного этанола.

Выдерживали 30 мин. Для определения содержания флавоноидов использовали спектрофотометр 1200 (поглощение при 415 нм).

Раствор сравнения – 60 мкл экстракта; 60 мкл 96%-ного этанола; 120 мкл дистиллированной воды; 10 мкл ледяной уксусной кислоты; 1,25 мл 96%-ного этанола.

Содержание флавоноидов рассчитывали по формуле:

$$C = (A_{415} * k * P * V_{\text{э}}) / (1000 * m),$$

где: C – содержание флавоноидов, мг/г сухой массы;  $A_{415}$  – оптическая плотность при длине волны 415 нм; k – пересчетный коэффициент (по рутину); P – разведение;  $V_{\text{э}}$  – объем раствора, мл; m – масса навески, г.

Калибровочные кривые строили по рутину (Запрометов, 1971).


## Глава 3

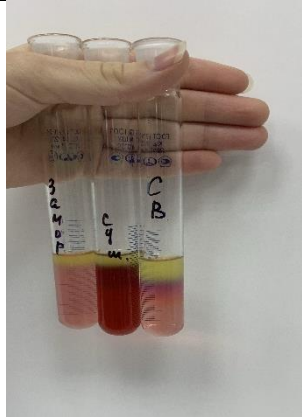
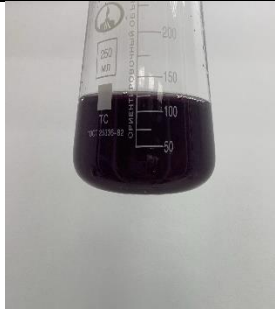
### Результаты исследования

За последние десятилетия выполнено множество исследований, которые подтверждают, что к развитию многих болезней, включающих опасные и социально значимые, приводит избыточное содержание свободных радикалов в организме. От избытка свободных радикалов организм человека защищен естественной антиоксидантной системой, которая нейтрализует вредное воздействие радикальных форм кислорода.

При нарушении баланса антиоксидантной системы организму человека требуется терапия природными антиоксидантами, веществами, которые в малых концентрациях замедляют или предотвращают окислительные процессы, которые проходят в организме человека и в растениях, к которым относятся аскорбиновая кислота, флавоноиды, хлорофилл и др.

**Таблица 1. Результаты определения групп биологически активных веществ в водно-спиртовых извлечениях из плодов *Vaccinium vitis-idaea* L. с помощью качественных химических реакций**

Группа БАВ	Химические реакции	Наблюдаемые эффект
Флавоноиды	Циандовая проба	 выраженного розового цвета

	Реакция с хлоридом алюминия	 <p>Появление желто-зеленого и фиолетового окрасов</p>
Аскорбиновая кислота	Реакция с раствором йода	 <p>Посинение раствора</p>

**Таблица 2. Показатели флавоноидов в растительном сырье**

Название образца	Содержание флавоноидов, мг/г сухой массы	
	Экстракция с нагреванием	Экстракция с настаиванием
<i>Vaccinium vitis-idaea L.</i>		
Свежие плоды	5,88	5,74
Замороженные плоды	4,59	4,35
Высушенные плоды	3,55	3,26

### Заключение

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что во всех исследованных образцах эффективность экстракции флавоноидов была выше

при настаивании. Это позволило определить наиболее эффективный способ выделения флавоноидов из растительного сырья.

Анализируя полученные результаты исследования, определили высокое содержание флавоноидов в свежих плодах *Vaccinium vitis-idaea L.*

### Список литературы

1. Абдрасилов Б.С., Ким Ю.А., Музафаров Е.Н., Тараховский Ю.С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. [отв. ред. Е.И. Маевский] – Пуццино: Synchronobook, 2013. – 310 с.
2. Гарифзянов А.Р., Жуков Н.Н., Иванищев В.В. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений. Современные проблемы науки и образования. 2011. №2. 21с.; URL: [www.science-education.ru/96-4600](http://www.science-education.ru/96-4600) (дата обращения: 02.09.2011).
3. Дьяков П.О., Качественное и количественное определение содержания флавоноидов в экстрактах из растительного сырья; Сборник работ победителей и призеров областных конкурсов среди обучающихся и педагогов Тульской области «Тебе, любимый Тульский край...» Тула, 2018 – 148-154 с.
4. А.П.Левецкий, О.А.Макаренко Физиологические функции флавоноидов в растениях культурных растений. 2013. Т.45 № 2
5. Ю.М. Левин Эндозкологическая медицина «Серии эндозкологии» – наука и практика лечения и оздоровления в условиях экологического неблагополучия – Москва, 2002. -131с.
6. Williams, C. (1995) Healthy eating: clarifying advice about fruit and vegetables, BMJ, 310, 1453–1455.