

К ВОПРОСУ ПОЛУЧЕНИЯ БИОАНТИОКСИДАНТНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ ПЛОДОВ МОЖЖЕВЕЛЬНИКА ОБЫКНОВЕННОГО (*JUNIPERUS COMMUNIS* L.)

О.А. ЯВОРСКАЯ¹;

В.Н. ЕЖОВ¹, доктор технических наук, профессор, академик УААН;

А.К. ПОЛОНСКАЯ¹, кандидат биологических наук;

В.В. КАЗАКОВА², кандидат биологических наук, доцент

¹Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

²Крымский государственный медицинский университет
им. С.И. Георгиевского

В настоящее время, наряду с пищевой ценностью, большое значение придаётся лечебно-профилактическим свойствам пищевых продуктов и добавок на их основе. Приоритетным становится использование лекарственного растительного сырья, содержащего в своём составе широкий спектр биологически активных веществ, в том числе и фенольные соединения, которые обладают антигеморрагическим, противовоспалительным, противолучевым, противоопухолевым, антитоксическим, противоязвенным действием [7, 10], оказывают влияние на функции генетического аппарата, на железы внутренней секреции [11]. Регулярно поступая в организм человека с растительной пищей, фенольные вещества оказывают длительное и систематическое, хотя и умеренное по величине, воздействие на все отделы пищеварительного тракта, а после всасывания в кровь – на сердечно-сосудистую систему, почки и другие органы, являясь одним из важных биологически активных компонентов пищи. Легко окисляясь сами, фенольные соединения в силу сопряжённости окислительно-восстановительных реакций способствуют восстановлению других веществ, либо препятствуют их окислению. Такое действие фенольных соединений характеризуют как антиокислительное [2]. Биоантиоксиданты – важнейшие регуляторы внутриклеточных ферментативных и неферментативных свободнорадикальных процессов. Их недостаток ведёт к пероксидации липидов, ряду обменных нарушений, стимулирует накопление свободных радикалов, приближает старение [11]. В отличие от классических восстановителей, для проявления эффекта которых необходимо их присутствие в реагирующей смеси в эквиваленте окислителя, фенольные антиоксиданты способны даже в виде ничтожных добавок значительно угнетать процесс окисления [2].

Можжевельник обыкновенный (*Juniperus communis* L.) является одним из перспективных источников фенольных веществ, среди лекарственных растений [4-6]. Несмотря на определённую степень изученности антиоксидантного комплекса можжевельника, в частности фенольных веществ [5, 6], потенциальная его эффективность, равно как и закономерности проявления, исследованы слабо; в особенности это касается таких аспектов, как взаимосвязь антиокислительной способности с составом и уровнем содержания веществ, а также влияние сопутствующих биополимеров.

Целью данной работы явилось установление оптимальных режимов получения экстрактов из плодов можжевельника обыкновенного с максимальным содержанием фенольных веществ; подробная характеристика контрастных по накоплению фенольных веществ экстрактов из плодов можжевельника обыкновенного, по содержанию различных групп фенольных веществ, а также фоновых компонентов – полисахаридов, в том числе пектиновых веществ, органических кислот и аскорбиновой кислоты.

Материалы и методы

Объектом исследования явились экстракты, полученные при различных режимах экстрагирования, из плодов можжевельника обыкновенного (*J. communis* L.), собранных в 2005 году в Карпатах. Для оптимизации режима получения данных экстрактов был составлен

многофакторный многоуровневый план (ДФЭ⁵₄), который предполагал получение 16 водно-спиртовых экстрактов из плодов можжевельника обыкновенного путём варьирования пятью параметрами экстрагирования на 4 уровнях значений, а именно:

- температура – 20 - 35 - 50 - 65°C;
- продолжительность настаивания – 1 – 3 – 5 – 7 суток;
- гидромодуль – 3,0 – 5,0 – 7,0 – 9,0;
- концентрация этанола – 40 – 50 – 60 – 70% об.;
- степень измельчённости плода – мелкий помол, ¼ плода, ½ плода, целый плод.

При составлении ортогональной матрицы планирования выбор номеров уровней значений параметров производился по таблице случайных чисел [1, 3].

Полученные экстракты исследованы на содержание суммы фенольных веществ [9]. Также три контрастных по данному показателю экстракта проанализированы на содержание фенольных веществ разных групп: нетаниновых фенолов, полимерных флаваноидов, мономерных флаваноидов, нефлаваноидных фенолов [9]. Помимо этих веществ, экстракты исследовались на содержание полисахаридов, пектиновых веществ [9], аскорбиновой кислоты [8], а также на содержание органических кислот, которые определялись хроматографически, методами ВЖХ и ГЖХ.

Результаты и обсуждение

Первоначально в ходе эксперимента устанавливались оптимальные режимы экстрагирования, при которых в экстракт из плодов можжевельника обыкновенного переходит максимальное количество фенольных веществ. В результате реализации эксперимента были получены 16 водно-спиртовых экстрактов (табл. 1). Данные таблицы позволяют заключить, что в зависимости от избранных режимов процесса экстрагирования можно получить экстракты с содержанием общих фенольных веществ от 437 до 4246 мг/дм³.

Таблица 1

Содержание суммы фенольных веществ в экстрактах из плодов можжевельника обыкновенного в зависимости от режимов экстрагирования

Вариант опыта	Уровни режимов экстрагирования					Сумма фенольных веществ (мг/дм ³)
	t, °C	τ, сут.	гидро-модуль	концентрация этанола, % об.	степень измельчения плодов	
1	20	1	9,0	60	¼ плода	437
2	20	3	9,0	50	¼ плода	1039
3	20	5	3,0	70	¼ плода	2642
4	20	7	3,0	40	¼ плода	2782
5	35	1	5,0	50	мелкий помол	2206
6	35	3	5,0	60	мелкий помол	2748
7	35	5	7,0	40	мелкий помол	1847
8	35	7	7,0	70	мелкий помол	1710
9	50	1	3,0	60	целый плод	3785
10	50	3	3,0	50	целый плод	4246
11	50	5	9,0	70	целый плод	1678
12	50	7	9,0	40	целый плод	1540
13	65	1	7,0	50	½ плода	2919
14	65	3	7,0	60	½ плода	2597
15	65	5	5,0	40	½ плода	3788
16	65	7	5,0	70	½ плода	3776

*- t – температура, С - τ – продолжительность настаивания, сут

На основании полученных данных был рассчитан эффект каждого режима, т.е. оптимальное его значение, при котором в экстракте из плодов можжевельника обыкновенного достигается максимальное значение суммы фенольных веществ (табл. 2-6, рис. 1-5).

Таблица 2

Влияние температуры на накопление суммы фенольных веществ в экстракте

Режим экстрагирования и его значение	Среднее значение суммы фенольных веществ, мг/ дм ³	Эффект выхода
50°C	2812,25	+328,5
65°C	3270	+786,25
20°C	1725	-758,75
35°C	2127,75	-356

В ходе исследования влияния температуры на накопление фенольных веществ в экстракте установлено, что наибольший эффект выхода данных соединений в экстракт обнаруживается при температуре 65°C.

Таблица 3

Влияние продолжительности настаивания на накопление суммы фенольных веществ в экстракте

Режим экстрагирования и его значение	Среднее значение суммы фенольных веществ (мг/ дм ³)	Эффект выхода
1 сут	2336,75	-147
5 сут	2488,75	+5
3 сут	2657,5	+173,75
7 сут	2452	-31,75



Рис. 1. Влияние температуры на накопление суммы фенольных веществ в экстракте (1 - 20°C; 2 - 35°C; 3 - 50°C; 4 - 65°C)

Соответствующий анализ данных эксперимента по продолжительности настаивания свидетельствует о том, что максимальный выход фенольных веществ происходит на третьи сутки настаивания экстракта. Можно предположить, что при увеличении продолжительности настаивания фенольные вещества подвергаются частичному окислению с образованием нерастворимых полимерных форм, в итоге чего на пятые и седьмые сутки содержание суммы фенольных веществ в экстракте снижается.



Рис. 2. Влияние продолжительности настаивания на накопление суммы фенольных веществ в экстракте (1 – 1 сут, 2 – 3 сут, 3 – 5 сут, 4 – 7 сут)

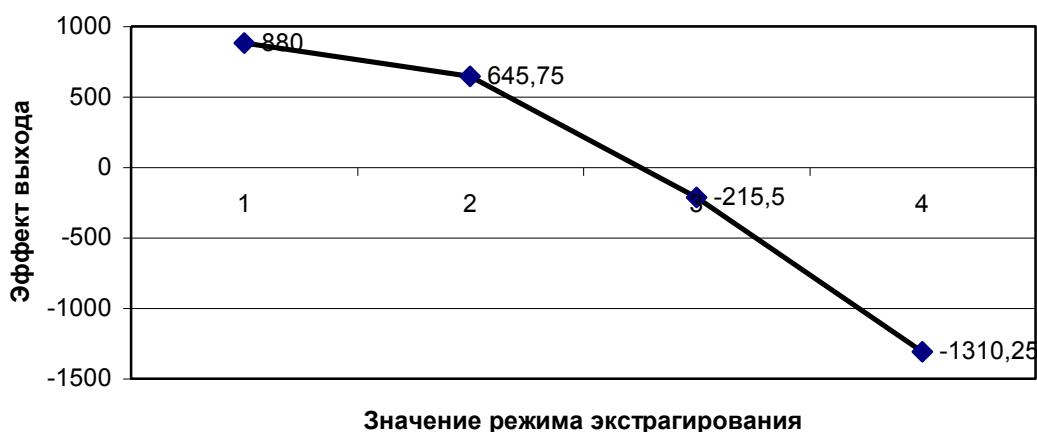


Рис. 3. Влияние гидромодуля на накопление суммы фенольных веществ в экстракте (1 – 3,0; 2 – 5,0; 3 – 7,0; 4 – 9,0)

Таблица 4

Влияние гидромодуля на накопление суммы фенольных веществ в экстракте

Режим экстрагирования и его значение	Среднее значение суммы фенольных веществ, мг/ дм ³	Эффект выхода
3,0	3363,75	+880
5,0	3129,5	+645,75
9,0	1173,5	-1310,25
7,0	2268,25	-215,5

Гидромодуль отображает соотношение навески можжевельника и объема водного этанола, который является экстрагентом. В ходе наших исследований установлено, что наибольший эффект выхода фенольных веществ в экстракт наблюдается при наименьшем значении гидромодуля, то есть 3,0. При более высоких значениях гидромодуля определяющим является не полнота экстракции, а эффект разбавления; тем не менее, максимальная полнота извлечения фенольных веществ достигается при гидромодуле 3,0.

Таблица 5

Влияние концентрации этанола на накопление суммы фенольных веществ в экстракте

Режим экстрагирования и его значение	Среднее значение суммы фенольных веществ, мг/ дм ³	Эффект выхода
60% об.	2391,75	-92
40% об.	2489,25	+5,5
50% об.	2602,5	+118,75
70% об.	2451,5	-32,25



Рис.4. Эффект концентрации этанола на накопление суммы фенольных веществ в экстракте (1 – 40% об., 2 – 50% об., 3 – 60% об., 4 – 70% об.)

Таблица 6

Влияние степени измельченности плодов на накопление суммы фенольных веществ в экстракте

Режим экстрагирования и его значение	Среднее значение суммы фенольных веществ (мг/ дм ³)	Эффект выхода
целый плод	2812,25	+328,5
½ плода	3270	+786,25
¼ плода	1725	-758,75
мелкий помол	2127,75	-356

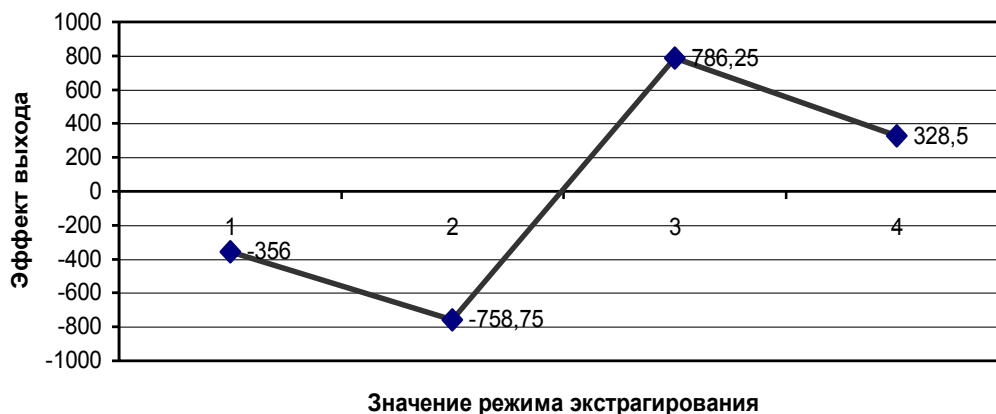


Рис. 5. Влияние степени измельченности плодов на накопление суммы фенольных веществ в экстракте (1 – мелкий помол; 2 – $\frac{1}{4}$ плода; 3 – $\frac{1}{2}$ плода; 4 – целый плод)

Что касается концентрации этанола и её влияния на эффект накопления фенольных веществ в экстракте, можно сделать вывод, что оптимальным значением данного режима экстрагирования является концентрация этанола 50% об. Возможно, большая концентрация этанола способствует частичному выпадению в осадок полимерных форм фенольных веществ, а меньшая недостаточна для максимального выхода данных соединений в экстракт.

По результатам исследования влияния степени измельченности плодов можжевельника обыкновенного на процесс экстрагирования установлено, что максимальный эффект накопления фенольных веществ в экстракте происходит при измельчении плодов напололам. При использовании целых плодов эффект ниже, так как материал в меньшей степени контактирует с экстрагентом и затрудняется выход изучаемых соединений в экстракт. При большем измельчении плодов, по-видимому, возрастает скорость окисления фенольных веществ.

Таким образом, оптимальными режимами экстрагирования фенольных веществ из плодов можжевельника обыкновенного являются следующие (табл.7).

Таблица 7

Оптимальные режимы экстрагирования фенольных веществ из плодов можжевельника обыкновенного

Режим экстрагирования	Значение режима экстрагирования
температура	65°C
продолжительность настаивания	3 сут
гидромодуль	3,0
концентрация этанола	50%об.
степень измельченности плодов	$\frac{1}{2}$ плода

С целью подтверждения данных результатов, был получен экстракт из плодов можжевельника обыкновенного при установленных оптимальных режимах экстрагирования. Экстракт проанализировали на содержание суммы фенольных веществ, и этот показатель составил 4312 мг/дм³, что подтверждает правильность установленных режимов экстрагирования.

На следующем этапе эксперимента, из 17 полученных водно-спиртовых экстрактов были выбраны 3 контрастных по значению суммы фенольных веществ экстракта (№ 1, 6, 17), в которых определено содержание различных групп фенольных веществ: нетаниновых фенолов, полимерных флаваноидов, мономерных флаваноидов, нефлаваноидных фенолов. Результаты, полученные в ходе данного исследования, представлены в таблице 8 и на рисунке 6.

Таблица 8

Содержание различных групп фенольных веществ в контрастных по значению суммы фенольных веществ экстрактах из плодов можжевельника обыкновенного

Группа фенольных веществ	Экстракты, контрастные по содержанию суммы фенольных веществ		
	№1	№6	№17
нетаниновые фенолы, мг/дм ³	138	189	359
полимерные флаваноиды, мг/дм ³	437	2559	3953
мономерные флаваноиды, мг/дм ³	58	136	267
нефлаваноидные фенолы, мг/дм ³	80	53	92

Как видно из таблицы 8 и рисунка 6, в экстракте из плодов можжевельника обыкновенного №17, полученном при оптимальных режимах экстрагирования, содержание всех изучаемых групп фенольных веществ преобладает над теми же показателями в экстрактах №1 и №6.

Тем не менее, амплитуда значений по отдельным группам выглядит далеко не одинаковой. Меньший размах значений отмечен для нефлаваноидных и нетаниновых фенолов; для мономерных флаваноидов имеет место пятикратный прирост, тогда как для полимерных форм – почти десятикратный. Можно сделать вывод, что наряду с повышением степени извлечения флаваноидов наблюдается окислительная полимеризация мономерных форм, и этот процесс практически в два раза перекрывает общую тенденцию.

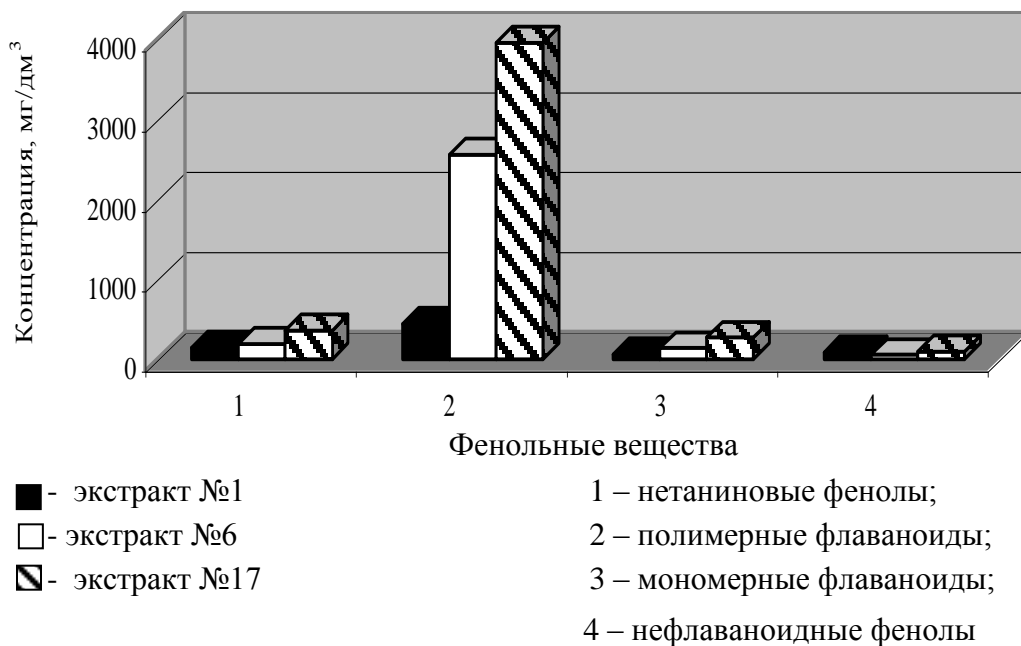


Рис. 6. Содержание различных групп фенольных веществ в контрастных по значению суммы фенольных веществ экстрактах из плодов можжевельника обыкновенного

Контрастные экстракты №1, 6 и 17 также были исследованы на содержание полисахаридов, в том числе пектиновых веществ, органических кислот и отдельно аскорбиновой кислоты, которые являются фоновыми компонентами для проявления антиоксидантных свойств фенольных веществ, и могут их повышать или понижать (табл. 9, рис. 7- 9).

Анализ содержания полисахаридов, в том числе пектиновых веществ в контрастных экстрактах из плодов можжевельника обыкновенного, свидетельствует, что в экстракте №17 данные показатели по сравнению с экстрактом №1 больше в 7,5 и 9,4 раза, а по сравнению с экстрактом №6 в 4,8 и 6,0 раз соответственно. Это свидетельствует о высокой скорости извлечения нейтральных и кислых полисахаридов при получении экстракта в оптимальных

режимах экстрагирования. Можно сделать предположение, что в ходе получения экстракта из плодов можжевельника обыкновенного при оптимальных режимах, он будет характеризоваться не только высоким содержанием фенольных веществ, но и полисахаридов, которые в свою очередь будут препятствовать окислению фенольных соединений.

Таблица 9

Содержание фоновых компонентов для проявления антиоксидантных свойств в трёх контрастных экстрактах из плодов можжевельника обыкновенного

№ экстракта	Полисахариды, мг/дм ³	Пектиновые вещества, мг/дм ³	Органические кислоты					Аскорбиновая кислота, мг%
			муравьиная, мг/дм ³	уксусная, мг/дм ³	яблочная, мг/дм ³	лимонная, мг/дм ³	фумаровая, мг/дм ³	
1	427	168	350	687	420	334	18	0,28
6	665	264	462	1020	532	672	30	0,35
17	3214	1587	643	1999	595	1332	34	1,03

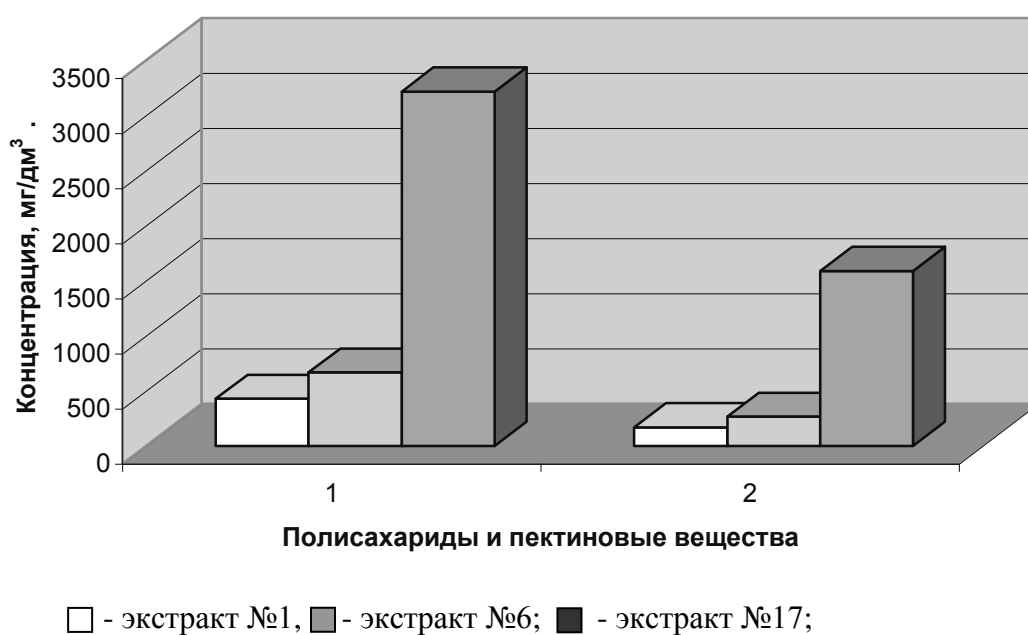
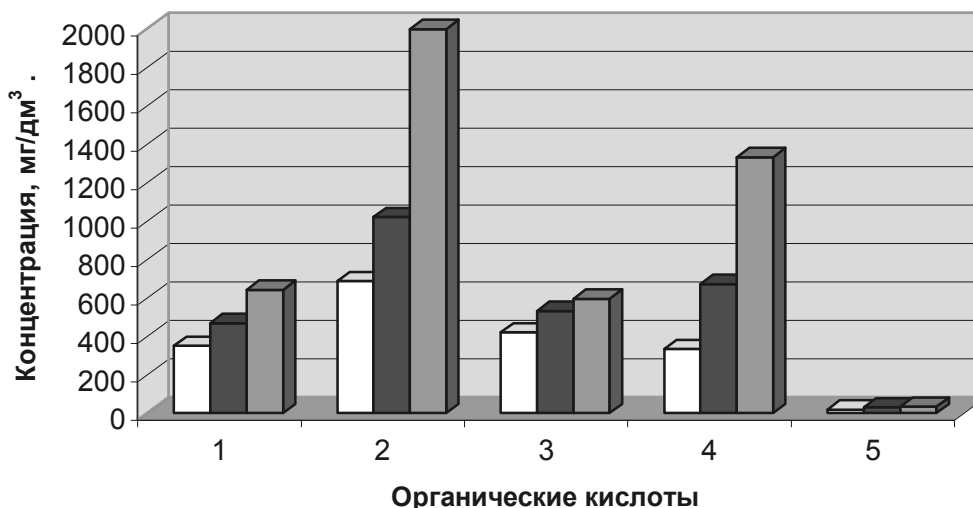


Рис. 7. Содержание полисахаридов и пектиновых веществ в контрастных экстрактах из плодов можжевельника обыкновенного: 1 - полисахариды; 2 - пектиновые вещества



□ – экстракт № 1; ■ – экстракт № 6; ■ – экстракт № 17

Рис. 8. Содержание различных органических кислот в контрастных экстрактах из плодов можжевельника обыкновенного: 1 - муравьиная кислота; 2 - уксусная кислота; 3 - яблочная кислота; 4 – лимонная кислота; 5 – фумаровая кислота.

Анализ содержания органических кислот показывает, что со средней скоростью в экстракт №17 переходят такие кислоты, как уксусная (по сравнению с экстрактами №1 и №6 содержание больше в 2,9 и 1,9 раза соответственно) и лимонная (по сравнению с экстрактами №1 и №6 содержание больше в 3,9 и 2 раза соответственно). Скорость перехода в экстракт №17 муравьиной, яблочной и фумаровой кислот относительно низкая. В тоже время, скорость перехода аскорбиновой кислоты может быть оценена по аналогии с уксусной и лимонной как средняя (по сравнению с экстрактом №1 и №6 больше в 3,7 и 2,9 раза, соответственно). Можно сделать вывод, что наличие в экстрактах трёх упомянутых соединений может внести значительные коррективы в окислительные процессы, по сравнению с «чистыми» растворами фенольных соединений.

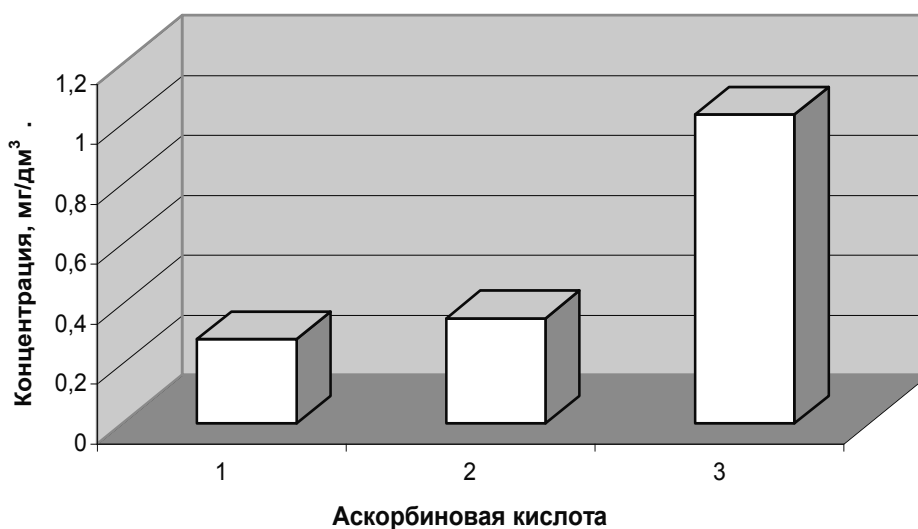


Рис. 9. Содержание аскорбиновой кислоты в контрастных экстрактах из плодов можжевельника обыкновенного (1 – экстракт №1; 2 – экстракт №6; 3 – экстракт №17)

Выводы

1. Экспериментально обоснованы оптимальные режимы получения экстракта из плодов можжевельника обыкновенного с высоким содержанием фенольных веществ:

- температура - 65°C;
- продолжительность настаивания - 3 сут;
- гидромодуль – 3,0;
- концентрация этанола - 50 % об.;
- степень измельченности плода - 1/2 плода.

2. Аналитически подтверждено, что экстракт из плодов можжевельника обыкновенного, полученный при использовании оптимальных режимов экстрагирования, действительно отличается высоким содержанием различных групп фенольных веществ. Это позволяет предположить, что данный экстракт будет обладать высокой биологической активностью и может быть использован для получения на его основе лечебно-профилактического напитка типа бальзам.

3. Анализ содержания в экстракте фоновых компонентов, тем или иным образом влияющих на проявление антиоксидантных свойств фенольных веществ, позволяет предположить существенное влияние на эти свойства (как стимулирующее, так и тормозящее), таких соединений, как полисахариды, а также аскорбиновая, лимонная и уксусная кислоты.

Список литературы

1. Адлер Ю.П., Маркова Е.В., Грановский Ю.В. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. – М.: Наука, 1976. – 279 с.
2. Барабой В.А. Биологическое действие растительных фенольных соединений. – К.: Наукова думка, 1976. – 260 с.
3. Грачев Ю.П. Математические методы планирования экспериментов. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 118 с.
4. Ежов В.Н., Полонская А.К., Биохимическое обоснование направлений переработки растений для получения лечебно-профилактических продуктов // Бюл. Главн. ботан. сада, РАН. – 2003. – Вып. 186. – С. 214-226.
5. Ежов В.Н., Полонская А.К., Виноградов Б.А. и др. Биологические свойства крымских можжевельников // Бюл. Ник. ботан. сада. - 2003. – Вып. 87 – С. 71-76.
6. Ежов В.Н., Полонская А.К., Осина И.В. и др. Антиоксидантные свойства крымских можжевельников // Украинский биохимический журнал. – 2002. – Вып.74. – № 46. – С. 112-113.
7. Мамбетсадыков М.Б., Матыев Э.С., Орозов М.А. и др. Химический состав и фармакологические свойства эфирного масла можжевельника обыкновенного // Химико-фармацевтический журнал. – 1990. – Т. 24. – № 9, – С. 59-60.
8. Методы биохимического исследования растений. Изд. 2-е, перераб. и доп. / А.И. Ермаков. – Л.: Колос, Ленингр. отд-ние, 1972. – 456 с.
9. Методы теххимического контроля в виноделии / В.Г. Гержилова. – Симферополь: Таврида, 2002. – 259 с.
10. Рошин Ю.В. Химическое и биологическое изучение полифенольных соединений и химический состав тритерпеноидов некоторых видов молочая: Автореф. дис... канд. биол. наук: 03.00.04 / Хабаровск, 1972. – 20 с.
11. Фенольные соединения и их физиологические свойства / Л.К. Клышев, Т.К. Чумбалов, Л.С. Алюкина и др. – М.: Наука, 1973. – 238 с.

Obtaining of the bioantioxidant complex from *Juniperus communis* L. fruits

Yavorskaya O.A., Ezhov V.N., Polonskaya A.K., Kazakova V.V.

Polyfactor multilevel experiment was carried out, and it was determined optimal regimes of extracting at which maximum content of phenol substances is founded from *Juniperus communis*.

fruits. Three contrasting on its meaning sums of phenol substances extract from *Juniperus communis*. fruits were studied on the content of different groups in examined compounds. It was determined that extract obtained at optimal regimes of extracting is differed by maximum content of phenol substances belonging to different groups. Also three contrasting extracts from *Juniperus communis*. fruits were examined on the content of polysaccharides, pectin substances, organic acids and ascorbic acid, which infuse on antyoxidantic activity.