

УДК 581.19:547.56

Я. Л. СТРАХ, О. С. ИГНАТОВЕЦ

ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ФЛАВОНОИДОВ РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ МОРОШКИ ПРИЗЕМИСТОЙ *RUBUS CHAMAEMORUS L.**Белорусский государственный технологический университет**(Поступила в редакцию 17.11.2020)*

Приведены результаты исследований по экстракции и определению содержания фенольных веществ и флавоноидов в различных популяциях морошки приземистой, а также в разных частях растения. Установлено, что наибольшее содержание фенольных соединений и флавоноидов обнаружено в листовых пластинках морошки приземистой, отобранных в заказнике «Лонно» (Республика Беларусь). В указанном образце с помощью метода хромато-масс-спектрометрии идентифицированы эллаговая кислота и кверцетин-3-О-глюкоронид. Для них получены характерные масс- и УФ-спектры. Сделан вывод о том, что наиболее оптимальными условиями произрастания морошки приземистой обладает заказник «Лонно».

Введение. Фенольные соединения – группа веществ ароматического ряда, содержащих в своей структуре одну или несколько ОН-групп. Флавоноиды – широкий класс низкомолекулярных многоатомных фенолов растительного происхождения, для которых характерно структурное многообразие, высокая и разнообразная активность и малая токсичность.

Предполагается, что биологический потенциал фенольных соединений отчасти обусловлен их антиоксидантной активностью. Антиоксидантная активность полифенолов проявляется за счет гидроксильных групп, а также фенольного водорода как донора электронов [1; 2]. Содержание и спектр фенольных соединений в растениях варьируется в зависимости от семейства и рода, к которому они принадлежат. Антиоксидантный эффект и другие виды биологической активности фенольных веществ зависят от органов растений и стадии вегетации. В данном исследовании был проведен анализ содержания фенольных соединений и флавоноидов в листьях и черешках различных популяций морошки приземистой. Флавоноиды обладают широким спектром биологической активности, которая в свою очередь связана с многообразием их химических структур и вытекающих из них различных физико-химических свойств. Интерес к данным компонентам обусловлен тем обстоятельством, что флавоноиды, будучи природными соединениями, определяют антиоксидантные, ангиопротекторные, гепатопротекторные, желчегонные, диуретические, нейротропные и другие важнейшие фармакологические

свойства [3–5]. Причем именно вышеперечисленные фармакологические эффекты в наибольшей степени привлекают ученых в области создания новых фитопрепаратов и биологически активных добавок.

Было показано, что фенольные смолы обладают полезными свойствами, такими как антиоксидантная и антимикробная активность [6; 7]. Феноловые кислоты считаются противовоспалительными, антиканцерогенными и антимикробными агентами, а также антиоксидантами [2; 8]. Известно, что различные экстракты растений, в том числе и морошки (*Rubus chamaemorus* L.), богаты эллаготанинами и другими фенольными соединениями, обладают антимикробными свойствами в отношении роста вирулентных бактерий, таких как *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, а также видов *Salmonella* и *Staphylococcus* [8].

Интерес к этим соединениям постоянно растет, чему в немалой степени способствуют такие исключительно ценные свойства флавоноидов, как антиоксидантная активность и связанная с ней способность многих метаболитов этого класса действовать в качестве агентов, предотвращающих или замедляющих образование опухолей, укрепляющих кровеносные сосуды, защищающих печень и желудочно-кишечный тракт, стимулирующих работу мозга и сердца, являющихся биологически активными добавками в лечебном и диетическом питании.

Морошка (*Rubus chamaemorus* L.) – вид многолетних травянистых растений с ползучим корневищем высотой до 30 см. Произрастает на торфяных болотах, в заболоченных лесах, моховых и кустарниковых тундрах в арктической и северной лесной полосе северного полушария. В Республике Беларусь таксон включен в Красную книгу Беларуси и относится ко II-й национальной категории охраны (соответствует статусу EN, по международной системе IUCN).

В настоящий момент исследований, посвященных изучению биологически активных веществ морошки, в частности фенольных соединений, недостаточно. Белорусскими учеными проводились исследования по комплексному определению различных классов биологически активных веществ (антоцианы, флавоноиды, катехины, фенолкарбоновые кислоты и др.) в вегетативных частях и плодах *Rubus chamaemorus* L. [9–11]. Тем не менее существует необходимость дальнейшего изучения и анализа различных популяций морошки приземистой для выявления закономерностей образования вторичных метаболитов и определения степени влияния условий окружающей среды для развития растений. Таким образом, целью проведенного исследования является сравнительный анализ содержания фенольных соединений и флавоноидов в листьях и черешках разных популяций морошки приземистой.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования являлись листья и черешки морошки приземистой, произрастающей на территории Республики Беларусь, собранные в августе 2019 г. на территории заказника «Лонно», Национального парка «Нарочанский», заказника «Болото Великий Мох».

Экстракция. Среди многообразия схем экстрагирования фенольных соединений из листьев и черешков морозники приземистой за основу был выбран метод трехкратной дробной экстракции. Навеску растительного сырья растирали в ступке с добавлением небольшого количества экстрагента 1-й концентрации. В качестве экстрагента использовали этиловый спирт следующих параметров: $V_{1,96\%} = 20$ мл, $V_{2,70\%} = 15$ мл, $V_{3,40\%} = 15$ мл [12]. Измельченное растительное сырье количественно переносили в круглодонную колбу и вносили оставшуюся порцию экстрагента. Экстракцию проводили при кипячении в течение 45 мин каждой порции экстрагента. Далее извлечения объединяли, фильтровали и упаривали досуха под вакуумом на роторном испарителе (IKA RV 8, Германия). Для дальнейших исследований сухой экстракт растворяли в 20 мл 70 %-ного этилового спирта.

Исследование содержания фенольных соединений в экстрактах методом Фолина–Чокальтеу. Определение концентрации фенольных соединений проводили методом Фолина–Чокальтеу в модификации Синглтона и Росси [13]. Метод основан на реакции фенолов с реактивом Фолина–Чокальтеу. Реактив состоит из солей фосфорновольфрамовой и фосформолибденовой кислот. В щелочной среде эти соли при взаимодействии с фенолами и полифенолами восстанавливаются с образованием окрашенных в синий цвет комплексов, содержание которых оценивается спектрофотометрически.

Раствор реактива Фолина–Чокальтеу готовили в соотношении 1 часть реактива и 9 частей дистиллированной воды. Готовили 7,5 %-ный раствор Na_2CO_3 .

Для построения калибровочного графика определения концентрации фенольных соединений в экстракте готовили сток-раствор галловой кислоты (5 мг галловой кислоты растворяли в 10 мл 70 %-ного этанола).

В табл. 1 приведены соотношения реактивов для построения калибровочного графика. В пробирки вносили определенные объемы сток-раствора галловой кислоты и добавляли 70 %-ный раствор этанола в объемах, необходимых для получения нужной концентрации.

Таблица 1. Соотношения реактивов для построения калибровочной кривой для определения содержания фенольных соединений методом Фолина–Чокальтеу

Концентрация, мг/л	Объем сток-раствора галловой кислоты для приготовления пробы, мкл	Объем 70 %-ного этанола для приготовления пробы, мкл	Среднее значение оптической плотности с использованием 70 %-ного этанола
Контроль, 0	0	250	0
25	12,5	237,5	0,161
50	25	225	0,397
100	50	200	0,833
150	75	175	1,291
200	125	125	1,909

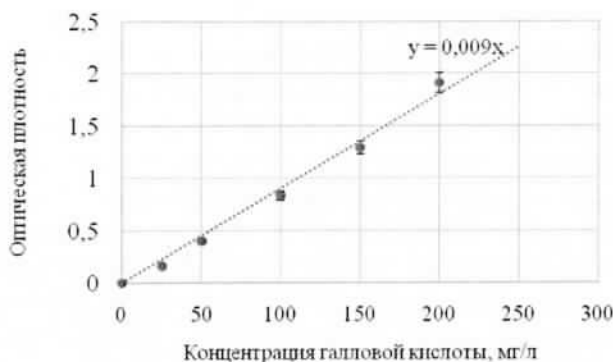


Рис. 1. Калибровочный график зависимости экстинкции E_{765} от концентрации галловой кислоты, мг/л в 70 %-ном этаноле

В каждую из пробирок вносили 1,25 мл разведенного реактива Фолина–Чокальтеу, точно через 3 мин добавляли 1 мл 7,5 %-ного раствора Na_2CO_3 , после чего реакционная смесь приобретала синюю окраску, интенсивность которой пропорциональна концентрации галловой кислоты в растворе. Калибровочную кривую строили как минимум в трех повторностях. Пробирки с реакционной смесью хорошо встряхивали и оставляли на 2 ч.

По истечению времени проводили измерение оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 765 нм. По результатам измерения оптической плотности растворов строили калибровочный график (рис. 1).

Для измерения концентрации флавоноидов в экстрактах в пробирку вносили 0,25 мл исследуемого спиртового экстракта, разбавленного в 10 раз (оптимальные величины разбавления устанавливались экспериментально), в контрольную пробирку – 0,25 мл 70 %-ного этанола и затем во все пробирки добавляли по 1,25 мл разведенного реактива Фолина–Чокальтеу, а ровно через 3 мин по 1,0 мл раствора Na_2CO_3 .

Пробирки с реакционной смесью интенсивно встряхивали и оставляли на 2 ч, после чего проводили измерение оптической плотности на спектрофотометре Specord 200 PLUS (Analytik Jena, Германия) при длине волны 765 нм. В качестве стандартного раствора использовали пробу «контроль», которую готовили без добавления галловой кислоты. Содержание фенольных соединений в экстракте определяли с помощью калибровочной кривой. Средние значения оптической плотности и концентрации фенольных соединений приведены в табл. 1.

Содержание внутриклеточных фенольных соединений в экстрактах рассчитывали по формуле

$$F = \frac{C_F V_3}{m(1-W)1000},$$

где F – общее содержание внутриклеточных фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту, мг-экв галловой кислоты/г сухого веса; C_F – концентрация

фенольных соединений, рассчитанная по калибровочной кривой, исходя из оптической плотности реакционных смесей, мг-экв галловой кислоты/л; V_3 – общий объем экстракта, мл; m – масса навески, г; W – влажность сырья, доли; 1000 – коэффициент перевода л в мл.

Определение содержания флавоноидов [14]. Для количественного определения флавоноидов в экстрактах растений в мерную колбу вместимостью 5 мл помещали 0,4 мл экстракта, добавляли 0,4 мл 1 %-ного раствора алюминия хлорида в 95 %-ном этиловом спирте, 0,1 мл 33 %-ного раствора уксусной кислоты и доводили объем раствора 95 %-ным этиловым спиртом до метки. Для приготовления раствора сравнения в другую колбу вместимостью 5 мл помещали 0,4 мл исследуемого раствора, 0,1 мл 33 %-ного раствора уксусной кислоты и доводили до метки 95 %-ным этиловым спиртом. Измерение оптической плотности проводили через 20 мин при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Параллельно измерили оптическую плотность стандартного раствора рутина. Для этого 0,4 мл 0,02 %-ного стандартного раствора помещали в мерную колбу 5 мл, прибавляли 0,4 мл 1 %-ного раствора алюминия хлорида, 0,1 мл 33 %-ного раствора уксусной кислоты и доводили до метки 95 %-ным этиловым спиртом. Для приготовления раствора сравнения в другую колбу вместимостью 5 мл помещали 0,4 мл стандартного раствора рутина, 0,1 мл 33 %-ного раствора уксусной кислоты и доводили до метки 95 %-ным этиловым спиртом. Суммарное содержание флавоноидов (X , мг-экв рутин/г абсолютно сухого сырья) в исследуемых экстрактах вычисляли по формуле

$$X = \frac{A_x C_{ст} V_3 1000}{A_{ст} m (1 - W) V_x 100},$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; $C_{ст}$ – концентрация стандартного раствора рутина, %; V_3 – общий объем экстракта, мл; 1000 – перевод граммов в миллиграммы; $A_{ст}$ – оптическая плотность стандартного раствора рутина; m – масса навески, г; W – влажность сырья, доли; V_x – объем исследуемого экстракта, мл; 100 – перевод из процентной концентрации в мг-экв/г.

Для идентификации фенольных соединений полученные экстракты анализировали с помощью метода жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Использовали высокоэффективный хромато-масс-спектрометр Waters с диодно-матричным спектрофотометрическим детектором PDA 996 и масс-детектором «Micromass ZQ 2000» (Waters, США). Колонка «HYPERSIL C18» длиной 250 мм и диаметром 4,6 мм, размер частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил: 0,1 %-ный водный раствор муравьиной кислоты при скорости элюирования 1 мл/мин. Ступенчатый градиент от 5 до 90 % ацетонитрила в 0,1 %-ном растворе муравьиной кислоты в течение 30 мин, затем в течение 15 мин 90 %-ный ацетонитрил в 0,1 %-ном растворе муравьиной кислоты. Объем вводимой пробы – 20 мкл, тип ионизации – электроспрей ионизация (ESI). Параметры

ионизации: напряжение на капилляре – 3,5 кВ, напряжение на конусе – 20 В, напряжение на экстракторе – 3 В, температура источника – 150 °С, температура испарения – 350 °С. Расход газа: на испарителе – 400 л/ч, на конусе – 150 л/ч. Запись масс-спектров производили в режиме регистрации положительных (ESI+) и отрицательных ионов (ESI–).

Результаты и их обсуждение. Анализ результатов, приведенных в табл. 2, позволяет сделать вывод о наличии межпопуляционных различий по содержанию фенольных соединений и флавоноидов в образцах морошки приземистой.

Таблица 2. Результаты исследований содержания внутриклеточных фенольных соединений и флавоноидов в морошке приземистой

№ образца	Место сбора	Объект исследования	Содержание внутриклеточных фенольных соединений, мг-экв галловой кислоты/г абсолютно сухого сырья	Содержание флавоноидов, мг-экв рутина/г абсолютно сухого сырья
1	Заказник «Лонно», Полоцкий р-н, Витебская обл.	Листовые пластинки	83,96 ± 2,29	39,75 ± 1,33
2	Нацпарк «Нарочанский», Мядельский р-н, Минская обл.	Листовые пластинки	65,35 ± 1,96	26,36 ± 1,14
3	Заказник «Болото Великий Мох», Миорский р-н, Витебская обл.	Листовые пластинки	57,42 ± 1,78	21,79 ± 1,17
4	Заказник «Лонно», Полоцкий р-н, Витебская обл.	Черешки	51,92 ± 1,22	13,09 ± 1,01
5	Нацпарк «Нарочанский», Мядельский р-н, Минская обл.	Черешки	50,29 ± 1,08	14,45 ± 0,83
6	Заказник «Болото Великий Мох», Миорский р-н, Витебская обл.	Черешки	51,04 ± 1,17	7,15 ± 0,22

Отличительной особенностью всех образцов является большее содержание фенольных соединений в листовых пластинках, в сравнении с черешками. В образцах листовых пластинок из заказника «Лонно» содержание фенольных соединений выше, чем у образцов из заказника «Болото Великий Мох» и нацпарка «Нарочанский». Выявленные различия предположительно обусловлены условиями произрастания популяций. Фенольные соединения имеют важное значение в физиологии и устойчивости растений в борьбе с вредителями [15]. Изменением процесса биосинтеза флавоноидов растение реагирует на перепады температуры и изменение интенсивности света [16]. Так как заказник «Лонно» имеет наиболее оптимальные геоклиматические условия для произрастания морошки приземистой. В связи с этим образцы данной популяции характеризуются наибольшим содержанием фенольных соединений и флавоноидов. Содержание фенольных соединений в листовых пластинках наименьшее у образцов из заказника «Болото Великий Мох», где популяционное поле расположено в пределах послепожарной трансформации растительного сообщества и может являться индикатором стресса.

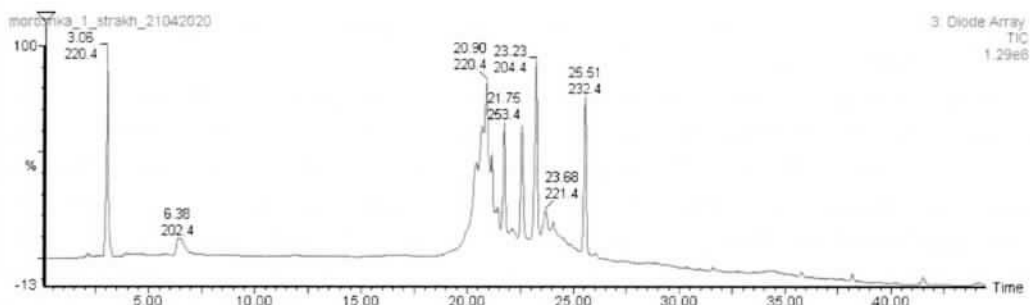
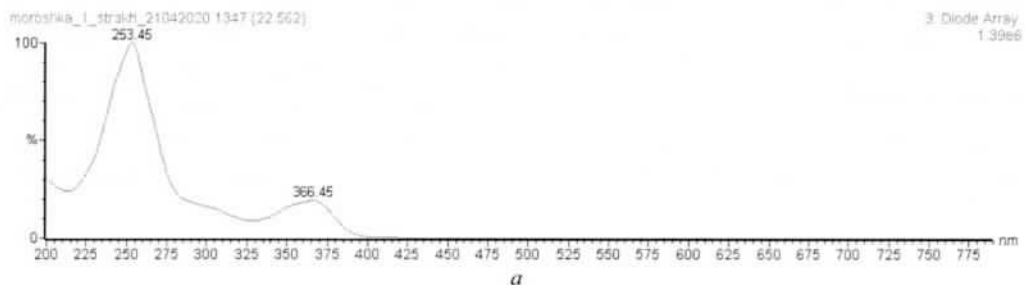
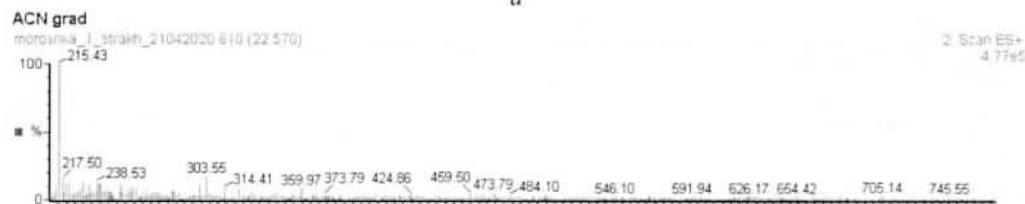


Рис. 2. Хроматограмма экстракта листовых пластинок заказника «Лонно»

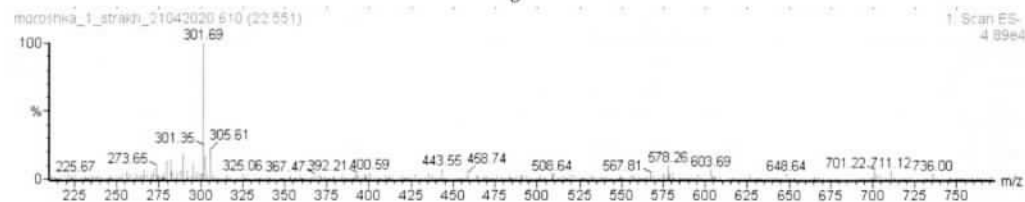
На рис. 2 представлена хроматограмма экстракта листовых пластинок мо­рошки приземистой заказника «Лонно». На хроматограмме присутствует 7 основ­ных хроматографических пиков с различными временами удерживания. иденти­фикацию фенольных соединений проводили на основании масс- и электронных спектров.



a



б



в

Рис. 3. Масс- и электронный спектры пика со временем удерживания 22,56 мин: *a* – электронный спектр, *б* – масс-спектр в области положительных ионов, *в* – масс-спектр в области отрицательных ионов

На рис. 3 представлены масс- и электронные спектры вещества со временем удерживания 22,56 мин.

В масс-спектре этого соединения, полученном в области положительных ионов, был зарегистрирован пик молекулярного иона с m/z 303,55 (рис. 3, б). Данное соединений дает также интенсивный пик в области отрицательных ионов $[M - H]^-$ с m/z 301,69. Электронный спектр указанного соединения имел выраженный максимум при 253,5 нм. (рис. 3, в). На основании приведенных физико-химических характеристик можно сделать вывод, что соединение с временем удерживания 22,56 мин принадлежит эллаговой кислоте. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными [17]. Эллаговая кислота обладает высокой антиоксидантной активностью. Благодаря своим биологическим свойствам, она входит в состав многих фитопрепаратов с широким спектром фармакологической активности.

Соединение со временем удерживания 23,2 мин было менее хроматографически подвижным, чем предыдущее и идентифицировано как кверцитин-3-О-глюкуронид. В пользу этой структуры свидетельствовало наличие молекулярного иона $[M - H]^-$ с m/z 477,85 в отрицательной области, а в области положительных ионов $[M + H]^+$ с m/z 479,70, агликона $[M - H]^-$ с m/z 301,76 в отрицательной

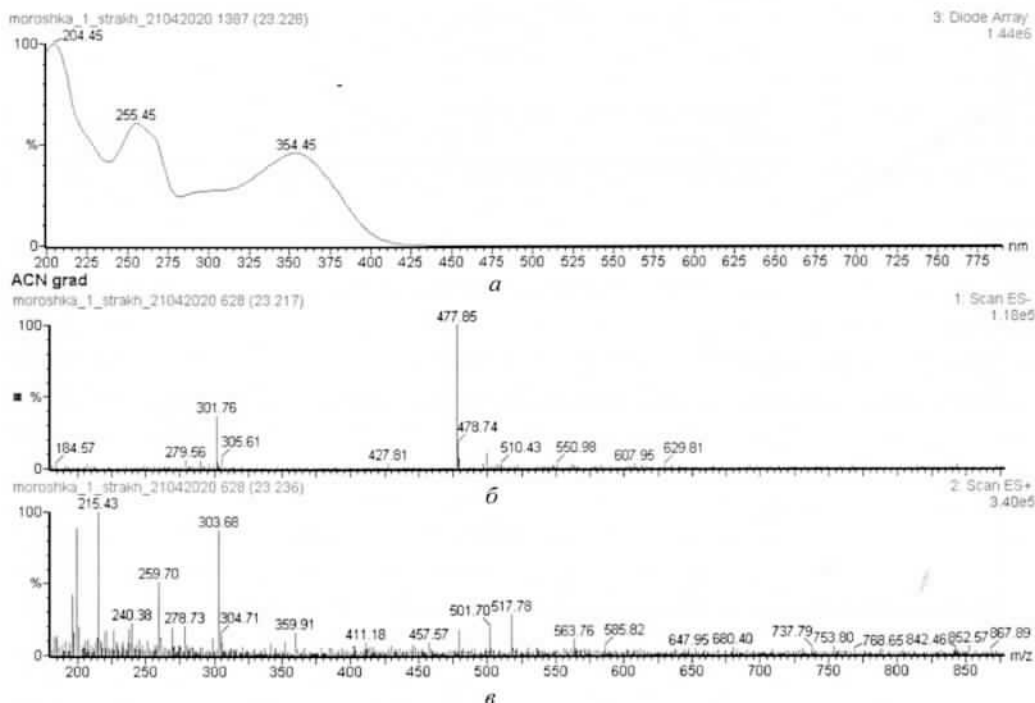


Рис. 4. Масс- и электронный спектры пика со временем удерживания 23,2 мин: а – электронный спектр, б – масс-спектр в области отрицательных ионов, в – масс-спектр в области положительных ионов

области, а в области положительных ионов – $[M + H]^+ c m / z 303,68$ (рис. 4). Данная структура подтверждается литературными данными [18], а кверцитин-3-О-глюкуронид является достаточно распространенным флавоноидом в растительном сырье. Антиоксидантные и противодиабетические функции кверцитин-3-О-глюкуронида являются основными биологическими функциями в организме человека.

Заключение. Таким образом, проведенные исследования позволили установить межпопуляционные различия по содержанию фенольных соединений и флавоноидов в различных частях морошки приземистой. Экстракты образцов получены методом трехкратной дробной экстракции. Определено содержание фенольных веществ и флавоноидов в различных популяциях морошки приземистой, а также в различных частях растения. Установлено, что в листовых пластинках морошки приземистой, отобранных в заказнике «Лонно», наибольшее содержание фенольных соединений и флавоноидов. В данном образце с помощью метода хромато-масс-спектрометрии идентифицированы эллаговая кислота и кверцетин-3-О-глюкуронид. Для данных соединений получены характерные масс- и электронные спектры. Образцы морошки приземистой из заказника «Лонно» характеризуются наиболее высоким содержанием фенольных соединений и флавоноидов, так как условия произрастания в нем являются наиболее оптимальными в сравнении с нацпарком «Нарочанский» и заказником «Болото Великий Мох».

Образцы предоставлены ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси». Работы выполнены при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б19ЛАТГ-004).

Литература

1. Jiang Hong Chen, Chi-Tang Ho // J. Agric. Food Chem. 1997. Vol. 45, N 7. P. 2374–2378.
2. Silva et al. // Rev. Bras. Zootec. 2000. Vol. 29, N 3. P. 823–829.
3. Harborne J. B., Mabry T. J. The Flavonoids: Advances in Research. London; New York: Chapman and Hall., 1982. – 744 p.
4. Wagner H. Pharmazeutische Biologie. Drogen und ihre Inhaltsstoffe. Stuttgart; New York: Gustav Fischer Verlag, 1993. – 522 p.
5. Тусунбекова Г. А. и др. // Вестник КазНМУ. 2019. № 1. С. 484–487.
6. Mäkinen M., Kähkönen M., Hopia A. // European Journal of Lipid Science and Technology. 2001. Vol. 103, N 10. P. 683–687.
7. Piirponen-Pimiä P. et al. // Journal of Applied Microbiology. 2005. Vol. 98, N 4. P. 991–1000.
8. Nohynek L. J. et al. // Nutrition and Cancer. 2006. Vol. 54, N 1. P. 18–32.
9. Вогулкин К. Э. и др. // Биология – наука XXI века: сб. тез. 12-й Пушкинской междунар. школы-конф. молодых ученых, Пушкино, 10–14 нояб. 2008 г. Пушкино, 2008. С. 286–287.
10. Вогулкин К. Э., Вогулкина Н. В. // Биологически активные вещества растений – изучение и использование: материалы междунар. науч. конф., Минск, 29–31 мая 2013 г. Минск, 2013. С. 82–83.
11. Игнатенко В. А. и др. // Охраняемые природные территории и объекты Белорусского Поозерья: современное состояние, перспективы развития: тез. докл. II Междунар. науч. конф., 13–14 дек. 2005 г. Витебск, 2005. С. 82–85.
12. Singh S. et al. // Current Science. 2011. Vol. 101, N 1. P. 57–65.
13. Singleton V. L. et al. // Methods in Enzymology. 1999. Vol. 299. P. 152–178.

14. Мальцева Е. М., Егорова Н. О., Егорова И. Н. // Вестн. уральской мед. акад. науки. 2011. № 3(1). С. 68.
15. Харборна Дж. Биохимия фенольных соединений. М.: Мир, 1968. – 451 с.
16. Мерзляк М. Н. // Биология. 1998. № 4. С. 19–24.
17. Мушкина О. В., Гурина Н. С. // Вестн. ВГМУ. 2008. Т. 7, № 4. С. 81–86.
18. Sarfaraz A. et al. // Saudi Pharmaceutical Journal. 2019. Vol. 27, N 5. P. 655–663.

Ya. L. STRAKH, O. S. IGNATOVETS

**RESEARCH OF THE CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS AND FLAVONOIDS
OF DIFFERENT POPULATIONS OF THE *RUBUS CHAMAEMORUS* L.**

Summary

The results of the studies on the extraction and determination of the phenolic substances and flavonoids content in various populations of cloudberry stock, as well as in diverse parts of the plant are presented. It was found that the highest content of the phenolic compounds and flavonoids are in the leaf blades of the cloudberry, which were selected in the Lonno reserve (Republic of Belarus). In this sample, ellagic acid and quercetin-3-O-glucuronide were identified using the method of high-pressure liquid chromatography-mass spectrometry. Typical mass and UV spectra were obtained for them. It was concluded that the Lonno reserve has the most optimal growing conditions for cloudberry.