



**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
(ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России)**

УДК 615.3.

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе
и инновациям,
д-р биол. наук, профессор
А.Ю. Жариков

« _____ » _____ 20 ____ г.

**ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ**

Определение антиоксидантной активности *in vitro* и основных биологически активных веществ в напитке сокосодержащем обогащённом «Фитогуру Черника-Черная смородина-Бархатцы»

г. Барнаул, 2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы:

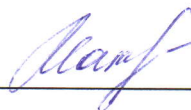
с.н.с. лаборатории биомедицины,
канд. биол. наук



_____ О.Н. Мазко

Исполнители темы:

с.н.с. лаборатории биомедицины,
канд. фармацевт. наук



_____ О.Г. Макарова

УДК 615.3.

Ключевые слова: черника, зрение, функциональное питание.

РЕФЕРАТ

Отчет 12 страниц

Объектом исследования является напиток сокосодержащий обогащённый «Фитогуру Черника-Черная смородина-Бархатцы» (Fitoguru Vision Blueberry - Black currant – Marygold).

Цель исследования – определение антиоксидантной и прооксидантной активностей *in vitro* и основных биологически активных веществ (лютеина, антоцианов, суммы флавоноидов в пересчете на рутин и водорастворимых витаминов) в напитке, сокосодержащем обогащённом «Фитогуру Черника-Черная смородина-Бархатцы» (Fitoguru Vision Blueberry - Black currant – Marygold).

В ходе экспериментов было установлено, что сокосодержащий обогащенный напиток «Фитогуру Черника-Черная смородина-Бархатцы» содержит заявленное количество антоцианов (4,4 мг / 100 см³), лютеина (0,85 мг / 100 см³) и флавоноидов (15,6 мг / 100 см³). Также методом капиллярного электрофореза были обнаружены водорастворимые витамины: пиридоксина гидрохлорид, никотиновая и пантотеновая кислоты в дозе, не превышающей суточную потребность для взрослого человека. Выявлена высокая активность исследуемого напитка в отношении процессов свободно-радикального окисления. Это позволило предположить, что и в условиях организма изучаемый напиток может проявлять значимую антиоксидантную и витаминную активность, способствуя повышению остроты зрения, улучшению цвето- и световосприятия и предотвращению преждевременного разрушения сетчатки глаза.

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение.....	5
2. Основная часть.....	7
3. Заключение.....	11
4. Нормативные ссылки.....	12

ВВЕДЕНИЕ

Зрение - удивительный дар природы. По оценкам специалистов 70-95% информации человек получает через зрительный анализатор. В то же время глаз является самым слабо защищенным органом.

Сетчатка глаза представляет собой «кисель» толщиной 0,3-0,5 мм и свободно прилегает к наружным структурам глаза. Сравнительно слабые механические воздействия могут привести к травме глаза (отслойке сетчатки).

Центральная область сетчатки не имеет кровеносных сосудов и капилляров, которые заканчиваются в 1 градусе от центра. Это означает, что самые незначительные сосудистые (склеротические) изменения в организме могут привести к значительному снижению зрения. Воспалительные процессы сосудистой и сетчатой оболочек (хороидиты и хореоритиниты), а также атрофия зрительного нерва связаны с инфекционными (частые ангины, тонзиллиты, отиты, заболевания зубов, холециститы) и аллергическими заболеваниями. А грозное, практически неподдающееся лечению заболевание - диабетическая ретинопатия, является одним из наиболее тяжелых и распространенных осложнений сахарного диабета.

Однако, несмотря на важную роль в развитии патологии органа зрения сопутствующих общим заболеваниям организма, самые распространенные болезни глаза (катаракта, глаукома, возрастная макулодистрофия) связаны с возрастными дегенеративными процессами, развивающимися в различных частях глаза.

Существенное ускорение таких процессов в настоящее время, связывают, в частности, с повышением уровня интенсивности зрительного труда. Активное внедрение в жизнь компьютеров привело к формированию нового вида патологии – «компьютерному зрительному синдрому». он сопровождается не только субъективными жалобами, но и усилением процессов расходования питательных веществ в клетках глаза,

сопровождающихся истощением тканей и развитием дистрофических процессов в различных структурах органа зрения.

Все это ведет к «старению» глаза и развитию глазных патологий в более молодом возрасте. По официальным данным МЗ РФ, у детей болезни глаза и его придатков, являются главной причиной инвалидности!

Но в любом случае, исследования свидетельствуют, что эффективность лечебно-профилактических мероприятий в офтальмологии существенно повышается при оптимизации рациона функционального питания, содержащего нутриенты и парафармацевтики, тропные к органам зрения.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводились на базе лаборатории биомедицины Центра медико-биологических исследований ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Используемое оборудование:

№ п/п	Наименование оборудования	№ свидетельства о поверке
1.	Спектрофотометр Cary-50	137051
2.	Система капиллярного электрофореза Капель-105М	205542
3.	Весы лабораторные серии «АВ 210-01С»	141364
4.	Дозатор механический с варьируемым объемом ВЮНТ 100-1000 мкл	85409
5.	Центрифуга-встряхиватель СМ-70Н-07	-
6.	Термостат электрический суховоздушный «ТСО-1/80СПУ»	-

1. Определение содержания суммы антоцианов в напитке «Фитогуру Черника-Черная смородина-Бархатцы»

1,0 см³ напитка помещали в мерную колбу объемом 25 см³, доводят водой очищенной содержащей 1% хлористоводородной кислоты, до метки. В качестве раствора сравнения воду очищенную, содержащую 1% хлористоводородной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 546 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Содержание суммы антоцианов рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot 1},$$

где А – оптическая плотность полученного раствора;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения цианидин-3-О-гликозида при длине волны 546 нм, равный 600;

25 – объем мерной колбы;

1 – объем аликвоты.

$$x = \frac{0,1053 \cdot 25 \cdot 100}{600 \cdot 1} = 0,44\%$$

Таким образом в 100 см³ напитка «Фитогуру Черника-Черная смородина-Бархатцы» содержится 2,5 мг антоцианов, что соответствует заявленному на этикетке содержанию биологически активных веществ.

2. Определение свободных витаминов в напитке «Фитогуру Черника-Черная смородина-Бархатцы» методом капиллярного электрофореза

Метод измерения основан на разделении, идентификации и определении массовых доле свободных форм водорастворимых витаминов в напитке «Фитогуру Черника-Черная смородина-Бархатцы» методом капиллярного электрофореза. Детектирование витаминов проводили по их собственному поглощению при длинах волн 200 и 267 нм, используя программируемое переключение длин волн.

Условия разделения:

- фоновый электролит: боратный, рН=8,9
- капилляр: L_{общ} = 75, ID = 50 мкм;
- температура: +30 С⁰;
- напряжение: +25 кВ;
- давление: в ходе анализа изменяется по заданной программе;
- детектирование в ходе анализа изменяется по заданной программе.

В ходе исследования в напитке «Фитогуру Черника-Черная смородина-Бархатцы» были обнаружены следующие формы водорастворимых витаминов:

Таблица 1 – Массовая концентрация водорастворимых витаминов в в напитке «Фитогуру Черника-Черная смородина-Бархатцы»

№ п/п	Витамин	Массовая концентрация, г/дм ³
1.	Пантотеновая кислота (В ₃)	0,95
2.	Никотиновая кислота (В ₅)	0,62
3.	Пиридоксина гидрохлорид (В ₆)	0,14

3. Определение показателей общей прооксидантной активности (ОПА) и общей антиоксидантной активности (ОАА) in vitro в напитке «Фитогуру Черника-Черная смородина-Бархатцы»

В основе определения показателей ОПА лежит способность препаратов окислять in vitro ТВИН-80. Содержание продуктов окисления ТВИН-80, определяли спектрофотометрически после предварительного добавления щелочного раствора тиобарбитуровой кислоты (ТБК). Методика определения ОАА базируется на способности препаратов подавлять in vitro Fe²⁺/аскорбат-индуцированное окисление ТВИН-80 с последующим спектрофотометрическим определением окрашенных комплексов, образующихся в результате цветной реакции продуктов окисления с ТБК.

Результаты определения прооксидантной и антиоксидантной активности напитка «Фитогуру Черника-Черная смородина-Бархатцы» в эксперименте in vitro представлены в таблице 1.

Таблица 2 – Общая прооксидантная и антиоксидантная активность напитка «Фитогуру Черника-Черная смородина-Бархатцы» в эксперименте *in vitro*

Показатели	Напиток «Фитогуру Черника-Черная смородина-Бархатцы»
ОПА (%)	15,7±3,21
ОАА (%)	80,4±5,63

Учитывая характер процессов свободно-радикального окисления, моделируемых *in vitro*, можно сделать вывод, что напиток «Фитогуру Черника-Черная смородина-Бархатцы» способен подавлять процесс пероксидации посредством прямой нейтрализации свободных радикалов, т.е. выступать в качестве их «ловушек».

Фенольные соединения, содержащиеся в экстрактах растений, используемые при приготовлении напитка «Фитогуру Черника-Черная смородина-Бархатцы» могут легко и обратимо окисляться в семихинон и хинон, отдавая электроны и ядра водорода и выступая тем самым в роли восстановителей, антиоксидантов. Эта реакция в силу особой легкости отдачи электронов может происходить при доступе кислорода и без ферментов, самопроизвольно. Причем продукты обратимого окисления — семихинон и хинон — выступают в роли самоускорителей реакции, автокатализаторов. До стадии хинона процесс обратим. Но если окисление продолжается, оно приводит к соединению отдельных фенольных молекул между собой — к окислительной конденсации с образованием полимерных продуктов. Фенольные соединения (кверцетин, рутин и др.) также обладая, комплексообразующей способностью (с относительной безвредностью и малой токсичностью) ослабляют или выключают каталитическое действие свободных ионов тяжелых металлов.

Таким образом, в опытах *in vitro* была выявлена высокая активность исследуемого напитка в отношении процессов свободно-радикального окисления.

4. Определение содержание лютеина

Определение лютеина проводили согласно Р.4.1.1672-03 Глава 2. п.1.1. Для приготовления градуировочных растворов лютеина 5 мг кристаллического β -каротина количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³, добавляют 1 см³ дихлорметана. Содержимое колбы тщательно перемешивают до полного растворения кристаллов, после чего объем в колбе доводят до метки этанолом и содержимое колбы вновь тщательно перемешивают. После введения в колбу на 100 см³ аликвоты раствора лютеина в этаноле (0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 см³) добавляют растворитель до метки.

Массовую концентрацию лютеина в градуировочных растворах (x , мкг/см³) уточняют спектрофотометрическим методом. Для этого определяют оптическую плотность (A) слоя градуировочного раствора толщиной 1 см по отношению к растворителю при длине волны 447 нм и рассчитывают по формуле:

$$x = \frac{A \cdot 10^4}{A_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot l}, \text{ где}$$

$A_{1\text{ см}}^{1\%}$ - коэффициент светопоглощения (2560);

l - толщина слоя раствора, см;

10^4 - коэффициент пересчета.

$$x = \frac{A \cdot 10^4}{A_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot l} = \frac{21504 \cdot 10^4}{2560 \cdot 1} = 8,5 \text{ мкг/см}^3 = 0,85 \text{ мг/100 см}^3$$

Таким образом в 100 см³ напитка «Фитогурю Черника-Черная смородина-Бархатцы» содержится 0,84 мг лютеина, что соответствует заявленному на этикетке содержанию биологически активных веществ.

5. Определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин

Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин в исследуемом экстракте проводили спектрофотометрическим методом, основанным на реакции окрашивания действующего вещества с раствором алюминия хлорида в уксуснокислой среде.

1 мл раствора помещали в мерную колбу на 25 см³, добавляли 2 см³ 2%-ного раствора хлорида алюминия на 95%-ном этиловом спирте и через 10 мин 1 см³ 3%-ной уксусной кислоты. Объем доводили до метки 95%-ным этанолом (раствор Б) и оставляли на 45 мин. Оптическую плотность раствора Б измеряли при длине волны 405+2 нм на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 1 см³ раствора А и 1 мл 3%-ной уксусной кислоты, доведенный до метки 95%-ным этанолом в мерной колбе вместимостью 25 см³. Приготовление раствора ГСО рутина (ГФ XI): около 0,05 г (точная навеска) рутина, предварительно высушенного при температуре 130-135°C в течение 3 ч, растворяли в 85 см³ 95%-ного этанола в конической колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждали, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводили объем раствора 95 %-ным этанолом до метки и перемешивали.

Содержание суммы флавоноидов в напитке в пересчете на рутин в % (X) вычисляли по формуле:

$$C = \frac{A_{\text{иссл}} \cdot m_0 \cdot 1000 \cdot 10}{A_{\text{ст}} \cdot V_{\text{лик}} \cdot 100} = \frac{1,0724 \cdot 0,05 \cdot 1000 \cdot 10}{0,3435 \cdot 1 \cdot 100} = 15,6 \text{ мг/100см}^3$$

где: $A_{\text{иссл}}$ – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_{\text{ст}}$ – оптическая плотность раствора комплекса ГСО рутин с алюминием хлоридом;

m_0 – навеска ГСО рутина, г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе экспериментов было установлено, что сокосодержащий обогащенный напиток «Фитогурю Черника-Черная смородина-Бархатцы» содержит заявленное количество антоцианов (4,4 мг/100 см³), лютеина (0,85 мг/100см³) и суммы флавоноидов в пересчете на рутин (15,6 мг/100 см³). А также методом капиллярного электрофореза были обнаружены водорастворимые витамины: пиридоксина гидрохлорид, никотиновая и пантотеновая кислоты в дозе, не превышающей суточную потребность для взрослого человека. Кроме этого выявлена высокая активность исследуемого напитка в отношении процессов свободно-радикального окисления. Это позволило предположить, что и в условиях организма изучаемый напиток может проявлять значимую антиоксидантную и витаминную активность, способствуя повышению остроты зрения, улучшению цвето- и световосприятия и предотвращению преждевременного разрушения сетчатки глаза.

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящем отчете НИР использованы ссылки на следующие литературные источники и нормативные документы:

1. Государственная фармакопея XIII издания ФС.2.5.0050.15 «Черники обыкновенной плоды»
2. М 04-72-2011 «Методика измерений содержания свободных форм водорастворимых витаминов в премиксах, витаминных концентратах, смесях и добавках в том числе в жидких, методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель-105/105М»»
3. Арбузова, Я.С. Влияние растений семейства грушанковых на процессы свободнорадикального окисления (экспериментальное исследование): дисс.....канд.биол.наук/ Я.С. Арбузова. – Барнаул, 2006. – 167 с.
4. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок (методы определения флавоноидов и лютеина) Р 4.1.1672-03