

КОМПЛЕКСНЫЙ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МОРОШКИ ПРИЗЕМИСТОЙ БЕЛОРУССКИХ ПОПУЛЯЦИЙ

Я. Л. Страх*, О. С. Игнатовец, О. Г. Совастей

УДК 543.42.062:581.19:547.56

Белорусский государственный технологический университет,
Минск, Беларусь; e-mail: y.strakh@gmail.com

(Поступила 14 декабря 2022)

Исследован состав фенольных соединений экстрактов листовых пластинок морошки приземистой *Rubus chamaemorus* L. популяций заказников “Лонно”, “Ельня”, “Болото Мох” и “Жада”. Наибольшее содержание фенольных соединений наблюдалось у женского клона популяции “Лонно” и составляло 651.54 ± 21.64 мг-экв галловой кислоты/г экстракта, из них 53.5 ± 15.01 мг-экв рутина/г экстракта флавоноидов. Методом хромато-масс-спектрометрии в экстрактах идентифицированы следующие фенольные соединения: кверцетин-3-О-ксилозид, эллаговая кислота, кверцетин-3-О-глюкозид, кверцетин-3-О-глюкуронид, кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид, хлорогеновая кислота, рутин. Определено содержание кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида, кверцетин-3-О-глюкозида, эллаговой кислоты, рутина.

Ключевые слова: хромато-масс-спектрометрия, спектрофотометрия, спектр поглощения, морошка приземистая (*Rubus chamaemorus* L.), популяция, экстракт, фенольное соединение, флавоноид, фенольная кислота.

Research of the composition of phenolic compounds in extracts of leaf blades of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) populations of the reserves “Lonno”, “Yelnya”, “Boloto Mokh”, and “Zhada” was conducted. The highest content of phenolic compounds was observed in the female clone of the “Lonno” population and amounted to 651.54 ± 21.64 mg-equiv of gallic acid/g of extract, of which 53.5 ± 15.01 mg-equiv of rutin/g of flavonoid extract. The following phenolic compounds were identified in the extracts with chromatography-mass spectrometry: quercetin-3-O-xyloside, ellagic acid, quercetin-3-O-glucoside, quercetin-3-O-glucuronide, kaempferol-3-β-D-glucopyranoside, chlorogenic acid, rutin. The content of kaempferol-3-β-D-glucopyranoside, quercetin-3-O-glucoside, ellagic acid, and rutin was determined.

Keywords: chromatography-mass spectrometry, spectrophotometry, absorption spectrum, cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.), population, extract, phenolic compound, flavonoid, phenolic acid.

Введение. Фенольные соединения — один из самых изученных классов вторичных метаболитов растений. По своей природе они являются ароматическими соединениями с одной или несколькими гидроксильными группами, связанными с атомами углерода ароматического кольца. Данные вторичные метаболиты обнаружены практически во всех растительных тканях, их содержание может достигать 10 % от массы органического вещества растений, а в некоторых случаях и более [1—3].

Структурное разнообразие фенольных соединений обусловлено характером гидроксирования, стереоизомерией, а также образованием конъюгатов. Они обладают многосторонней биологической активностью в клетках растений (антиоксидантной активностью, мембраностабилизирующей способностью, защитой от ультрафиолетового излучения, патогенов, растительноядных животных), являются пигментами, субстратами различных химических реакций, эндогенными регуляторами роста, вы-

COMPREHENSIVE SPECTROSCOPIC ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS OF CLOUDBERRY POPULATIONS IN BELARUS

Ya. L. Strakh*, O. S. Ignatovets, O. G. Sovastey (Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus; e-mail: y.strakh@gmail.com)

полняют механические функции [4—13]. В процессе роста растений они аккумулируются в вакуолях клеток или полимеризуются в лигнин, который укрепляет вторичную оболочку клетки [8—10]. Обычно фенольные соединения в растительных клетках находятся в форме гликозидов.

Количество фенолов, синтезируемых в растениях, зависит от их физиологического состояния, условий произрастания и характеристики местообитания и могут стать индикаторами физиологических проявлений воздействия негативных факторов различной природы [3]. Для комплексного анализа фенольных соединений в растительных объектах чаще используют спектрофотометрические и хроматографические методы. Исследование данной группы соединений в растениях, находящихся в стрессовых условиях произрастания различной природы, является актуальным направлением биохимии растений.

Морошка приземистая (*Rubus chamaemorus* L.) — многолетнее травянистое растение семейства розовых, находящееся в Республике Беларусь под угрозой исчезновения. Вид занесен в Красную книгу, относится ко II категории охраны. Согласно [14], около 100 лет назад вид можно было встретить на более южных территориях Беларуси, однако сегодня даже популяции северных регионов находятся в зоне реального риска исчезновения. Для сохранения и поддержания вида необходимо получение и накопление информации о состоянии популяций как по внешним признакам растений, так и по биохимическим маркерам, которыми могут служить фенольные соединения. Ранее [15] было исследовано содержание фенольных соединений (антоцианов, лейкоантоцианов, катехинов, флавонов, фенолкарбоновых кислот) морошки приземистой в модельных условиях в онтогенезе и продемонстрирована зависимость накопления биологически активных веществ от стадии вегетации.

Цель настоящей работы — сравнительный анализ спектроскопическими методами межпопуляционных и гендерных различий качественного и количественного состава фенольных соединений экстрактов листьев морошки приземистой (*Rubus chamaemorus* L.).

Эксперимент. Объектом исследования служили этанольно-водные экстракты замороженных листовых пластинок *Rubus chamaemorus* L. (мужские и женские особи) дикорастущих популяций заказников “Лонно”, “Ельня”, “Болото Мох”, “Жада”. Растительное сырье собрано в фазе цветения в июне 2020 г. Экстракция фенольных соединений проведена по методике [16]. Влажность образцов определена с помощью методики [17]. Данные о межпопуляционных различиях по составу фенольных соединений белорусских популяций морошки в литературе отсутствуют.

Общее содержание фенольных соединений в пересчете на г/экв галловой кислоты определяли спектрофотометрическим методом Фолина—Чокальтеу в модификации Синглетона и Росси [18]. Калибровочный график строили на основе оптической плотности окрашенного продукта взаимодействия фосфовольфрамовых и фосфомолибденовых гетерополикислот с эталонным фенольным соединением — галловой кислотой. Указанные соединения в щелочной среде образуют комплекс синего цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации раствора стандартного образца. Для определения общего содержания флавоноидов использован спектрофотометрический метод [19]. Для флавонов и флавонолов, в частности рутина, характерны два максимума поглощения — коротковолновый (260 нм) и длинноволновый (362 нм), что может быть использовано не только с целью идентификации веществ, но и в плане количественной оценки, особенно в условиях дифференциальной спектрофотометрии. В присутствии $AlCl_3$ происходит батохромный сдвиг длинноволновой полосы с появлением максимума при 410 нм. Этот подход наиболее часто используется при анализе растительного сырья, содержащего флавоноиды, поскольку позволяет минимизировать вклад сопутствующих веществ в оптическую плотность исследуемых растворов.

Для идентификации и количественного определения фенольных соединений разработана методика хромато-масс-спектрометрического анализа. Варьировали состав и скорость подвижной фазы, а также параметры ионизации. Сухие экстракты растворяли в подвижной фазе и анализировали с помощью высокоэффективного хромато-масс-спектрометра Waters с диодно-матричным спектрофотометрическим детектором PDA 996 и масс-детектором Micromass ZQ 2000 (Waters, США). Разделение индивидуальных соединений проводили на колонке SYMMETRY C18 (Waters, США) длиной 250 мм и диаметром 4.6 мм, размер частиц 5 мкм. Для идентификации и количественного определения содержания индивидуальных соединений использовали стандартные образцы эллаговой кислоты, хлорогеновой кислоты, феруловой кислоты, коричной кислоты, кверцетина-3-О-глюкозида, рутина, кверцетина гидрата, кемпферол-3-β-О-глюкопиранозида.

Оптимальное разделение фенольных соединений наблюдали при использовании в качестве подвижной фазы ацетонитрил:0.1 % водный раствор муравьиной кислоты в соотношении 80:20 в ионно-кратическом режиме при скорости элюирования 1 мл/мин. Объем вводимой пробы 20 мкл, тип ионизации — электроспрей ионизация (ESI). Масс-спектры зарегистрированы в режиме регистрации положительных (ESI⁺) и отрицательных (ESI⁻) ионов.

Результаты и их обсуждение. Выполнены три параллельных эксперимента. Результаты представлены в виде среднего значения выборки и полуширины доверительного интервала. Для статистической обработки результатов использована программа Microsoft Office Excel 2016. Получены этанольно-водные экстракты листовых пластинок *Rubus chamaemorus* L. Экстракция фенольных соединений проведена при температуре 60 °C в течение 40 мин, соотношение сырье:экстрагент 1:50, концентрация этанола 70 %.

В табл. 1 представлено суммарное содержание внутриклеточных фенольных соединений и флавоноидов в экстрактах листовых пластинок популяций морошки приземистой, установленное спектрофотометрическим методом.

Т а б л и ц а 1. Содержание фенольных соединений и флавоноидов в экстрактах листовых пластинок *Rubus chamaemorus* L.

Происхождение образца	Пол	Содержание внутриклеточных фенольных соединений, мг-экв галловой кислоты/г экстракта	Содержание флавоноидов, мг-экв рутина/г экстракта
“Лонно”	♂	373.30±16.03	249.27±10.18
	♀	651.54±21.64	539.45±15.01
“Ельня”	♂	444.1±23.67	273.95±10.57
	♀	442.71±19.89	253.60±10.97
“Болото Мох”	♂	382.03±19.53	356.65±17.42
	♀	570.09±26.13	402.64±21.19
“Жада”	♂	391.09±13.74	234.77±15.61
	♀	393.20±21.14	248.81±13.80

В результате анализа компонентного состава и содержания индивидуальных фенольных соединений листовой массы морошки приземистой установлено, что основная часть фенольных соединений в экстрактах листовых пластинок морошки приземистой приходится на флавоноиды. Наибольшим содержанием фенольных соединений, в частности флавоноидов, характеризуются женские особи популяции “Лонно”. Для данного места произрастания отмечается достаточно низкая освещенность за счет высокого древесного яруса, однако женский клон расположен в относительно открытой зоне с высоким уровнем интенсивности света. Зона произрастания характеризуется как наиболее оптимальная согласно геоклиматическим условиям для исследуемого вида. Содержание внутриклеточных фенольных соединений у мужских особей популяций “Лонно”, “Болото Мох”, “Жада” схоже. Достаточным отличием обладает мужской клон популяции “Ельня”, где данный параметр достигает 444.01±23.67 мг-экв галловой кислоты/г экстракта. Схожая тенденция наблюдается и для флавоноидов, однако для мужского клона популяции “Болото Мох” характерно более высокое содержание флавоноидов, на долю которых приходится значительная часть фенольных соединений.

Флавоноиды — неотъемлемая часть защиты растений от стресс-факторов, в частности, окислительной природы. Наименьшим содержанием соединений данной группы характеризуется популяция заказника “Жада”. Следовательно, данная популяция имеет меньший ресурс для сопротивления негативным факторам окружающей среды.

Идентификацию фенольных соединений осуществляли на основании электронных и масс-спектров. Для флавоноидов в УФ-спектре характерны две интенсивные полосы поглощения в длинноволновой области 320—380 нм (I полоса) и в коротковолновой 240—270 нм (II полоса), а для флавонолов 350—390 и 250—270 нм соответственно. Расстояние между основными максимумами более или менее постоянно и для флавонолов составляет 93—125 нм, что может служить отличительным признаком. Гидроксильные группы оказывают значительное батохромное и гипсохромное влияние на максимумы поглощения в зависимости от их положений. Наибольшее влияние оказывают оксигруппы, сопряженные с карбонилем, другие группы имеют вспомогательное значение.

На рис. 1 представлены электронные спектры поглощения некоторых фенольных соединений. Видны характерные для фенольных соединений максимумы поглощения в УФ-области спектра, которые определяются электронным строением молекул. Следует отметить, что максимум поглощения эллаговой кислоты в длинноволновой области УФ-спектра находится при 366.4 нм, в то время как для флавоноидов характерен максимум при 353.4 нм. Присутствие гликозидных остатков в составе молекул флавоноидов характеризуется полосой при 203—204 нм (рис. 1, б и в).

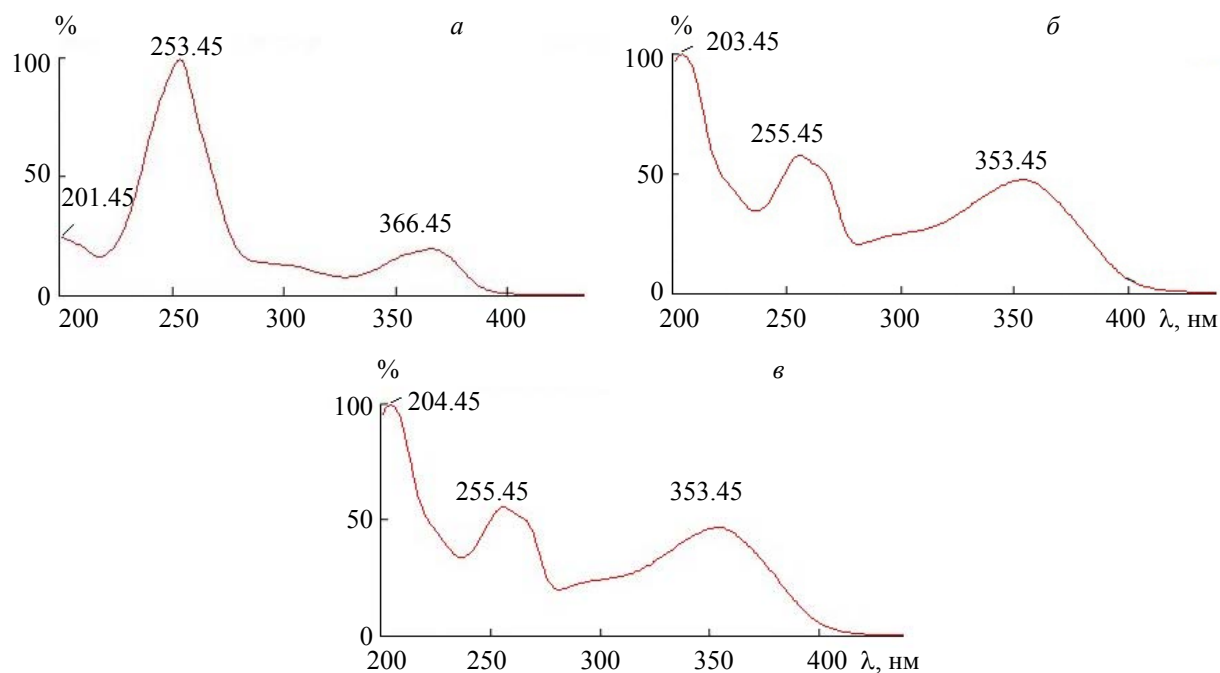
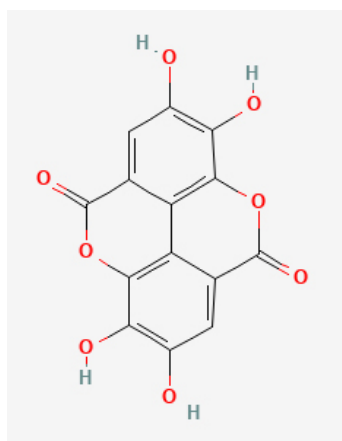
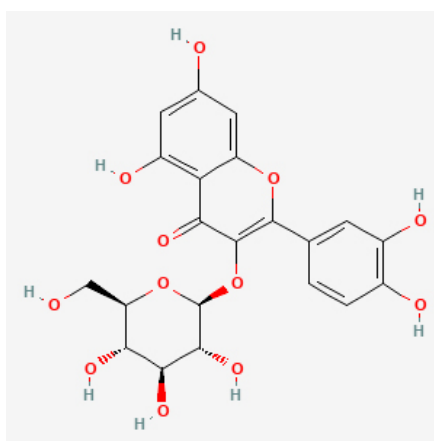


Рис. 1. Электронные спектры поглощения доминирующих фенольных соединений морошки приземистой: а — эллаговая кислота, б — кверцетин-3-О-гликозид, в — рутин

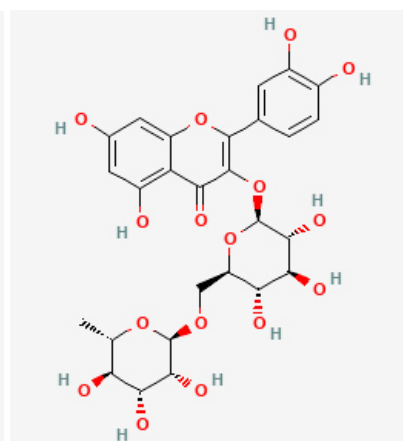
Идентифицированные фенольные соединения представлены в табл. 2. В области положительных ионов для кверцетин-3-О-ксилозида детектируется молекулярный ион с m/z 435.09, который соответствует $[M+H]^+$; для кверцетин-3-О-гликозида — с m/z 463.83, соответствующий $[M+H]^+$; для кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида — m/z 449.56 ($[M+H]^+$) и m/z 287.51, соответствующий $[M-glu+H]^+$ (агликон кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида — кемпферол); для рутина — m/z 611.16 ($[M+H]^+$); для хлорогеновой кислоты — m/z 355.68 ($[M+H]^+$). В области отрицательных ионов наблюдается молекулярный ион с m/z 301.69, соответствующий $[M-H]^-$, т. е. эллаговой кислоте, и с m/z 477.06, который соответствует $[M-H]^-$, т. е. кверцетин-3-О-гликурониду.



Эллаговая кислота



Кверцетин-3-О-гликозид



Рутин

Т а б л и ц а 2. Идентифицированные фенольные соединения в экстрактах листовых пластинок *Rubus chamaemorus* L.

Соединение	Образец							
	“Лонно”		“Ельня”		“Болото Мох”		“Жада”	
	пол		пол		пол		пол	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Кверцетин-3-О-ксилозид	+	+	+	+	+	+	+	+
Эллаговая кислота	+	+	+	+	+	+	+	+
Кверцетин-3-О-глюкозид	+	+	+	+	+	+	+	+
Кверцетин-3-О-глюкуронид	+	+	+	+	+	+	+	+
Кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид	+	+	+	+	+	+	+	+
Рутин	—	+	+	—	—	+	+	—
Хлорогеновая кислота	—	—	—	—	—	—	—	+

На основании сопоставления измеренных масс- и электронных спектров индивидуальных соединений со спектрами стандартных образцов в экстрактах листовых пластинок морошки приземистой идентифицированы фенольные соединения: кверцетин-3-О-ксилозид, эллаговая кислота, кверцетин-3-О-глюкозид, кверцетин-3-О-глюкуронид, кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид, хлорогеновая кислота, рутин. Качественный состав идентифицированных фенольных соединений у образцов анализируемых популяций и клонов разных полов схож. Отличительной особенностью женского клона популяции “Жада” является наличие хлорогеновой кислоты, которая определяет устойчивость растений к заболеваниям и обеспечивает иммунитет против фитопатогенных грибов и вирусов. Данное соединение является регулятором ростовых процессов и мощным антиоксидантом, который нейтрализует внутриклеточные свободные радикалы.

В женских клонах популяций “Лонно” и “Болото Мох” и мужских клонах популяций “Ельня” и “Жада” идентифицирован рутин. Основной функцией рутина в растениях считается обеспечение защиты от УФ-излучения.

Для количественного анализа использованы стандартные образцы. Результаты количественного определения фенольных соединений представлены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3. Количественное содержание (мг/г сухого экстракта) индивидуальных фенольных соединений в экстрактах листьев морошки приземистой различных популяций

Образец	“Лонно”		“Ельня”		“Болото Мох”		“Жада”	
	пол		пол		пол		пол	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид	1.29± 0.04	3.89± 0.11	2.44± 0.07	1.59± 0.05	2.53± 0.07	3.04± 0.09	2.78± 0.09	4.00± 0.12
Кверцетин-3-О-глюкозид	1.09± 0.03	0.45± 0.01	1.22± 0.03	1.37± 0.03	1.05± 0.02	0.88± 0.02	0.84± 0.02	0.41± 0.01
Эллаговая кислота	5.21± 0.14	3.89± 0.13	2.01± 0.08	3.58± 0.11	1.39± 0.05	2.02± 0.09	3.53± 0.15	3.21± 0.16
Рутин	—	4.66± 0.14	6.41± 0.21	—	—	4.36± 0.15	3.31± 0.12	—

Доминирующим соединением в экстрактах листовых пластинок является эллаговая кислота с содержанием от 1.39±0.05 до 5.21±0.14 мг/г сухого экстракта. Она является дилактоном, который имеет таксономическое значение, содержится только в растениях семейства розовых. В *Rubus chamaemorus* L. содержится в свободном состоянии и в связанном в составе эллаготанинов. Известно, что эллаговая кислота обладает фунгицидными свойствами и способна препятствовать размножению вирусов в макроорганизмах.

Заключение. Разработана методика хромато-масс-спектрометрического анализа, которая позволяет идентифицировать фенольные соединения в экстрактах *Rubus chamaemorus* L.: кверцетин-3-О-ксилозид, эллаговую кислоту, кверцетин-3-О-глюкозид, кверцетин-3-О-глюкуронид, кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид, рутин, хлорогеновую кислоту. На основании экспериментальных данных можно заключить, что качественные составы экстрактов листовых пластинок морошки приземистой популяций “Лонно”, “Болото Мох”, “Ельня”, “Жада” различаются незначительно, сопоставимы с литературными данными, а также соответствуют известным закономерностям в биохимии растений. Отличительным для женских клонов популяции “Жада” стало наличие хлорогеновой кислоты, для мужских клонов популяций “Ельня”, “Жада” и женских “Болото Мох”, “Лонно” — рутина, содержание которого различается для диапазонов (3.31 ± 0.12) — (6.41 ± 0.21) мг/г сухого экстракта. Данные результаты можно связать с различными условиями произрастания растений и общим уровнем воздействия стресс-факторов. Установлено, что наиболее устойчивой является популяция заказчика “Лонно”. Популяция заказчика “Жада” наименее устойчива из анализируемых и нуждается в организации мер по обеспечению ее сохранения.

- [1] В. А. Барабой. Растительные фенолы и здоровье человека, Москва, Наука (1984)
- [2] А. С. Петухов, Н. А. Хритохин, Г. А. Петухова, Т. А. Кремлева. Уч. зап. Казанского ун-та. Сер. Естеств. науки, **161**, № 1 (2019) 93—107
- [3] М. Н. Запроматов. Физиол. растений, **40**, № 6 (1993) 920—931
- [4] М. Н. Запроматов. Фенольные соединения и их роль в жизни растения, Москва, Наука (1996)
- [5] Н. В. Загоскина, Г. А. Дубравина, М. Н. Запроматов. Физиол. растений, **47** (2000) 537—543
- [6] М. Н. Запроматов, Т. Н. Николаева. Физиол. растений, **50** (2003) 699—702
- [7] Н. В. Загоскина, Н. А. Олениченко, С. В. Климов, Н. В. Астахова, Е. А. Живухина, Т. И. Трунова. Физиол. растений, **52** (2005) 366—371
- [8] C. B. Rasmussen, H. B. Dunford, K. G. Welinder. Biochemistry, **34**, N 12 (1995) 4022—4029
- [9] A. J. Parr, A. Ng, K. W. Waldron. J. Agric. Food Chem., **45**, N 7 (1997) 2468—2471
- [10] K. Wakabayashi, T. Hoson, S. Kamisaka. Plant Physiol., **113**, N 3 (1997) 967—973
- [11] М. С. Бардинская. Растительные клеточные стенки, их образование, Москва, изд-во АН СССР (1964)
- [12] В. И. Кефели. Природные ингибиторы роста и фитогормоны, Москва, Наука (1974)
- [13] V. I. Kefeli, M. V. Kalevitch. Natural Growth Inhibitors and Phytohormones in Plants and Environment, Berlin, Springer Science and Business Media (2003)
- [14] Л. И. Хоружик. Красная книга Республики Беларусь: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений, Минск, Белорусская энциклопедия (2005)
- [15] К. Э. Вогулкин, Н. В. Вогулкина, Л. Н. Шандрикова, А. П. Яковлев. Вестн. ВГУ, **51**, № 1 (2009) 117—140
- [16] Я. Л. Страх, О. С. Игнатовец. Химия растит. сырья, № 4 (2021) 319—325
- [17] K. Rapp, S. K. Næss, H. J. Swartz. In: New Crops, Eds. J. Janick, J. E. Simon, Wiley, New York (1993) 524—526
- [18] E. Small. North American Cornucopia, Boca Raton (2013)
- [19] E. Hulten. Flora of Alaska and Neighboring Territories: A Manual of the Vascular Plants, Stanford University Press (1968)