



Биол. журн. Армении, 1 (68), 2016

**РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНОГО СПОСОБА ВЫДЕЛЕНИЯ СЛАДКИХ
ГЛИКОЗИДОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ СТЕВИИ (*STEVIA REBAUDIANA* BERTONI),
ВЫРАЩЕННОЙ В РЕСПУБЛИКЕ АРМЕНИЯ И НАГОРНОМ КАРАБАХЕ**

**В.Т. КОЧИКЯН¹, Л.С. МАНУКЯН¹, А.О. ЦАТУРЯН¹, А.С. САГИЯН¹,
А.Т. КОЧИКЯН², Л.Э. ОГАНЕСЯН³, Г.Ю. ОВСЕПЯН⁴, М.А. БАБАХАНИЯН³**

¹ НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА,
vahe-ghochikyan@yandex.ru

² Кафедра технологии лекарств ЕГМУ им. М. Гераци

³ Институт проблем гидропоники им. Г.С. Давтяна НАН РА

⁴ Научный центр Арцаха НКР

Предложен экономически эффективный способ получения сухого очищенного экстракта из листьев *Stevia rebaudiana* Bertoni. Показано, что оптимальными условиями для экстракции дитерпеновых гликозидов являются pH-3,5 и температура 65°C. С применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии определено содержание органических кислот в разных экстрактах листьев *Stevia rebaudiana* Bertoni. Показано, что наиболее предпочтительным сырьем для получения дитерпеновых гликозидов являются листья стевии, выращенные в Нагорном Карабахе.

*Стевиозид – ребаудиозид А – Stevia rebaudiana Bertoni –
дитерпеновые гликозиды – экстракция – гидропоника*

Առաջարկվել է *Stevia rebaudiana* Bertoni բույսի տերևներից՝ մաքրված չոր լուծամզվածքի ստացման արդյունավետ եղանակ: Ցույց է տրվել, որ դիտերպենային գլիկոզիդների լուծամզման համար օպտիմալ պայմաններ են հանդիսանում pH-3,5 և 65°C ջերմաստիճանը: Բարձր արդյունավետության հեղուկ քրոմատոգրաֆիայի մեթոդի կիրառմամբ որոշվել է *Stevia rebaudiana* Bertoni բույսի տերևների տարբեր լուծամզվածքներում օրգանական թթուների պարունակությունը: Ցույց է տրվել, որ մեղրախոտի դիտերպենային գլիկոզիդների ստացման համար առավել զերադասելի հումք է հանդիսանում Լեռնային Ղարաբաղում ստացված կենսազանգվածը:

*Ստեիոզիդ – ռեբաուդիոզիդ – A – Stevia rebaudiana Bertoni –
դիտերպենային գլիկոզիդներ – լուծամզում – հիդրոպոնիկա*

The economically efficient method for the production of dry purified extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves has been proposed. It was shown that the optimal conditions for the extraction of diterpene glycosides were pH-3.5 and 65 °C. The content of organic acids in various extracts of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves was determined by high-performance liquid chromatography. The most preferred raw materials for production of diterpene glycosides of stevia were shown to be leaves grown in Nagorno-Karabakh.

*Stevioside – rebaudioside A – Stevia rebaudiana Bertoni –
diterpene glycosides – extraction – hydroponics*

В настоящее время известно много растений с содержанием соединений, по сладости превосходящих сахарозу в сотни и тысячи раз, таких как диоскорефеллум (*Dioscorephellum cumminsii*), липпия (*Lippia dulcis*), хемслея (*Hemsleya panicis-scandens*), синсепалу (*Syncepalum dulcificum*), момордика (*Thladiantha grosvenorii*, syn. *Momordica grosvenorii*). Коммерческое использование их как сырья для производства сахарозаменителей ограничено либо трудностью сбора плодов и нетехнологичностью переработки, либо токсичностью экстракта [6-7].

Сладкие дитерпеновые гликозиды стевии (стевиозид, ребаудиозид А и др.) натуральные подсластители, которые накапливаются в растении стевия *Stevia rebaudiana* Bertoni, р. *Stevia* сем. астровых (*Compositae*). Род *Stevia* насчитывает 154 вида, но лишь в двух из них накапливаются сладкие гликозиды, причем содержание их максимально в надземной части *S. rebaudiana* Bertoni – от 8 до 15% в пересчете на сухой вес [8]. Родиной стевии считается Парагвай. Парагвайские индейцы называют ее Каа-хее, что означает медовая трава. Широко культивируется в странах Южной Америки, Японии, Корее, Тайвани, Малазии [2-5]. В последние годы стевию начали культивировать в Армении методом гидропонии и в Нагорном Карабахе [1].

Экстракт стевии содержит смесь различных дитерпеновых гликозидов, которые имеют единую основу – стевиол и отличаются содержанием углеводных остатков в положении С13 и С19. Из экстракта стевии выделены и идентифицированы стевиозид, ребаудиозиды А, В, С, D и Е, дулкозид А, рубузозид и стевиолбиозид. Основным компонентом среди них является стевиозид (5-10% м./м.), ребаудиозид А (2-4% м./м.), ребаудиозид С (1-2% м./м.) и дулкозид А (0.4-0.7% м./м.) [12-15]. Все выделенные гликозиды обладают повышенной сладостью по отношению к сахарозе, которая для стевиозида составляет 200-280; ребаудиозида А – 400-450; ребаудиозида В – 300-350; ребаудиозида С – 50-120; ребаудиозида D – 250-450; ребаудиозида Е – 150-300; дулкозида А – 50-120; рубузозида – 120-200 и для стевиолбиозида – 100-125 [11].

Стевиозид и другие гликозиды стевии, кроме интенсивной сладости, обладают низкой калорийностью, а также уникальными биологическими свойствами [9, 10, 12, 18, 19]. При его регулярном употреблении снижается содержание сахара, радионуклидов и холестерина в организме человека, улучшается регенерация клеток и коагуляция крови, тормозится рост новообразований, укрепляются кровеносные сосуды. Он проявляет также желчегонное, противовоспалительное и диуретическое свойства, препятствует образованию язв в желудочно-кишечном тракте [3].

Задача настоящей работы состояла в разработке способа получения сухого очищенного экстракта из листьев стевии, выращенных в Армении и в Нагорном Карабахе.

Материал и методика. В качестве сырья использовались листья стевии, выращенные как методом гидропонии, так и в почве Арагатской равнины, Нагорного Карабаха, а также листья, привезенные из Украины. Работы по выращиванию стевии проводились в рамках проекта тематического финансирования 13-1Ф072 Министерства образования и науки РА Государственного комитета по науке. Влажность исходного сырья составляла 4,2%. Чистота и подлинность полученных образцов подтверждались методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

ТСХ осуществлялся на пластинках TLC силилгальгель 60 F254 (Merck, Германия). На стартовую линию пластинки для ТСХ микропипеткой наносили 0,01мл испытуемого раствора и 0,01мл 1%-ного раствора стандартного образца стевиозида в метаноле, высушивали на воздухе в течение 10 мин и хроматографировали восходящим способом в камере с системой растворителей: хлороформ-метанол-вода (60:30:6). В качестве проявителя использовали 50%-ный раствор серной кислоты [4].

Экстракты листьев стевии упаривали на вакуумно-испарительной установке Laborota 4000/HB/G3 (Heidolph, Германия). Содержание органических кислот определяли методом ВЭЖХ на приборе “Water Separations Modul 2695” (США). Редуцирующие вещества определяли методом Шомоди-Нельсона [16-17].

Результаты и обсуждение. В качестве экстрагентов для выделения сладких дитерпеновых гликозидов чаще всего используются органические растворители, такие как метанол, этанол, диэтиловый эфир, ацетон, изопропиловый спирт и ацетонитрил. Однако при использовании этих растворителей в экстракт переходит большое количество органических веществ, прежде всего пигментов, препятствующих дальнейшему осветлению экстракта. Принимая во внимание лечебно-профилактическую ценность гликозидов стевии, в качестве экстрагента нами использовалась вода, благодаря которой максимально снижалось содержание сопутствующих примесей. Экстракцию дитерпеновых гликозидов проводили при различных pH (7,0; 6,5; 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0) с целью определения оптимальных условий. Полученные результаты показали, что с уменьшением pH повышается выход гликозидов, однако при pH-3,0 и ниже наблюдается частичный гидролиз стевиозида. В целях оптимизации процесса экстракции дитерпеновых гликозидов нами было изучено влияние таких параметров, как степень измельчения сырья, соотношение сырьё-экстрагент, температура экстрагента и продолжительность процесса. Для определения оптимальной температуры и продолжительности процесса экстракцию проводили при следующих температурах (30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70°C). Наибольшее извлечение дитерпеновых гликозидов из растительного сырья обеспечивала экстракция десятикратным объемом воды (pH-3,5) в течение 3 ч при температуре 65°C. Оптимальный размер частиц сырья 0,5-1,0 мм. После экстракции раствор фильтровали и с помощью $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pH фильтрата доводили до 10. Выпавший осадок отделяли центрифугированием. Надосадочную жидкость обесцвечивали активированным углем (10-15 г угля на 1 л жидкости) при 70°C с перемешиванием в течение 30 мин. Получали экстракт темно-коричневого цвета. Для обессоливания полученного экстракта использовали ионообменный метод. Экстракт пропускали через две ионообменные колонки, заполненные сульфокатеонитом в H^+ – форме и среднеосновным анионитом в OH^- – форме. Линейная скорость потока раствора по направлению снизу вверх составляла 0,05 см/с. На выходе из колонки раствор имел желтоватый цвет. Затем водный раствор упаривали на вакуумно-испарительной установке досуха. Получали сухой порошок дитерпеновых гликозидов стевии желтоватого цвета. Процесс экстракции представлен в виде схемы (рис.1).

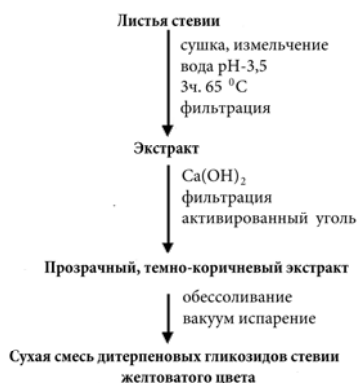


Рис.1. Схема получения смеси дитерпеновых гликозидов из листьев стевии

Выход дитерпеновых гликозидов составлял 69-83%, содержание в нём моносахаридов варьировало от 0,05-0,12% в зависимости от использованного образца (табл. 1).

Таблица 1. Выход дитерпеновых гликозидов из различных образцов листьев стевии

	Образцы листьев стевии	Выход дитерпеновых гликозидов, % (от содержания в сырье)	Содержание моносахаридов в конечном продукте, %
1.	Гидропоника	76	0,07
2.	Почва (Арагатская равнина)	81	0,09
3.	Почва Украина (Крым)	69	0,12
4.	Почва Нагорного Карабаха (Аскеранский район)	83	0,05

Органические кислоты – большая и разнообразная по своим свойствам группа веществ, содержащаяся в большинстве пищевых и лекарственных растений. Наиболее часто встречаются такие органические кислоты, как яблочная, лимонная, янтарная, щавелевая, уксусная, винная, молочная. Они оказывают на организм человека достаточно разнообразное действие: содержащиеся в цветках ромашки, в коре белой ивы бензойная и салициловая кислоты - антисептическое действие; содержащиеся в листьях подорожника, мать-и-мачехи, побегах топинамбура производные кофейной и других оксикоричных кислот - желчегонное, противовоспалительное действие; урсоловые кислоты и их производные обладают детоксицирующими свойствами, выводят из организма продукты обмена веществ, соли тяжелых металлов, радионуклиды, холестерин. Органические кислоты ягод, фруктов, плодов стимулируют сокоотделение в желудочно-кишечном тракте и улучшают пищеварение, активизируют перистальтику кишечника, уменьшая риск развития многих желудочно-кишечных заболеваний.

Во всех экстрактах листьев стевии определяли наличие органических кислот методом ВЭЖХ. Использовали колонку Altima C-18, 5 μ , 250мм x 4,6мм со скоростью потока 1мл/мин, (детектор УФ 210нм, элюент вода-метанол-ацетонитрил 99:0,5:0,5 об./об.) (табл. 2).

Таблица 2. Содержание органических кислот в экстрактах листьев стевии

	Органические кислоты	Концентрация, мг/мл			
		Почвы			
		Гидропоника	Арагатская равнина	Украина (Крым)	Нагорный Карабах (Аскеранский район)
1.	Аспарагиновая	3,66 $\pm$ 0,52	2,13 $\pm$ 0,27	0,93 $\pm$ 0,07	4,55 $\pm$ 0,03
2.	Щавелевая	14,59 $\pm$ 1,87	5,53 $\pm$ 0,54	3,84 $\pm$ 0,25	16,52 $\pm$ 1,64
3.	Винная	2,76 $\pm$ 0,42	2,23 $\pm$ 0,12	0,91 $\pm$ 0,09	3,46 $\pm$ 0,58
4.	Яблочная	45,96 $\pm$ 2,36	61,04 $\pm$ 3,82	13,52 $\pm$ 1,05	52,26 $\pm$ 3,48
5.	Лимонная	3,43 $\pm$ 0,26	-	0,21 $\pm$ 0,08	4,72 $\pm$ 0,57
6.	Фумаровая	0,02 $\pm$ 0,001	0,02 $\pm$ 0,001	0,008 $\pm$ 0,0005	0,008 $\pm$ 0,005

Исследования показали, что из четырёх типов изучаемых образцов листьев стевии наиболее продуктивным сырьем для получения сладких гликозидов являются листья растения, выращенного в Нагорном Карабахе, где выход дитерпеновых гликозидов составляет 83%.

Таким образом, предложен способ получения сухого порошка смеси дитерпеновых гликозидов из листьев стевии, который исключает использование токсичного метанола и высокотоксичного дорогостоящего хлороформа, благодаря чему он экологически более безопасен и экономически эффективен.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Քարախանյան Մ.Ա., Հովհաննիսյան Լ.Է., Պուլյան Ա.Ա. և ուրիշներ.* Նոր տեխնիկական մշակարարի՝ Ստերախոսի (*Stevia rebaudiana* Bertoni) ինտրոդուկցիան ՀՀ-ում և ԼՂՀ-ում, շահավետ հեռանկարային առաջարկ պետական և մասնավոր ներդրումների համար: ՀՀ Գյուղ. Նախ., Ագրոգիտություն, Երևան, 5-6, էջ 296-302, 2012.
2. Биологический энциклопедический словарь. Гл. ред. М.С. Гиляров. Редкол.: А.А. Баев, Г.Г. Винберг и др. М., 831 с., 1986.
3. *Зубцов В.А., Осипова Л.Л., Лебедева Т.И., Антипова Н.В.* Стевия – лекарственное и пищевое растение. Мат. I Межд. научно-практ. конф. “Растительные ресурсы для здоровья человека”. - 23-27 сент., 2002. М.,Сергиев-Пасад: “Арес”. сс. 356-358.
4. *Кедик С.А., Ярцев Е.И., Станишевская И.Е., Федоров С.В.* Технология получения сухого очищенного экстракта из листьев стевии. “Вестник МИТХТ”, 3, 2, сс. 79-83, 2008.
5. Латинская Америка: Энциклопедический словарь. М., I, сс. 479-480, 1980.
6. *Ляховкин А.Г., Николаева А.П., Учитель В.Б.* Стевия-медовая трава.С.-Петербург: “Весь”. 123 с., 1999.
7. *Семенова Н.* Стевия – растение XXI века. М., С.-Петербург. “Диля”, 160 с., 2004.
8. *Bondarev N., Reshetnyak O., Nosov A.* Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Science, 161, p.155-163, 2001.
9. *Chan P., Xu D.Y., Liu J.C., Chen Y.J., Tomlinson B., Huang W.P., Cheng J.T.* The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously hypertensive rats. Life Sci., - 63, 19, pp. 1679-1684, 1998.
10. *Chan P., Tomlinson B., Chen Yi-J., Liu Ju-C., Hsieh Ming-H., Cheng Juei-T.* A double-blind placebo controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. Bras. J. Clin. Pharmacol., 50, pp. 215-220, 2000.
11. *Crammer B., Ikan R.* Progress in the chemistry and properties of the rebaudioside. In: Grenby, T.B. Developments in Sweeteners. 3, London: Elsevier, p. 45-64, 1987.
12. *Jeppesen P.B., Gregersen S., Alstrup K.K., Hermansen K.* Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects *in vivo*: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. Phytomedicine, 9, pp. 9-14, 2002.
13. *Kinghom A.D., Soejarto D.D.* Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. In: Wagner H., Hikino H., Farnsworth N.R. Economic and medicinal plant research, I. L., Academic Press. pp. 1-52, 1985.
14. *Kinghom A.D., Kaneda N., Baek N.I., Kennelly E.J., Soejarto D.D.* Noncariogenic intense natural sweeteners. Med. Res. Rev., 18, 5, pp. 347-360, 1998.
15. *Kinghom A.D.* Overview In: Kinghom, A.D. Stevia, the genus Stevia, N.Y., Taylor and Francis. pp. 1-17, 2002.
16. *Nelson N.* A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., 153, 2, pp. 375-380, 1944.
17. *Somogyi M.* Notes on sugar determination. J. Biol. Chem., 195, 1, pp. 19-23, 1952.
18. *Takahashi K., Matsuda M., Ohashi K., Taniguchi K., Nakagomi O., Abe Y., Mori S., Sato N., Okutani K., Shigeta S.* Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. Antiviral Res., 49, pp. 15-24, 2001.
19. *Yasukawa K., Kitanaka S., Seo S.* Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse. Skin Biol. Pharm. Bull., 25. 11, pp. 1488-490, 2002.

Поступила 03.04.2015