

Министерство образования и науки Российской Федерации

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕРМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

УТВЕРЖДАЮ
Проректор ПНИПУ по науке и инновациям, профессор

В.Н. Коротаев
2018



ОТЧЕТ

**о выполнении НИР «Анализ биологически активных ингредиентов в продукте
«Персин».**

№ 2017/471

Подразделение: НОЦ ХимБИ

Директор, к.х.н. Красных О.П.

Пермь, 2018 г.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы
К.х.н., директор Ольга Красных ^{11.04.2018} Красных О.П. (заключение)
(подпись, дата)

Исполнители темы Ирина Фефилова ^{11.04.2018} Фефилова И.В.(эксперимент)
(подпись, дата)

Алена Ботева ^{11.04.18} Ботева А.А.(эксперимент)
(подпись, дата)

Объект анализа: Персин - концентрат безалкогольного напитка, содержащий очищенный концентрированный водный экстракт листьев Персика обыкновенного (*Persica vulgaris*) произведенного 07.10.2017 (для качественного анализа) и 07.02.2018 (для количественного анализа) ООО "НПК Инфинити".

Цели работы:

1. Выбор биологически активных ингредиентов в продукте "Персин", подбор и обоснование методик их количественного и качественного определения
2. Проведение качественных реакций на основные группы природных соединений в продукте "Персин"
3. Количественное определение суммы полифенольных соединений в пересчете на галловую кислоту в продукте "Персин".

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Выбор биологически активных ингредиентов в продукте "Персин", подбор и обоснование методик их количественного и качественного определения

Установлено, что листья персика содержат большое количество биологически активных веществ, таких как фенольные соединения, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, гликозиды, антоцианы, витамины, и др. [1-3]. Исследователями были выделены кемпферол-3- β -D-диглюкопиранозид и кверцетин-3- β -D-диглюкопиранозид, кофеиновая кислота, хлорогеновая кислота, п-кумариновая кислота, кумарин, скополетин, скополин, умбеллиферон, изокверцетин, кверцитрин, сапонины, хинная кислота, танин, урсоловая кислота [2-4].

Высокое содержание биологически активных веществ определяет разнообразную биологическую активность листьев персика и продуктов их переработки. В научной литературе описана антиоксидантная активность спиртовых экстрактов [1,4], упоминается применение *Prunus persica* в качестве слабительного, успокаивающего и противоракового средства [3]. Водный экстракт листьев Персика проявляет гипогликемическое действие, снижая постпрандиальный уровень глюкозы в крови за счет уменьшения всасывания глюкозы в тонком кишечнике [5].

Биологическая активность листьев персика связана с наличием веществ фенольной природы. Например, преимущественно ими обусловлена антиоксидантная активность [2]. Гепатопротекторное действие экстракта также связывается с действием фенольных соединений, а именно - флавоноидов. [4]

Предлагается определить наличие основных групп биологически активных веществ, содержащихся в растительном сырье: флавоноидов, дубильных веществ, сапонинов и кумаринов. Идентификация соединений основана на их физико-химических свойствах, и, как правило, используются химические и хроматографические методы анализа [6,7,8].

Количественное содержание фенольных веществ целесообразно определять спектрофотометрически с использованием реактива Фолина – Чокальтеу с пересчетом полученных значений на галловую кислоту [1,2, 4, 9].

2. Результат проведения качественных реакций на основные группы биологических веществ в пищевом продукте "Персин"

Интерпретация результата:

+ положительный результат

- отрицательный результат

0 неоднозначный результат (аналитический сигнал маскируется окраской Персина)

Качественные реакции на группы веществ	Результат

Флавоноиды	
Реакция с хлоридом железа	+
Проба Синода	+
Реакция с ванилином в соляной кислоте	+
Реакция с диазореактивом	+
Реакция с соляной кислотой конц.	+
Флуоресценция пятен - тонкослойная хроматография (TCX)	+
Реактив Вильсона	0
С раствором аммиака (халконы, ауруны)	+
Реакция с 10 %-ным раствором щелочи (флавоны, флаванолы)	+
Ацетат свинца	0
Алюминия хлорид	+
Дубильные вещества	
Реакция с хлоридом железа	+
Реакция с бромной водой	+
Реакция с нитритом натрия и уксусной кислотой (на свободную эллаговую кислоту)	0
Реакция с нитритом натрия и соляной кислотой (на связанную эллаговую кислоту)	0
Раствор желатина	+
Железоаммонийные квасцы	+
40% формальдегид	+
Кумарины	
Лактонная проба	+
Образование азокрасителя	+
Сапонины	

Реакция на пенообразование (тритерпеновые сапонины)	+
Гемолиз эритроцитов	-
Реакция Лафона	-
Реакция с нитратом калия	+
Ацетат свинца	+
Фенолгликозиды	
Образование фенолятов с гидроксидом натрия (флавоноиды, кумарины)	+
Реакция с хлоридом железа	+
Реакция с диазореактивом	+
Железоаммонийные квасцы	+
Натрий фосфорно-молибденовокислый	+
Фенолкарбоновые кислоты (хлорогеновая кислота)	
Диазореактив	+

3. Результаты количественного определения суммы полифенольных соединений в пересчете на галловую кислоту в продукте "Персин"

Исследование проводили по модифицированному методу Фолина-Чокальтеу, адаптированному к многофункциональному микропланшетному ридеру Infinite M1000 Tecan, согласно руководству Р 4.1.1672—03 Федерального центра гигиенического и эпидемиологического надзора Минздрава России "Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище".

Приготовление реагентов:

Реактив Фолина-Чокальтеу, раствор карбоната натрия и раствор галловой кислоты готовили согласно методике, приведенной в руководстве Р 4.1.1672—03.

Для приготовления разбавленного раствора Персина для измерений в мерную колбу вместимостью 10 см³ вносили 0,1 см³ Персина, доводили дистиллированной водой до метки и перемешивали.

Проведение эксперимента:

Построение градуировочного графика по галловой кислоте:

0,1, 0,2, 0,5, 1, 1,5, 2 см³ раствора галловой кислоты помещали в мерные колбы вместимостью 10 см³. В седьмую колбу вносили 0,1 см³ дистиллированной воды – контрольный раствор. В каждую мерную колбу добавляли по 0,1 см³ реактива Фолина-Чокальтеу, по 1 см³ раствора карбоната натрия, доводили дистиллированной водой до метки и перемешивали. Через 25 мин раскалывали в четырех повторностях по 0,2 см³ в 96-луночную прозрачную полистироловую планшету. Измеряли поглощение при 750 нм. (Параметры настройки - Number of flashes:50, Settle time: 1 ms.). Повторяли 2 раза, по полученным средним значениям строили градуировочный график, откладывая по оси абсцисс массовую концентрацию галловой кислоты (мг/см³), а по оси ординат – оптическую плотность растворов.

Выполнение измерений:

0,1 см³ разбавленного раствора Персина помещали в мерные колбы вместимостью 10 см³, добавляли по 0,1 см³ реактива Фолина-Чокальтеу, по 1 см³ раствора карбоната натрия, доводили дистиллированной водой до метки и перемешивали. Через 25 мин раскалывали в четырех повторностях по 0,2 см³ в 96-луночную прозрачную полистироловую планшету. Измеряли поглощение на многофункциональном микропланшетном ридере Tecan infinite M 1000 PRO. Длина волны 750 нм. (Параметры настройки: Number of flashes -50, Settle time - 1ms.). Концентрацию определяли по градуировочному графику (формула: $y = 64,93x + 0,009$), с пересчетом в массовую долю.

За окончательный результат принимали среднее арифметическое результатов трех параллельных определений.

Результат: В пищевом продукте "Персин" содержится $3,9 \pm 0,1\%$ ($39,44 \pm 1,3$ г/дм³) полифенольных соединений в пересчете на галловую кислоту.

В продукте Персин содержится аскорбиновая кислота, которая может влиять на определение полифенольных соединений методом Фолина-Чокальтеу и завышать полученный результат.

Было изучено влияние аскорбиновой кислоты на определение полифенольных соединений методом Фолина-Чокальтеу. Установлено, что при содержании аскорбиновой кислоты в Персине в дозе 0,2 мг/мл (или 0,003 г на 1 флакон), она не влияет на результаты анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Для качественного анализа были выбраны основные группы биологически активных веществ (флавоноиды, дубильные вещества, сапонины, кумарины), содержащиеся в листьях персика обыкновенного. Проведением качественных реакций было установлено наличие в пищевом продукте "Персин" флавоноидов, дубильных веществ, кумаринов, фенолгликозидов и сапонинов.

2. В представленном на анализ образце пищевого продукта "Персин" содержится $3,9 \pm 0,1\%$ ($39,44 \pm 1,3$ г/дм³) полифенольных соединений в пересчете на галловую кислоту.

Приложение № 1

Библиографический список:

1. Исследование биологически активных веществ экстракта, полученного из листьев персика Таджикских сортов. Г. Ф. Наврузова, В. С. Кисличенко, Л. В. Ленчик. VISNIK FARMACIЇ 3 (91) 2017
2. Получение экстрактов с повышенным содержанием фенольных веществ из листьев нектарина. Корнильев Г.В. Вісник Запорізького національного університету, №2, 2009.
3. Hepatoprotective effect of Prunus Persica leaves extract against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. Preeti Chaudhary, Ravinder Kumar Mehra, Ratendra Kumar and Shamim Ahamad. Der Pharmacia Lettre, 2015, 7 (2):150-153
4. Supercritical fluid extraction of Prunus persica leaves and utilization possibilities as a source of phenolic compounds. Aslihan Kazan, Halil Koyu, Irem Cemrē Turu, Ozlem Yesil-Celiktas. J. of Supercritical Fluids 92 (2014) 55–59
5. Suppressive Effect of Peach Leaf Extract on Glucose Absorption from the Small Intestine of Mice. Shiroasaki M, Koyama T, Yazawa K. Biosci Biotechnol Biochem. 2012;76(1):89-94
6. Химический анализ лекарственных растений – Гриневич Н.И., Сафронич Л.Н. - 1983 год - 176 с.
7. Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды. Методическое пособие по фармакогнозии. Иркутск 2009
8. Методы анализа биологически активных веществ и их свойства. Методическое пособие.
9. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище.—М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004.—240 с. Р 4.1.1672—03