

УДК 615.451.322:582.734]:547.466]07

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЖОМЕ ПЛОДОВ ГРАНАТА

О.В. Нестерова, В.Н. Матвеев, Р.А. Погосян, В.Ю. Ермакова,
Д.А. Доброхотов, А.М. Савватеев

(¹ ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России; ² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет; e-mail: olganesterova9297@mail.ru)

Оптимизированы условия пробоподготовки сырья (жом плодов граната) для анализа разделения полифенольных веществ методом ВЭЖХ. Проведено количественное определение галловой кислоты и суммарного содержания полифенольных веществ. Антирадикальную активность оценивали в DPPH-тесте (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) *in vitro* и выражали в миллиграммах тролоксового эквивалента (ТЭ) на 100 г плодов. Проведено определение значения антирадикальной активности жомов плодов, составившее от 677,8 до 986,5 мг ТЭ/100 г. Выявлено наличие корреляции между выходом полифенольных веществ из исследуемых образцов и выраженностью их антирадикальных свойств.

Ключевые слова: жом плодов граната, полифенольные вещества, галловая кислота, высокоэффективная жидкостная хроматография, антирадикальная активность.

Гранат обыкновенный (*Punica granatum L.*) – невысокое вечнозеленое дерево или листопадный кустарник. В РФ гранат разводят в Закавказье и Крыму. Плоды, цветки и кора граната издавна применялись в народной медицине в качестве общеукрепляющего и вяжущего средства [1]. Они входят в состав популярных в фитотерапии сборов [2] и описаны во многих исторических медицинских трактатах [3, 4]. Исторический опыт применения плодов граната в медицинской практике подробно рассматривался в наших предыдущих исследованиях [5]. Приведены данные, подтверждающие наличие у плодов граната, относящихся к разным сортам, выраженных антибактериальных свойств в отношении широкого спектра микроорганизмов [6, 7], причем это действие напрямую связано с содержанием полифенолов в сырье [8]. Учитывая данные, характеризующие высокое содержание полифенольного комплекса в жоме плодов граната, остающемся после переработки плодов при получении сока, были предприняты попытки разработать безотходную технологию переработки плодов граната, не нашедшую, к сожалению, промышленного применения [9–11]. Для семян граната был определен жирнокислотный состав и рассчитан выход липидного комплекса [12, 13].

В [14] была проведена оценка различных способов экстракции на выход биологически

активных веществ из кожуры граната, в ходе которой оценивалось содержание общего сахара, пектина, полифенольных веществ и органических кислот. В [15] получены данные по содержанию фенолкарбоновых кислот, флавоноидов и антоцианов в различных частях плодов граната (кожура, мякоть, семена и цельные плоды). В качестве экстрагента авторы использовали метанол и этилацетат. Анализ проводили методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектором. В ходе исследования было установлено, что максимальное число антоциановых соединений накапливается в кожуре граната. Выявлено, что в метанольном экстракте кожуры преобладают хлорогеновая и кумаровая кислоты, а среди флавоноидов – рутин. Сопоставимые данные получены по содержанию и составу антоцианов в плодах и соке граната. [16]. Зависимость содержания полифенольного комплекса в извлечениях, полученных с помощью этилового спирта из измельченной кожуры граната, от условий хранения установлена в [17]. Наблюдалось снижение суммарного содержания полифенолов на 13,2% по окончании срока хранения (две недели) при комнатной температуре.

Интерес вызывают противоопухолевые свойства граната в отношении рака разных локаций, наиболее проявляемые при раке предстательной железы [18]. В ходе клинико-лабораторной оценки эффективности гранатового масла в ком-

плексной терапии заболеваний пародонта было доказано наличие выраженного противовоспалительного действия [19].

Несмотря на многочисленные научные данные, характеризующие спектр фармакологического действия (плодов, сока и жом плодов граната), обусловленного содержанием ценных биологически активных веществ [20], до сих пор плоды граната и жом плодов не являются официальным лекарственным растительным сырьем. Анализ научной литературы, показывающий первоочередную роль полифенольных веществ в обеспечении фармакологического действия экстрактов из плодов и кожуры граната, подтвердил необходимость исследований качественного состава и количественного содержания веществ полифенольной природы для последующей разработки нормативов их содержания и дальнейшей стандартизации сырья.

Цель нашего исследования – изучение фенольных соединений в извлечениях из жома плодов, а также разработка методики их количественного определения.

Объекты и методы исследования

Для идентификации и количественного определения фенолкарбоновых кислот использовали свежие плоды граната сортов, наиболее широко представленных на рынке РФ, и сортовую смесь. Сырье соответствующее показателям качества, регламентируемым ГОСТ 27573-87 «Плоды граната свежие», подвергали измельчению и механическому выжиму сока, после чего сушили в изотермическом режиме при 100 °С и измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм.

В целях выбора условий хроматографического анализа использовали извлечение из жома плодов граната, полученное методом настаивания в течение 1 ч на водяной бане с 70%-м этиловым спиртом ($T = 40$ °С) при соотношении сырья и экстрагента, равном 1:10.

Анализ литературных данных показывает целесообразность использования в качестве обращенной фазы сорбента С18, а в качестве подвижной фазы смеси ацетонитрила, воды и кислоты фосфорной концентрированной в соотношении 20:80:0,05. Детектирование осуществляют при 280 нм. Такой элюент был выбран в целях подавления ионизации карбоксильной и фенольной групп, содержащихся в галловой кислоте, для оптимальной эффективности разделения при использовании обращенных фаз для

исследуемых веществ в молекулярной форме [21]. При подкислении происходит возрастание удерживаемых объемов соединений кислотной природы и снижение объемов соединений основного характера. При этом следует помнить, что использование элюентов, имеющих значение $pH < 2$, крайне нежелательно для сохранения стабильности неподвижной фазы, поскольку в этом случае возможен гидролиз силанольных групп сорбента. Для создания значения pH системы в кислой области нами была выбрана кислота фосфорная концентрированная [22].

В работе использовали колонку металлическую Kromasil C18 размером 4,6×250 мм (размер частиц 5 мк), систему ацетонитрил – вода – кислота фосфорная концентрированная в соотношении 400:600:5 в условиях изократического элюирования. Анализ осуществляли при комнатной температуре при скорости подачи элюента 0,5 мл/мин. Продолжительность анализа от 20 до 40 мин. Детектирование проводили с использованием УФ-детектора «GILSTON» UV/VIS МОДЕЛЬ 151 при длине волны 280, 360 и 520 нм.

Суммарное содержание полифенольных соединений в пересчете на кислоту галловую проводили методом Фолина–Чикалтеу [23, 24]. Изучение антирадикальных свойств в DPPH-тесте *in vitro* осуществляли по методике, широко применяемой при изучении пищевых культурных растений [25, 26], а также используемой при анализе антиоксидантной активности гранатового сока, проводимой в сравнении с аналогичными показателями красного вина и зеленого чая [27]. Антирадикальную активность оценивали в DPPH-тесте (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) *in vitro* и выражали в миллиграммах тролоксового эквивалента (ТЭ) на 100 г плодов.

Аналитическую пробу жома измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. Свежее сырье измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 7 мм.

Навеску 10 г измельченного сырья жома помещали в колбу объемом 250 мл, добавляли 70 мл 70%-го этилового спирта, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане при 40 °С в течение 1 ч. По истечении времени экстракции смесь фильтровали через мембранный фильтр (диаметр пор 0,25–0,45 мкм) в колбу мерную объемом 100 мл (первые 7 мл фильтрата отбрасывали), затем доводили объем 70%-м этиловым спиртом до

Т а б л и ц а 1

Метрологические характеристики методики количественного определения галловой кислоты в спиртовых извлечениях из жом плодов граната

n	f	$\Delta X_{\text{ср.}}$	S^2	S_x	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta X_{\text{ср.}}$	ε
свежее сырье – жом плодов граната								
5	4	1,107	0,0017	0,0412	95	2,78	0,0512	4,6
высушенное сырье – жом плодов граната								
5	4	0,964	0,0011	0,0332	95	2,78	0,0413	4,3

Т а б л и ц а 2

Суммарное содержание полифенольных соединений и оценка антирадикальной активности жома плодов граната различных сортов

Исследуемый образец	Суммарное содержание полифенольных соединений, %	Антирадикальная активность, мг ТЭ/100 г
Гюлейша розовая	12,65	924,2
Кизил-анор	8,53	786,9
Шах нар	7,34	677,8
Весна	13,26	986,5
Республика	8,76	813,7
Казаке	7,56	688,3
Сортовая смесь	8,96	794,1

метки. Параллельно осуществляли приготовление 0,05%-х растворов рабочих стандартных образцов фенольных соединений в 70%-м этиловом спирте по известной методике. По 20 мкл исследуемых растворов и раствора сравнения вводили в хроматограф с помощью микрошприца Hamilton емкостью 25 мкл, затем осуществляли хроматографирование. В спиртовых извлечениях жома с использованием метода внутренней нормализации были определены галловая кислота, катехин, эллаговая кислота, галлат эпигаллокатехина. Наиболее информативным оказался хроматографический профиль при длине волны 280 нм, на котором удалось идентифицировать галловую кислоту и катехин. Следует отметить, что хроматограммы спиртовых извлечений из сухих и свежих жомов идентичны. Расчет количественного содержания галловой кислоты осуществляли методом абсолютной калибровки при

280 нм с использованием компьютерной программы МультиХром Windows (версия 3.4.).

Метрологические характеристики методики количественного определения галловой кислоты в спиртовых извлечениях из жома в пяти независимых экспериментах представлены в табл. 1.

Относительная ошибка методики определения содержания галловой кислоты с 95%-й вероятностью составляет $\pm 4,6\%$ для свежего сырья и $\pm 4,3\%$ для высушенного сырья.

Обсуждение результатов

Изучен качественный состав полифенольных веществ, извлекаемых из жома плодов граната различных сортов и разработана методика количественного определения галловой кислоты с использованием метода ВЭЖХ, которая в перспективе может применяться при стандартизации нового растительного сырья – жом плодов

граната, а также экстракционных препаратов на его основе. Общее содержание полифенольного комплекса, а также результаты исследования жомов плодов граната на наличие антирадикальных свойств в DPPH-тесте *in vitro* представлены в табл. 2.

Заключение

Впервые проведено исследование состава веществ полифенольной природы, содержащихся в спиртовых извлечениях из жомов плодов граната различных сортов, представленных на рынке РФ и используемых при производстве соков. Для жомов плодов граната сортовой смеси предложена методика количественного определения галловой кислоты методом ВЭЖХ. Проведено определение суммарного содержания полифенольных веществ в жомовых плодах, полученных после отжатия сока из сортовых образцов по

методу Фолина–Чикалтеу, составившее от 7,34 до 13,26% в пересчете на сухое сырье. Значения антирадикальной активности жомов плодов составляло от 677,8 до 986,5 мг ТЭ/100 г. Установлено наличие четкой корреляции между выходом полифенольных веществ из исследуемых образцов и выраженностью их антирадикальных свойств, определенных в DPPH-тесте *in vitro*.

Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России и МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет. Supported by the “Russian Academic Excellence Project 5-100”. Поддерживается «Проектом повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров».

Конфликта интересов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Груздев В.Ф. Русские рукописные лечебники. Л., 1964.
2. Торэн М.Д. Использование лекарственных растений в русской народной медицине. // 7-й Международный конгресс антропологов и этнографических наук. М., 1964. С. 56.
3. Цельс Авл Корнелий. О медицине. Соч. 25–30 гг. н. э. М., 1959.
4. Атлас тибетской медицины // пер. Т.А. Асеевой, Н.Д. Болхосоевой, Т.Г. Бухашеевой, Д.Б. Дашиева М., 1994. С. 485.
5. Погосян Р.А., Нестерова О.В., Доброхотов Д.А. // Здоровье и образование в XXI веке. 2016. № 5. Т. 18. С. 131.
6. Кириленко О.А. и др. Антибактериальные свойства сока из гранатов различных сортов. М., 1978. 12. С. 12.
7. Machado T.B, Leal C.R, Amaral A.C, Santos K.R, Silva M.G, Kuster R.M. // J. Braz. Chem. Soc. 2002. Vol. 13. P. 606.
8. Зыкина Т.Ф., Костинская Л.И. // Изв. вузов. Пищевая технология. Краснодар, 1984. № 3. С. 117.
9. Карашарлы А.С. Переработка граната без отходов. Садоводство. М., 1981. № 1. С. 153.
10. Gafizov G.K. // Proceedings of the International Scientific and Practical Conference “Methodology of modern research, Vol. 1(March 21–22, 2015, Dubai, UAE)”. Dubai., 2015. P. 15.
11. Гафизов С.Г., Гафизов Г.К. // Пат. РФ 2 712 602 С. 1. 2020.
12. Горянков С.В., Хомик А.С., Калабин Г.А, Вандышев В.В., Абрамович Р.А. // Вестн. РУДН. Сер. экология и безопасность жизнедеятельности. № . М., 2012. С. 11.
13. Курбанов Н.Г., Гадимова Н.С., Ахундова Н.А. // Пищевая промышленность. Перспективы развития масложирового комплекса России. 2017. № 5. С. 28.
14. Гафизов Г.К. // Universum: Технические науки : электрон. научн. журн. 2015. № 6 (18).
15. Sami I. Ali, Farouk K. El-Baz, Gehan A.E. El-Emary, Ekhlaque A. Khan, Amal A. Mohamed // International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 2014. 6 (4). С. 348.
16. Pala G. // J. of Food Composition and Analysis. 2011. P. 1–6 [Электронный ресурс].
17. Venkataramanamma D., Aruna P., Singh R.P. // J Food Sci Technol (May 2016) 53 (5). P. 2497.
18. Turrini E., Ferruzzi L., Fimognari C. // Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Special Issue. Vol. 2015. Article ID 938475. 19 pages (<http://dx.doi.org/10.1155/2015/938475>).
19. Гараев З.И., Алиев А.А. // Медицинские новости. 2014. № 8. С. 76.
20. Погосян Р.А., Нестерова О.В., Доброхотов Д.А. // Здоровье и образование в XXI веке. 2017. № 4. Т. 19. С. 136.
21. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография: Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии. Рига, 1988. С. 380.
22. Wagner, et al. // Deutsche Apotheker Zeitung. 1985. N 30. P. 1515.
23. Нестерова Н.В., Самылина И.А. // Здоровье и образование в XXI веке. 2016. № 5. Т. 18. С. 251.
24. Рогачкова Е.И., Нестерова Н.Н., Бирюкова Н.В. // Медицинское образование и вузовская наука. 2018. № 3 (13). С. 112.
25. Bondet V. Brand-Williams A., Berset C. // Leb-tnsm WISS Technol. 1997. Vol. 30. P. 609.
26. Kanti Bhooshan Pandey, Syed Ibrahim Rizvi // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2009. Vol. 2. P. 270.
27. María I. Gil Francisco A. Tomás-Barberán Betty Hess-M. Holcroft Adel A. Kader // J. Agric. Food Chem. 2000. Vol. 48. N 10. P. 4581.

Поступила в редакцию 11.01.2021
Получена после доработки 14.01.2021
Принята к публикации 20.01.2021

STUDY OF THE COMPOSITION AND QUANTITATIVE CONTENT OF POLYPHENOLIC SUBSTANCES IN POMEGRANATE FRUIT PULP

O.V. Nesterova*, V.N. Matveenko, R.A. Poghosyan, V.Y. Ermakova,
D.A. Dobrokhotoy, A.M. Savvateev

¹ ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, ² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; *e-mail: olganesterova9297@mail.ru

The conditions for sample preparation of raw materials – pomegranate pulp – for analyzing the separation of polyphenolic substances by HPLC were proposed and quantitative determination of gallic acid and the total content of polyphenolic substances in terms of gallic acid was carried out. The value of the antiradical activity of fruit pulp was determined, ranging from 677.8 mg TE / 100 g to 986.5 mg TE / 100 g. A correlation was found between the yield of polyphenolic substances from the samples and the severity of their antiradical properties determined in the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl test in vitro.

Key words: pomegranate fruit pulp, polyphenolic substances, Gallic acid, high-performance liquid chromatography, anti-radical activity.

Сведения об авторах: *Нестерова Ольга Владимировна* – зав. кафедрой химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) профессор, докт. фарм. наук (olganesterova9297@mail.ru); *Матвеевко Владимир Николаевич* – профессор кафедры коллоидной химии МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (13121946VNM@gmail.com); *Погосян Рубен Ашотович* – аспирант кафедры химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) (Ra.poghosyan@inbox.ru); *Ермакова Виктория Юрьевна* – доцент кафедры химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), канд. фарм. наук (ermakova.viktoriya.yurievna@mail.ru); *Доброхотов Денис Анатольевич* – доцент кафедры химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), канд. фарм. наук (dennicas@mail.ru); *Савватеев Алексей Михайлович* – доцент кафедры химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), канд. фарм. наук (savvateev.am@1msmu.ru).