

МЕЖПОПУЛЯЦИОННЫЕ РАЗЛИЧИЯ СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПЛОДОВ МОРОШКИ ПРИЗЕМИСТОЙ (*RUBUS CHAMAEMORUS* L.)

Страх Я. Л.^{а)}, доцент, к.б.н. Игнатовец О. С., доцент, к.х.н. Леонтьев В. Н.

Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет»,
Республика Беларусь, г. Минск, ул. Свердлова, д. 13 а, 220006

а) автор для переписки – y.strakh@gmail.com

Аннотация. Изучение биологической активности растений представляет значительный интерес как для поиска новых источников сырья для создания фитопрепаратов, так и для анализа условий произрастания. Антиоксидантная активность растений проявляется благодаря наличию целого спектра фенольных соединений, биосинтез которых зависит от ряда факторов. В работе приведены результаты исследований по содержанию фенольных соединений, в том числе флавоноидов, в плодах морошки приземистой популяций, произрастающих в различных геоклиматических зонах ареала обитания данного вида растения. Дана оценка перспективности использования плодов морошки приземистой для разработки растительных препаратов, обладающих антиоксидантной активностью. Выявлено, что наиболее перспективным источником фенольных соединений, обладающих антиоксидантной активностью является популяция, произрастающая на территории южной границы ареала обитания (Республика Беларусь).

Ключевые слова: морошка приземистая, *Rubus chamaemorus* L., популяция, плоды, фенольные соединения, флавоноиды, антиоксидантная активность.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время поиск новых перспективных видов растительного сырья, как источника биологически активных веществ, является весьма актуальной задачей. Накопление указанных веществ зависит от целого ряда характеристик: вид, геоклиматические условия, стрессовые факторы и др. Существует множество исследований, направленных на поиск взаимосвязи закономерностей влияния вышеуказанных факторов на биосинтез вторичных метаболитов. В наибольшей степени интерес представляет сравнительный анализ накопления фенольных соединений растений, которые вносят основной вклад в антиоксидантную защиту клетки.

Морошка приземистая (*Rubus chamaemorus* L.) – высшее растение, которое является хозяйственно полезным и перспективным видом сырья для фармацевтической и пищевой промышленности. На территории Республики Беларусь проходит южная граница ареала обитания. В настоящий момент недостаточно сведений о закономерностях накопления фенольных соединений в зависимости от географического расположения популяции.

В связи с вышеизложенным, целью исследований являлось изучение межпопуляционных различий по содержанию фенольных соединений в плодах морошки приземистой, а также определение антиоксидантной активности экстрактов данного растения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Объектом исследований являлись плоды морошки приземистой, произрастающей на территории Республики Беларусь (заказник «Лонно»), Латвийской Республики, Российской Федерации (Республика Карелия).

Экстракцию образцов проводили при температуре 60 °С в течение 40 минут, соотношение сырье : экстрагент составляло 1 : 50, концентрация этанола 70% (ГФ РБ, Т.1, стр. 699).

Для определения содержания фенольных соединений использовали реактив Фолина-Чокальтеу (Sigma-Aldrich, партия SHBK8810, годен до 09.2023 г., Германия), дистиллированную воду (ГФ РБ, Т.1, стр. 616), карбонат натрия (ОАО «Белреахим», ГОСТ 83-79, годен до 02.2022 г., ЧДА). В качестве стандарта использовали галловую кислоту (Sigma-Aldrich, партия SLCB2701, годен до 04.2021 г., Германия).

Для определения содержания флавоноидов использовали алюминия хлорид (PanReac AppliChem ITW Reagents партия 000126541, годен до 06.03.2025, Испания, USP, BP, Ph. Eur.), этиловый спирт (ГФ РБ, Т.1, стр. 699), уксусную кислоту (ОАО «Белреахим», ГОСТ 61-75, годен до 10.2021 г., ХЧ). В качестве стандарта использовали рутин (Sigma-Aldrich, партия BCBS3798, годен до 06.2021 г., Германия).

Для оценки общей антиоксидантной активности фосфолибденовым методом использовали серную кислоту (ОАО «Белреахим», ГОСТ 4204-77, годен до 12.2021 г., ХЧ), фосфат натрия (Sigma-Aldrich, партия 0000114917, годен до 12.2020 г., Германия), молибдат аммония (Sigma-Aldrich, партия 0000042294, годен до 07.2021 г., Германия). В качестве стандарта использовали аскорбиновую кислоту (Supelco, партия LRAA9813, годен до 31.12.2020 г., Германия).

Все реактивы приобретены кафедрой биотехнологии БГТУ.

Методы. Влажность образцов определяли с помощью методики приведенной в [1].

Исследование содержания фенольных соединений в экстрактах методом Фолина-Чокальтеу.

Определение концентрации фенольных соединений проводили методом Фолина-Чокальтеу в модификации Синглетона и Росси [2].

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

Для измерения концентрации фенольных соединений в экстрактах в пробирку вносили 0,25 мл исследуемого спиртового экстракта, 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 минуты по 1,0 мл раствора Na_2CO_3 .

Пробирки с реакционной смесью интенсивно встряхивали и оставляли на 2 часа, после чего проводили измерение оптической плотности на спектрофотометре Specord 200 PLUS (Analytik Jena, Германия) при длине волны 765 нм. Содержание фенольных соединений в экстракте определяли с помощью калибровочного графика, который строили по приведенной ранее методике, где вместо экстракта были внесены точные количества раствора галловой кислоты.

Содержание внутриклеточных фенольных соединений в экстрактах рассчитывали по формуле:

$$P = \frac{C_p \cdot V_{\Sigma} \cdot 100}{m \cdot (100 - W) \cdot 1000},$$

где P – общее содержание внутриклеточных фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту, мг-экв галловой кислоты/г сухого веса; C_p – концентрация фенольных соединений, рассчитанная по калибровочному графику, исходя из оптической плотности реакционных смесей, мг-экв галловой кислоты /л; V_{Σ} – общий объем экстракта, мл; 100 – перевод процентов в доли, m – масса навески, г; W – влажность сырья, %; 1000 – коэффициент перевода л в мл.

Определение содержания флавоноидов [3].

Для количественного определения флавоноидов в экстрактах растений в мерную колбу вместимостью 5 мл помещали 0,4 мл экстракта, добавляли 0,4 мл 1 % раствора алюминия хлорида в 95 % этиловом спирте, 0,1 мл 33 % раствора уксусной кислоты и доводили объем раствора 95 % этиловым спиртом до метки. Для приготовления раствора сравнения в другую колбу вместимостью 5 мл помещали 0,4 мл исследуемого раствора, 0,1 мл 33 % раствора

уксусной кислоты и доводили до метки 95 % этиловым спиртом. Измерение оптической плотности проводили через 20 минут при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Параллельно измеряли оптическую плотность реакционной смеси содержащей стандартный раствор рутина. Для этого 0,4 мл 0,02 % стандартного раствора рутина помещали в мерную колбу 5 мл, прибавляли 0,4 мл 1 % раствора алюминия хлорида, 0,1 мл 33 % раствора уксусной кислоты и доводили до метки 95 % этиловым спиртом. Для приготовления раствора сравнения в колбу вместимостью 5 мл помещали 0,4 мл стандартного раствора рутина, 0,1 мл 33 % раствора уксусной кислоты и доводили до метки 95 % этиловым спиртом. Суммарное содержание флавоноидов (X , мг-экв рутина / г абсолютно сухого сырья) в исследуемых экстрактах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot C_{СТ} \cdot V_{Э} \cdot 1000 \cdot 100}{A_{СТ} \cdot m \cdot (100 - W) \cdot V_x \cdot 100},$$

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

Общая антиоксидантная активность была оценена фосфомолибденовым методом [4].

Фосфомолибденовый метод определения общей антиоксидантной активности основан на способности атомов и молекул отдавать электроны, восстанавливая молибден (VI) в молибден (V) с помощью пробы анализируемого вещества и последующим образованием фосфата/Mo(V) – комплекса с максимумом поглощения при 695 нм. К 0,2 мл экстракта вносили 1 мл раствора 0,6 М серной кислоты, 1 мл раствора 28 мМ фосфата натрия и 1 мл раствора 4 мМ молибдата аммония. Пробирки с крышкой инкубировали в термостате при 95 °С в течение 90 минут. После охлаждения до комнатной температуры измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Specord 200 PLUS (Analytik Jena, Германия) при 695 нм по отношению к холостому образцу, в который вносили 0,2 мл 70 % этилового спирта. Активность сравнивали с 1,7 мМ раствором аскорбиновой кислоты (Supelco, партия LRAA9813, годен до 31.12.2020 г., Германия) в качестве стандарта.

Общую антиоксидантную активность рассчитывали по следующему уравнению:

$$\% \text{ от общей антиоксидантной емкости} = \left(\frac{A_{\text{контр}} - A_x}{A_{\text{контр}}} \right) \cdot 100\%,$$

где $A_{\text{контр}}$ – оптическая плотность контроля;

A_x – оптическая плотность исследуемого образца.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных исследований по анализу содержания биологически активных веществ и определению общей антиоксидантной активности представлены в Таблице.

Таблица – Содержание биологически активных веществ и общая антиоксидантная активность плодов *Rubus chamaemorus* L.

Объект исследования	Содержание внутриклеточных фенольных соединений, мг-экв галловой кислоты / г абсолютно сухого сырья	Содержание флавоноидов, мг-экв рутина / г абсолютно сухого сырья	Общая антиоксидантная активность (ОАА), %
Плоды морошки приземистой,	33,02±2,12	9,25±0,96	56,52±2,38

Республика Беларусь, заказник «Лонно»			
Плоды морошки приземистой, Латвийская Республика	25,10±1,87	7,58±0,68	41,18±2,44
Плоды морошки приземистой, Российская Федерация, Республика Карелия	20,53±1,54	6,83±0,61	35,24±1,85

Благоприятными условиями для произрастания морошки являются следующие: высокий уровень влажности воздуха и почвы, неглубокое прохождение подземных вод, стабильный уровень температур без резких перепадов, высокий уровень освещенности.

Северный регион РБ является южной границей ареала обитания морошки приземистой и характеризуется не самыми оптимальными климатическими условиями для жизнедеятельности данного вида растения. Для указанного региона характерно наличие таких стрессовых факторов для морошки, как средний уровень освещенности, низкая влажность и резкие перепады температур. В связи с этим мы наблюдали высокое содержание фенольных соединений, в том числе флавоноидов в плодах морошки, произрастающей в заказнике «Лонно». В тоже время северные популяции (Республика Карелия) характеризуются низким накоплением указанных вторичных метаболитов. Так как фенольные соединения вносят основной вклад в формирование антиоксидантных свойств, то их содержание коррелирует с общей антиоксидантной активностью экстрактов. Наибольшее значение ОАА имел образец плодов заказника «Лонно» (Республика Беларусь) в сравнении с образцами РФ и Латвии. Таким образом, очевидно, что содержание фенольных соединений и флавоноидов зависит от геоклиматических условий произрастания популяции.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты позволяют сделать выводы о межпопуляционных различиях содержания фенольных соединений и антиоксидантной активности плодов морошки приземистой. Наиболее перспективным источником фенольных соединений для разработки фитопрепаратов с антиоксидантной активностью является популяция, произрастающая на территории Республики Беларусь.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственная фармакопея Республики Беларусь. В 2 т. Т. 1. Общие методы контроля качества лекарственных средств / Центр экспертиз и испытания в здравоохранении; под общ. ред. А. А. Шерякова. – Молодечно: Победа, 2012. – 1220 с.
2. Singleton, V. L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent / V.L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventós // *Methods in Enzymology*. – 1999. – Vol. 299. – P. 152–178.
3. Мальцева, Е.М. Количественное определение суммарного содержания флавоноидов в траве кровохлебки лекарственной / Е.М. Мальцева, Н.О. Егорова, И.Н. Егорова // *Вестник уральской медицинской академической науки*. – 2011. – № 3(1). – С. 68.
4. Rahini, D. In-vitro antioxidant activity of *Artabotrys hexapetalus* / D. Rahini, R. Anuradha // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – 2014. – Vol. 5(2). – P. 396–405.

INTERPOPULATION DIFFERENCES IN THE CONTENT OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF CLOUDBERRY FRUITS (*RUBUS CHAMAEMORUS* L.)

Strakh Ya. L.^{a)}, Associate Professor, Ph.D. in Biology Ignatovets O. S.,

Associate Professor, Ph.D. in Chemistry V. N. Leontiev

Belarusian State Technological University, Republic of Belarus, Minsk, Sverdlova str., 13 a, 220006

a) corresponding author – y.strakh@gmail.com

Abstract. The study of the biological activity of plants is of considerable interest both for the search for new sources of raw materials for the creation of herbal treatment and for the analysis of growing conditions. The antioxidant activity of plants is manifested due to the presence of a whole spectrum of phenolic compounds, the biosynthesis of which depends on a number of factors. The paper presents the results of studies on the content of phenolic compounds, including flavonoids, in the fruits of cloudberry populations growing in different geoclimatic zones of the habitat of this plant species. An assessment of the prospects of using the fruits of cloudberry for the development of herbal preparations with antioxidant activity is given. It was revealed that the most promising source of phenolic compounds with antioxidant activity is the population growing on the territory of the southern border of the habitat (Republic of Belarus).

Keywords: *cloudberry, Rubus chamaemorus L., population, fruits, phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity.*