

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России)

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе ФГБОУ ВО
СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук,
профессор

_____ И.Л. ДАВЫДКИН
« ____ » _____ 2024 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

по исследованию компонентного состава и антиоксидантных свойств продукта
«Хлорофилл питьевой»

Руководитель НИР,
директор НОЦ «Фармация»

Т.К. Рязанова

Самара

2024

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР,
Директор НОЦ «Фармация» _____ Т.К. Рязанова
подпись, дата

Главный специалист НОЦ «Фармация» _____ А.Р. Мубинов
подпись, дата

Главный специалист НОЦ «Фармация» _____ И.В. Соколова
подпись, дата

Инженер-химик НОЦ «Фармация» _____ А.А. Андреев
подпись, дата

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АОА – антиоксидантная активность

АФК – активные формы кислорода

БАС — биологически активные соединения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГФ РФ— Государственная фармакопея Российской Федерации

ГХ МС – газовая хроматография с масс-селективным детектированием

ЛПРП — лекарственные препараты растительного происхождения

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ТСХ — тонкослойная хроматография

УФ — ультрафиолетовый

DRPH - 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

FRAP – метод определения антиоксидантной активности, основанный на восстановлении железа (ferric reducing/ antioxidant power)

РЕФЕРАТ

Цель работы — изучение форм хлорофилла, входящих в состав коммерческого продукта «Хлорофилл питьевой» в количествах, достаточных для последующей оценки их активности, и проведение исследований их антиоксидантной активности.

Задачи:

- Подготовка литературного обзора по формам хлорофилла, основным источникам и биологической активности хлорофиллов и отдельных форм.
- Проведение препаративной работы по выделению отдельных форм хлорофилла в количествах, достаточных для проведения исследований биологической активности.
- Оценка относительной антиоксидантной активности полученных фракций из экстракта крапивы.

Объекты исследований — экстракт крапивы («хлорофилл питьевой»), экстракт укропа (отдушка), листья крапивы двудомной, образцы тролокса и натриевая соль медного комплекса хлорофилла.

С использованием хроматографических и спектральных методов анализа выделены фракции, содержащие хлорофилл. С применением метода газовой хроматографии с масс-селективным детектором (ГХ-МС) проведен качественный анализ летучих органических соединений и установлены 49 основных соединений для ароматизатора пищевого натурального тип УКРОП 541.

В анализе антиоксидантной активности исследуемых образцов методом FRAP (общая активность) продемонстрировано, что они превосходят тролокс, «Хлорофилл травяной питьевой» - аскорбиновую кислоту. Согласно результатам вольтамперометрического определения «Хлорофилл травяной питьевой» превосходил аскорбиновую кислоту. По антирадикальной активности и способности ингибировать перекисное окисление липидов исследуемые субстанции уступали веществам-стандартам.

Данный промежуточный отчет изложен на 39 страницах машинописного текста, проиллюстрировано 7 таблиц, 17 рисунков. Содержание работы представлено списком обозначений и сокращений, рефератом, 3 основными главами с подразделами, заключением и списком литературы. Список использованных источников состоит из 43 источника, среди которых 25 на иностранном языке.

Ключевые слова: хлорофилл, крапива двудомная, медный комплекс хлорофилла, антиоксидантная активность.

СОДЕРЖАНИЕ

Обозначения и сокращения.....	4
Реферат	5
1. Обзор данных литературы о хлорофиллах и их производных	8
2. Объекты и методы исследования	16
2.1. Объекты исследования.....	16
2.2. Методы исследования.....	17
2.2.1. Методы пробоподготовки	17
2.2.2. Хроматографические методы	17
2.2.2.1. Тонкослойная хроматография.....	17
2.2.2.2. Адсорбционная жидкостная колоночная хроматография (заводской экстракт)	18
2.2.2.3. Адсорбционная жидкостная колоночная хроматография (полученная в лабораторных условиях настойка крапивы).....	19
2.2.2.4. Газовая хроматография	21
2.2.2.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография	22
2.2.3. Спектральные методы.....	23
2.3. Оценка антиоксидантной активности	23
2.3.1. Оценка общей антиоксидантной активности методом FRAP.....	23
2.3.4. Оценка антиоксидантной способности методом вольтамперометрии	26
2.4. Статистическая обработка	27
3. Результаты фитохимических исследований.....	28
1. Качественный анализ исходного сырья и субстанций методом ТСХ.	28
2. Качественный анализ летучих органических соединений субстанций (ГХ-МС)	30
3. Результаты препаративного выделения компонентов	34
4. Результаты количественного определения	37
4. Оценка антиоксидантной активности	39
4.1. Оценка общей антиоксидантной активности методом FRAP	39

4.2. Оценка антирадикальной антиоксидантной активности методом DPPH.....	40
4.3. Оценка способности ингибировать перекисное окисление липидов.....	41
4.4. Электрохимическое определение антиоксидантной активности.....	42
Заключение	45
Список литературы.....	46

1. ОБЗОР ДАННЫХ ЛИТЕРАТУРЫ О ХЛОРОФИЛЛАХ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Природные красители – естественные компоненты пищевых продуктов или биологических объектов, не употребляемых обычно в качестве продуктов питания или составной их части. Натуральные красители обычно выделяют из природных источников в виде смеси соединений, различных по своей химической природе, состав которой зависит от источника и технологии получения, в связи с чем бывает сложно обеспечить его постоянство [18, 26, 29, 30].

Натуральные красители, как правило, не обладают токсичностью, но для многих из них установлены допустимые суточные дозы. Некоторые натуральные красители обладают биологической активностью. Сырьем для получения натуральных пищевых красителей служат различные части дикорастущих и культурных растений, отходы их переработки, водоросли. Одними из распространенных натуральных пищевых красителей являются хлорофиллы [18, 26, 29, 30].

Хлорофиллы – магнийзамещенные производные порфирина – природные пигменты, придающие зеленую окраску многим наземным растениям и водорослям, овощам, плодам. По своему химическому строению хлорофилл близок к пигменту крови человека – гемоглобину [26].

Наиболее распространенными хлорофиллами являются хлорофилл а ($C_{55}H_{72}MgO_5N_4$) с метильной ($-CH_3$) группой в 7 положении углерода, в то время как

хлорофилл b ($C_{55}H_{70}MgN_4O_6$) имеет альдегидную ($-CHO$) группу в том же положении [20]. Хлорофиллид b (биосинтетический предшественник хлорофилла) может быть получен из хлорофиллида a (предшественника хлорофилла a) под действием фермента хлорофиллида a оксигеназы. Различия в химической структуре хлорофилла a и b показаны на Рис. 1. Различные структурные характеристики хлорофиллов приводят к вариациям в их цвете, при этом хлорофилл a показывает сине-зеленый цвет, а хлорофилл b показывает сине-желтый цвет [18, 29, 30].

В растениях также присутствуют хлорофиллы c, d, f (в порядке их обнаружения). Хлорофиллид c – это форма хлорофиллида, обнаруженная в некоторых морских водорослях. Хлорофиллиды c также делятся на несколько разновидностей, отличающиеся наличием винильной группы в положении C8, метоксикарбонильной группы в положении C7. Хлорофиллид d похож на хлорофиллид a, за исключением C3, который имеет формильную группу [16, 18]. Впервые был идентифицирован в 1943 г. у некоторых видов красных морских водорослей. Что касается хлорофиллида e, его природа остается неопределенной (например, по структуре), поскольку он не был далее охарактеризован. Хлорофилл f был впервые обнаружен и назван в 2010 г. группой под руководством Chen в цианобактериях. Структура хлорофиллида f была предсказана с помощью вычислительных исследований в 2011 году Yamijala и др. Как правило, хлорофиллид f имеет структуру хлоринового кольца с C2-формильной группой, а его флуоресцентное излучение максимально при 722 нм [16].

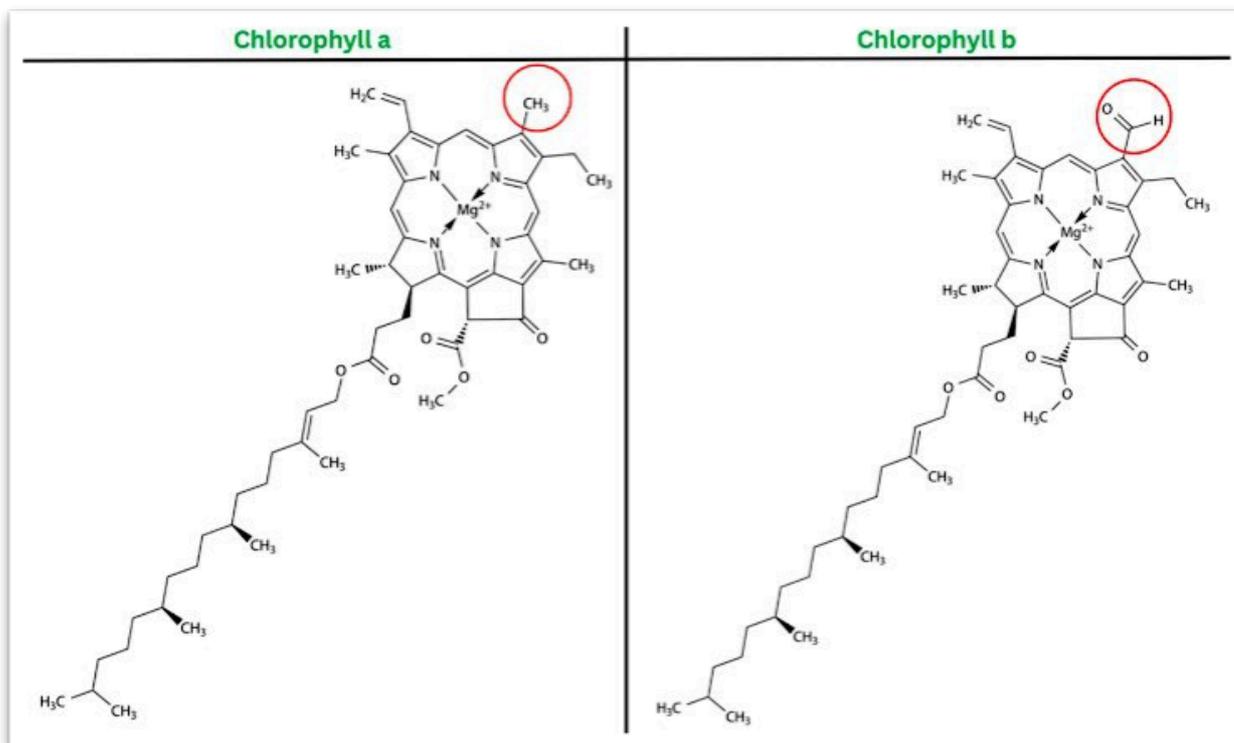


Рисунок 1 – Структурный формулы хлорофиллов а и b (адаптировано из [29])

Для экстракции хлорофиллов используются различные методы, в том числе ультразвуковая, микроволновая экстракция и др. [2, 8, 10, 11, 18, 26, 37]. Для разделения используют экстракционные и хроматографические методы. Для хроматографического разделения в нормальнофазовом режиме в качестве сорбентов использовали углеводы (сахара, целлюлозу), полиэтилен, в обращеннофазовом – октадецилсилильный силикагель [8, 10, 11, 37].

Спектры поглощения хлорофиллов также отличаются друг от друга. Так, длинноволновый максимум в спектре поглощения Chl d и Chl f сдвинут в длинноволновую сторону по сравнению с Chl a, а максимум Chl b, наоборот, сдвинут в коротковолновую сторону [16, 24, 37] (рис. 2).

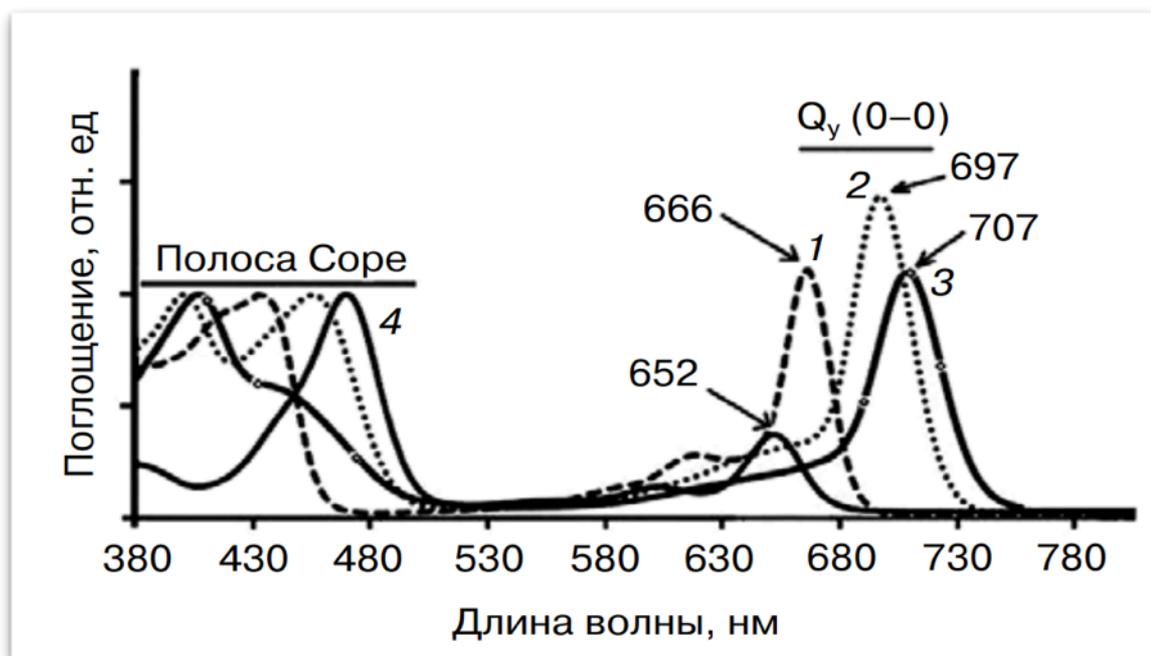


Рисунок 2 – Спектры поглощения в видимой области различных хлорофиллов (адаптировано из [18])

По данным литературы экстракты зеленых частей растений, в частности, листьев, могут содержать 6,0-8,0% хлорофилла. Овощи более богаты хлорофиллом по сравнению с фруктами. Среди овощей наибольшее количество хлорофиллов накапливают шпинат, брокколи, рукола, лук-порей, латук и др. Содержание хлорофиллов в зеленых частях этих растений в зависимости от способа экстракции может превышать 500 мг на 1 кг воздушно-сухого сырья и достигать 20 г на 1 кг воздушно-сухого сырья [26]. Листья крапивы

двудомной являются перспективным источником хлорофилла, и могут содержать около 5 г суммы хлорофиллов в 1 кг воздушно-сухого сырья [5, 14, 29, 32].

Хлорофиллы и их производные широко применяются в пищевой, фармацевтической и парафармацевтической промышленности. В связи с нестабильностью хлорофилла используют различные методы для ее повышения, в том числе образование комплексов с металлами (медный комплекс и его соли) [18, 26].

Пищевой краситель хлорофилл (E140) состоит из сине-зеленого хлорофилла а и желто-зеленого хлорофилла b, находящихся в соотношении 3 : 1. Применение их в качестве красителя в пищевой промышленности сдерживается их нестойкостью, т.к. при повышенной температуре в кислых средах зеленый цвет переходит в оливковый, затем в грязно-желто-бурый вследствие образования феофитина. Для окраски продуктов питания в настоящее время используют хлорофиллы, выделенные из капусты, ботвы моркови, крапивы и др. Производные хлорофилла используются в медицине для фотодинамической терапии рака. В литературе описано применение хлорофилла для окраски мыла, масел, жиров, кремов, алкогольных и безалкогольных напитков, косметических средств, одеколona, духов, в качестве дезодоранта и в других целях. В Японии хлорофиллы используют для подкрашивания рыбных паст и некоторых других кулинарных изделий. В Европе хлорофилл применяется для подкрашивания масел, жиров, ароматических эссенций [18, 26].

По СанПиН 2.3.2.1293-03, хлорофиллы можно добавлять в некоторые виды сыров, овощи в уксусе, рассоле или масле, джемы, желе, мармелады и другие подобные продукты. Кроме того, в документе указано, что «...хлорофиллы разрешается использовать для изготовления всех пищевых продуктов, за исключением тех, подкрашивание которых не допускается,... и в которые могут быть добавлены только определенные красители». К таким продуктам относят те, добавление красителей в которые будет искажать натуральный цвет (молочные, яйцопродукты, мясо-, рыбопродукты, мука, крупы, фрукты, овощи свежие и сушеные, сахар, глюкоза, мед, какао продукты, кофе, специи, соль поваренная, продукты для детей до 3-х лет, вода питьевая бутилированная и в банках. Важно отметить, что, согласно СанПиН 2.3.2.1293-03, для пищевого красителя хлорофилла (E140) не установлен максимальный уровень в продуктах питания. Его применение должно осуществляться в соответствии с технологической инструкцией, что «..определяется технологической целесообразностью; количество добавляемых пищевых добавок не должно превышать уровней, необходимых для

достижения технологического эффекта в соответствии с современной технологией (рекомендуемой практикой) производства пищевых продуктов».

Хлорофиллы являются одними из наиболее известных биологически активных соединений и по данным научной литературы оказывают множество положительных воздействий на здоровье благодаря своим противовоспалительным, противоопухолевым, ранозаживляющим и антимуtagenным свойствам. Кроме того, установлено, что хлорофилл обладает стимулирующим и тонизирующим действием, активизирует основной обмен, тонус кишечника, сердечно-сосудистой системы, дыхательного центра, стимулирует грануляцию и эпителизацию тканей, влияет на формулу крови, увеличивая лейкоциты и гемоглобин, оказывает бактериостатическое действие [18, 26, 35]. Опубликованы данные о защитном действии хлорофиллов и его медных комплексов (хлорофиллина) в отношении специфических генотоксических агентов. Хлорофиллин достоверно снижал кластогенное действие ряда солей металлов у мышей *in vivo*. Степень ингибирования варьировала в зависимости от природы солей и пути введения. Было сделано предположение, что он либо удаляет свободные радикалы, связывается с активными группами мутагенов, либо действует как стабилизатор мембраны [19, 34].

Одним из наиболее возможных механизмов действия хлорофилла и натриевой соли медного комплекса являются антиоксидантные свойства. В недавних исследованиях показано, что в основе хемопреентивного действия хлорофиллов может быть влияние на сигнальные пути, связанные с транскрипционным фактором 2 семейства NFE, ядерным транскрипционным фактором карра В, TGF- β и β -катенином [20].

Следует отметить, что нарушение окислительно-восстановительного баланса может приводить к развитию различного рода заболеваний всех систем организма, в том числе иммунной, центральной нервной, сердечно-сосудистой систем, желудочно-кишечного тракта. С окислительным стрессом связывают преждевременное старение организма и, как следствие, сокращение жизни человека. При этом на развитие окислительного процесса могут оказывать влияние как эндо-, так и экзогенные факторы. К эндогенным источникам свободных радикалов относятся повреждения в дыхательной цепи митохондрий, что приводит к увеличению производства высокоактивных форм кислорода), последующее самоокисление, ферментативные реакции, респираторный взрыв, инфекции, ионы металлов переменной валентности. К экзогенным источникам относятся неблагоприятные факторы окружающей среды, воздействие радиации. Под

влиянием этих факторов увеличивается продукция активных форм кислорода, которые наиболее опасны для липидов, содержащих двойные связи [12, 13, 15, 28].

Модуляция окислительного стресса может происходить путем предотвращения развития активных форм кислорода (АФК), инактивации АФК или повышения их управления через эндогенные клеточные антиоксидантные системы. Антиоксиданты в малых количествах относительно окисляемого субстрата вызывают задержку или ингибирование окисления. Среди возможных механизмов антиоксидантной защиты могут быть: ингибирование радикальных форм активного кислорода, локальное снижение концентрации кислорода с предотвращением его включения в окисление, взаимодействие с органическими радикалами и ингибирование развития цепных окислительных процессов; связывание ионов металлов переменной валентности; превращение пероксидов в стабильные продукты окисления [12, 13, 15, 28].

Антиоксиданты можно разделить на антиоксиданты косвенного (опосредованного) действия и прямого (направленного) действия. В отличие от антиоксидантов косвенного действия антиоксиданты прямого действия способны оказывать антирадикальное воздействие и вне биологических объектов. Антиоксиданты косвенного действия снижают окислительный стресс, измеряемый внутри клетки, путем стимуляции ее эндогенной системы [3, 12, 13].

Для хлорофилла обнаружены антиоксидантные свойства за счет подавления перекисного окисления липидов в гомогенате печени крыс, а также в гомогенате мозга крыс с дефицитом витамина Е. Каничкова и др. и Ванкова и др. обнаружили, что клеточный окислительный стресс и окислительно-восстановительный статус клеток рака поджелудочной железы человека (PA-TU-8902) подвержены влиянию хлорофилла и хлорофиллина из-за увеличения восстановленного глутатиона, восстановленного H_2O_2 и/или восстановленного супероксида, что предполагает как прямую, так и, возможно, косвенную антиоксидантную активность. Имеются данные, что продукты, содержащие хлорофилл (из хвои) значительно уменьшают проявления воспалительно-дегенеративного поражения тканей пародонта у крыс, оцененные по состоянию перекисного окисления липидов и систем антиоксидантной защиты [20, 21, 31].

Сообщается, что выше пороговой концентрации антиоксидантная активность хлорофилла действует дозозависимым образом. Он продемонстрировал способность снижать выработку АФК и, соответственно, удалять свободные радикалы внутри клетки, при этом хлорофилл а обладает большей способностью удалять свободные радикалы, чем

хлорофилл b, а феофитины обладают более сильной антиоксидантной способностью, чем хлорофиллы [19, 20, 21, 31].

Исследования *in vitro*, проведенные Ferruzi и др., продемонстрировали, что производные хлорофилла a демонстрируют более высокую антиоксидантную способность по сравнению с производными хлорофилла b. В то же время Lanfer-Marquez и др. сообщили о противоположных результатах, показав, что феофорбид b и феофитин b являются наиболее мощными природными антиоксидантными производными по сравнению с производными хлорофилла a. Ferruzi и др. также наблюдали, что комплексы хлорофиллов с металлами (такие как Mg-хлорофиллы, Zn-феофитины, Zn-пирофеофитины, Cu-феофитин a и Cu-хлорофиллины) демонстрируют более высокую антирадикальную способность, чем производные без металлов (такие как хлорофиллы, феофитины и пирофеофитины). Это говорит о том, что в дополнение к фундаментальной структуре порфирина, способствующей восстановлению свободных радикалов, хелатирование металлов усиливает антиоксидантную активность. В работе Lanfer-Marquez и др. продемонстрировано, что медный комплекс хлорофилла проявляет более высокую антиоксидантную активность по сравнению с природными хлорофиллами, подчеркивая влияние хелатированного металла в порфириновом кольце на силу антиоксидантной способности. В исследовании *in vitro*, проведенном Kang и др., комплексы феофитинов с цинком показали самую высокую способность к удалению, превзойдя антиоксидантную активность хлорофиллов и феофитинов. Цинковые комплексы феофитинов также продемонстрировали ингибирующую активность против липополисахаридом (ЛПС)-индуцированной продукции оксида азота и подавили экспрессию индуцируемой синтазы оксида азота в стимулированных липополисахаридом макрофагальных клетках, не оказывая цитотоксического действия. Предварительное введение мышам хлорофилла b приводило к снижению окислительного стресса и перекисного окисления липидов, вызванных цисплатином, хотя антиоксидантные эффекты были непоследовательными. Несмотря на потенциальную антиоксидантную активность природных хлорофиллов, исследования в этой области были относительно ограниченными в последние годы. Это может быть связано с восприятием того, что хлорофиллы менее важны по сравнению с другими фитохимическими веществами, обнаруженными во фруктах и овощах, а также с убеждением, что хлорофиллы плохо усваиваются желудочно-кишечным трактом человека. Однако стоит отметить, что понимание антиоксидантных свойств природных хлорофиллов является развивающейся областью, и необходимы дальнейшие исследования, чтобы

полностью выяснить их потенциал и установить их значимость по сравнению с другими веществами [19, 20, 21, 31].

В рамках настоящей работы планируется изучение форм хлорофилла, входящих в состав коммерческого продукта «Хлорофилл питьевой» в количествах, достаточных для последующей оценки их активности, и проведение исследований их антиоксидантной активности.

2.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования использовали:

1. листья крапивы двудомной;
2. экстракт крапивы (хлорофилл), номер партии: 1910 от 19.10.2023 г. (производитель ООО «ЭВКЛаб», ТУ 10.89.15-019296672-2020);
3. «Хлорофилл травяной питьевой» от 22.05.2023 г.
4. ароматизатор пищевой натуральный тип УКРОП 541 (ООО «Комбинат химико-пищевой ароматики», партия 1397 от 30.05.2024 г.)
5. образцы тролокса и натриевая соль медного комплекса хлорофилла (хлорофиллина) (производства Alfa Chemical).

Экспериментальные данные были получены с использованием следующих приборов, оборудования:

1. Аналитические весы электронные «САРТО ГОСМ ЛВ 210-А».
2. Спектрофотометры «СФ-2000» (ОКБ Спектр) и «Specord 40» (Analytik Jena), кюветы с толщиной стекла 10 мм.
3. Облучатель ультрафиолетовый «ТСХ-254/365».
4. Набор сит 1, 2, 3, 5 мм (Химприбор).
5. Шкаф сушильный 2В-151.
6. Аквадистилятор «АЭ-14-“Я-ФП”-01» (Ферропласт Медикал).
7. Ротационный испаритель ИР-1ЛТ (Labtex).
8. Спектрометры: JEOL JNM EСХ-400 для ^1H -ЯМР спектроскопии (399,78 МГц) и ^{13}C -ЯМР спектроскопии (100,52 МГц), Bruker Maxis для масс-спектрометрии.
9. Лабораторная посуда по ГОСТ 25336-82 (ПАО Химлаборприбор) — стаканы, делительные воронки, воронки Шотта, колбы, мерные колбы, цилиндры и др.

Используемые расходные материалы включали:

- хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ», «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ», фильтровальная бумага для хроматографии, системы элюирования (хлороформ-этанол-вода и бутанол-уксусная кислота-вода в различных соотношениях);

- элюенты для экстракции БАС из сырья и субстанции: гексан, хлороформ, этанол 96% (ООО «Компонент-реактив» и ООО «Гиппократ») в различных разведениях с водой очищенной; вода очищенная дистиллированная (полученная в лабораторных условиях с помощью аквадистиллятора указанного выше);
- стандартные образцы веществ (аскорбиновая кислота, тролокс, медный комплекс хлорофилла);
- фильтры обеззоленные «Красная лента» и «Синяя лента» различных диаметров («МЕЛИОР XXI») и мембранные фильтры «Millipore» (0,45 мкм);

Реактивы и остальные растворители (хлороформ, бутанол, кислота уксусная ледяная и др.) имели степень чистоты ч.д.а. или х.ч.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методы пробоподготовки

Для получения концентрированного извлечения из сырья крапивы при обеспечении максимальной стабильности БАС с целью дальнейшего фитохимического изучения готовили настойку на этаноле 96% методом модифицированной дробной мацерации в трех экстракторах (в соотношении «сырье:экстрагент» 1:5, при изготовлении учитывали поглощение экстрагента сырьем) с включением заключительной термической стадии — 30 минут при температуре 70°C [13]. Из 120 г сырья было получено около 450 мл настойки.

Полученное извлечение отстаивали в течение 2 суток при температуре 8°C в защищенном от света месте и профильтровали через фильтр обеззоленный «Красная лента» во флакон темного стекла объемом 1 л, укупоривали полиэтиленовыми пробками с навинчивающейся крышкой.

Органолептические свойства настойки травы крапивы двудомной: темно-зелёная непрозрачная в толстом слое жидкость с травяным запахом.

2.2.2. Хроматографические методы

2.2.2.1. Тонкослойная хроматография

В исследовании ТСХ-разделение проводили на хроматографических пластинках «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» или «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ». Пластинки предварительно выдерживали для активации в сушильном шкафу при температуре 100-105 °C в течение 1 часа. Пробы наносили микропипеткой на линию старта, проведенную на расстоянии 1,5

см от нижнего края пластинки вдоль линии накатки, так чтобы пятна отстояли друг от друга на расстоянии около 1 см. После нанесения проб пластинку высушивали на воздухе в течение 5 мин, затем помещали в предварительно насыщенную парами растворителей камеру и хроматографировали восходящим способом в различных системах хлороформ-этанол 95%-вода очищенная (25:18:2) и хлороформ-этанол 95% (19:1), подготовленные не менее чем за 24 ч. до хроматографирования. После прохождения фронтом растворителя не менее 80-90% длины пластинки, её вынимали и сушили на воздухе в течение 5-10 минут до удаления запаха растворителей. Детекцию проводили в видимой области спектра и при облучении УФ-светом (254 и 365 нм).

2.2.2.2. Адсорбционная жидкостная колоночная хроматография (заводской экстракт)

С целью выделения медного комплекса хлорофилла из заводского экстракта крапивы была проведена адсорбционная жидкостная колоночная хроматография [4, 5]. Экстракт упаривали и смешивали с силикагелем для колоночной хроматографии, высушивали до получения сыпучего порошка. Для заполнения колонок использовали суспензионный метод. Хроматографическое разделение проводили на сорбенте силикагеле L 50/100 мкм с использованием в качестве элюентов спирто-хлороформных смесей в различных соотношениях. Общая схема процесса проведения колоночной хроматографии и подробного элюирования представлены на Рисунке 3 и в Таблице 1 соответственно.



Рисунок 3 – Процесс проведения колоночной хроматографии

Таблица 1 – Схема основного элюирования при проведении исследования компонентного состава заводского экстракта крапивы методом адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии

Состав элюента, об. %		Объём элюента, мл	Номера фракций
Гексан, %	Хлороформ, %		
100	0	500	1-3
80	20	1000	4-9
60	40	500	10-11
40	60	500	12-14
20	80	1000	15-23
0	100	2500	24-38

Фракции собирали объемам по 100-200 мл; упаривали в роторно-вакуумном испарителе при температуре 50 ± 2 °С до остаточного объема 5-6 мл. Ход хроматографического разделения контролировали методом ТСХ в нескольких системах с использованием различных способов детекции (визуально в видимой области; в УФ-свете при длине волны 254 и 366 нм).

2.2.2.3. Адсорбционная жидкостная колоночная хроматография (полученная в лабораторных условиях настойка крапивы)

Настойку, полученную как описано в разделе 1.2.1) упаривали и смешивали с силикагелем для колоночной хроматографии, высушивали до получения сыпучего порошка. Для заполнения колонок использовали суспензионный метод. Разделение проводили в режиме вакуумной хроматографии на сорбенте силикагеле L 15/45 мкм с использованием в качестве элюентов гексана, хлороформа, гексано-хлороформных смесей в различных соотношениях (Рис. 4). Схема элюирования представлена в Таблице 2. Сам принцип деления под вакуумом подробно описан в работе [33].

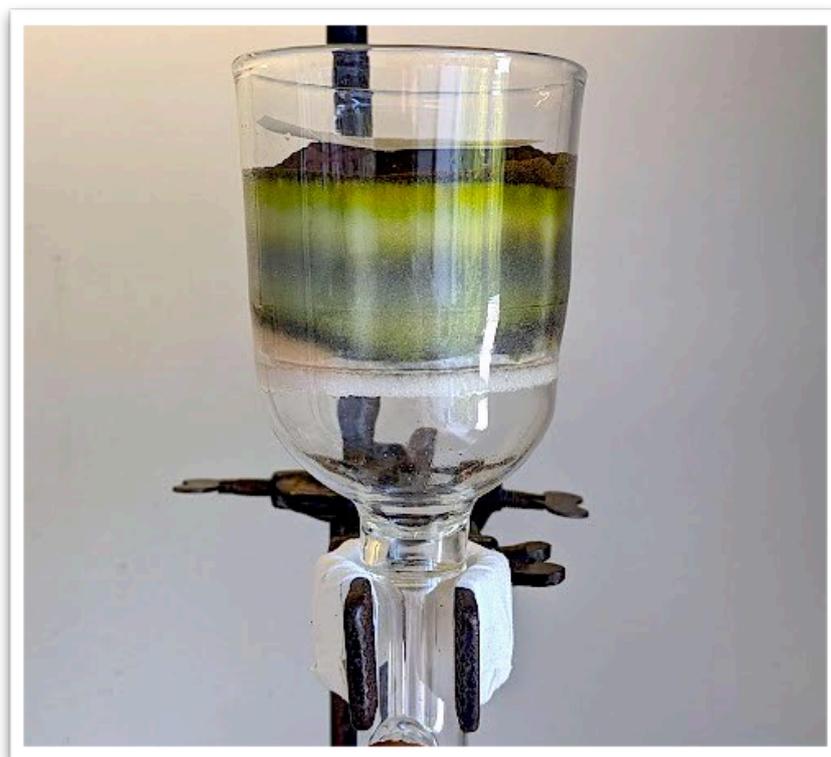


Рисунок 4 – Процесс деления извлечения из листьев крапивы двудомной (вакуумная хроматография)

Таблица 2 – Схема основного элюирования при проведении исследования компонентного состава настойки крапивы (экстрагент – 95% этанол, соотношение сырье : экстрагент 1:5) методом адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии

Состав элюента, об. %		Объём элюента, мл	Номера фракций
Гексан, %	Хлороформ, %		
100	0	200	1-4
90	10	200	5-8
80	20	200	9-12
70	30	200	13-16
60	40	200	17-20
50	50	400	21-28
40	60	200	29-32
30	70	200	33-36
20	80	200	37-40
10	90	200	41-44
0	100	200	45-48

Фракции собирали объемам по 50 мл; упаривали в роторно-вакуумном испарителе при температуре 50 ± 2 °С до остаточного объема 5-6 мл. Ход хроматографического разделения контролировали методом ТСХ в нескольких системах с использованием различных способов детекции (визуально в видимой области; в УФ-свете при длине волны 254 и 366 нм).

2.2.2.4. Газовая хроматография

Компонентный состав летучих соединений ароматизатора типа УКРОП определяли с помощью газового хроматографа «МАЭСТРО 7820» с масс-спектрометром модели Agilent 5975 и автоинжектором. Анализ проводили с использованием капиллярной кварцевой колонки HP-5ms 30 м×0,25 мм×0,25 мкм (неподвижная фаза: 5%-дифенил-95%-диметилсилоксан).

В общем случае условия хроматографирования:

1. газ-носитель: гелий, скорость потока 1 мл/мин;
2. программирование температуры термостата колонок: изотерма 40°C в течение 5 мин – нагрев до 80°C со скоростью 3°C/мин – нагрев до 180°C со скоростью 4°C/мин – нагрев до 280°C со скоростью 8°C/мин - изотерма 280°C в течение 10 мин.;
3. температура испарителя 270°C; температура источника ионов 150°C; температура квадруполя 230°C; температура переходной камеры 280°C;
4. объем вводимой жидкой пробы 1 мкл.

Для идентификации компонентов определяли линейные индексы удерживания, сопоставляли полученные результаты и полные масс-спектры с библиотечными (библиотеки масс-спектров «NIST 2.0») и литературными данными. Рассматривались только компоненты, определяемые по библиотеке с вероятностью более 90%. Долю каждого компонента эфирного масла от суммы всех компонентов рассчитывали методом внутренней нормализации по площадям соответствующих пиков на хроматограмме, построенной по полному ионному току.

2.2.2.5.Высокоэффективная жидкостная хроматография

Количественное определение хлорофиллов в исследуемых образцах (фракции, продукция) проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Условия хроматографирования:

Колонка	150 × 4,6 мм, октадецилсилильный силикагель, 5 мкм
Подвижная фаза	А - ацетонитрил, В - 1% раствор уксусной кислоты 0 – 5 мин – градиент А 50% → А 90% 5 – 25 мин - изократический режим А – 90%
Скорость потока	1,0 мл/мин
Температура колонки	30 °С
Детектор	УФ, 410, 430, 458 нм
Объем пробы	10 мкл

В качестве стандартного образца использовали хлорофиллин ($C_{34}H_{31}CuN_4Na_3O_6$) со степенью чистоты 98%. При расчетах использовали поправочные коэффициенты,

учитывающие соотношение молекулярных масс хлорофиллов и хлорофиллина (натриевой соли медного комплекса хлорофилла).

2.2.3. Спектральные методы

Прямая и дифференциальная УФ-спектрофотометрия [5,14]

Метод абсорбционной спектроскопии в варианте УФ-спектрофотометрии использовали для анализа индивидуальных соединений. Анализ проводили на спектрофотометрах — СФ-2000 и Spеcord-40, кюветы — 10 мм, диапазон определения длин волн — 190-1000 нм. Результаты измерений обрабатывались с помощью программ SFScan, WinASPECT и Microsoft Excel.

2.3. Оценка антиоксидантной активности

2.3.1. Оценка общей антиоксидантной активности методом FRAP

Оценку антиоксидантной активности (АОА) проводили в соответствии с методикой, описанной в работе [19].

Принцип метода

Метод позволяет провести прямое определение суммарной АОА соединений по восстановлению ими железа. В сравнении с косвенными методами, метод FRAP характеризуется экспрессностью, низкой стоимостью единичного анализа и нечувствительностью к небольшим отклонениям от прописанной методики (робастностью).

В методе FRAP вводят в избытке ионы Fe^{3+} и фотометрический реагент – трипиридилтриазин, 1,10-фенантролин, 2,2'-дипиридил и др. Под действием антиоксидантов образуется интенсивно окрашенный комплекс железа (II) с реагентом. При низких значениях pH восстановление трипиридилтриазинового комплекса Fe(III) в комплекс с Fe (II) сопровождается появлением интенсивной голубой окраски. Измерения основаны на способности АО подавлять окислительный эффект реакционных частиц, генерируемых в реакционной смеси. Окраска развивается медленно, поэтому аналитический сигнал измеряют через τ минут после смешивания реагентов, не дожидаясь установления равновесия. АОА находят по градуировочному графику, предварительно построенному по растворам стандартного вещества (аскорбиновой кислоты).

Реактивы

Ацетатный буфер рН 3,6. 1,5 г ацетата натрия отвешивают в мерной колбе на 500 мл, прибавляют часть воды очищенной дистиллированной и в неё приливают 8 мл ледяной уксусной кислоты, перемешивают, доводят растворителем до метки и вновь перемешивают.

Раствор железа хлорида (III). 0,27 г железа хлорида (III) отвешивают в мерную колбу на 50 мл и доводят водой очищенной дистиллированной до метки.

Раствор 40 мМ соляной кислоты. 0,6 мл соляной кислоты растворяют в части воды внутри мерной колбы на 500 мл и доводят водой очищенной дистиллированной до метки.

Раствор 10 мМ трипиридилгидразина (ТРТЗ). 31,8 мг ТРТЗ отвешивают в мерную колбу на 10 мл. Растворяют раствором 40 мМ соляной кислоты при нагревании на водяной бане. Доводят раствором кислоты до метки.

Рабочий реактив FRAP. Смешивают ацетатный буфер, раствор железа хлорида (III) и раствор ТРТЗ в соотношении 10:1:1 соответственно. Реактив годен сутки.

Методика

В фотометрическую кювету наливают 3,9 мл рабочего реактива FRAP, добавляют 100 мкл пробы и измеряют оптическую плотность раствора при 593 нм и через 6-12 минут повторно.

Перед каждой серией опытов повторяли построение градуировочного графика (по аскорбиновой кислоте).

Все опыты повторяли не менее трех раз, результаты обрабатывали по Стьюденту ($p = 0,95$), предполагая нормальное распределение случайных погрешностей.

Приготовление растворов стандартных образцов

4,4 мг (точная навеска) аскорбиновой кислоты отвешивают в мерную колбу объемом 25 мл, растворяют в воде дистиллированной и доводят до метки.

6,7 мг (точная навеска) тролокса отвешивают в мерную колбу объемом 25 мл, растворяют в спирте этиловом и доводят до метки.

18,1 мг (точная навеска) медного комплекса отвешивают в мерную колбу объемом 25 мл, растворяют в спирте этиловом и доводят до метки.

2.3.2. Оценка антирадикальной антиоксидантной активности методом DPPH

Метод основан на реакции стабильного свободного радикала DPPH* (2,2-дифенил-1-пикрилгидразила) с антиоксидантом-донором водорода, при этом образуется восстановленная форма DPPH, что приводит к исчезновению фиолетовой окраски.

Реакция контролируется по изменению оптической плотности при 514 нм методом спектрофотометрии [3, 17].

Оценка антирадикальной активности проводилась методом DPPH по методике, описанной в работе [37] в небольшой модификации.

Аликвоты этанольного раствора исследуемых образцов (аскорбиновая кислота, тролокс, заводской экстракт крапивы, хлорофилл пищевой, натриевая соль медного комплекса хлорофилла, фракции с колоночной хроматографии, содержащие хлорофилл), содержащих различные концентрации действующих веществ добавляли к постоянному объему DPPH. Абсорбцию измеряли на спектрофотометре ПЭ-5400ВИ при длине волны 515 нм один раз в минуту в течение 20 мин.

В качестве показателя АОА использовали концентрацию, которая необходима для снижения на 50% исходной концентрации субстрата (EC50).

2.3.3. Оценка способности ингибировать перекисное окисление липидов

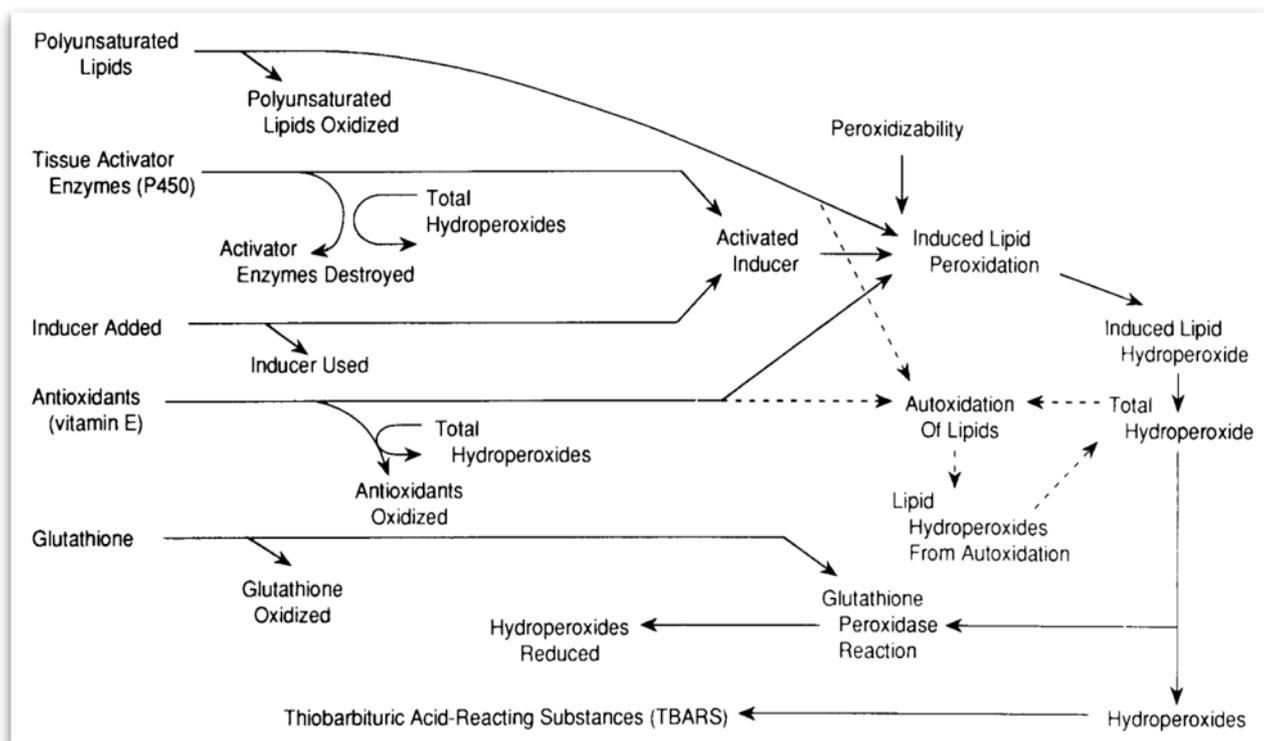
Измерение способности антиоксидантов подавлять образование реакционных частиц, которые взаимодействуют с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) с образованием окрашенных комплексов.

Метод применяется для оценки ингибирования перекисного окисления липидов (ПОЛ). Окисление моделировали в липосомальной системе лецитина, приготовленной инъекционным способом. В качестве инициатора ПОЛ использовали ионы Fe^{2+} . Продукты ПОЛ связываются 2-тиобарбитуровой кислотой в окрашенный комплекс, придающий растворам оранжевый цвет. Следовательно, антиоксиданты, связывая перекисные радикалы, препятствуют окислению лецитина, тем самым уменьшая оптическую плотность в сравнении с холостой пробой. Количественную оценку осуществляли измерением оптической плотности при длине волны 535 нм в пересчёте на малоновый диальдегид (МДА).

На Рис. 5 представлены механизмы активации перекисного окисления липидов и защитного действия антиоксидантов [42].

Рисунок 5 – Схематическая модель основных компонентов и реакций перекисного окисления липидов в биологических системах (адаптировано из [42])

Методика:



Липосомальную систему готовили инъекционным способом: 1 мл раствора лецитина 440 мг в 25 мл *n*-бутанола при перемешивании через тонкую иглу инсулинового шприца вводили в 20 мл дистиллированной воды.

5 мл полученной тонкой эмульсии отмеряли в термостойкую пробирку с навинчивающейся крышкой, прибавляли 0,15 мл 10 % фосфорной кислоты, 0,5 мл 0,6% 2-ТБК, 50 мкл 2,8 мг/мл железа сернокислого 7-водного, 100 мкл антиоксиданта. Полученную смесь перемешивали затем инкубировали в кипящей водяной бане в течение 1 часа. Продукт реакции 2-ТБК с пероксидами экстрагировали 2 мл *n*-бутанола и центрифугировали 10 минут при 1800 об/мин. Слой *n*-бутанола отделяли, помещали в кювету и измеряли оптическую плотность на СФ-2000 при 535 нм.

2.3.4. Оценка антиоксидантной способности методом вольтамперометрии

Для водорастворимых соединений оценивалась АОА электрохимическим методом. Из литературных источников известен электрохимический способ определения антиоксидантной активности на примере растительных объектов, пищевых продуктов и других объектов аналитического контроля с применением Fe(III) - медиаторов. Описанные методы основаны на измерении смещения максимума анодного тока на единицу концентрации объекта сравнения. В качестве объектов сравнения в основном используют кислоту аскорбиновую, тролокс, кислоту галловую и др.

В настоящем исследовании в качестве медиатора использовали 0,005 М раствор калия гексацианоферрат (III) железа в 1М растворе калия хлорида. Объем электролитической ячейки составил 30 мл. В качестве основного и вспомогательного электродов использовали платиновые электроды ЭРП-101, а электродов сравнения – насыщенный хлорсеребряный электрод ЭСр-10101/7. Измерение вольтамперометрических характеристик проводили в линейной развертке от 0 до 1 В со скоростью изменения потенциала 100 мВ/с.

2.4. Статистическая обработка

Статистическая обработка результатов количественного определения проводилась в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [4].

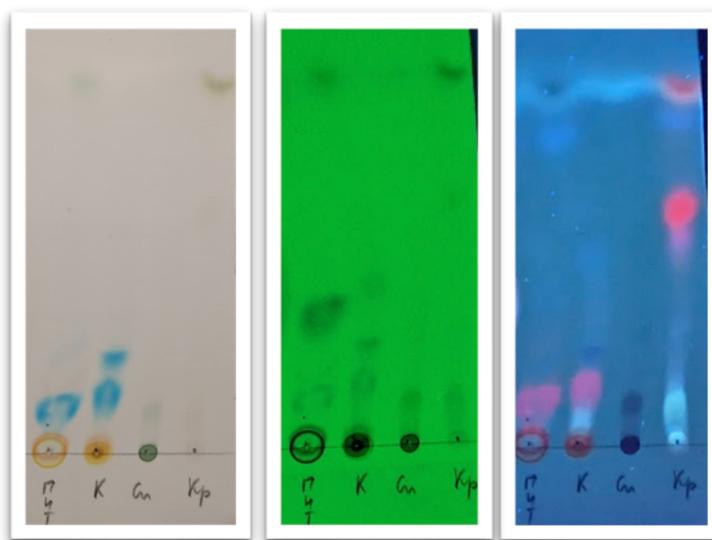
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ФИТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Качественный анализ исходного сырья и субстанций методом ТСХ.

При анализе методом тонкослойной хроматографии, УФ-спектрофотометрии в извлечении из крапивы двудомной, заводском экстракте крапивы обнаруживались хлорофиллы или медные комплексы (Рис. 6). Следует отметить отличия в профиле разделяемых компонентов в извлечении из крапивы, полученном в лабораторных условиях, и заводского экстракта крапивы. В извлечении обнаруживался и хлорофилла а, и хлорофилл b. На хроматограмме «Хлорофилл пищевой травяной» и заводского экстракта крапивы обнаруживались зоны компонентов синего и желтого цвета, отсутствующие в сырье (предположительно синтетические красители).

На УФ-спектре извлечения из крапивы обнаруживались максимумы поглощения при длинах волн 430 и 660 нм, соответствующие данным литературы о максимумах поглощения хлорофилла а (Рис. 7).

В УФ-спектрах «Хлорофилл пищевой травяной» (Рис. 8) и заводского экстракта крапивы (Рис. 9) максимумы поглощения находились в область 410-417 нм и 620-623 нм, что в целом приближено к данным по максимум поглощения натриевой соли медного комплекса хлорофилла (404 и 626 нм) – пищевого красителя E141, но отличается от данных для медного комплекса феофитина а (молекула хлорофилла с недостающим ионом Mg^{2+}) – 410 и 665-670 нм, что свидетельствует об использовании других сырьевых источников, кроме крапивы.



А

Б

В

Рисунок 6 — ТСХ продукции, содержащей хлорофилл.

А – просмотр при видимом свете; Б – просмотр в УФ-лампе при длине волны 254 нм; В – просмотр в УФ-лампе при длине волны 366 нм (слева направо: пищевой хлорофилл, заводской экстракт крапивы, хлорофиллин, экстракт крапивы; хроматографическая система: хлороформ : этанол : вода 25:18:2 (об./об./об.))

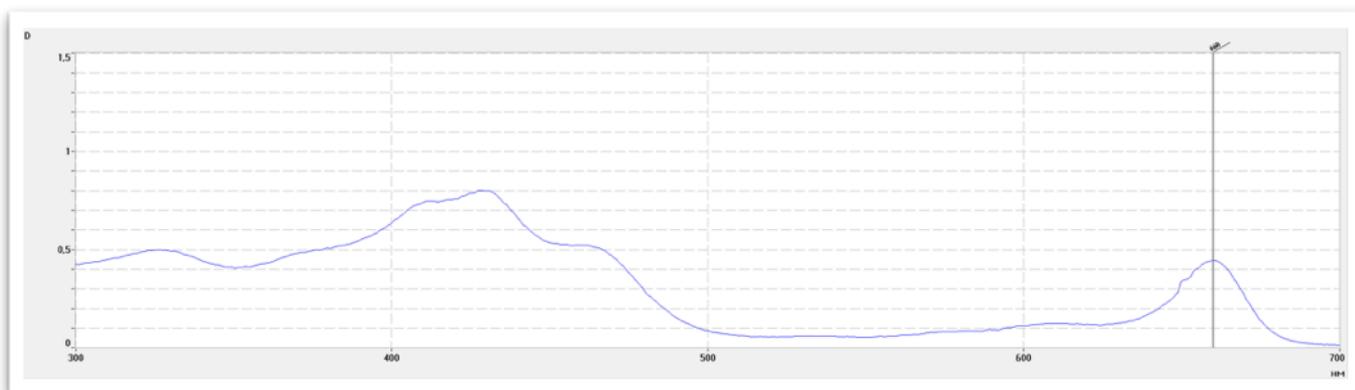


Рисунок 7 – Спектр поглощения в ультрафиолетовой и видимой области для извлечения из листьев крапивы двудомной

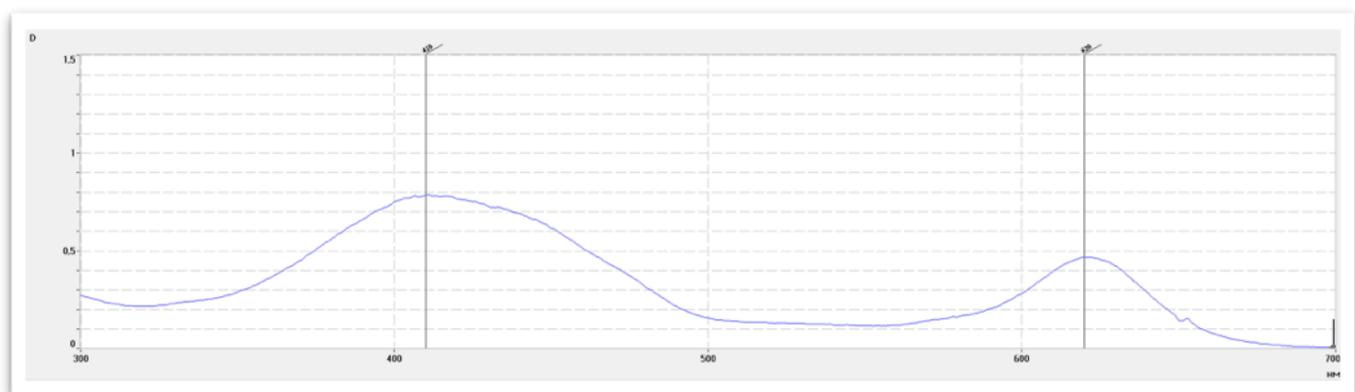


Рисунок 8 – Спектр поглощения в ультрафиолетовой и видимой области для продукта «Хлорофилл пищевой травяной»

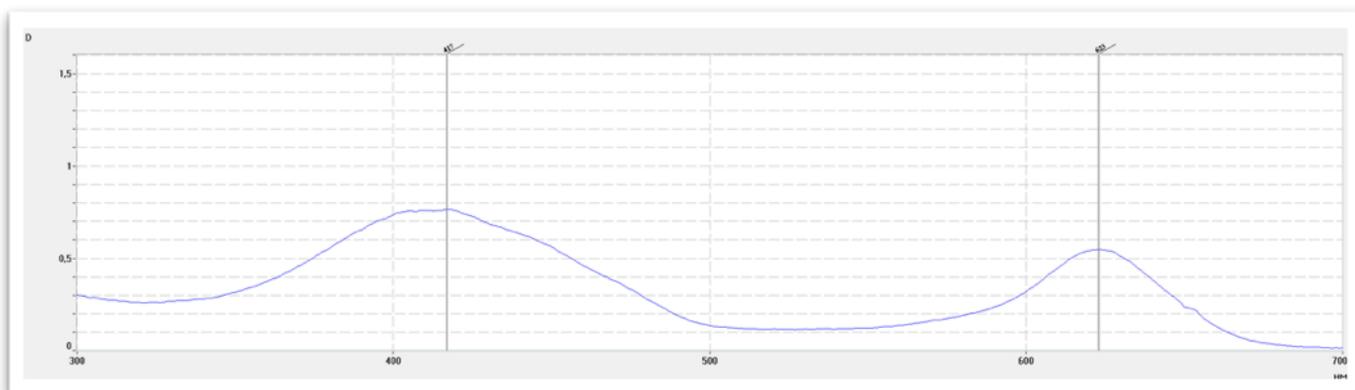


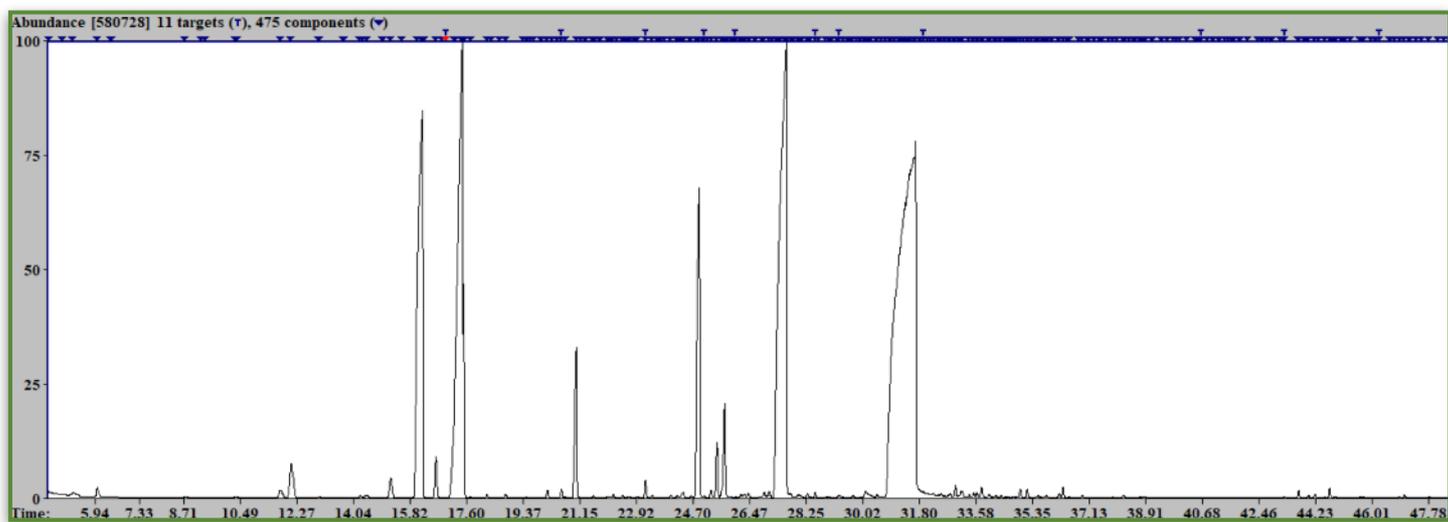
Рисунок 9 – Спектр поглощения в ультрафиолетовой и видимой области для заводского экстракта крапивы

2. Качественный анализ летучих органических соединений субстанций (ГХ-МС)

Определение компонентного состава летучих органических соединений проводили методом ГХ-МС. Подробные условия хроматографирования и пробоподготовка указаны в разделе «Глава 2. Объекты и методы исследования». Компонентный состав представлен в Таблице 3, хроматограмма – на Рисунке 10. При подсчетах относительного процентного содержания компонентов эфирного масла не учитывали пик триацетина – используемого при приготовлении ароматизатора растворителя.

Таблица 3 — Основной компонентный состав летучих органических соединений по данным газовой хроматографии с масс-селективным детектором гексановых разведений ароматизатора УКРОП 541

№ п/п	Компонент	Время удерживания, мин	Относительное процентное содержание, %
	α -туйен	11,757	0,29
	α-пинен	12,101	1,35
	камфен	12,975	0,04
	сабинен	14,264	0,07
	β -пинен	14,462	0,09
	мирцен	15,225	0,62
	α-фелландрен	16,222	22,93
	α -терпинен	16,642	0,96
	D-лимонен	17,469	26,35
	β-фелландрен	17,516	2,21
	β -оцимен	18,245	0,06
	γ -терпинен	18,827	0,07
	терпинолен	20,139	0,13
	<i>n</i> -цименен	20,582	0,15
	β-линалоол	21,054	3,59
	1,3,8-п-ментатриен	21,579	0,03
	p-мента-2,8-диенол	22,039	0,03
	нео-алло-оцимен	22,208	0,06
	2-п-ментен-1-ол	22,966	0,03
	2-борнанон	23,222	0,32
	б-камфенон	24,009	0,05
	карфенон	24,394	0,16
	терпинен-4-ол	24,656	0,05
	сабинакетон	25,070	0,04
	дигидрокарвон	25,460	1,02
	дигидрокарвеол	26,323	0,09
	карвеол	26,451	0,11
	неодигидрокарвеол	26,953	0,17



карвеол	27,098	0,16
карвон	27,623	34,07
борнеол	28,013	0,07
п-мента-1,8-диен-3-он	28,299	0,07
борнилацетат	28,544	0,08
6-камфенол	28,981	0,02

	карвакрол	29,290	0,06
	карвилацетат	30,310	0,03
	2,3-борнандиол	32,787	0,07
	β -кубебен	33,131	0,13
	кариофиллен	33,172	0,09
	гермакрен D	33,521	0,09
	хумулен	34,372	0,02
	γ -мууролен	34,984	0,14
	β -кубебен	35,200	0,13
	леден	35,486	0,02
	α -фарнезен	35,806	0,04
	γ -кадинен	36,208	0,08
	δ -кадинен	36,325	0,16
	α -кадинен	36,931	0,03

n/i — неидентифицированный компонент, н/о — не обнаружено либо в незначительных (следовых) количествах.

Рисунок 10 – ГХ-МС хроматограмма для ароматизатора УКРОП 541

Основными компонентами среди идентифицированных 49 компонентов были карвон (34,1% от общего числа компонентов эфирного масла), лимонен (26,4%), α -фелландрен (23,0%), линалоол (3,6%), β -фелландрен (2,2%) и α -пинен (1,4%).

Согласно данным научной литературы, преобладающими компонентами в эфирном масле семян укропа пахучего являются карвон и лимонен, суммарное содержание которых может составлять 60-90% от общего содержания компонентов. В эфирном масле травы укропа основными компонентами являются α -фелландрен, лимонен, β -фелландрен, α -пинен, при этом α -фелландрен не обнаруживался в семенах укропа [25, 26, 28, 30].

Присутствие этого компонента в ароматизаторе позволяет предположить, использование в качестве источника его получения травы укропа, в том числе в период плодоношения.

3. Результаты препаративного выделения компонентов

В результате хроматографического разделения настойки крапивы из фракций, полученных при элюировании гексаново-хлороформными смесями в соотношении 60/40 (об./об.) выделен хлорофилл а, во фракциях, полученных при элюировании смесью гексана и хлороформа 50/50 (об./об.), содержался хлорофилл b (Рис. 11). Хлорофилл а был преобладающим компонентом, соотношение по массе с хлорофиллом b примерно 3,2:1. Другие формы хлорофилла не обнаруживались. В УФ-спектре фракций с преобладанием хлорофилла а максимум поглощения приходился на 665 нм, хлорофилла b – 650 нм, что совпадает с литературными данными.

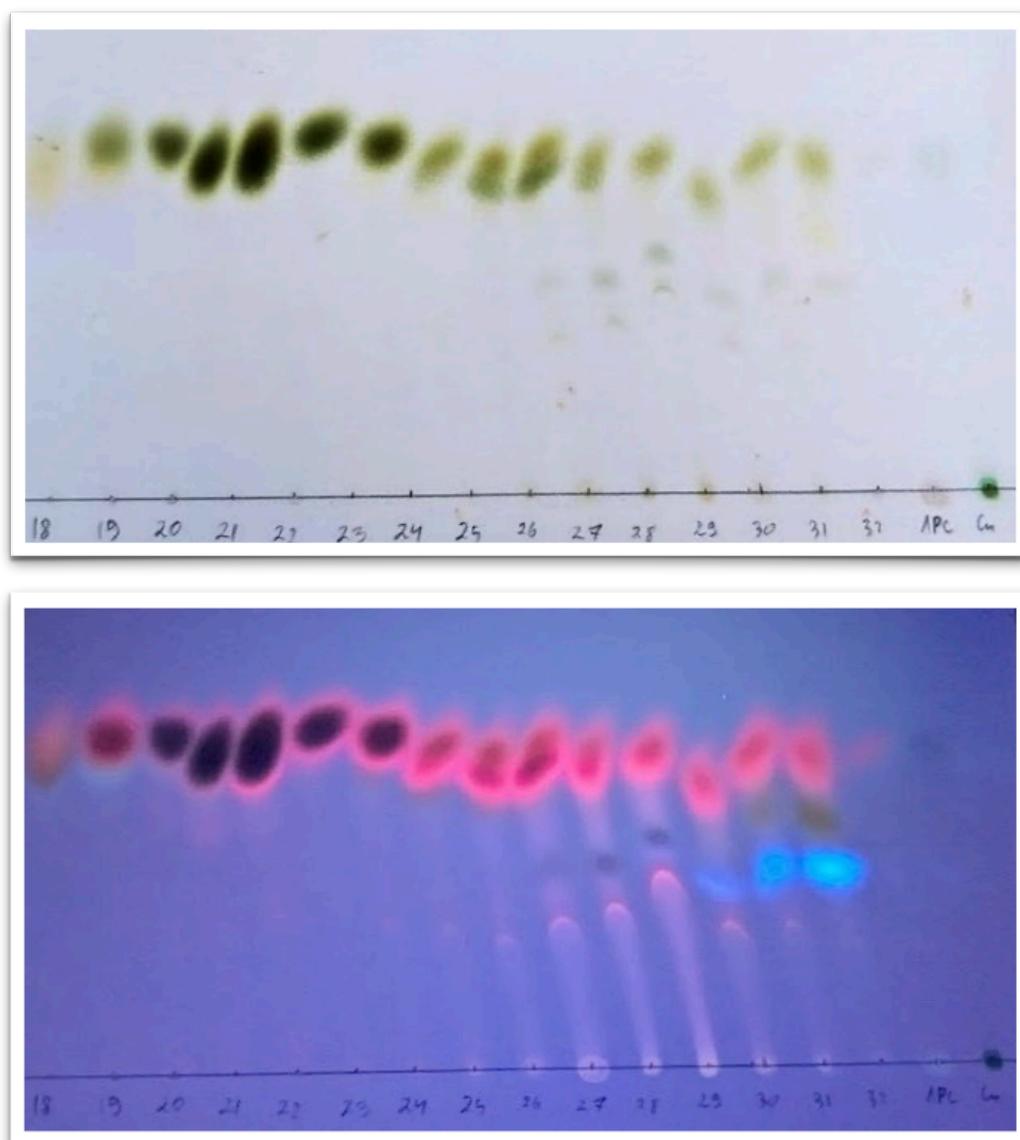


Рисунок 11 – ТСХ хроматограммы фракций из этанольного извлечения крапивы (система хлороформ – этанол 18:1 (об./об.)) (слева направо: просмотр при видимой свете, при облучении лампой с длиной волны 366 нм)

При препаративном разделении коммерческого экстракта крапивы (хлорофилл) комплекс хлорофилла а был выделен из фракций, полученных при элюировании гексаново-хлороформными смесями в соотношении 60/40 (об./об.) (Рис. 12). В заводском экстракте крапивы максимумы поглощения находились при 408-412 нм и 645-649 нм, что соответствует литературным данным по медному комплексу феофитина а (Рис. 13).

Кроме этого, во фракциях, элюируемых смесями гексана и хлороформа, начиная с 80/20, был выделен краситель, идентифицированный на основании спектральных данных, качественных реакций как зеленый прочный FCF (синонимы: Зелёный стойкий FCF, Fast Green FCF, Food Green 3; пищевой краситель, входит в Кодекс Алиментариус под названием E143) (Рис. 14, 15). Так как основная цель работы связана с изучением форм хлорофилла, элюирование этанолом не проводилось, но на хроматограммах исходного экстракта обнаруживалась зона желтого цвета на старте, что, по нашим предположениям, также может являться водорастворимым красителем – тартразином (E102).

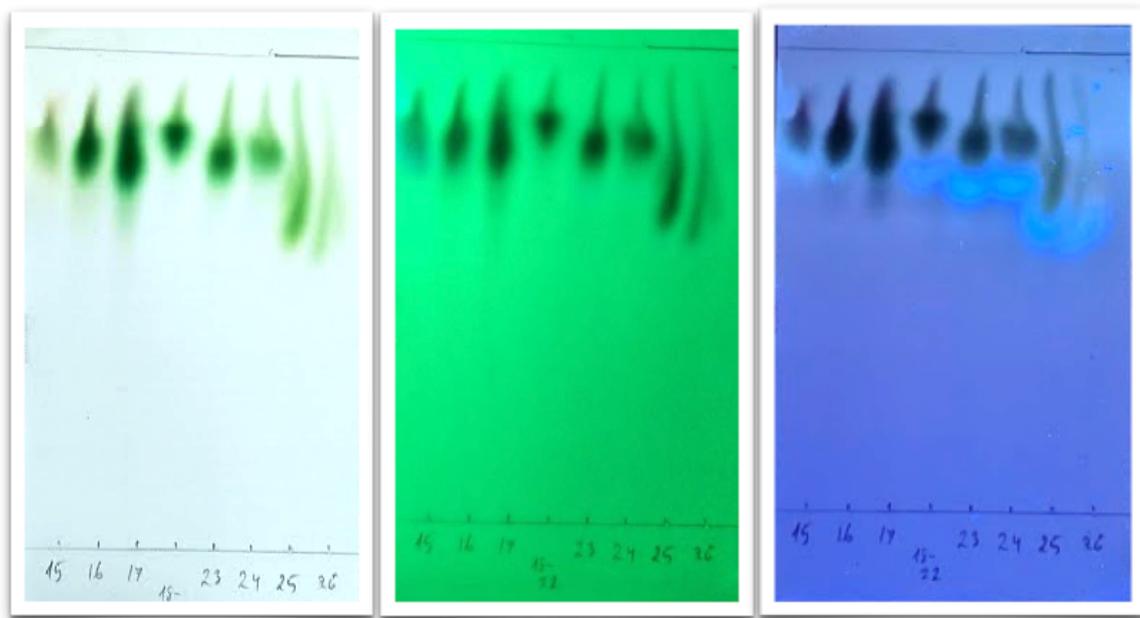


Рисунок 12 – ТСХ хроматограмма фракций из заводского экстракта крапивы (система хлороформ – этанол 18:1 (об./об.)) (слева направо: просмотр при видимой свете, при облучении лампой с длиной волны 366 нм)

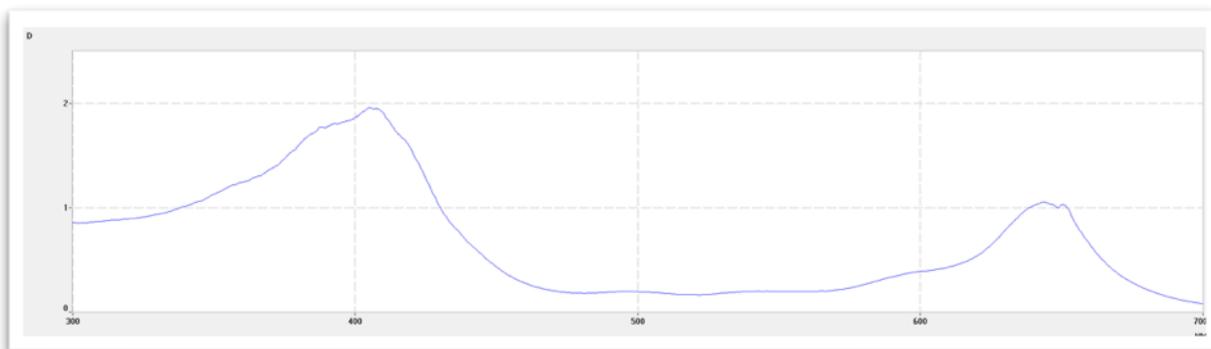


Рисунок 13 – Спектр поглощения в УФ- и видимой области фракций медного комплекса хлорофилла, полученных при делении заводского экстракта

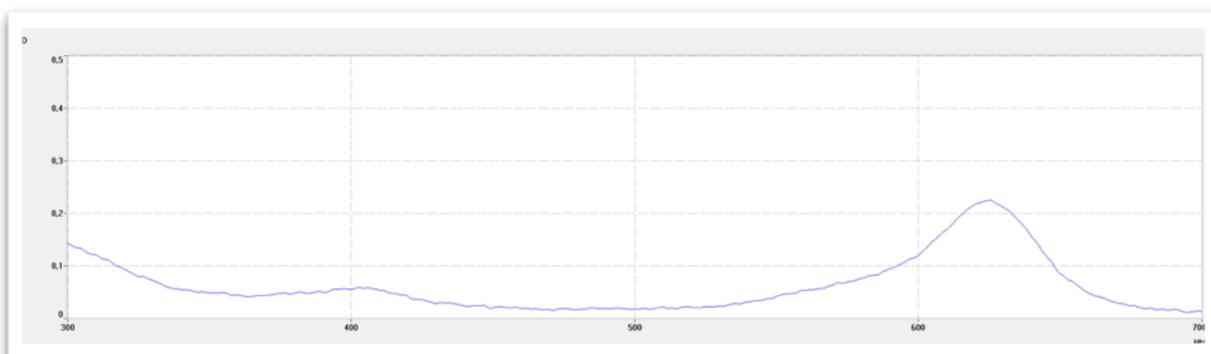


Рисунок 14 – Спектр поглощения в УФ- и видимой области фракций синего красителя, полученных при делении заводского экстракта

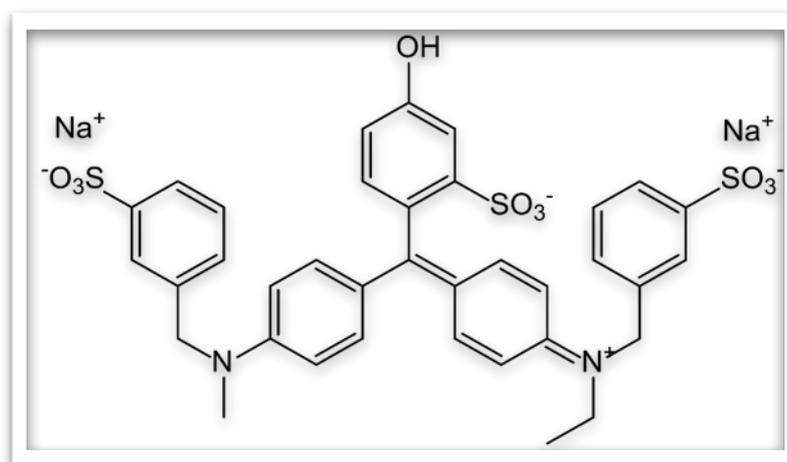


Рисунок 15 – Структурная формула синего прочного FCF

4. Результаты количественного определения

Согласно результатам ВЭЖХ-анализа (Рис. 16-19) содержание хлорофиллов в «Хлорофилле питьевом травяном» составило 0,02% (в пересчете на абсолютно сухую субстанцию – 20%), в заводском экстракте крапивы – 1,0% (в пересчете на абсолютно сухую субстанцию – 1,6%).

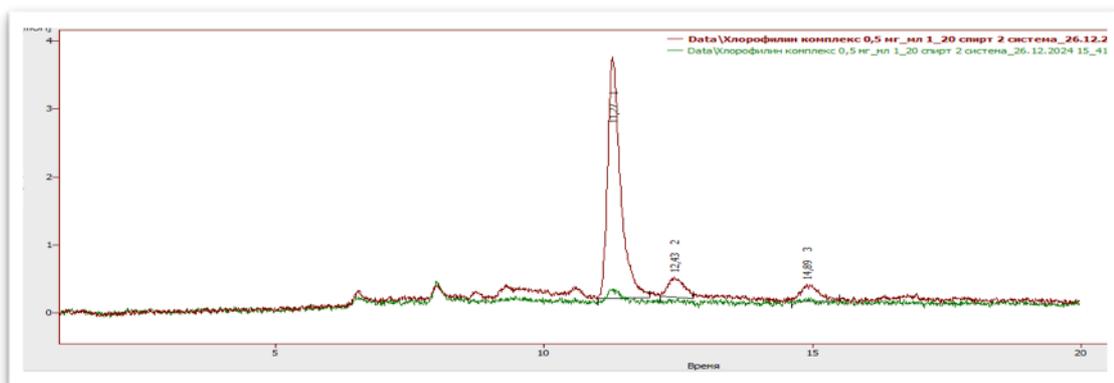


Рисунок 16 – ВЭЖХ хлорофиллина (натриевой соли медного комплекса хлорофилла)

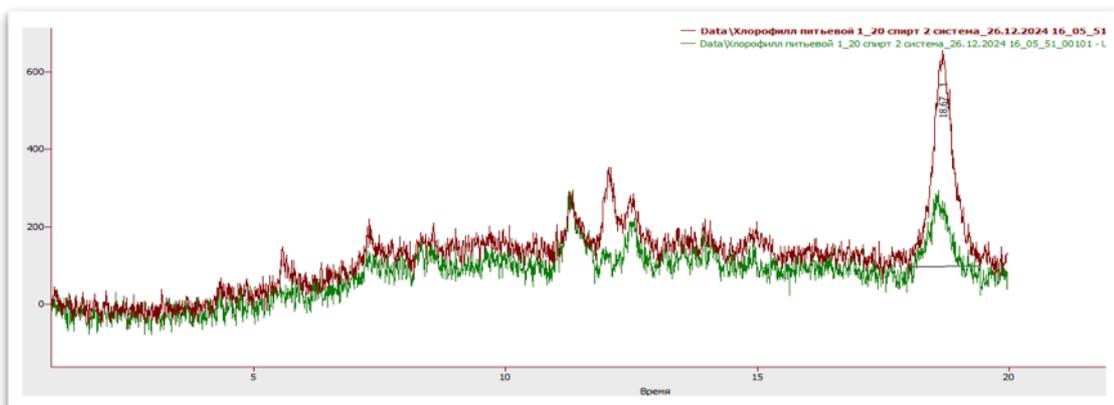


Рисунок 17 – ВЭЖХ образца «Хлорофилл травяной пищевой»

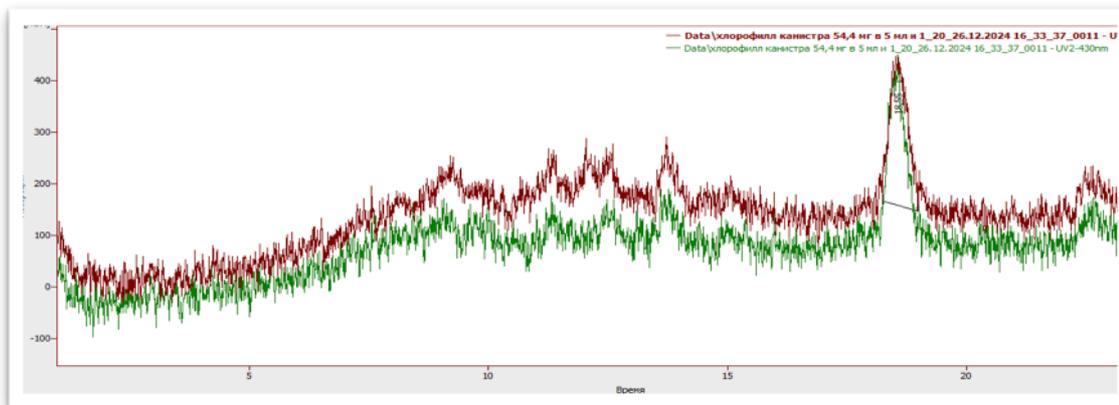


Рисунок 18 – ВЭЖХ заводского экстракта крапивы

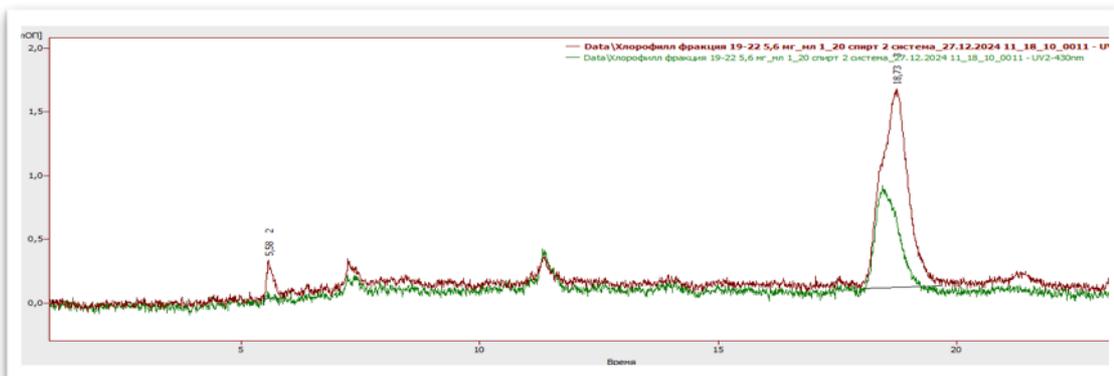


Рисунок 19 – ВЭЖХ фракции, содержащий комплекс хлорофилла из заводского экстракта крапивы

4. ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ

4.1. Оценка общей антиоксидантной активности методом FRAP

Для интерпретации данных по общей АОА важно ввести понятие силы FRAP. Сила FRAP — это число микромолей вещества, которое может восстановить эквивалентное число молей Fe^{III} -TPTZ. Для аскорбиновой кислоты сила FRAP равна удвоенной концентрации аскорбиновой кислоты, так как 1 мкмоль аскорбиновой кислоты восстанавливает 2 мкмоль комплекса. На рис. 20 представлен градуировочный типовой график зависимости разности оптических плотностей в разные временные промежутки от концентрации аскорбиновой кислоты.

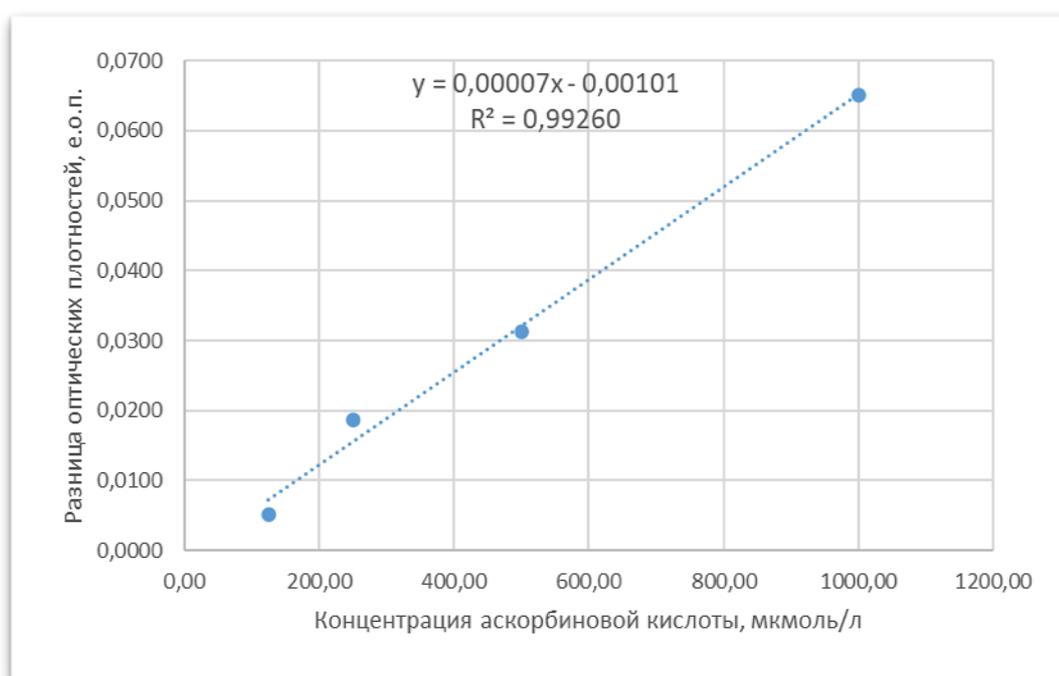


Рисунок 20 – Градуировочный график зависимости разности оптических плотностей раствора через 6 мин по отношению к нулевому раствору от концентрации аскорбиновой кислоты

Исследуемые в условиях эксперимента хлорофиллы, выделенные из заводских экстрактов и настойки крапивы, занимали промежуточное положение по суммарной антиоксидантной активности между аскорбиновой кислотой и синтетическим

антиоксидантном (тролоксом). Практически все исследуемые образцы (с учетом содержания хлорофилла) показали более высокую АОА по отношению к аскорбиновой кислоте (табл. 4).

Низкие значения АОА, полученные для тролокса, могут быть обусловлены медленным протеканием окислительно-восстановительной реакции с Fe(III).

Таблица 4 – Значения антиоксидантной активности для образцов хлорофилла и коммерческих образцов, содержащих хлорофилл.

Образец	Концентрация	АОА, в нормированных значениях по аскорбиновой кислоте (СО)
Хлорофилл а (ЛРС)	1,04 мг/мл	2,2 (0,3)
Медный комплекс хлорофилла а (заводской экстракт)	1,00 мг/мл	1,1 (0,3)
Натриевая соль медного комплекса хлорофилла (Alfa Chemical)	0,25 мг/мл	6,1 (1,2)
Заводской экстракт крапивы	2,0 мг/мл	в пересчете на сухой остаток – 0,59 (0,09) в пересчете на содержание хлорофилла – 3,7 (0,5) Сумма антиоксидантов (ммоль-экв/г субстанции) - 0,28 (0,05)
«Хлорофилл питьевой»	100 мкл	в пересчете на сухой остаток – 15,3 (2,3) в пересчете на содержание хлорофилла – 19,2 (2,5) Сумма антиоксидантов (ммоль-экв/г субстанции) - 7,8 (1,1)
Тролокс	0,25 мг/мл	0,26 (0,05)

4.2. Оценка антирадикальной антиоксидантной активности методом DPPH

Результаты оценки антирадикальной активности представлены в Таблице 5.

Как видно из представленных данных исследуемые образцы практически не обладают антирадикальной активностью в условиях эксперимента. Значения, полученные для аскорбиновой кислоты и тролокса согласуются с литературными данными [37].

Таблица 5 – Значения антиоксидантной активности для образцов хлорофилла и коммерческих образцов, содержащих хлорофилл.

Образец	Концентрация IC50, г/кг DPPH	Диапазон времени наступления равновесного состояния, мин	T_{EC50} (мин)
Медный комплекс хлорофилла а (заводской экстракт)	5 601 (258)	10-35	27 (4,3)
Натриевая соль медного комплекса хлорофилла (Alfa Chemical)	3 043 (157)	5-12	8,0 (3,5)
Заводской экстракт крапивы	21 374 (515)* 344,7 (84)**	8-32	25 (3,9)
Хлорофилл питьевой	13 123 (910)* 2 583 (101)**	6-30	23 (3,4)
Тролокс	80 (2,0)	5-18	9,2 (1,6)
Аскорбиновая кислота	120 (4,0)	Менее 30 сек	Менее 30 сек

Примечание: * в пересчете на сухой остаток. ** В пересчете на содержание хлорофилла.

4.3. Оценка способности ингибировать перекисное окисление липидов

Результаты оценки способности ингибировать перекисное окисление липидов (определяемой как разность значений оптической плотности до и после добавления антиоксиданта) представлены в Таблице 6. В отношении ПОЛ исследуемые продукты

также уступали тролоксу и аскорбиновой кислоте, за исключением хлорофиллина, который показал статистически незначимые отличия от аскорбиновой кислоты.

Таблица 6 – Значения антиоксидантной активности для образцов хлорофилла и коммерческих образцов, содержащих хлорофилл

Образец	Концентрация	АОА, Δ е.о.п./г субстанции (СО)
Медный комплекс хлорофилла а (заводской экстракт)	4,81 мг/мл	1,71 (0,23)
Натриевая соль медного комплекса хлорофилла (Alfa Chemical)	0,632 мг/мл	3,04 (0,75)
Заводской экстракт крапивы	4,332 мг/мл	0,47 (0,06)* 1,69 (0,22)**
Хлорофилл питьевой*	100 мкл	0,97 (0,19)* 4,86 (0,54)**
Тролокс	0,112 мг/мл	9,51 (0,87)
Аскорбиновая кислота	0,144 мг/мл	3,76 (0,46)

Примечание: * в пересчете на сухой остаток. ** В пересчете на содержание хлорофилла.

4.4. Электрохимическое определение антиоксидантной активности

Расчет антиоксидантной активности на единицу массы пробы проводили по формуле:

$$AOA = \frac{E_x - E_{хол}}{m}, \text{ где:}$$

$E_{хол}$ – потенциал максимума анодного тока холостой пробы, мВ;

E_x - потенциал максимума анодного тока пробы, мВ;

m – масса пробы, взятой на анализ, г.

Расчет коэффициента относительной антиоксидантной активности проводили по формуле:

$$K = \frac{AOA_x}{AOA_o}, \text{ где:}$$

АОА₀ – антиоксидантная активность стандартного образца (кислоты аскорбиновой);

АОА_x – антиоксидантная активность пробы.

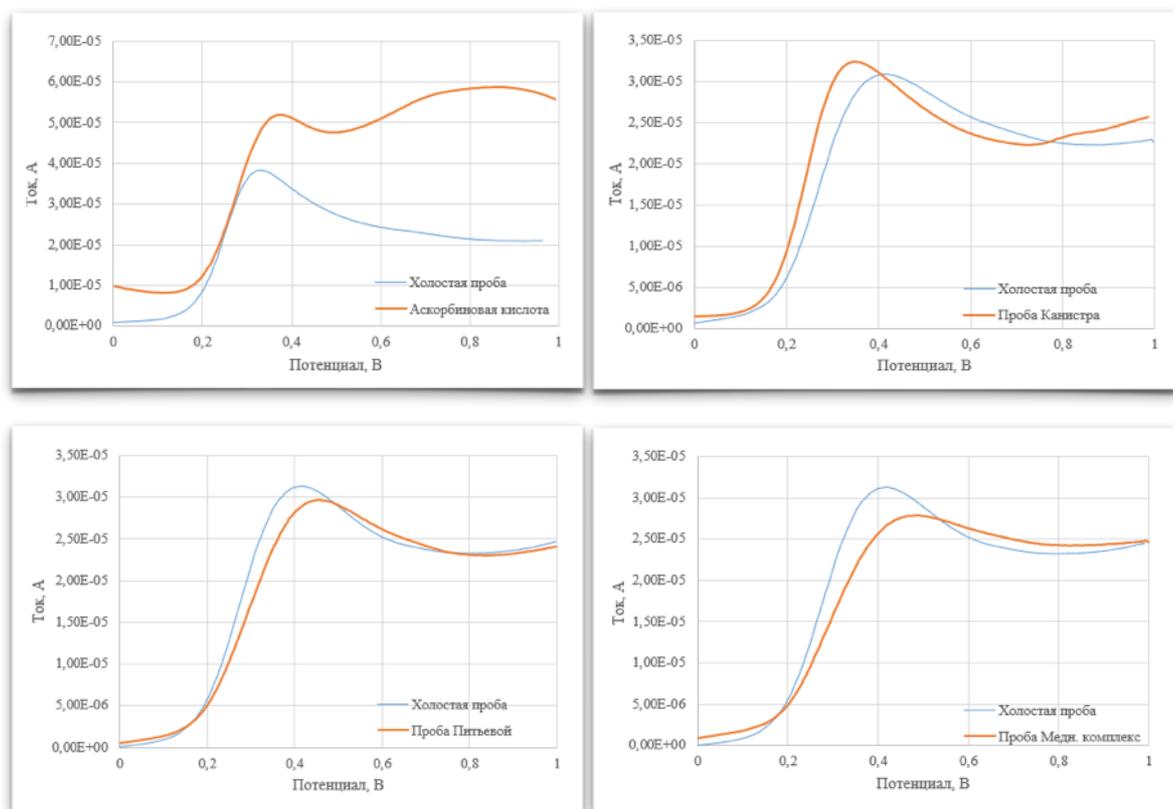


Рисунок 21 – Вольтамперограммы кислоты аскорбиновой, проб заводского экстракта крапивы, «Хлорофилла питьевого» и натриевой соли медного комплекса хлорофилла

Зарегистрированные вольтамперограммы представлены на рисунке 21. Отмечено изменение максимума анодного тока пробы «Канистра» с 425 до 345 мВ, что говорит о возможной индукции окислительного процесса биологически активных соединений пробы с комплексами Fe(III). В остальных случаях наблюдается смещение потенциала максимума анодного тока в область более высокого потенциала.

Результаты исследования с пересчетом на антиоксидантную активность и коэффициент относительной антиоксидантной активности предоставлены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты исследования относительной антиоксидантной активности образцов методом вольтамперометрии

Наименование пробы	Концентрация аналита, мг/мл	Объем пробы, взятой на анализ, мл	Потенциал максимума анодного тока холостой пробы, мВ	Потенциал максимума анодного тока пробы, мВ	АОА	К
Аскорбиновая кислота	40,30	1	334	376	1042	1,00
Хлорофилл пищевой травяной	10,16		419	453	3366	3,23
Заводской экстракт крапивы	-		425	345	-	-
Натриевая соль медного комплекса хлорофилла (хлорофиллин)	24,38		423	488	2666	2,56

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведены фитохимические исследования субстанций и продуктов, содержащих хлорофилл (листья крапивы, «Хлорофилл травяной питьевой», заводской экстракт крапивы, натриевая соль медного комплекса хлорофилла (краситель E141), фракции, содержащие хлорофилл). В сырье обнаруживались хлорофилл а и хлорофилл b в примерном соотношении 3:1. В коммерческом экстракте крапивы идентифицированы медный комплекс хлорофилла, красители зеленый прочный FCF и, возможно, тартазин.

С использованием хроматографических и спектральных методов анализа выделены фракции, содержащие хлорофилл. С применением метода газовой хроматографии с масс-селективным детектором (ГХ-МС) проведен качественный анализ летучих органических соединений и установлены 49 основных соединений для ароматизатора пищевого натурального типа УКРОП 541.

В анализе антиоксидантной активности исследуемых образцов методом FRAP (общая активность) продемонстрировано, что все исследуемые образцы (с учетом содержания хлорофиллов) превосходят вещества сравнения (аскорбиновую кислоту и тролокс). Согласно результатам вольтамперометрического определения «Хлорофилл травяной питьевой» превосходил аскорбиновую кислоту. По антирадикальной активности и способности ингибировать перекисное окисление липидов исследуемые субстанции уступали веществам-стандартам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белых Д.В., Зайнуллина Е.Н., Старцева О.М. Количественное определение хлорофилла а в биомассе спирулины с помощью ЯМР ¹H. Макрогетероциклы, 2020. Т. 13, № 3. С. 260-268. DOI: 10.6060/mhc200607b
2. Борисова А. В., Червоткина Д. Р. Оптимизация условий получения экстракта *Urtica dioica* L. и изучение его антиоксидантных свойств. Химия растительного сырья, 2024. № 1. С. 276-283. URL: <http://journal.asu.ru/cw/article/view/12199>.
3. Вяткин А.В., Пастушкова Е.В., Феофилактова О.В. Обзор методов определения общей антиоксидантной активности. Современная наука и инновации. 2018. № 1(121). С. 58-66.
4. Государственная Фармакопея Российской Федерации. — Пятнадцатое издание. — М.: Министерство здравоохранения РФ, 2024. / URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/>
5. Дейл, З. Жидкостная колоночная хроматография (пер. с англ.) / З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака // Под ред. докт. Хим. Наук, профессора В.Г. Березкина. — М.: Мир. — 1978. — 544 с.
6. Добрынина О. А., Курегян А.Г. Определение содержания хлорофиллов и каротиноидов в листьях крапивы двудомной при совместном присутствии. Современные технологии в мировом научном пространстве : сборник статей Международной научно-практической конференции, Тюмень, 07 апреля 2022 года. Уфа: Общество с ограниченной ответственностью "ОМЕГА САЙНС", 2022. С. 197-202.
7. Зайцев В.Г. Модельные системы перекисного окисления липидов и их применение для оценки антиоксидантного действия лекарственных препаратов.
8. Исайкина Н.В., Коломиец Н.Э., Абрамец Н.Ю., Марьин А.А. Исследование травы крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.), произрастающей в некоторых районах европейской части России и Сибири. Химия растительного сырья, 2022. №3. С. 127-138. DOI: 10.14258/jcpim.20220310873
9. Каримов Д.Р., Макаров В.В., Кручин С.О., Березин Д.Б., Смирнова Н.Л., Березин М.Б., Желтова Е.И., Стрельников А.И., Кустов А.В. Оптимизация условий выделения хлорофиллов из крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) И

- спирулины (*Spirulina platensis*). Химия растительного сырья, 2014. №4. С. 189-196. DOI: 10.14258/jcprtm.201404310
10. Корнопольцева Т.В., Чехирова Г.В., Абидуева Л.Р., Чукаев С.А. Стандартизация сухого экстракта из листьев крапивы двудомной и его эффективность в профилактике гипоксических состояний. Бутлеровские сообщения, 2008. Т.13. №3.
 11. Патент № 2573310 С1 Российская Федерация, МПК С11В 1/10. Способ экстракции растительного сырья, способ получения хлорофиллсодержащего биоактивного продукта, включающий такую экстракцию, и продукт : № 2014123894/13 : заявл. 10.06.2014 : опубл. 20.01.2016 / В. Б. Некрасова, Е. В. Ахтемиров; заявитель ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ФИТОЛОН-НАУКА".
 12. Патент № 2659165 С1 Российская Федерация, МПК А61К 36/185, В01D 11/02, С07С 403/00. Способ разделения каротинов, ксантофилов и хлорофиллов листьев крапивы двудомной : № 2017115145 : заявл. 27.04.2017 : опубл. 28.06.2018 / А. Г. Курегян, С. В. Печинский, Э. Ф. Степанова ; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Волгоградский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.
 13. Патент РФ № 2134584 на изобретение «Способ получения иммуномодулирующего препарата «Настойка эхинацеи пурпурной»» / В.А. Куркин и др. — №. 97111362/14; заявл. 02.07.1997; опубл. 20.08.1999, Бюл. №23. 11 с
 14. Плавинский С.Л., Плавинская С.И. Роль антиоксидантов в лечении и профилактике заболеваний человека. Журнал «Медицина», 2013. № 1. С. 41-54.
 15. Рыбакова Л.П., Алексанян Л.Р., Капустин С.И., Бессмельцев С.С. Окислительно-антиокислительная система организма человека, роль в развитии патологического процесса и его коррекции. (Обзор литературы). Вестник гематологии, 2022
 16. Темираев Р. Б., Пех А.А. Оценка влияния условий произрастания крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.), на содержание биологически активных веществ, в Правобережном районе РСО-Алания. Биоразнообразие, состояние и динамика природных и антропогенных экосистем России : материалы Всероссийской

научно-практической конференции, Комсомольск-на-Амуре, 09 декабря 2021 года. Комсомольск-на-Амуре: Амурский гуманитарно-педагогический государственный университет, 2021. С. 168-172.

17. Тринеева О.В. Методы определения антиоксидантной активности объектов растительного и синтетического происхождения в фармации (обзор). Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017, № 4(21). С. 180-197.
18. Хлорофиллы d и f и их роль в первичных процессах фотосинтеза цианобактерий (обзор) / С. И. Аллахвердиев, В. Д. Креслаеский, С. К. Жармухамедов [и др.] // Биохимия. 2016. Т. 81, № 3. С. 315-328.
19. Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1999). [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 15–27. doi:10.1016/s0076-6879(99)99005-5
20. Charles, D. J., Simon, J. E., & Widrechner, M. P. (1995). Characterization of Essential Oil of Dill (*Anethum graveolens* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 7(1), 11–20. <https://doi.org/10.1080/10412905.1995.9698456>
21. Ebrahimi P, Shokramraji Z, Tavakkoli S, Mihaylova D, Lante A. Chlorophylls as Natural Bioactive Compounds Existing in Food By-Products: A Critical Review. *Plants (Basel)*. 2023 Apr 2;12(7):1533. doi: 10.3390/plants12071533. PMID: 37050159; PMCID: PMC10096697.
22. Ferruzzi, M. G., Bohm, V., Courtney, P. D., & Schwartz, S. J. (2002). Antioxidant and Antimutagenic Activity of Dietary Chlorophyll Derivatives Determined by Radical Scavenging and Bacterial Reverse Mutagenesis Assays. *Journal of Food Science*, 67(7), 2589–2595. doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb08782.x
23. Hayes M, Ferruzzi MG. Update on the bioavailability and chemopreventative mechanisms of dietary chlorophyll derivatives. *Nutr Res*. 2020;81:19-37. doi:10.1016/j.nutres.2020.06.010
24. Jamshidi-Ghaleh, K., Salmani, S., & Majles Ara, M. H. (2007). Nonlinear responses and optical limiting behavior of fast green FCF dye under a low power CW He–Ne laser irradiation. *Optics Communications*, 271(2), 551–554. doi:10.1016/j.optcom.2006.10.037

25. Kaur, N., Chahal, K. K., Kumar, A., Singh, R., & Bhardwaj, U. (2019). Antioxidant activity of *Anethum graveolens* L. essential oil constituents and their chemical analogues. *Journal of Food Biochemistry*, e12782. doi:10.1111/jfbc.12782
26. Kazemi M., Abdossi V. Chemical composition of the essential oils of *Anethum graveolens* L. *Bangladesh J. Bot.* 44(1): 159-161, 2015 (March)
27. Küpper, H., Spiller, M., & Küpper, F. C. (2000). Photometric Method for the Quantification of Chlorophylls and Their Derivatives in Complex Mixtures: Fitting with Gauss-Peak Spectra. *Analytical Biochemistry*, 286(2), 247–256. doi:10.1006/abio.2000.4794
28. Li H., Zhou W., Hu Y., Mo H., Wang J., Hu L. GC-MS analysis of essential oil from *Anethum graveolens* L (dill) seeds extracted by supercritical carbon dioxide/ *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* June 2019; 18 (6): 1291-1296
29. Martins T, Barros AN, Rosa E, Antunes L. Enhancing Health Benefits through Chlorophylls and Chlorophyll-Rich Agro-Food: A Comprehensive Review. *Molecules*. 2023;28(14):5344. Published 2023 Jul 11. doi:10.3390/molecules28145344
30. Mujović M, Šojić B, Peulić T, Kocić-Tanackov S, Ikonić P, Božović D, Teslić N, Županjac M, Novaković S, Jokanović M, et al. Effects of Dill (*Anethum graveolens*) Essential Oil and Lipid Extracts as Novel Antioxidants and Antimicrobial Agents on the Quality of Beef Burger. *Foods*. 2024; 13(6):896. <https://doi.org/10.3390/foods13060896>
31. Parcheta M, Świsłocka R, Orzechowska S, Akimowicz M, Choińska R, Lewandowski W. Recent Developments in Effective Antioxidants: The Structure and Antioxidant Properties. *Materials*. 2021; 14(8):1984. <https://doi.org/10.3390/ma14081984>
32. Paulauskienė A, Tarasevičienė Ž, Laukagalis V. Influence of Harvesting Time on the Chemical Composition of Wild Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *Plants (Basel)*. 2021 Apr 2;10(4):686. doi: 10.3390/plants10040686.
33. Pedersen D.S. Dry column vacuum chromatography. *Synthesis* 2001, No. 16, 2431–2434.
34. Pérez-Gálvez A, Viera I, Roca M. Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(6):505. doi:10.3390/antiox9060505

35. Perez-Galvez A, Viera I, Roca M. Chemistry in the Bioactivity of Chlorophylls: An Overview. *Curr Med Chem*. 2017; 24(40): 4515-4536. doi:10.2174/0929867324666170714102619
36. Repajić M, Cegledi E, Zorić Z, Pedisić S, Elez Garofulić I, Radman S, Palčić I, Dragović-Uzelac V. Bioactive Compounds in Wild Nettle (*Urtica dioica* L.) Leaves and Stalks: Polyphenols and Pigments upon Seasonal and Habitat Variations. *Foods*, 2021. 10(1):190. DOI: 10.3390/foods10010190.
37. Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270–276. doi:10.1002/(sici)1097-0010(199802)76:2<270::aid-jsfa945>3.0.co;2-9
38. Sarkar D, Sharma A, Talukder G. Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotoxic effects. *Mutat Res*. 1994; 318(3): 239-247. doi:10.1016/0165-1110(94)90017-5
39. Solymosi K, Mysliwa-Kurdziel B. Chlorophylls and their Derivatives Used in Food Industry and Medicine. *Mini Rev Med Chem*, 2017. 17(13):1194-1222. DOI: 10.2174/1389557516666161004161411.
40. Sun, L. (2004). Spectral and nonlinear optical properties of chlorophyll b depends on distortion of two-dimensional electron configuration along one axis. *Dyes and Pigments*, 61(3), 273–278. doi:10.1016/j.dyepig.2003.10.017
41. Taniguchi, M., & Lindsey, J. S. (2020). Absorption and Fluorescence Spectral Database of Chlorophylls and Analogues. *Photochemistry and Photobiology*. doi:10.1111/php.13319.
42. Tappel, A. L., Tappel, A. A., & Fraga, C. G. (1989). Application of stimulation modeling to lipid peroxidation processes. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(4), 361–368. doi:10.1016/0891-5849(89)90122-6
43. Wang YT, Yang CH, Huang KS, Shaw JF. Chlorophyllides: Preparation, Purification, and Application. *Biomolecules*. 2021 Jul 28;11(8):1115. doi: 10.3390/biom11081115.