

## ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ВОДНО-ЭТАНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ПЛОДОВ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА ROSACEAE

Н.Ю. Колбас, В.Н. Решетников\*

УО «Брестский государственный университет имени А.С. Пушкина», Брест, Республика Беларусь, e-mail: n.kolbas@gmail.com

\*ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь, e-mail: v.reshetnikov@cbg.org.by

### Введение

В последние десятилетия активно изучается роль отдельных классов фенольных соединений (ФС) в профилактике и лечении многих заболеваний человека [1], а также их антиоксидантная активность [2, 3]. Перспективными источниками этих биологически активных веществ являются плоды представителей семейства Rosaceae Juss [4, 5].

Разработка фитопрепаратов и биологически активных добавок предусматривает детальное изучение биохимического состава той или иной лекарственной формы, с целью добиться максимального лечебного или профилактического эффекта, а также дать рекомендации по стандартизации фармакологической продукции и установлению ее подлинности. Технология производства должна быть направлена на целенаправленное извлечение действующих веществ в максимальном количестве при сохранении их высокой природной активности и функциональной направленности.

Целью данной работы является изучение состава фенольных соединений водно-этанольных экстрактов плодов пяти представителей семейства Rosaceae.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

- 1) определить общее количество ФС, содержание антоцианов, флавонолов и флаван-3-олов;
- 2) рассчитать степень извлечения компонентов из нативного сырья;
- 3) изучить динамику изменения содержания ФС и антоцианов в процессе хранения водно-этанольных экстрактов.

### Методы исследования

Объектами данного исследования служили водно-этанольные экстракты плодов пяти представителей семейства Rosaceae – *Amelanchier spicata* (Lam.) C. Koch (ирга колосистая), *Rubus caesius* L. (ежевика сизая), *Rubus fruticosus* L. (ежевика кустистая), *Rubus nessesensis* W. Hall. (ежевика неская), *Rubus idaeus* L. (малина обыкновенная).

Для получения экстрактов использовали сублимированные плоды, которые дважды обрабатывали 70%-ным этанолом в соотношении 1 г к 10 мл. Каждый этап экстракции длился 10 минут при температуре +22°C и максимальном давлении 1500-1700 psi, в инертной атмосфере азота с применением экстрактора ASE-350 (фирма «Dionex», США). Полученные экстракты хранили в сосудах из темного стекла при температуре +4°C без доступа света и воздуха.

Содержание ФС определяли по реакции аликвотного объема водно-этанольного экстракта с реактивом Folin-Ciocalteu согласно методике [6] и при длине волны 765 нм. Общее количество ФС рассчитывали в мг галловой кислоты на мл водно-этанольного экстракта.

Количественный анализ антоцианов проводили методом рН-дифференциальной спектрофотометрии [7]. Для исходного водно-этанольного экстракта готовили по два разбавления с использованием 0,025М хлоридного (рН=1,0) и 0,4М ацетатного (рН=4,5) буферных растворов. Оптическую плотность каждого из полученных растворов измеряли при  $\lambda=510$  нм и  $\lambda=700$  нм, при длине пути светового монохромного луча в 1 см на

спектрофотометре Proscan MC 122. Содержание антоцианов (САН) в мл водно-этанольного экстракта в пересчете на мг цианидин-глюкозида рассчитывали по формуле:

$$CAH = \frac{[(A_{510pH_{1,0}} - A_{700pH_{1,0}}) - (A_{510pH_{4,5}} - A_{700pH_{4,5}})] \times Mm \times F}{E \times l}$$

где  $A_{510pH_{1,0}}$ ;  $A_{700pH_{1,0}}$  – оптические плотности разбавленных экстрактов в хлоридном буфере;  $A_{510pH_{4,5}}$ ;  $A_{700pH_{4,5}}$  – оптические плотности разбавленных экстрактов в ацетатном буфере;  $Mm$  – молекулярная масса стандарта, г/моль (449,2 для цианидин-глюкозида);  $F$  – коэффициент разведения;  $E$  – коэффициент молярной экстинкции (26900 для цианидин-глюкозида);  $l$  – длина оптического пути, см.

Определение количества флавонолов в водно-этанольных экстрактах проводили по реакции с  $AlCl_3$  при  $\lambda=415$  нм, как описано в работе [8] и выражали в мг кверцетина на мл.

Для анализа флаван-3-олов использовали метод P. Ribéreau-Gayon [9]. Общее количество флаван-3-олов выражали в мг катехина на мл водно-этанольного экстракта.

Все опыты проводили в трехкратной повторности. Для статистической обработки полученных данных применяли программу R software version 2.9.2.

### Результаты и их обсуждение

Полученные данные о составе ФС водно-этанольных экстрактов плодов пяти видов Rosaceae представлены в таблице 1. Общее количество ФС водно-этанольных экстрактов плодов изученных растений варьирует от 0,828 до 1,455 мг галловой кислоты на мл и снижается в последовательности: *R. nessensis* > *R. caesius* ≈ *A. spicata* > *R. fruticosus* > *R. idaeus*. Содержание антоцианов составляет 0,075–0,326 мг цианидин-глюкозида на мл и изученные водно-этанольные экстракты можно распределить следующим образом: *R. caesius* > *A. spicata* ≈ *R. nessensis* > *R. fruticosus* > *R. idaeus*. Количество флавонолов колеблется от 0,022 до 0,132 мг кверцетина на мл и снижается в последовательности: *A. spicata* > *R. nessensis* > *R. fruticosus* > *R. caesius* > *R. idaeus*. Общее содержание флаван-3-олов варьирует от 0,148 до 0,347 мг катехина на мл водно-этанольного экстракта и уменьшается в ряду: *R. idaeus* > *R. nessensis* ≈ *R. caesius* ≈ *A. spicata* > *R. fruticosus*.

Таблица 1 – Содержание фенольных соединений в водно-этанольных экстрактах плодов пяти видов семейства Rosaceae

Вид	ОКФС	САН	СФл	СФл-3-ол
<i>Amelanchier spicata</i>	1,269 <sup>a</sup> ±0,09	0,304 <sup>a</sup> ±0,008	0,132 <sup>a</sup> ±0,001	0,283 <sup>a</sup> ±0,008
<i>Rubus caesius</i>	1,331 <sup>ac</sup> ±0,064	0,326 <sup>b</sup> ±0,007	0,05 <sup>b</sup> ±0,0019	0,289 <sup>a</sup> ±0,011
<i>Rubus fruticosus</i>	0,942 <sup>b</sup> ±0,004	0,184 <sup>c</sup> ±0,003	0,061 <sup>c</sup> ±0,002	0,148 <sup>b</sup> ±0,006
<i>Rubus nessensis</i>	1,455 <sup>c</sup> ±0,038	0,293 <sup>a</sup> ±0,005	0,084 <sup>d</sup> ±0,003	0,297 <sup>a</sup> ±0,012
<i>Rubus idaeus</i>	0,828 <sup>d</sup> ±0,02	0,075 <sup>d</sup> ±0,002	0,022 <sup>e</sup> ±0,002	0,347 <sup>c</sup> ±0,008

Примечание: ОКФС – общее количество фенольных соединений (в мг галловой кислоты/мл), САН – содержание антоцианов (в мг цианидин-глюкозида/мл), СФл – содержание флавонолов (в мг кверцетина/мл), СФл-3-ол – содержание флаван-3-олов (в мг катехина/мл); *a, b, c, d, e* – статистические различия в пределах параметра (Tukey-тест, при  $p \leq 0,05$ ).

Среди водно-этанольных экстрактов плодов растений подрода *Eubatus* (Ежевика) между *R. fruticosus* и *R. caesius*, *R. nessensis* установлены статистические различия по четырем изученным параметрам. Водно-этанольные экстракты *R. caesius* и *R. nessensis* не различаются по содержанию флаван-3-олов и общему количеству ФС. При этом содержание флавонолов в 1 мл экстракта плодов *R. caesius* в 1,7 раз меньше, чем в соответствующем объеме экстракта плодов *R. nessensis*.

Примененный в данном исследовании метод двухступенчатой экстракции позволил извлечь из нативного сырья от 32,2% до 63,2% всех ФС, в том числе от 68,9% до 98,8% антоцианов, от 54,8% до 79,4% флавонолов и от 51,8% до 90,4% флаван-3-олов. Наиболее эффективным примененный метод экстракции был для плодов *R. idaeus*, так как обеспечил высокое извлечение всех ФС, в том числе антоцианов, флавонолов и флаван-3-олов.

Корреляционные связи между изученными параметрами представлены в таблице 2. Антоцианы вносят наибольший вклад в общее количество ФС водно-этанольных экстрактов плодов *A. spicata*, *R. caesius*, *R. fruticosus* и *R. nessesis*. Положительный коэффициент корреляции выявлен между количеством антоцианов и флавонолов, что вероятно связано с синергизмом в извлечении компонентов из нативного сырья при двуступенчатой экстракции 70%-ным этанолом. Статистический анализ подтвердил достоверность полученных результатов об отрицательной зависимости между концентрацией антоцианов и свободных флаван-3-олов, что возможно связано с копигментацией или образованием полимерных танинов.

Таблица 2 – Коэффициенты корреляции (*r*-Pearson) между общим количеством фенольных соединений (ОКФС) и содержанием антоцианов (САН), флавонолов (СФл), флаван-3-олов (СФл-3-ол) водно-этанольных экстрактов

	ОКФС	САН	СФл	СФл-3-ол
ОКФС	–	0,963***	0,533*	0,03
САН		–	0,626*	-0,980***
СФл			–	0,018
СФл-3-ол				–

Примечание. \*\*\* – достоверно при уровне значимости (*p*) менее 0,001; \*\* – при  $0,001 \leq p < 0,01$ ; \* – при  $0,01 \leq p < 0,05$ .

Для достижения наибольшего содержания действующего вещества необходимо не только соблюдать точные сроки заготовки растительного сырья и условия его переработки, но и учитывать условия и сроки хранения той или иной лекарственной формы.

На рисунке 1 представлена динамика изменения общего количества ФС и антоцианов водно-этанольных экстрактов в процессе их хранения в течение 18 месяцев. Установлено, что после 6 месяцев хранения содержание ФС экстрактов плодов *R. nessesis* снижается на 6,5%, а дальнейшее изменение параметра незначительное. В целом, при хранении экстрактов плодов остальных видов изменения содержания ФС варьируют в пределах статистической погрешности. Распределение водно-этанольных экстрактов в порядке снижения значений параметра сохраняется на всех этапах хранения в следующей последовательности: *R. nessesis* ≈ *R. caesius* > *A. spicata* > *R. fruticosus* > *R. idaeus*.

Антоцианы химически нестабильные вещества и их устойчивость зависит и от ряда факторов, в том числе от природы растворителя [7]. На рисунке 2 представлены данные об изменении общего количества антоцианов в процессе хранения водно-этанольных экстрактов. Через 6 месяцев хранения значения параметра варьировали от 0,31 до 0,069 мг цианидин-глюкозида на мл и снижались в следующей последовательности: *R. caesius* > *A. spicata* ≈ *R. nessesis* > *R. fruticosus* > *R. idaeus*. После 12 месяцев хранения общее количество антоцианов водно-этанольных экстрактов составило 0,065–0,28, при этом их ранжирование изменилось следующим образом: *A. spicata* > *R. nessesis* ≈ *R. caesius* > *R. fruticosus* > *R. idaeus*. Минимальные потери количества антоцианов выявлены для экстрактов плодов *A. spicata* и составили 2,8%, 7,0% и 20,3% от начального значения за 6, 12 и 18 месяцев хранения соответственно. Максимальные потери содержания антоцианов при хранении характерны для экстрактов плодов *R. caesius* и *R. idaeus*. Для экстрактов плодов *R. caesius* снижение общего количества антоцианов составило 4,5% от начального за 6 месяцев хранения, 21,7% – за 12 и 44,2% – за 18 месяцев. Данный параметр для экстрактов плодов *R. idaeus* снижался на 6,9% при хранении 6 месяцев, на 12,7% – за 12 и 47,6% – за 18 месяцев.

Полученные результаты для водно-этанольных экстрактов *R. idaeus* вполне согласуются с данными, имеющимися в литературе. Согласно литературным данным при хранении свежих плодов *R. idaeus* сохранение содержания антоцианов наблюдается в течение 3–8 дней при

температуре +4°C [10, 11] и снижается на 15–20% при длительном хранении даже в условиях заморозки (-20°C).

Выявленные изменения содержания антоцианов водно-этанольных экстрактов в процессе их хранения связаны с особенностями биохимического состава экстрактов. Согласно нашим данным [12] антоцианы водно-этанольных экстрактов плодов *A. spicata* образованы производными только цианидина и они показали наибольшую устойчивость при хранении. В то время как водно-этанольные экстракты плодов *R. caesius* кроме соединений цианидина содержат дельфинидин и петунидин, а *R. idaeus* – мальвидин и пеларгонидин. Водно-этанольные экстракты плодов *R. idaeus*, характеризующиеся наименьшей устойчивостью антоцианов, превосходят другие экстракты по содержанию флаван-3-олов, что может быть связано с деструкцией антоцианов.

### Выводы

Примененный в данном исследовании метод двухступенчатой экстракции 70%-ным этанолом показал высокую эффективность в извлечении биологически активных веществ фенольной природы из нативного сырья. Водно-этанольные экстракты плодов *R. nessensis* характеризуются высоким содержанием ФС, экстракты плодов *R. caesius* – содержанием антоцианов, а экстракты плодов *A. spicata* – количеством флавонолов. Водно-этанольные экстракты плодов *R. idaeus* отличаются более высоким содержанием флаван-3-олов, а также наименьшим содержанием ФС, в том числе антоцианов и флавонолов.

Хранение водно-этанольных экстрактов при температуре +4°C, без доступа света и воздуха может быть пролонгировано без потери фармакологической ценности до 1 года для экстрактов плодов *A. spicata* и до 6 месяцев для экстрактов *R. nessensis*, *R. caesius*, *R. fruticosus*. Водно-этанольные экстракты плодов *R. idaeus* уступают по срокам хранения экстрактам других изученных видов.

Полученные данные о достаточно высоком содержании ФС, антоцианов, флавонолов, флаван-3-олов, а также имеющиеся сведения о терапевтическом действии и антиоксидантной активности, позволяют рекомендовать водно-этанольные экстракты плодов изученных растений для производства биологически активных добавок поливалентного действия.

### Список литературы

1. Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition, and pharmacology / ed. C.G. Fraga. – Hoboken, New Jersey: Wiley, 2010. – 594 p.
2. Rice-Evans, C.A. Antioxidant properties of phenolic compounds / C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga // Trends in plant science. – 1997. – Vol. 2, № 4. – P. 152–159.
3. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests / J. Tabart [et al.] // Food Chem. – 2009. – Vol. 113. – P. 1226–1233.
4. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds / M.P. Kähkönen [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 1999. – Vol. 47, № 10 – P. 3954–3962.
5. Колбас, Н.Ю. Антоцианы и антиоксидантная активность плодов некоторых представителей рода *Rubus* / Н.Ю. Колбас, М.-А. Силва, П.-Л. Тэссэдр, В.Н. Решетников // Весці НАН Беларусі, сер. біялагічных навук. – 2012. – № 1. – С. 5–10.
6. Waterhouse, A.L. Determination of Total Phenolics/ A.L. Waterhousein // Current Protocols in Food Analytical Chemistry. – 2002. – II.1.1-II.1.8.
7. Giusti, M.M. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy / M.M. Giusti, R.E. Wrolstad // Current Protocols in Food Analytical Chemistry. – 2001. – F1.2.1–F1.2.13.
8. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods / C.C. Chang [et al.] // Journal of Food and Drug Analysis. – 2002. – № 10. – P. 178–182.
9. Phenolic compounds. / P. Ribéreau-Gayon [et al.] // Handbook of Enology. – West Sussex : John Wiley & Sons Ltd., 2006. –Vol. 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. – P. 141–203.
10. Antioxidant Capacity, Vitamin C, Phenolics, and Anthocyanins after Fresh Storage of Small Fruits / W. Kalt [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 1999. – Vol. 47, № 11. – P. 4638–4644.
11. Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries / W. Mullen [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2002. – Vol. 50, № 18. – P. 5197–5201.
12. Колбас, Н.Ю. Характеристика антоцианового комплекса водно-этанольных экстрактов плодов некоторых представителей рода *Rubus* / Н.Ю. Колбас, В.Н. Решетников // Веснік Брэсцкага ўніверсітэта, сер. 5. Хімія. Біялогія. Навукі аб зямлі. – 2011. – № 2. – С. 40–47.