

УДК 633.3:658.562

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В ЛИСТЬЯХ СТЕВИИ (*STEVIA REBAUDIANA BERTONI*)

© *И.В. Кузнецова*

Национальная академия аграрных наук Украины, ул. Васильковская, 37, Киев, 03022 (Украина), e-mail: ingaV@ukr.net

Благодаря содержанию в листьях дитерпеновых гликозидов стевия практически используется в мире как заменитель сахара. Однако перед перерабатывающими предприятиями стоит задача организации комплексной переработки растительного сырья. Стевия является малоизученной культурой, что снижает ее рентабельность. Организация получения других веществ из вторичных продуктов производства возможна при более глубоком исследовании стевии.

Известно, что листья стевии также содержат флавоноиды, определение количества которых практически не проводится. Несмотря на отсутствие контроля их содержания и извлечения из листьев стевии полученные из них концентраты успешно используются в производстве косметических изделий, таких как кремы для рук и ног, мыло натуральное и пр.

В работе представлены результаты научных исследований по разработке методики определения флавоноидов в листьях стевии методом спектрофотометрии. Установлено, что оптимальной концентрацией реагента, который используется для осаждения балластных веществ экстракта, полученного из сушеных листьев стевии, является 5% раствор хлорида алюминия в этаноле. Использование такого реагента позволяет максимально извлечь балластные вещества из экстракта при скорости фильтрации 1,83 м/с на вакуум-насосе. Установлено оптимальное введенное количество: 4 мл раствора хлорида алюминия в этаноле на 10 мл фильтрата. Получены спектрофотометрические кривые стандартного раствора рутина и исследуемого фильтрата. На основе максимумов спектрофотометрических кривых рассчитано общее количество флавоноидов в листьях стевии, которое составляет 6,39% флавоноидов в пересчете на рутин. Таким образом, листья стевии являются богатым источником флавоноидов, что может в дальнейшем повысить рентабельность стевии путем углубленной ее переработки.

Ключевые слова: листья стевии, флавоноиды, методика, раствор хлорида алюминия в этаноле, спектрофотометрический метод.

Введение

Флавоноиды – класс природных фенольных соединений, для которых характерно структурное многообразие, малая токсичность, высокая и разносторонняя активность [1]. Практически все растения содержат флавоноиды и более 4000 данных веществ сегодня идентифицированы [2]. Некоторые флавоноиды являются более сильными антиоксидантами, чем β-каротин, витамины С и Е. Их антиоксидантная активность проявляется благодаря их синергизму с витаминами, позволяет использовать данные вещества в производстве пищевых продуктов [3]. Также флавоноиды используются в производстве косметических изделий для защиты кожи от преждевременного старения, солнечных ожогов, угревой сыпи, снятия воспалительных процессов и уменьшения хрупкости кровеносных капилляров [4].

Стевия – известная в мире культура благодаря содержанию дитерпеновых гликозидов. Сегодня физико-химический состав стевии практически не изучен и отсутствуют данные о количественном содержании флавоноидов в ее листьях [5]. Однако экстракты, полученные из листьев стевии, успешно используются в производстве косметических изделий, таких как мыло, кремы для рук и ног.

Не существует универсальной методики определения количественного содержания флавоноидов. Для извлечения сопутствующих веществ из экстрактов преимущественно используют реакцию комплексообразования флавоноидов с раствором хлорида алюминия (AlCl₃·6H₂O) в этаноле концентрацией 2, 3 и 5% [6–8]. Методика основывается на определении спектрофотометрическим методом опти-

Кузнецова Инга Владимировна – ведущий научный сотрудник отделения аграрной экономики и продовольствия, кандидат технических наук, старший научный сотрудник, e-mail: ingaV@ukr.net

ческого взаимодействия с раствором хлорида алюминия (AlCl₃·6H₂O) в этаноле концентрацией 2, 3 и 5% [6–8]. Методика основывается на определении спектрофотометрическим методом опти-

ческой плотности полученных очищенных от сопутствующих веществ экстрактов (фильтратов). Реакция комплексообразования является селективной для фенольных и флавоноидных веществ и дает многохромный сдвиг спектра, что позволяет определить количественное содержание флавоноидов [7, 9]. Поэтому целью исследования было разработать методику определения флавоноидов в листьях стевии.

Методы и методика исследований

В исследовании использовались сушеные листья стевии (*Stevia rebaudiana Bertoni*), выращенной на опытном участке агрофирмы «Веселиновка» (Киевская область, Украина).

Подготовку листьев стевии для анализа проводили следующим образом: в колбу вместимостью 50 мл с притертой пробкой поместили навеску 3 г ($\pm 0,1$ г) измельченных листьев стевии и добавили нагретую до 35–40 °С дистиллированную воду в соотношении листья – вода как 1 : 10 [10]. Экстрагирование проводили в термостате при температуре 60 °С на протяжении 30 мин. После чего добавили 10 мл этилового спирта и продолжили экстракцию еще 30 мин. По окончании процесса отфильтровали экстракт.

Приготовление раствора хлорида алюминия в этаноле делали по методике В.Л. Бербека и др. Измерения проводили на спектрофотометре СФ-46 при длине волн 380–420 нм в кювете толщиной 1 см.

Результаты и обсуждение

Устанавливали оптимальное вводное количество раствора хлорида алюминия в этаноле на основе полученных результатов об изменении скорости фильтрования и оптической плотности спектров поглощения полученных фильтратов из листьев стевии. Вводное количество раствора для анализа варьировали в границах 0,5–1,5 объемных частей по отношению к объемной части экстракта листьев стевии. Опыт проводили следующим образом: в мерную колбу вместимостью 25 мл пипеткой вносили 1 объемную часть фильтрата и добавляли установленное количество раствора хлорида алюминия в этаноле, доводили объем до метки 60% спиртом этиловым и оставляли образцы на 30 мин. В процессе отстаивания образцов отмечено, что при внесении 5% раствора хлорида алюминия в этаноле происходит формирование взвесей сопутствующих веществ (рис. 1).

После чего образцы фильтровали с помощью вакуум-насоса и воронки Бюхнера диаметром 7 см. По данным исследований ученых при определении содержания флавоноидов наблюдались максимумы спектров поглощения при 410–415 нм [7, 9, 8]. Определяли оптическую плотность полученных очищенных образцов при спектрах поглощения 410 нм на спектрофотометре СФ-46. Результаты исследования представлены в таблице.

При использовании 2% раствора образцы практически не фильтруются. Увеличение концентрации раствора хлорида алюминия в этаноле позволяет увеличить скорость фильтрования образцов и получить стабильное значение (1,83 м/с) при его вводном количестве 1–1,5 объемной части к 1 части экстракта из листьев стевии. Следует отметить, что при использовании 2% раствора хлорида алюминия в этаноле, введенного в различном количестве, невозможно было установить оптическую плотность.



Рис. 1. Глобулы сопутствующих веществ

Изменение скорости фильтрации и оптической плотности экстракта листьев стевии

Концентрация хлорида алюминия, %	Часть хлорида алюминия в этаноле на 1 часть экстракта листьев стевии	Скорость фильтрации, м/с	Оптическая плотность
2	0,5	0,12	–
	1,0	0,12	–
	1,5	0,14	–
3	0,5	0,18	–
	1,0	0,28	4,025
	1,5	0,35	3,735
5	0,5	1,83	2,742
	1,0	1,99	2,741
	1,5	1,99	2,744
7	0,5	1,69	2,745
	1,0	1,83	2,747
	1,5	1,83	2,741

Незначительный результат наблюдается при введении в фильтраты 3% раствора хлорида алюминия в этаноле. Образцы имеют высокие нечеткие значения оптической плотности. Четкие значения оптической плотности устанавливаются при введении в экстракт раствора хлорида алюминия в этаноле концентрацией 5 и 7%. Результаты в обоих случаях идентичны, что позволяет рекомендовать для проведения исследований 5% концентрацию раствора хлорида алюминия в этаноле в количестве 0,5 объемных к 1 объемной части фильтрата.

Разработанная методика количественного определения флавоноидов в листьях стевии представлена следующим образом: в мерную колбу вместимостью 25 мл перенесли пипеткой 10 мл экстракта листьев стевии и добавили 4 мл 5% раствора хлорида алюминия в этаноле. Довели до метки 60% этиловым спиртом, перемешали и оставили на 30 мин. Исследуемый раствор фильтровали и определяли оптическую плотность с помощью спектрофотометра при толщине кюветы 1 см в диапазоне спектров поглощения 380–420 нм [5, 11]. В качестве контроля использовали стандартный раствор рутина в этаноле, приготовленный из х.ч. рутина [8].

Полученный спектр поглощения фильтрата (рис. 2) имеет максимумы при 380 и 410 нм, идентичные максимумам стандартного раствора.

Присутствие в молекулах флавоноидов большего количества бензольных колец в значительной мере определяет способность фильтрата к поглощению определенной длины волны оптической плотности и позволяет установить их количество. В нашем случае максимум спектра поглощения составляет 380 нм. Содержание флавоноидов в пересчете на рутин (Φ) рассчитали по формуле, %:

$$\Phi = \frac{D_x \times m_0 \times 25 \times 100}{D_0 \times 4 \times (100 - W)},$$

где D_x – оптическая плотность исследуемого раствора (нм), D_0 – оптическая плотность стандарта в этаноле (нм), W – содержание массовой части влаги (%).

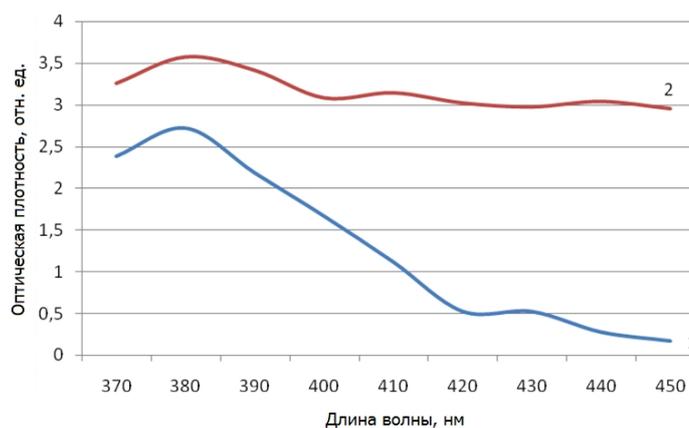


Рис. 2. Спектры поглощения растворов: 1 – рутин, 2 – экстракт листьев стевии

Таким образом, содержание флавоноидов в пересчете на рутин в листьях стевии согласно рисунка 2 составляет 6,39%, что показывает перспективность использования листьев стевии в пищевой или фармацевтической областях.

Выводы

Установлены оптимальные значения по концентрации (5%) и введенному количеству (4 мл) раствора хлорида алюминия в этаноле, что стало основой для разработки методики количественного определения флавоноидов в листьях стевии. Полученные результаты содержания флавоноидов в листьях стевии в пересчете на рутин (6,39%) позволяют говорить о богатом потенциале стевии и могут стать основой углубленной переработки листьев стевии.

Список литературы

1. Лобанова А.А., Будаева В.В., Сакович Г.В. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья // Химия растительного сырья. 2004. №1. С. 47–52.
2. Vinson J. A., Hao Y., Su X., Zubik L. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods // J. Agric. Food Chem. 1998. Vol. 46, N9. Pp. 3630–3634.
3. Kahkonen M.P., Horia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.-P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds // J. Agric. Food Chem. 1999. Vol. 47. Pp. 3954–3962.
4. Кривченкова М.В., Клышинская Е.В., Ильиных М.А., Бутова С.Н. Растительные флавоноиды как функциональные добавки в косметических и пищевых продуктах // Вестник Российской академии естественных наук. 2013. №3. С. 47–51.
5. Роїк М.В., Кузнецова І.В. Методичні рекомендації з критеріїв оцінки якості листків стевії (*Stevia rebaudiana* Bertoni) сушеної як сировини для подальшого використання у харчовій промисловості. Київ, 2013. 23 с.
6. Евдокимова О.В. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве тысячелистника // Вестник ВГУ. Серия: химия, биология, фармация. 2007. №2. С. 155–160.
7. Бекетов Е.В., Абрамов А.А., Нестерова О.В., Кондрашев С.В. Идентификация и количественная оценка флавоноидов в плодах черемухи обыкновенной // Вестник московского университета. Сер. 2. Химия. 2005. Т. 46, №4. С. 259–262.
8. Бербек В.Л., Тихонов О.И., Котенко О.М., Жукова Т.В. Фізико-хімічні дослідження природної лікарської перги // Вісник фармації. 2011. №3(61). С. 20–23.
9. Дмитрук А.Ф., Лесишина Ю.О., Володченко И.И. Антирадикальная активность растительных экстрактов, полученных в среде субкритической воды // Химическая технология. 2011. №3. С. 176–181.
10. Государственная фармакопея СССР. Вып. 1. Общие методы анализа. Лекарственное сырье. 11-е изд. М., 1990, 336 с.
11. Патент України 79471 на корисну модель Спосіб визначення вмісту речовин флаваноїдного комплексу / М.В. Роїк, І.В. Кузнецова, Т.В. Рудакова. 2013.

Поступило в редакцию 27 июня 2014 г.

После переработки 21 декабря 2015 г.

Kuznetsova I.V. OF DETERMINING THE FLAVONOL OF LEAVES OF STEVIA (STEVIA OF REBAUDIANA OF BERTONI)

*The National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Vasil'kovskaia st., 37, Kiev, 03022 (Ukraine),
e-mail: ingaV@ukr.net*

Due to maintenance in the leaves of diterpene glycosides of stevia practically used in the world as a substitute of sugar. However much the task of organization of the complex processing of digester costs before processing enterprises. Stevia is an insufficiently known culture that reduces its profitability. Organization of receipt of other matters from the after products of production is possible at more deep research of stevia.

It is known that the leaves of stevia contain flavonoids also, determining the amount of which practically is not conducted. In spite absence of control of their maintenance and extraction from the leaves of stevia the concentrates got from them successfully used in the production of cosmetic wares such as hand creams and feet, washed natural and other.

The results of scientific researches are in-process presented on development of method of determination of flavonol in leaves the stevia method of spectrophotometric. It is set that the optimum concentration of reagent which is used for besieging of ballast matters of extract got from the dried leaves of stevia is 5% solution of chloride of aluminum in an ethanol. The use of such reagent allows maximally to extract ballast matters from an extract at speed of filtration 1,83 m/s on a vacuum-pump. The optimum entered amount is set: 4 ml of solution of chloride of aluminum in an ethanol on 10 ml of filtrate. Spectrophotometric is got curves of standard solution routine and the probed filtrate. On the basis of maximums of spectrophotometric of curves the general amount of flavonoids is expected in the leaves of stevia, maintenance of which makes 6,39% flavonol in a count on rutin. Thus, leaves of stevia are the rich source of flavonol that can in future promote profitability of stevia by its deep processing.

Keywords: leaves of stevia, flavonol, methodic, chloride of aluminum in an ethanol, method of spectrophotometric.

References

1. Lobanova A.A., Budaeva V.V., Sakovich G.V. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2004, no. 1, pp. 47–52. (in Russ.).
2. Vinson J. A., Hao Y., Su X., Zubik L. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, vol. 46, no. 9, pp. 3630–3634.
3. Kahkonen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.-P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, vol. 47, pp. 3954–3962.
4. Krivchenkova M.V., Klyshinskaia E.V., Il'nykh M.A., Butova S.N. *Vestnik Rossiiskoi akademii estestvennykh nauk*, 2013, no. 3, pp. 47–51. (in Russ.).
5. Roi'k M.V., Kuznjecova I.V. *Metodychni rekomendacii' z kryterii'v ocinky jakosti lystkiv stevii' (Stevia rebaudiana Bertoni) sushenoi' jak syrovyny dlja podal'shogo vykorystannja u harchovij promyslovosti*. [Guidelines on criteria for assessing the quality of the leaves of stevia (Stevia rebaudiana Berton) as dried material for use in the food industry]. Kiev, 2013, 23 p. (in Ukr.).
6. Evdokimova O.V. *Vestnik VGU, Serii: khimiia, biologii, farmatsiia*, 2007, no. 2, pp. 155–160. (in Russ.).
7. Beketov E.V., Abramov A.A., Nesterova O.V., Kondrashev S.V. *Vestnik moskovskogo universiteta. Ser. 2. Khimiia*, 2005, vol. 46, no. 4, pp. 259–262. (in Russ.).
8. Berbek V.L., Tikhonov O.I., Kotenko O.M., Zhukova T.V. *Visnyk farmacii'*, 2011, no. 3(61), pp. 20–23. (in Ukr.).
9. Dmitruk A.F., Lesishina Iu.O., Volodchenko I.I. *Khimicheskaiia tekhnologiia*, 2011, no. 3, pp. 176–181. (in Russ.).
10. *Gosudarstvennaia farmakopeia SSSR. Vyp. 1. Obshchie metody analiza. Lekarstvennoe syr'e*. [State-owned Pharmacopoeia USSR. Vol. 1. Sharing analysis methods. Lekarstvennoe raw materials]. 11 ed. Moscow, 1990, 336 p. (in Russ.).
11. Patent 79471 (UA). (in Ukr.).

Received Juny 27, 2014

Revised December 21, 2015

