

УДК 663.95

## АНАЛИЗ БИОДОСТУПНОСТИ АНТИОКСИДАНТОВ ЧАЙНЫХ СБОРОВ

П.В. Масленников, М.В. Зорин, А.В. Серегина

*Балтийский федеральный университет им. И. Канта, институт живых систем, Калининград, Россия*

**Введение.** В последние десятилетия специалисты в области биологии и медицины все большее внимание уделяют проблеме окислительного (оксидативного) стресса и путям его предупреждения. Доказано, что активные формы кислорода оказывают токсическое действие на организм, повреждая мембранные липиды, белки и ДНК. В организмах животных и растений действуют особые защитные механизмы – антиоксидантные системы, компоненты которых способны связывать образующиеся избыточные радикалы, предупреждая развитие оксидативного стресса [1–3]. Образование активных форм кислорода может происходить как в процессе нормального аэробного метаболизма, так и при действии экзогенных физико-химических факторов, прямо или косвенно, генерирующих активные формы кислорода. Усиливающееся негативное действие окружающей среды на современного человека повышает актуальность разработки новых способов профилактики оксидативного стресса [1–3].

В последние годы большое внимание уделяется изучению антиоксидантной активности ряда продуктов питания, в первую очередь растительного происхождения, обусловленной наличием в них полифенолов, в том числе, флавоноидов и таннинов [4]. Эти соединения обладают способностью к прямому ингибированию свободных радикалов и хелатированию металлов, включая железо, оказывая тем самым выраженный антиоксидантный эффект [5]. Популярным продуктом питания, употребляемым подавляющим большинством населения и богатым растительными антиоксидантами, является чай [6]. В настоящее время потребителям доступны разнообразные сорта чая, а также чайные сборы на основе трав. Хотя целебные свойства чая известны с глубокой древности, исследование биохимических и фармакологических свойств чайных сборов с использованием методических возможностей современной науки имеет большую теоретическую и практическую значимость. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение биодоступности растительных антиоксидантов, содержащихся в чайных сборах. Анализ содержания биологически активных веществ (аскорбиновая кислота, рутин, полифенолы, антоцианы, водорастворимые антиоксиданты) в различных видах чая.

**Материалы и методы.** Определялось содержание биологически активных соединений в образцах семи видов чая: цветочный чай (Суданская роза, Египет), зеленый чай с лимоном (Lemon Gree Tee, Winckler GmbH, Германия), Фиточай «Амарант» (Россия), цейлонский черный байховый чай с пряностями (Greenfield tea Ltd, Англия), зеленый листовый чай «Marco Tea» (Venture Tea Ltd, Sri Lanka), чай черный байховый мелколистный с ароматом бергамота (Ahmad Tea Ltd, Англия), чайный травяной сбор из мяты (Калининградская область, Россия). Содержание антоциановых пигментов определяли в 1 % солянокислом водном экстракте, предварительно гомогенизировав в течение 30–45 минут при 4500 об/мин. Содержание суммы антоцианов рассчитывали по формуле с применением удельного показателя поглощения цианидин – 3,5 – дигликозида в 1 % водном растворе соляной кислоты (453). Поглощение данных пигментов определяли на спектрофотометре UV-3600 (Shimadzu, Japan) при длине волны 510 нм [7, 8]. Количественное определение каротиноидов проводили спектрофотометрическим методом без предварительного разделения в 100 %-ной ацетоновой вытяжке, с последующим расчетом по формуле Хольма. Для расчета концентрации определяли оптическую плотность экстракта при длинах волн 440, 644, 662 нм [8]. Количественное определение аскорбиновой кислоты проводили титрационным методом [5]. Принцип метода количественного определения витамина С основан на его способности восстанавливать 2,6 – дихлорфенолиндофенол, который в щелочной среде имеет синюю окраску, а в восстановленном состоянии – бесцветный. Количественный уровень рутина определяли по методике Кушмановой методом титра [5]. Определение рутина основано на его способности окисляться перманганатом. В качестве индикатора применялся индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом после того, как окислится весь рутин. Суммарное содержание водорастворимых антиоксидантов (ССА или АОА) определяли амперометрическим методом на приборе «Цвет Яуза 01-AAA» по методике Яшина Я.И. [9]. В работе исследовалась биодоступность антиоксидантов трех чайных сборов – зеленого чая с лимоном (Lemon Gree Tee), цейлонского черного байхового чая с пряностями (Greenfield) и фиточая «Амарант». Для определения биологической доступности антиоксидантов у 30 добровольцев производили отбор слюны.

Добровольцы представляли собой однородную группу, в которую входили лица женского пола в возрасте от 18 до 21 года. Отбор слюны производили натощак (через 3–4 часа после еды). Перед отбором проб необходимо было прополоскать рот дистиллированной водой 2–3 раза. Отобранные пробы центрифугировали или вортексировали. Надосадочную жидкость количественно переносили в мерную пробирку и разводили элюентом в соотношении 1:50 (100 мкл пробы слюны до 5 мл элюентом). Далее проводили анализ суммарного содержания водорастворимых антиоксидантов. Для оценки биодоступности антиоксидантов образцов чая отбор слюны проводили перед употреблением чая и после, через 60 минут. Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Statistica ver. 12 (Statsoft Inc., Thulsa, OK, USA). Для выявления статистически достоверных различий между вариантами эксперимента данные обрабатывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). В качестве критерия достоверности различий использовался тест множественных сравнений Тьюки (Tukey's HSD test) при уровне значимости  $p < 0.05$ . Предварительно был проведен тест Шапиро–Уилка для проверки нормальности распределения данных, который не выявил препятствий для применения дисперсионного анализа. Степень взаимосвязи двух переменных оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона ( $r$ -Пирсона). В таблицах приведены статистически обработанные данные в виде средних арифметических значений и их стандартных ошибок.

**Результаты и обсуждение.** В работе представлены результаты сравнительного анализа содержания важнейших биологически активных соединений с антиоксидантной активностью (суммарное содержание водорастворимых антиоксидантов, аскорбиновая кислота, рутин, каротиноиды, антоцианы), а также их биодоступности в чайных смесях, представленных в розничной торговой сети. Следует отметить, что среди выбранных образцов чая присутствовали смеси на основе зеленого чая, на основе черного чая, а также травяные смеси различного состава. Показано, что чайные сборы существенно различались по содержанию биологически активных веществ, что связано с особенностями их состава. Как известно, содержание антиоксидантов в чайном листе определяется целым рядом факторов, в том числе агротехнических и технологических [10]. Максимальное содержание водорастворимых антиоксидантов было выявлено в образцах зеленого чая (табл. 1.), что хорошо согласуется с многочисленными данными о том, что наиболее выраженные антиоксидантные свойства характерны именно для зеленых чаев, которые в процессе обработки не ферментируются [11]. Фенольные соединения представляют самую распространенную группу вторичных метаболитов растений и выполняют широкий спектр физиологических функций, включая активное участие в окислительно – восстановительных реакциях. Важно, что водорастворимые фенольные соединения в значительной степени сохраняются после термической обработки [11], таким образом, чай, содержащий высокие концентрации фенольных соединений, сохраняют свои антиоксидантные свойства в процессе заваривания.

Все исследованные сорта зеленого и черного чая содержали сходное количество рутина – гликозида флавоноида кверцетина, обладающего Р-витаминной активностью, однако травяные сборы существенно различались по этому показателю. Минимальное содержание рутина наблюдалось в фиточае «Амарант» и в цветочном чае «Суданская роза». Чайный травяной сбор из мяты, напротив, характеризовался очень высоким содержанием рутина. Большие различия в содержании рутина в различных травяных сборах, вероятно, связаны с особенностями их состава [12]. В частности, имеются данные о том, что добавки к чайной смеси могут существенно изменить уровень содержания в ней рутина [12]. Так, добавление лимона почти в 2 раза увеличивает содержание витамина Р. Так как мята содержит значительное количество рутина (по некоторым данным, до 13.8 мг %), то не удивительно, что чайный сбор на ее основе лидирует по его содержанию.

Травяные чаи занимают лидирующие позиции по содержанию аскорбиновой кислоты, уровень которой в 2–2,5 раз превышает уровень, характерный для зеленых и черных чаев. Данные об содержании аскорбиновой кислоты, полученные нами для зеленых и черных чаев, соответствуют данным других авторов [13, 14]. Так как усвоение витамина Р и аскорбиновой кислоты лучше происходит в комплексе, следует особо отметить травяной чай на основе мяты, который среди изученных нами образцов содержал максимальное количество как рутина, так и аскорбиновой кислоты. Содержание каротиноидов в исследованных чайных смесях также существенно различалось. Интересно, что нами была обнаружена значительная разница по данному показателю между зелеными чаями. Зеленый чай с лимоном содержал в 3,6 раза меньше каротиноидов, чем зеленый чай «Marco Tea». Возможно, это связано с тем, что каротиноиды, которые представляют собой неустойчивые соединения, легко окисляются атмосферным воздухом, лучше сохраняются в цельнолистных чаях.

Таблица 1. Содержание антиоксидантов в различных чайных и травяных сборах.

Вид чайного сбора	ССА, мг QE г <sup>-1</sup>	Рутин, мг %	АК, мг %	Каротиноиды, мкг г <sup>-1</sup>	Антоцианы, %
Цветочный чай	21,67±1,24	8,12±0,72	42,2±4,2	59,4±5,6	0,45±0,04
Зеленый чай с лимоном	39,01±2,54	23,41±1,92	40,1±3,5	68,41±7,1	0,41±0,04
Фиточай «Амарант»	8,25±0,87	7,16±0,92	20,1±1,8	110,5±10,2	0,23±0,02
Цейлонский черный байховый чай с пряностями	22,69±1,89	23,40±2,14	18,4±1,6	287,4±25,2	0,37±0,03
Зеленый листовый чай «Marco Tea»	36,13±3,12	24,65±2,14	19,7±1,9	246,3±23,1	0,31±0,03
Чай черный байховый мелколистный с ароматом бергамота	30,11±2,58	22,12±2,03	22,4±2,1	275,4±24,5	0,19±0,02
Чайный травяной сбор из мяты	10,67±1,05	40,2±4,12	48,9±4,2	82,7±8,2	0,15±0,01

Уровень содержания антоцианов в исследованных чайных смесях не зависел от типа чая. Максимальное количество антоцианов было обнаружено в чае, содержащем цветки суданской розы (гибискуса), которые содержат высокие количества антоцианов. Обнаруженные значительные различия по содержанию антоцианов между исследованными черными и зелеными чаями, возможно, связаны с особенностями технологической обработки чайного листа, в частности в процессе его высушивания. Имеются данные о том, что содержание антоцианов сильно уменьшается при высушивании образцов. Так, при высушивании ягод черники на воздухе вне прямого доступа

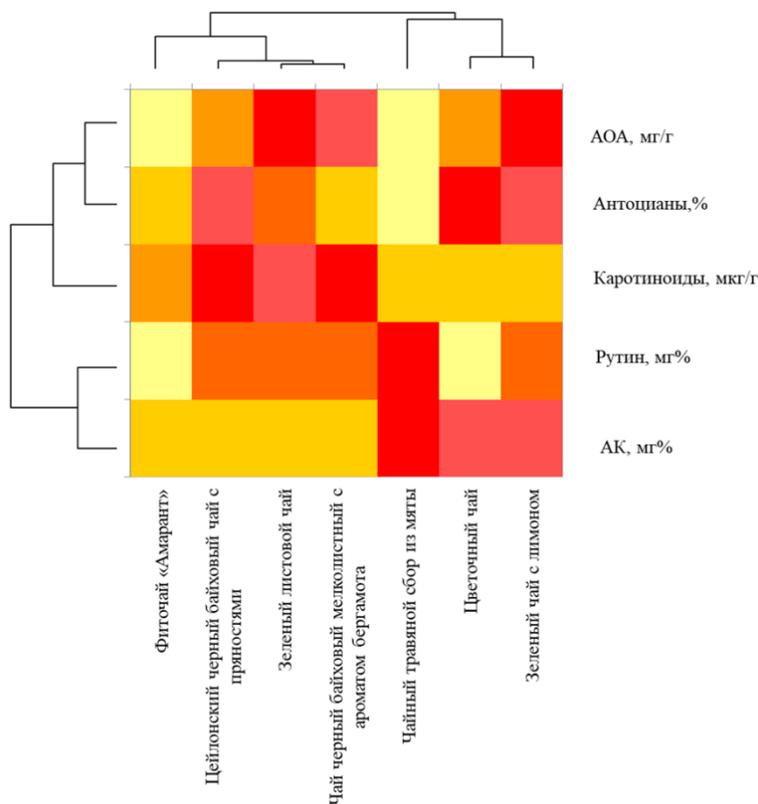


Рис. 1. Heat map (темное – высокое значение, светлое – низкое значение) с кластерами для классификации экстрактов разных видов чайных сборов по содержанию в них различных антиоксидантов

солнечного света, их потери составляют около 40 %, а в некоторых образцах сушеной черники, приобретенных в аптеке, они достигали 60 %. Корреляционной связи между содержанием каротиноидов и антоцианов в исследованных чайных смесях выявлено не было, хотя в литературе имеются данные о положительной корреляционной зависимости средней степени сопряженности между содержанием антоцианов и уровнем каротиноидов в листьях растений прибрежного дюнного комплекса [15]. В связи с этим можно предположить, что уровень корреляции между содержанием антоцианов и каротиноидов может определяться климатическими условиями произрастания растений. Проведен кластерный анализ чайных сборов по содержанию в них отдельных антиоксидантов. Результаты анализа позволили разделить все исследованные образцы чая на две группы в зависимости от их фитохимической ценности (рис. 1.).

Исследование биодоступности было проведено для образцов трех чайных сборов – зеленого чая с лимоном, цейлонского черного байхового чая с пряностями и фиточая «Амарант» (Россия).

В ходе проведения эксперимента испытуемые были условно разделены на две группы: лица с изначально высоким уровнем антиоксидантной активности слюны ( $0,22 \pm 0,02$  мг/мл) и лица с низким уровнем антиоксидантной активности слюны ( $0,035 \pm 0,005$ ). В качестве критерия биодоступности оценивали изменение уровня суммарного содержания антиоксидантов в слюне добровольцев через 60 минут после приема напитка. Было показано, что после употребления зеленого и черного чая уровень антиоксидантов в слюне добровольцев с исходной низкой антиоксидантной активностью достоверно увеличивался (более чем в два раза). После употребления фиточая «Амарант» подобного эффекта не наблюдали. Таким образом, можно сделать вывод о более высокой степени биодоступности антиоксидантов в составе зеленого и черного чая. Интересным является факт снижения уровня суммарного содержания антиоксидантов в слюне после употребления зеленого и черного чая у лиц с исходно высокими показателями антиоксидантной активности. Возможно, данная закономерность связана со сложными механизмами всасывания и усвоения антиоксидантных соединений в организме человека.

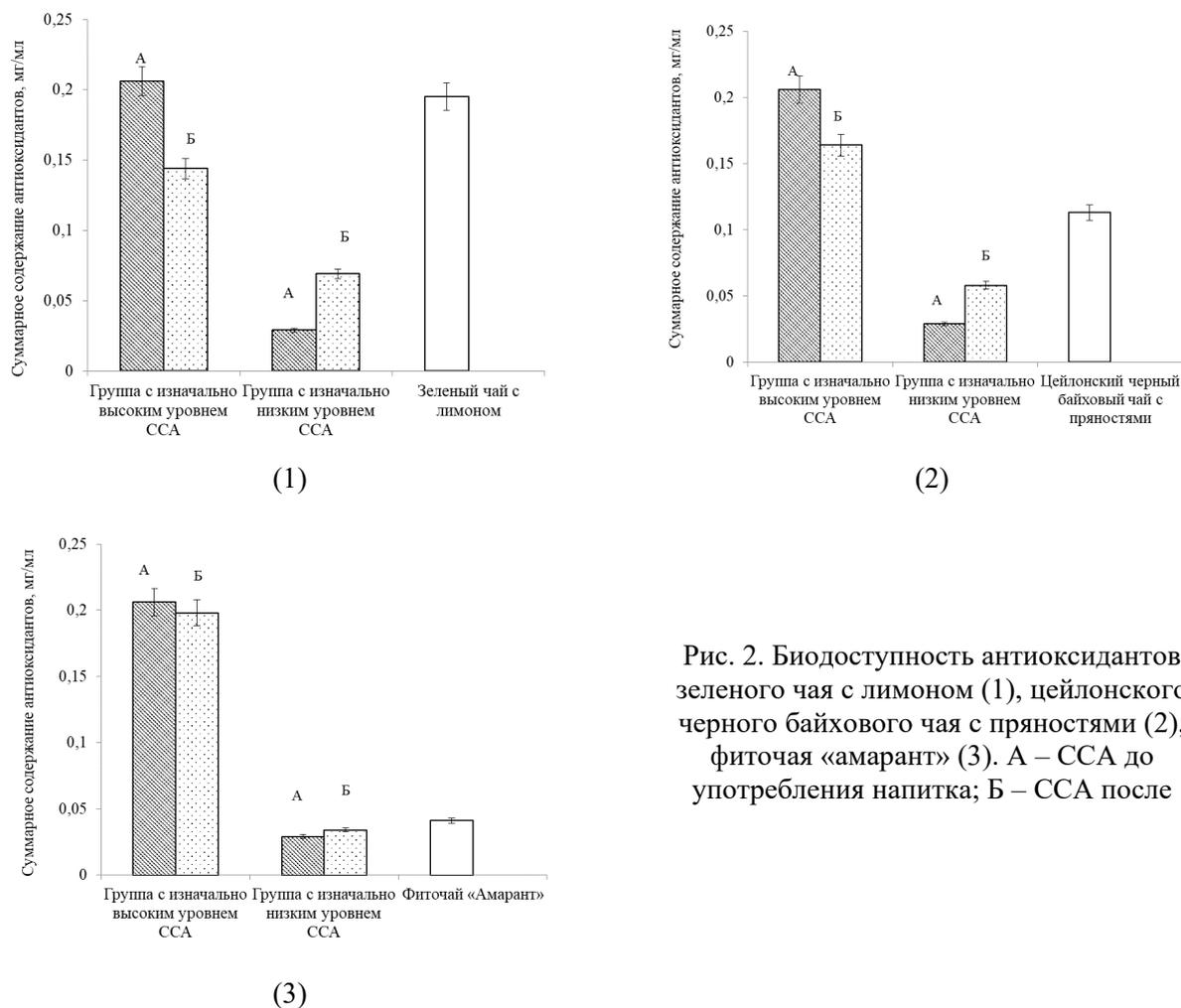


Рис. 2. Биодоступность антиоксидантов зеленого чая с лимоном (1), цейлонского черного байхового чая с пряностями (2), фиточая «амарант» (3). А – ССА до употребления напитка; Б – ССА после

**Заключение.** Исследованные образцы чайных и травяных сборов существенно различаются по содержанию фенольных антиоксидантов. Максимальное количество антиоксидантов характерно для образцов зеленого чая, минимальное – для фиточая «Амарант» и чайного травяного сбора из мяты. Все исследованные сорта зеленого и черного чая содержат сходное количество рутина, тогда как травяные сборы существенно различаются по этому показателю. Минимальное количество рутина характерно для фиточая «Амарант» и цветочного чая «Суданская роза», максимальное – для чайного травяного сбора из мяты. Максимальное количество аскорбиновой кислоты среди исследованных чайных смесей содержится в травяном сборе из мяты.

Максимальное количество каротиноидов содержат чайные смеси на основе черного чая, минимальное количество каротиноидов содержит цветочный чай «Суданская роза». Минимальное содержание антоцианов характерно для чайного травяного сбора из мяты, а максимальное для цветочного чая «Суданская роза». Зеленый чай с лимоном и цейлонский черный байховый чай с пряностями характеризуются сходным уровнем биодоступности антиоксидантов. После употребления обоих напитков у лиц с изначально низким содержанием антиоксидантов в слюне отмечается достоверное увеличение этого показателя. Антиоксиданты фиточая «Амарант» характеризуются низким уровнем биодоступности. Употребление этого напитка не приводит к изменению уровня антиоксидантов в слюне независимо от их исходного содержания. Проведен кластерный анализ чайных сборов по содержанию в них отдельных антиоксидантов.

#### Литература

1. Preiser J. – C. Oxidative Stress //JPEN Journal, 2012. Vol.36(2). P. 147–154.
2. Breitenbach M., Eckl P. Introduction to Oxidative Stress in Biomedical and Biological Research // Biomolecules, 2015. Vol. 5. P. 1169–1177.
3. Adwas A.A. et al. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body // J. Appl. Biotechnol. Bioeng., 2019. Vol. 6(1). P. 43–47.
4. Nasri H., Baradaran A., Shirzad H., Rafieian-Kopaei M. New concepts in nutraceuticals as alternative for pharmaceuticals // Int. J. Prev. Med., 2014. Vol. 5. P. 1487–1499.
5. Maslennikov P., Golovina E., Artemenko A. Ecological and Geochemical Conditions for the Accumulation of Antioxidants in the Leaves of *Lathyrus maritimus* (L.) Bigel // Plants, 2020. Vol. 9(6). P. 746.
6. Jakubczyk K. et al. Antioxidant Properties and Nutritional Composition of Matcha Green Tea // Foods, 2020. Vol. 9(4). P. 483.
7. Feduraev P., Skrypnik L., Riabova A., Maslennikov P., Chupakhina G. Phenylalanine and Tyrosine as Exogenous Precursors of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Secondary Metabolism through PAL-Associated Pathways // Plants, 2020. Vol.9(4). P. 476.
8. Maslennikov P.V., Chupakhina G.N., Skrypnik L.N., Feduraev P.V., Melnik A.S. Assessment of the Antioxidant Potential of Plants in Urban Ecosystems under Conditions of Anthropogenic Pollution of Soils // Russ. J. Ecol., 2018. Vol.49(5). P.384–394.
9. Maslennikov P.V., Chupakhina G.N., Skrypnik L.N., Feduraev P.V., Melnik A.S. The contribution of polyphenols to plant resistance to Pb soil pollution // International Journal of Environmental Studies, 2018. Vol.75(5). P. 719–731.
10. Yang J., Liu R.H. The phenolic profiles and antioxidant activity in different types of tea // IFST Journal, 2012. Vol. 48(1). P.163–171.
11. Abdeltaif S., SirElkhatim K.A. Estimation of Phenolic and Flavonoid Compounds and Antioxidant Activity of Spent Coffee and Black Tea (Processing) Waste for Potential Recovery and Reuse in Sudan // Recycling, 2018. Vol. 3(2). P. 27.
12. Habtemariam S., Varghese G. Extractability of Rutin in Herbal Tea Preparations of *Moringa stenopetala* Leaves // Beverages, 2015. Vol.1(3). P. 169–182.
13. Korus A. Level of Vitamin C, Polyphenols, and Antioxidant and Enzymatic Activity in Three Varieties of Kale (*Brassica Oleracea* L. Var. *Acephala*) at Different Stages of Maturity // International Journal of Food Properties, 2011. Vol. 14(5). P. 106910–80.
14. Jaroszevska A., Biel W. Chemical composition and antioxidant activity of leaves of mycorrhized seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) // Chilean Journal of Agricultural Research, 2017. Vol. 77(2). P. 155–161.
15. Chupakhina G.N., Shansky M., Parol A., Chupakhina N.Y., Feduraev P.V., Skrypnik L.N., Maslennikov P.V. Comparative characteristics of antioxidant capacity of some forage plants of the Baltic Sea Region (a case study of the Kaliningrad Region and Estonia) //Agronomy Research, 2018. Vol. 16, 1976–1985.