

УДК 54.056

ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ЭКСТРАКТОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ *Calluna vulgaris*

© 2023 г. О. О. Бабич¹, А. Х. Бахтиярова¹, О. В. Кроль¹,
И. Г. Самусев¹, А. В. Цибульникова¹, С. А. Сухих^{1, *}

¹ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет
имени Иммануила Канта», Калининград, 236016 Россия

*e-mail: stas-asp@mail.ru

Поступила в редакцию 03.10.2023 г.

После доработки 16.10.2023 г.

Принята к публикации 01.11.2023 г.

Выделены и исследованы антиоксидантная активность экстрактов и биологически активных соединений, полученных из цветущих побегов вереска обыкновенного *C. vulgaris* L., произрастающего в Калининградской области России, и оценен фитохимический профиль полученных экстрактов. Наибольшая антиоксидантная активность, обнаружена в метанольных экстрактах. Ее значения согласуются с общим содержанием в них фенольных веществ. Из экстрактов были выделены с концентрацией не менее 92.0 отн. % гиперозид и хлорогеновая кислота, структура которых подтверждена методами УФ и ИК спектроскопии. Антиоксидантная активность индивидуальных биологически активных веществ значительно превышала активность метанольных экстрактов. Таким образом, экстракты и биологически активные вещества, полученные из *C. vulgaris* L., произрастающего на территории Калининградской области, обладают большим потенциалом в качестве источника природных антиоксидантов для использования их в функциональных продуктах питания с целью замедления процессов старения и улучшения качества жизни.

Ключевые слова: старение, *Calluna vulgaris*, антиоксидантная активность, свободные радикалы, хлорогеновая кислота, гиперозид, биологически—активные вещества

DOI: 10.56304/S0234275823050022

Окислительный стресс сопровождается и/или является одним из ключевых патогенетических звеньев в развитии преждевременного старения. Оксидативным стрессом считают нарушение баланса между образованием свободных радикалов и механизмов антиоксидантной защиты [1, 2]. При преждевременном старении в клетках увеличивается уровень активных форм кислорода, повышается интенсивность окислительных процессов в митохондриях, снижается антиоксидантная защита. Этот процесс приводит к появлению широкого спектра болезней в старости, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, заболевания нервной и мочевыделительной системы, возрастные изменения зрения [3–7].

Список сокращений: БАВ — биологически активные вещества, DPPH — 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил, ABTS — 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты) диаммониевая соль, FRAP — ferric reducing antioxidant power, TFA — трифторуксусная кислота, t_R — время удерживания, FTIR — инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье.

В настоящее время ведутся поиски методов воздействия на оксидативный стресс, изучаются естественные и синтетические антиоксиданты, оценивается их влияние на интенсивность окислительных процессов в клетках и организме человека в целом. Один из основных факторов, определяющих здоровье населения — полноценное, сбалансированное питание [8–11]. Перспективными функциональными добавками в продукты питания являются полученные из лекарственных растений БАВ, поскольку они обладают широким спектром полезного действия на организм, лучше переносятся, значительно реже вызывают побочные аллергические реакции и, как правило, не обладают кумулятивными свойствами, что, с учетом роста средней продолжительности жизни человека, особенно важно для лиц пожилого возраста [1, 12]. Применение БАВ из лекарственных растений способствует появлению на рынке натуральных продуктов, обладающих профилактическими и антиоксидантными свойствами, формирующимися за счет широкого спектра амфифильных молекул, от-

носящихся к фенольным соединениям, которые обладают выраженными окислительно–восстановительными свойствами, позволяющими замедлять процессы окислительного стресса [13, 14].

Для создания нутрицевтиков лекарственные растения, произрастающие на территории Калининградской области, являются перспективным источником сырья, поскольку в данном регионе произрастает их большое количество, а данных по многим из них в научной публицистике недостаточно. Одним из таких растений является вереск обыкновенный (*Calluna vulgaris*).

Calluna vulgaris — это древесный вечнозеленый карликовый кустарник с сильно ветвящимися стеблями [15, 16]. Цветки или цветущие верхушки побегов содержат флавоноиды, гликозид, дубильные вещества и полисахариды [17, 18]. За счет высокой концентрации БАВ экстракты *C. vulgaris* L. обладают антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами.

Целью исследования является получение, идентификация и изучение биологически активных веществ *C. vulgaris* L.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объект исследования

В качестве объектов исследования выбрано растение *C. vulgaris* Калининградской области. Побеги на стадии цветения были собраны в период с июня по октябрь 2021 года. Таксономическая идентичность растительного материала была подтверждена в соответствии с протоколом № 8/2021 к.г.н. Пунгиным А.В., заведующим гербарием Высшей школы живых систем БФУ им. И. Канта.

Все стандарты и реагенты, использованные в работе с чистотой не ниже химически чистой, поставляла компания ООО “АГ Аналитэксперт”, Россия.

Получение экстрактов и определение общего выхода

Материал сушили в два этапа: сначала на открытой поверхности в тени, а затем в сушильном шкафу при температуре 40–60°C. Для экстракции биологически активных веществ применяли этилацетат, метанол и 60%-ный этанол. Этилацетатные и метанольные экстракты получали на аппарате Сокслета (11 циклов по 6 ч). Водно–спиртовые экстракты были получены путем мацерации на кипящей водяной бане с обратным холодильником 60 мин при модуле экстракции 1 : 20 [19]. Общий выход экстрактов определяли гравиметрически. Полученные экстракты концентрировали в вакуумном роторном испарителе RV 8 V (IKA, Германия) и сушили в сублимационной сушилке Labconco Triad (Labconco, США).

Измерение антиоксидантной активности

Антиоксидантные свойства активных фракций метанольных экстрактов определяли тремя методами, которые основаны на одной из следующих способностей исследуемых веществ:

1. улавливать свободные радикалы DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразила) согласно [20];
2. улавливать свободные радикалы ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) согласно [21]
3. взаимодействовать с комплексом Fe(III)-2,4,6-трипиридил-*s*-триазин (FRAP) согласно [22].

При измерении антиоксидантной активности с использованием DPPH, ABTS и FRAP методов стандартом служили растворы тролокса (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновой кислоты) известной концентрации. Результаты анализов выражали в мкмоль эквивалентов тролокса на грамм фракции (ммоль экв. тролокса/г). Все спектрофотометрические измерения проводили с использованием микропланшетного ридера CLARIOstar (BMG Labtech, Германия).

Изучение содержания вторичных метаболитов фенольной природы

Содержание вторичных метаболитов фенольной природы анализировали ВЭЖХ с помощью хроматографа LC–20AB Shimadzu Prominence (Shimadzu, Япония), оснащенного бинарным насосом, детектором с диодной матрицей SPD–M20A (Shimadzu) и RP–колоной Zorbax 300SB–C18 4.6 × 250 мм 5 мкм (Agilent, США). Разделение проводили при 40°C в режиме градиентного элюирования. Подвижная фаза: элюент А — 0.1% (в/в) TFA в бидистиллированной воде, В — ацетонитрил с трифторуксусной кислотой (TFA). Скорость потока 1 мл/мин, детекция в УФ–диапазоне при 254, 280 и 325 нм. Идентификацию компонентов проводили по временам удерживания и спектрам индивидуальных стандартных веществ. Количественный анализ (определение содержания индивидуальных компонентов в экстрактах) был основан на внешней стандартизации по серийным разведениям растворов аутентичных стандартов.

Фракционирование экстрактов

Разделение экстрактов на фракции проводили на препаративном хроматографе BUCHI PURE C–850 (BUCHI, Швейцария) в режиме flash с применением хроматографической колонки FP ECOFLEX Si 40g, и детектором ELSD и UV.

Полученные фракции метанольного экстракта *C. vulgaris* L. идентифицировали с помощью ВЭЖХ. Для этого применяли хроматограф LC–20AB Shimadzu Prominence с бинарным насосом. Диодно–матричный детектор SPD–M20A. Колонка Zor-

Таблица 1. Тотальный выход экстрактов *C. vulgaris* L. (мас. %)**Table 1.** Total yield of extracts of *C. vulgaris* L. (mas %)

Метод Сокслета		Метод мацерации
метанол	этилацетат	aq.EtOH 60%(v/v)
20.39	9.90	32.45

бах 300SB—C18 4.6 × 250 mm 5 µm (Agilent). Выход фракций оценивали гравиметрически, а количественное содержание идентифицированных БАВ определяли по калибровочным кривым с использованием коммерческих стандартов.

Выделение индивидуальных соединений

С целью выделения индивидуальных БАВ из фракций метанольных экстрактов *C. vulgaris* L. применяли метод препаративной жидкостной хроматографии. Для реализации метода использовали хроматограф BÜCHI PURE C—850 (BÜCHI, Швейцария) и колонку Prep Pure C18 100 Å 5 µm 250 × 20 mm (Büchi).

Индивидуальные компоненты выделяли и доочищали методом полупрепаративной ВЭЖХ. Количественный анализ компонентов, идентифицированных методом ВЭЖХ, проводили по калибровочным уравнениям.

Фурье—спектроскопия

0.11 г порошка KBr (Pike Technologies, США) пропитывали 0.5 мл раствора образца. Далее порошок с образцом сушили в печи (Memmert, Германия) при температуре 50°C до полного испарения жидкости в течение 40 мин. Полученный сухой порошок растирали в агатовой ступке до измельчения фракции. Полученную смесь прессовали в прозрачную таблетку. ИК—Фурье—спектры планшетов измеряли на ИК—спектрометре IRPrestige—21 (Shimadzu, Япония) в диапазоне 500—4000 см⁻¹ [23].

Статистический анализ

Данные подвергали дисперсионному анализу (ANOVA) с использованием Statistica 10.0 (StatSoft

Inc., 2007, США). Анализ Post hoc (тест Дункана) проводили для выявления образцов, которые значительно отличались друг от друга. Различия между средними значениями считали значимыми, когда доверительный интервал был меньше 5%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение экстрактов

Были определены тотальные выходы веществ, содержащихся в водно—спиртовых, метанольных и этилацетатных экстрактах *C. vulgaris* L. гравиметрическим методом, результаты которого представлены в табл. 1.

Согласно полученным результатам для *C. vulgaris* L. наибольший выход наблюдался для водно—спиртовых экстрактов, полученных методом мацерации.

Скрининг образцов экстрактов *C. vulgaris* L. in vitro для определения их антиоксидантного действия

Результаты исследований антиоксидантной активности экстрактов *C. vulgaris* L. приведены в табл. 2. Выявлено, что наибольшей активностью по связыванию радикалов обладали метанольные экстракты: 480.64 ± 14.90 мкмоль экв. тролокса/г для ABTS, 278.08 ± 20.03 мкмоль экв. тролокса/г для DPPH, 208.21 ± 12.33 мкмоль экв. тролокса/г для FRAP. Значения антиоксидантной активности экстрактов, полученных с помощью этилацетата, были ниже по сравнению с метанольными и водно—спиртовыми экстрактами.

Изучение вторичных метаболитов фенольной природы

Для водно—этанольных экстрактов проводилась первичная оценка фитохимических профилей. Результаты качественного и количественного определения мажорных фенольных компонентов экстрактов приведены в табл. 3.

Был проведен фитохимический скрининг экстрактов с помощью ВЭЖХ—УФ и были получены количественные данные по абсолютному содержанию вторичных фенольных метаболитов (рис. 1—3).

Таблица 2. Антиоксидантная активность экстрактов *C. vulgaris* L.**Table 2.** Antioxidant activity of *C. vulgaris* L. extracts

Тип экстракта	мкмоль экв. тролокса/г		
	ABTS	DPPH	FRAP
aq.EtOH 60%(v/v)	233.57 ± 20.84	57.38 ± 6.21	172.95 ± 15.0
MeOH	480.64 ± 14.90	278.08 ± 20.03	208.21 ± 12.33
EtAc	85.54 ± 3.21	14.30 ± 0.96	14.00 ± 1.23

Таблица 3. Содержание УФ–активных вторичных метаболитов в экстрактах *C. vulgaris* L.
Table 3. The content of UV–active secondary metabolites in extracts of *C. vulgaris* L.

Содержание индивидуальных метаболитов (г/кг)	Экстрагент		
	aq. EtOH 60%(v/v)	MeOH	EtAc
3,4–дигидроксibenзойн. кислота	0.186	0.163	0.040
Гиперозид	2.273	3.965	0.443
Галловая к–та	–	–	0.017
Апигенин–7– <i>O</i> –глюкозид	2.250	3.615	0.159
Катехин	0.354	0.688	–
Астрагалин	0.396	0.694	0.120
Феруловая кислота	0.083	0.105	–
Кофейная кислота	0.250	0.370	–
Хлорогеновая кислота	12.294	17.123	0.142
Акацетин	–	–	0.005
Кверцетин–3 <i>D</i> –глюкозид	0.523	0.930	0.072
Рутин	–	–	0.288

Водно–этанольный и метанольные экстракты *C. vulgaris* L. содержали рекордное количество хлорогеновой кислоты, а также значительные количества гиперозида, апигенина–7–*O*–глюкозида, кверцетина–3*D*–глюкозида, катехина, астрагалина и кофейной кислоты (рис. 1 и 2). Сигналы при t_R 22.7 и 23.6 мин соответствовали соединениям со спектром поглощения, аналогичным спектру гиперозида, однако времена удерживания отличались от стандарта. В связи с этим можно предположить, что данные соединения представ-

ляют собой производные гиперозида. Сигналы при t_R 48.3 мин (на хроматограмме водно–этанольного экстракта, рис. 1) и t_R 48.4 мин (рис. 2) согласно спектрам поглощения соответствуют апигенину–7–*O*–глюкозиду. Основными фенольными компонентами этилацетатного экстракта *C. vulgaris* L. были гиперозид, рутин, хлорогеновая кислота, апигенин и астрагалин, но их содержание было значительно ниже, чем в водно–этанольном и метанольном экстрактах (рис. 3).

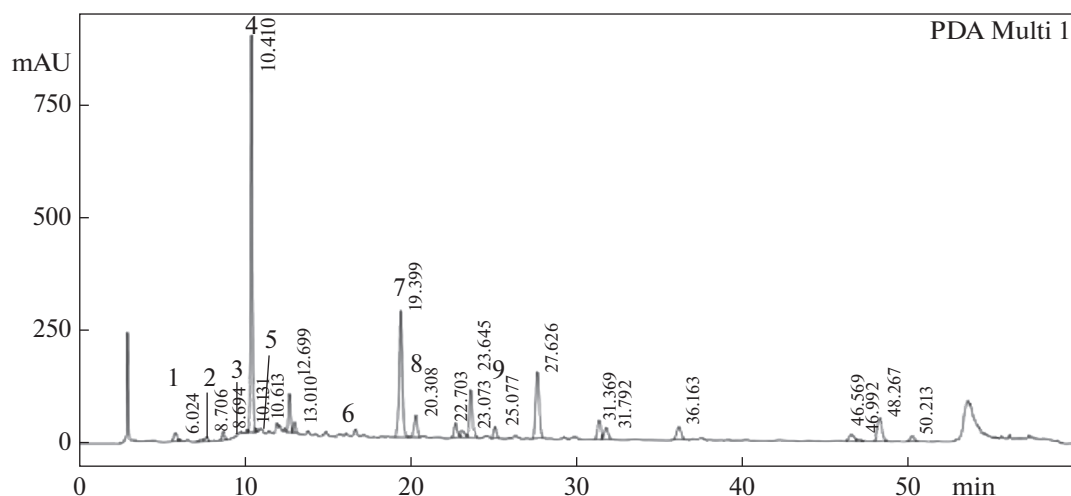


Рис. 1. Обратnofазная ВЭЖХ–хроматограмма водно–этанольного экстракта *C. vulgaris* L. 1 – 3,4–дигидроксibenзойная кислота, 2 – оксикоричные кислоты, 3 – катехин, 4 – хлорогеновая кислота, 5 – кофейная кислота, 6 – феруловая кислота, 7 – гиперозид, 8 – кверцетин–3*D*–глюкозид, 9 – астрагалин.

Fig. 1. Reverse phase HPLC chromatogram of aqueous ethanol extract of *Calluna vulgaris* L. 1 – 3,4–dihydroxybenzoic acid, 2 – hydroxycinnamic acids, 3 – catechin, 4 – chlorogenic acid, 5 – caffeic acid, 6 – ferulic acid, 7 – hyperoside, 8 – quercetin–3*D*–glucoside, 9 – astragaline.

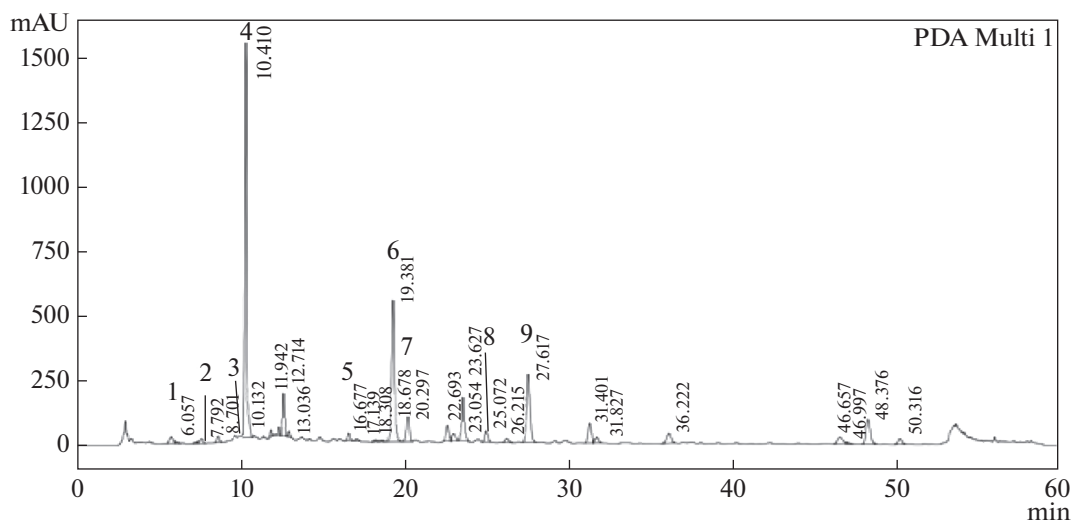


Рис. 2. Обратнoфазная ВЭЖХ-хроматограмма метанольного экстракта *C. vulgaris* L. 1 – 3,4-дигироксибензойная кислота, 2 – оксикоричные кислоты, 3 – катехин, 4 – хлорогеновая кислота, 5 – феруловая кислота, 6 – гиперозид, 7 – кверцетин-3-*D*-глюкозид, 8 – астрагалин, 9 – апигенин-7-*O*-глюкозид.

Fig. 2. Reverse phase HPLC chromatogram of methanolic extract of *Calluna vulgaris* L. 1 – 3,4-dihydroxybenzoic acid, 2 – hydroxycinnamic acids, 3 – catechin, 4 – chlorogenic acid, 5 – ferulic acid, 6 – hyperoside, 7 – quercetin-3-*D*-glucoside, 8 – astragaline, 9 – apigenin-7-*O*-glucoside.

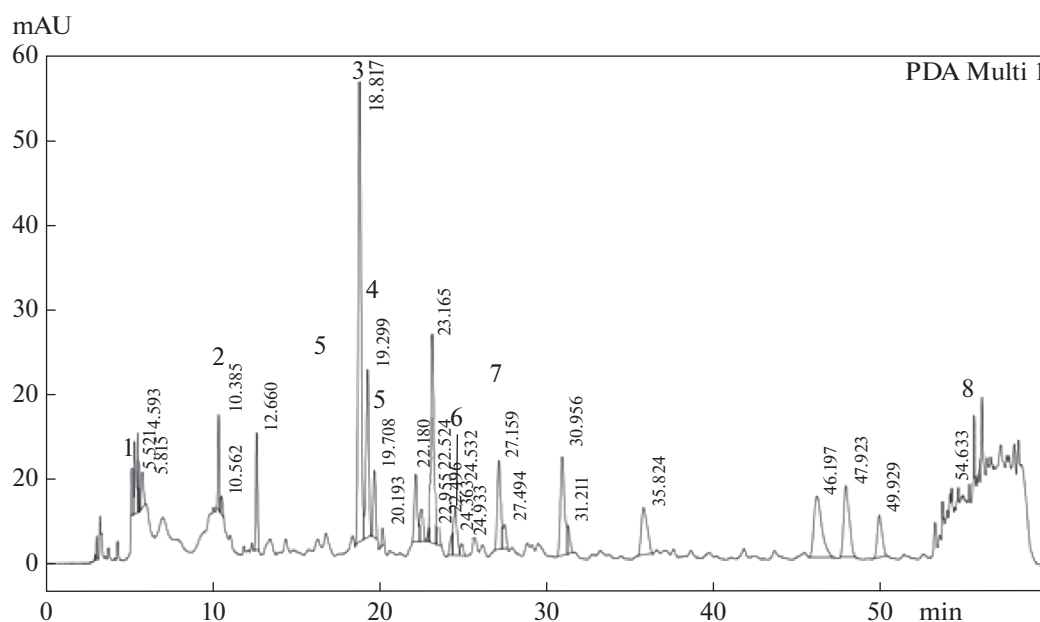


Рис. 3. Обратнoфазная ВЭЖХ-хроматограмма этилацетатного экстракта *C. vulgaris* L. 1 – 3,4-дигидроксибензойная кислота, 2 – хлорогеновая кислота, 3 – гиперозид, 4 – рутин, 5 – кверцетин-3-*D*-глюкозид, 6 – астрагалин, 7 – апигенин-7-*O*-глюкозид, 8 – акацетин.

Fig. 3. Reverse phase HPLC chromatogram of ethyl acetate extract of *Calluna vulgaris* L. 1 – 3,4-dihydroxybenzoic acid, 2 – chlorogenic acid, 3 – hyperoside, 4 – rutin, 5 – quercetin-3-*D*-glucoside, 6 – astragaline, 7 – apigenin-7-*O*-glucoside, 8 – acacetin.

Фракционирование экстрактов

Для фракционирования экстрактов *C. vulgaris* L. были выбраны метанольные изоляты (рис. 4), так как антиоксидантная активность в них была наибольшей.

В ходе разделения метанольного экстракта *C. vulgaris* L. удалось получить 9 фракций биологически активных веществ, которые затем идентифицировали с помощью аналитической ВЭЖХ. Массу БАВ определяли по калибровочным кривым с использованием коммерческих стандартов.

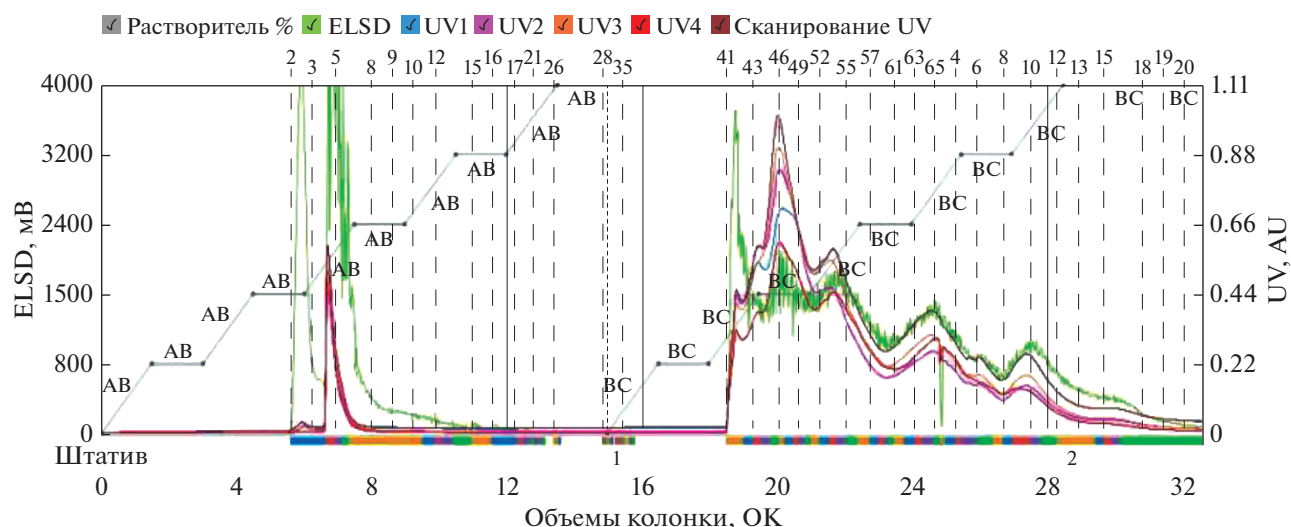


Рис. 4. Результаты фракционирования метанольного экстракта *C. vulgaris* L. (UV1 254 нм, UV2 270 нм, UV3 280 нм, UV4: 320 нм).

Fig. 4. Results of fractionation of methanol extract of common heather (*Calluna vulgaris* L.) (UV1 254 nm, UV2 270 nm, UV3 280 nm, UV4: 320 nm).

Результаты изучения качественного и количественного состава фракций представлены в рис. S1–S9 (дополнительный материал) и в Табл. S1 (дополнительный материал).

Согласно результатам исследований, состав фракции разнообразен и представлен такими веществами как розмариновая кислота (фракция № 1), акацетин и его производные (фракции №№ 2–5), п-кумаровая кислота (фракция № 2), неохлорогеновая кислота (фракции №№ 3, 6–9), кафтаровая кислота (фракции №№ 3–7), феруловая кислота (фракции №№ 3–5, 9), производные астрагалина (фракция № 3), производные лютеолина–7-глюкозида (фракции №№ 3, 4), производные кверцетина (фракции №№ 3–7), катехин (фракция №№ 4, 5), 3,4-дигидроксibenзойная кислота (фракции №№ 4, 5), галловая кислота (фракции №№ 4, 5), производные апигенина и производные астрагалина (фракции №№ 4–7), апигенин–7-О-глюкозид (космосин) (фракции №№ 5–7).

Во фракциях №№ 5 и 6 (рис. S2, дополнительный материал) метанольного экстракта *C. vulgaris* L. обнаружены: гиперозид в количестве 225.08 и 17.29 мг/кг соответственно, рутин 335.22 и 25.65 мг/кг соответственно; кверцетин–3D-глюкозид (изокверцитрин) 40.66 и 9.22 мг/кг соответственно. Количество рутина во фракции № 7 составило не более 8.71 мг/кг, в то время как содержание гиперозида этой фракции превысило его количество во фракции № 6.

Согласно результатам анализа, в составе фракций №№ 8 и 9 гиперозида 33.81 и 16.56 мг/кг соответственно. Данные фракции содержат меньшее количество кверцетин–3D-глюкозида (изо-

кверцитрина) по сравнению с фракциями №№ 5 и 7. Выход БАВ в первых двух составил 9.08 мг/кг и 2.80 мг/кг соответственно, в то время как содержание БАВ во фракции № 5 – 40.66 мг/кг, а во фракции № 7 – 9.22 мг/кг).

В составе фракций №№ 6 и 7 обнаружена хлорогеновая кислота в количестве 106.04 мг/кг и 94.77 мг/кг соответственно. Незначительное ее содержание найдено во фракциях №№ 8 и 9 метанольного экстракта *C. vulgaris* L. Выявлено (рис. S6 (дополнительный материал)), что фракция № 9 метанольного экстракта *C. vulgaris* L. содержит также апигенин–7-О-глюкозид (космосин) в количестве 158.39 мг/кг и производное апигенина 31.06 мг/кг. Причем во фракции № 9 содержание производного апигенина выше, чем во фракции № 8 (выход БАВ составил 22.20 мг/кг). Обнаружено, что фракция № 8 дополнительно содержит такие БАВ как апигенин–7-О-глюкозид (космосин), производное кверцетина, производное астрагалина и лютеолин–7-глюкозид (цинарозид).

Тестирование фракций *C. vulgaris* L.

для определения их антиоксидантного действия

Результаты исследования антиоксидантной активности полученных фракций приведены в табл. 4.

Среди фракций метанольного экстракта *C. vulgaris* L. выраженной антиоксидантной активностью обладают фракции №№ 4 и 8. Антиоксидантная активность фракции № 4 составила 10535.56 мкмоль экв. тролокса/г (по отношению к радикалу ABTS), 2627.22 мкмоль экв. тролокса/г (по отношению к радикалу DPPH) и 3785.98 мкмоль экв. тролокса/г (при применении метода FRAP). Для

Таблица 4. Антиоксидантная активность метанольного экстракта *C. vulgaris* L.**Table 4.** Antioxidant activity of methanol extract of *C. vulgaris* L.

Номер фракции (номер виал)	Антиоксидантная активность, мкмоль экв. тролокса/г		
	ABTS	DPPH	FRAP
1 (2–3)	106.42 ± 3.19	—	—
2 (4–7)	—	—	—
3 (41)	1759.37 ± 0.52	969.15 ± 29.07	600.02 ± 18.01
4 (42–43)	10535.56 ± 316.05	2627.22 ± 78.81	3785.98 ± 112.95
5 (44–50)	6905.70 ± 207.15	1923.86 ± 0.58	2502.00 ± 75.15
6 (51–59)	2516.77 ± 75.48	1393.70 ± 41.79	928.26 ± 27.85
7 (60–4.2)	4435.82 ± 1.33	2184.40 ± 65.52	1620.63 ± 48.62
8 (5.2–7.2)	7921.40 ± 2.37	2825.41 ± 84.75	2389.58 ± 71.67
9 (8.2–16.2)	717.84 ± 21.51	1060.75 ± 31.81	291.91 ± 8.75

фракции № 8 антиоксидантная активность достигла 7921.40 мкмоль экв. тролокса/г (по отношению к радикалу ABTS), 2825.41 мкмоль экв. тролокса/г (по отношению к радикалу DPPH) и 2389.58 мкмоль экв. тролокса/г (при применении метода FRAP).

Отмечено полное отсутствие антиоксидантной активности фракций №№ 1 и 2 (по отношению к радикалу DPPH и при применении метода FRAP). Установлено, что фракции №№ 3 и 9 практически не содержат биологически активные вещества, способные вступать во взаимодействие с комплексами Fe (III). В случае применения метода FRAP у фракций № 3 и № 9 отмечена низкая антиоксидантная активность (она составила 600.02 мкмоль экв. тролокса/г и 291.91 мкмоль экв. тролокса/г соответственно).

Выделение и изучение индивидуальных соединений из наиболее активных фракций

Для выделения индивидуальных и идентификации БАВ из метанольного экстракта *C. vulgaris* L. выбраны фракции №№ 4 и 8, наиболее активные по антиоксидантным свойствам. Выделенные из фракций №№ 4 и 8 метанольного экстракта *C. vulgaris* L. индивидуальные вещества по времени их удерживания были идентифицированы как хлорогеновая кислота и гиперозид с концентрацией не менее 92.0 отн. % (табл. 5).

Следует отметить, что во фракции № 4 метанольного экстракта *C. vulgaris* L. наблюдалось выпадение осадка кристаллического вещества серого цвета со временем удерживания 12.5 мин, степень чистоты которого не удалось определить методом ВЭЖХ. Осадок был отделен, промыт метанолом и лиофильно высушен.

Для подтверждения химической структуры и чистоты индивидуальных БАВ, выделенных из наиболее активных фракций, применяли метод хрома-

томасс–спектрометрии, жидкостной хроматографии и инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR).

Согласно ВЭЖХ хроматограммам (рис. 5a и 6a) выделенные из активных фракций №№ 4 и 8 метанольного экстракта *C. vulgaris* L. индивидуальные вещества по спектрам поглощения соответствуют гиперозиду и хлорогеновой кислоте (рис. 5b и 6b).

По спектру поглощения не удалось идентифицировать кристаллическое серое вещество (время удерживания 12.5 мин), выделенное из активной фракции № 8 *C. vulgaris* L. Не идентифицированное вещество направлено на анализ методом ВЭЖХ–МС.

Структурные формулы выделенных индивидуальных БАВ, построенные с помощью программы ChemDraw Professional 16.0, приведены на рис. 7.

Соответствие выделенных из активных фракций №№ 4 и 8 метанольного экстракта *C. vulgaris* L. в индивидуальном виде чистых веществ гиперозиду и хлорогеновой кислоте дополнительно подтверждено спектрами FTIR (рис. 8, 9). Теоретическая интерпретация спектров приведена в табл. 6 и 7.

Максимумы при 3441–3412 см⁻¹ в ИК–спектрах указывают на наличие соединений с фенольным гидроксильным. Это подтверждают и полосы поглощения 1406, 1449 см⁻¹, соответствующие де-

Таблица 5. Индивидуальные БАВ, выделенные из экстрактов *C. vulgaris* L.**Table 5.** Individual BAS isolated from extracts of *C. vulgaris* L.

БАВ	Концентрация, отн. %
Хлорогеновая кислота	92.0 ± 2.7
Гиперозид	92.0 ± 2.7*

Примечание. * основная примесь кверцетин–3D–глюкозид (7%).

Note. * the main admixture of quercetin is 3D–glucoside (7%).

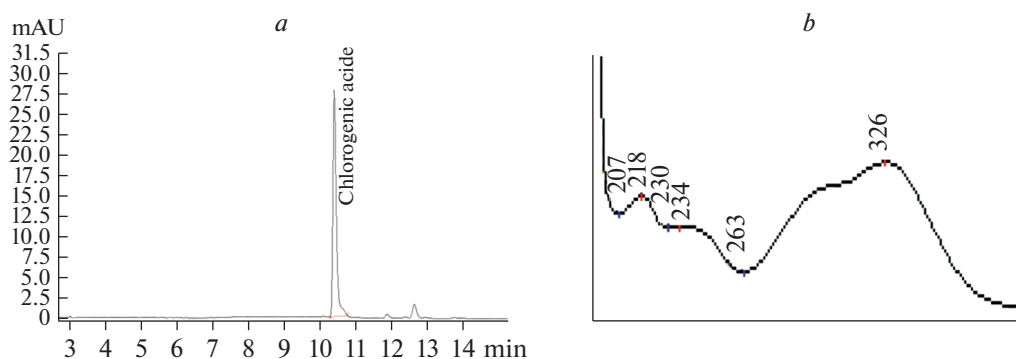


Рис. 5. Идентификация хлорогеновой кислоты, выделенной из активной фракции *C. vulgaris* L.: *a* – хроматограмма хлорогеновой кислоты; *b* – спектр поглощения.

Fig. 5. Identification of an individual substance (chlorogenic acid) isolated from the active fraction of common heather (*Calluna vulgaris* L.): *a* – chromatogram of chlorogenic acid; *b* – absorption spectrum.

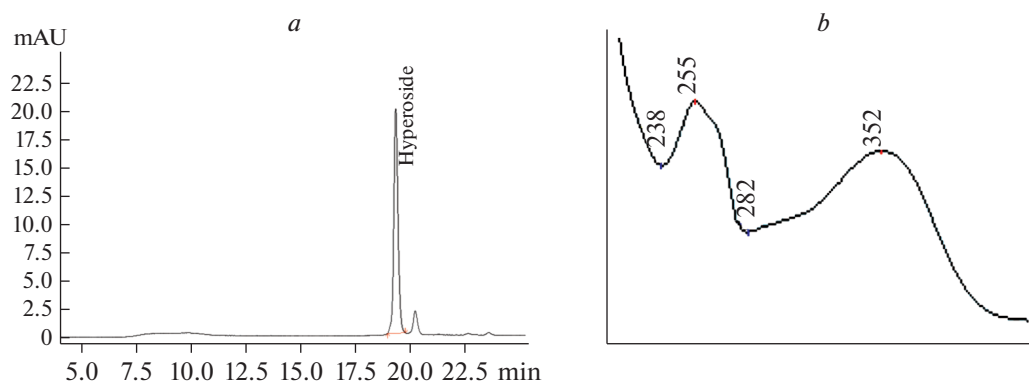


Рис. 6. Идентификация гиперозида, выделенного из активной фракции *C. vulgaris* L.: *a* – хроматограмма гиперозида; *b* – спектр поглощения.

Fig. 6. Identification of an individual substance (hyperoside) isolated from the active fraction of common heather (*Calluna vulgaris* L.): *a* – chromatogram of hyperoside; *b* – absorption spectrum.

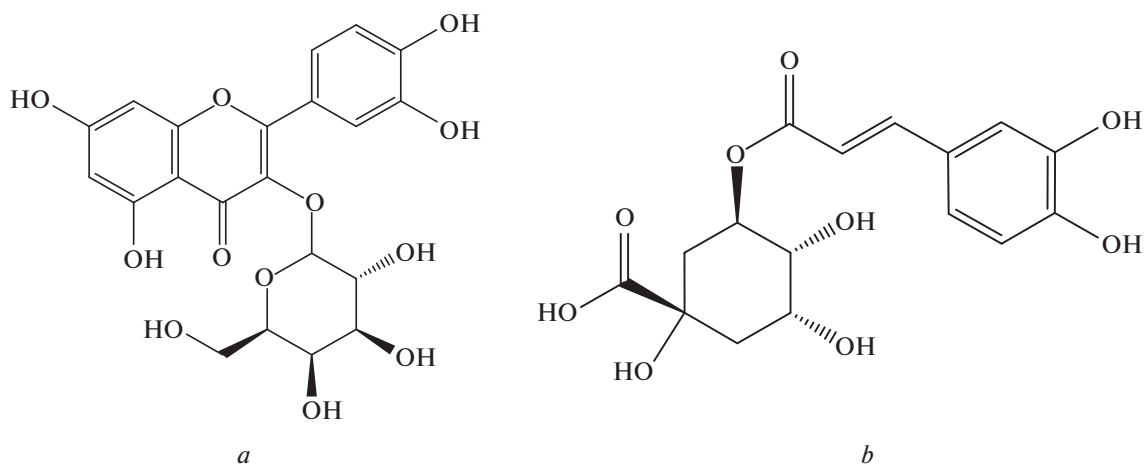


Рис. 7. Структурные формулы индивидуальных БАВ из *C. vulgaris* L.: *a* – гиперозида; *b* – хлорогеновая кислота.

Fig. 7. Structural formulas of individual biologically active substances from common heather (*Calluna vulgaris* L.) constructed in the ChemDraw Professional 16.0 program: *a* – hyperoside; *b* – chlorogenic acid.

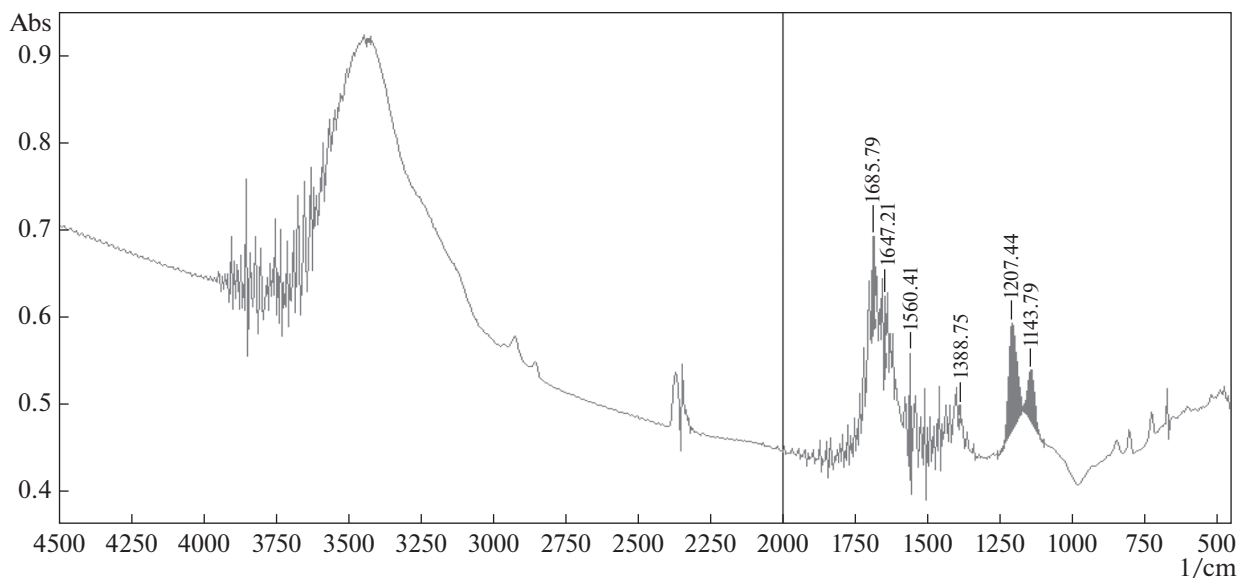


Рис. 8. FTIR спектр гиперозида из *C. vulgaris* L.
Fig. 8. FTIR spectrum of hyperoside from *Calluna vulgaris* L.

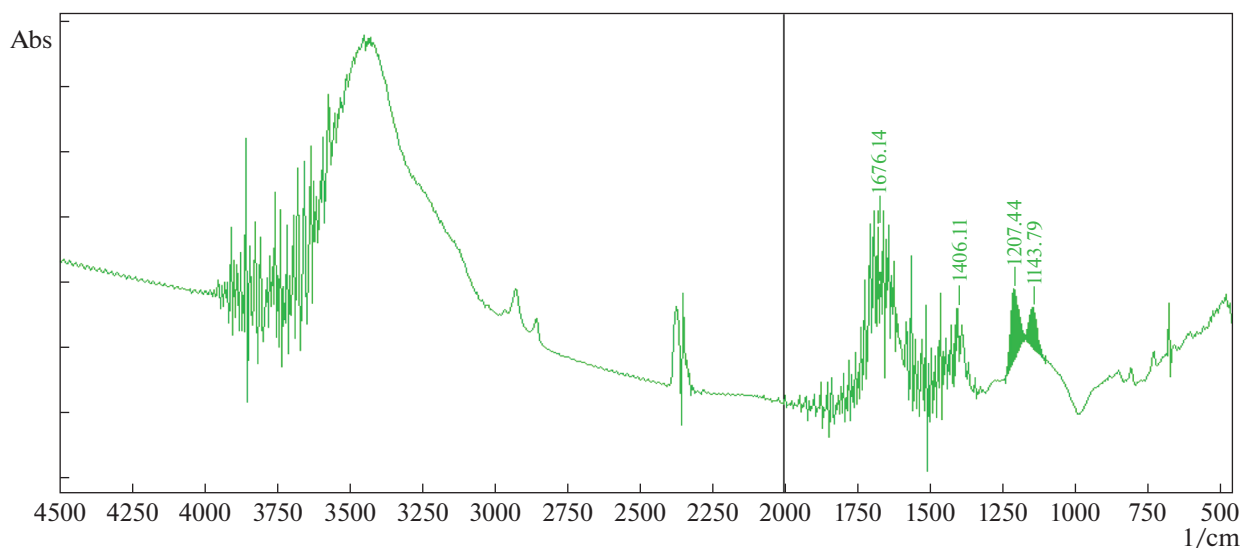


Рис. 9. FTIR спектр хлорогеновой кислоты из *C. vulgaris* L.
Fig. 9. FTIR spectrum of chlorogenic acid from *C. vulgaris* L.

формационным колебаниям связи гидроксильной группы в фенольных соединениях [24].

Область поглощения $2926\text{--}2855\text{ см}^{-1}$ (образцы 1 и 2) характерна для валентных колебаний $\text{CH}_3\text{--}$, $\text{CH}_2\text{--}$ групп [24, 25]. Им соответствуют и полосы поглощения 1389 , 1375 , 1273 см^{-1} , которые относятся к деформационным колебаниям алифатических групп. Полосы поглощения 1647 , 1638 , 1560 , 1522 см^{-1} всех образцов соответствуют валентным колебаниям связи $\text{C}=\text{C}$ бензольного кольца.

Полосы поглощения при 1695 , 1676 , 1686 см^{-1} свидетельствуют о присутствии карбонильных групп во всех образцах.

Область поглощения $1200\text{--}900\text{ см}^{-1}$ соответствует валентным колебаниям C--O связи в простых ароматических эфирах, что говорит о наличии в экстрактах соединений с метоксильными группами.

В ИК-спектрах всех образцов наблюдаются интенсивные полосы в области поглощения гидроксильных групп и ароматической системы.

Таблица 6. Теоретическая интерпретация FTIR спектра хлорогеновой кислоты
Table 6. Theoretical interpretation of the FTIR spectrum of chlorogenic acid

Волновое число, эксперимент, см ⁻¹	Теоретическая интерпретация
1144	Деформационные колебания свободных фенольных групп –ОН
1207	Сильные полосы валентных колебаний фрагмента СО–О (одна или две) свидетельствуют о наличии эфиров (RCOOR')
1406	Деформационные колебания алифатических групп
1676	Карбонильная группа γ–пирона
3431	Валентные колебания гидроксильной группы

Таблица 7. Теоретическая интерпретация FTIR спектра гиперозида
Table 7. Theoretical interpretation of the FTIR spectrum of hyperoside

Волновое число, эксперимент, см ⁻¹	Теоретическая интерпретация
1144	Деформационные колебания свободных фенольных групп –ОН
1208	Сильные полосы валентных колебаний фрагмента СО–О (одна или две) свидетельствуют о наличии эфиров (RCOOR')
1389	Деформационные колебания алифатических групп
1560	Валентные колебания связи С=С бензольного кольца
1647	Stretching vibrations of C=C bonds
1686	Карбонильная группа γ–пирона
3431	Валентные колебания гидроксильной группы

Выделенные БАВ из метанольных экстрактов *C. vulgaris* L. были проанализированы на наличие антиоксидантной активности. Результаты определения представлены в табл. 8.

Результаты свидетельствуют о том, что хлорогеновая кислота и гиперозид, выделенные из активных фракций №№ 4 и 8 метанольного экстракта *C. vulgaris* L., обладают наибольшей антиоксидантной активностью. Хлорогеновая кислота характеризуется следующими значениями 15285.89 ± 425.55 мкмоль экв. тролокса/г, 9933.12 ± 297.99 мкмоль экв. тролокса/г и 12782.81 ± 383.46 мкмоль экв. тролокса/г (по отношению к радикалам ABTS и DPPH и железо–восстанавливающей способности соответственно).

Согласно данным табл. 8 для гиперозида по отношению к ABTS–радикалу антиоксидантная активность составила 14946.54 мкмоль экв. тролокса/г, 6513.92 мкмоль экв. тролокса/г по отноше-

нию к DPPH –радикалу, а по методу FRAP – 8972.75 мкмоль экв. тролокса/г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Направление работ, связанных с введением в повседневный образ жизни функциональных продуктов питания, которые, обогащены компонентами, обладающими геропротекторными свойствами является весьма перспективным, так как это позволит эффективнее противостоять таким истощающим организм патологиям, связанным со старением, как рак, сердечно–сосудистые заболевания, амилоидозы и нейродегенеративные заболевания и другие

Поскольку в усилении свободнорадикальных реакций ключевую роль играют нарушенные механизмы антиоксидантной защиты одним из наиболее актуальных приоритетов биомедицинских исследований является разработка лекарств и

Таблица 8. Антиоксидантная активность индивидуальных соединений
Table 8. Antioxidant activity of individual compounds

БАВ	Антиоксидантная активность, мкмоль экв. тролокса/г		
	ABTS	DPPH	FRAP
Хлорогеновая кислота	15285.89 ± 425.55	9933.12 ± 297.99	12782.81 ± 383.46
Гиперозид	14946.54 ± 448.38	6513.92 ± 195.39	8972.75 ± 269.16

биологически активных добавок к пище с антиоксидантными свойствами. Антиоксиданты растительного происхождения считаются наиболее перспективными для непрерывного терапевтического и диетического потребления, поскольку они, как правило, менее токсичны для человека, чем синтетические, [1, 12].

По итогам экспериментов при изучении фитохимического профиля и антиоксидантных свойств экстрактов *C. vulgaris* L., произрастающей на территории Калининградской области, сами экстракты и выделенные из них индивидуальные БАВ продемонстрировали высокую антиоксидантную активность.

Таким образом, экстракты и биологически активные вещества, полученные из *C. vulgaris* L., произрастающего на территории Калининградской области, обладают большим потенциалом в качестве источника природных антиоксидантов для использования их в функциональных продуктах питания с целью замедления процессов старения и улучшения качества жизни.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность за помощь в проведении исследований старшему преподавателю БФУ им. И. Канта В.В. Лариной.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 22-16-00044).

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте: <https://sciencejournals.ru/journal/biotech/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дышлюк Л.С., Дроздова М.Ю., Лосева А.И. Исследование показателей безопасности экстрактов калусных культур *Pulmonaria officinalis* и их фитохимического состава на наличие биологически активных веществ с потенциальными геропротекторными свойствами. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*, 2021, 11(2), 260–271. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-260-271>
2. Suen J., Kranz J.T.A., Vun S., Miller M. Effect of Flavonoids on Oxidative Stress and Inflammation in Adults at Risk of Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *Healthcare*, 2016, 4(3), 69. <https://doi.org/10.3390/healthcare4030069>
3. Forni C., Facchiano F., Bartoli M., Pieretti S., Facchiano A., D'Arcangelo D., Norelli S., Valle G., Nisini R., Beninati S., Tabolacci C., Jadeja R.N. Beneficial Role of Phytochemicals on Oxidative Stress and Age-Related Diseases. *Biomed. Res. Int.*, 2019, 2019, 8748253. <https://doi.org/10.1155/2019/8748253>
4. Devi S., Kumar V., Singh S.K., Dubey A.K., Kim J.J. Flavonoids: Potential Candidates for the Treatment of Neurodegenerative Disorders. *Biomedicines*, 2021, 9, 99. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020099>
5. Jung U.J., Kim S.R. Beneficial Effects of Flavonoids Against Parkinson's Disease. *J. Med. Food*, 2018, 21(5), 421–432. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.4078>
6. Maher P. The Potential of Flavonoids for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20, 3056. <https://doi.org/10.3390/ijms2012305>
7. Jubaidi F.F., Zainalabidin S., Taib I.S., Hamid Z.A., Budin S.B. The Potential Role of Flavonoids in Ameliorating Diabetic Cardiomyopathy via Alleviation of Cardiac Oxidative Stress. Inflammation and Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 5094. <https://doi.org/10.3390/ijms22105094>
8. Huber K.L., Fernández J.R., Webb C., Rouzard K., Healy J., Tamura M., Stock J.B., Stock M., Pérez E. AGSE: A Novel Grape Seed Extract Enriched for PP2A Activating Flavonoids That Combats Oxidative Stress and Promotes Skin Health. *Molecules*, 2021, 26, 6351. <https://doi.org/10.3390/molecules26216351>
9. Zeng Y., Song J., Zhang M., Wang H., Zhang Y., Suo H. Comparison of in vitro and in vivo antioxidant activities of six flavonoids with similar structures. *Antioxidants*, 2020, 9, 732. <https://doi.org/10.3390/antiox9080732>
10. Фёдорова Р.А., Котова Т.В., Вальнюкова А.С., Худынецов К.А., Федорова Ю.С., Тихонова О.Ю. Изучение химического состава и острой токсичности отваров дикорастущих трав как рецептурного компонента напитков безалкогольных. *Индустрия питания*, 2022, 7(2), 5–14. doi:
11. Wang Yu., Liu X.J., Chen J.B., Cao J.P., Li X., Sun C.D. Citrus flavonoids and their antioxidant evaluation. *Crit. Rev. Food Sci. and Nutr.*, 2022, 62(14), 3833–3854. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1870035>
12. Sukhikh S., Ivanova S., Skrypnik L., Bakhtiyarova A., Larina V. Study of the Antioxidant Properties of *Filipendula ulmaria* and *Alnus glutinosa*. *Plants (Basel)*, 2022, 11(18), 2415. <https://doi.org/10.3390/plants11182415>
13. Gildawie K.R., Galli R.L., Shukitt-Hale B. Protective Effects of Foods Containing Flavonoids on Age-Related Cognitive Decline. *Curr. Nutr. Rep.*, 2018, 7, 39–48. <https://doi.org/10.1007/s13668-018-0227-0>
14. Титова Т., Кудряшова Л., Болгова И., Павлова И. Оксидативный стресс и старение: возможности коррекции. *Врач*, 2015, 6, 6–10.
15. Онегин С.В., Фурса Н.С. Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот в траве вереска обыкновенного из различных мест произрастания. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*, 2007, 15(3), 114–122.
16. Сапарклычева С.Е. Вёреск обыкновенный [*Calluna vulgaris* (L.) Hill.] – реликтовое растение флоры среднего Урала. *Аграрное образование и наука*, 2020, 2, 9.

17. Шелюто В.Л., Онегин С.В., Фурса Н.С. Обнаружение, выделение, физико-химическое изучение и количественное определение флавоноидов в траве вереска обыкновенного. *Вестник фармации*, 2007, 2(36), 15–25.
18. Mandim F., Barros L., Calhella R.C., Abreu R.M., Pine-la J., Alves M.J., Heleno S., Santos P.F., Ferreira I.C. *Calluna vulgaris* (L.) Hull: Chemical characterization, evaluation of its bioactive properties and effect on the vaginal microbiota. *Food Funct.*, 2019, 10(1), 78–89. <https://doi.org/10.1039/C8FO01910J>
19. Drózd P., Sentkowska A., Pyrzynska K. Flavonoid content and antioxidant properties in different extracts of *Calluna vulgaris* (L.) flowers. *J. Agric. Sci. Technol. A*, 2017, 7, 39–44. <https://doi.org/10.17265/2161-6256/2017.01.006>
20. Yamaguchi T., Takamura H., Matoba T., Terao J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1998, 62, 1201–1204. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.1201>
21. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
22. Gohari A.R., Hajimehdipoor H., Saeidnia S., Ajani Y., Hadjiakhoondi A. Antioxidant activity of some medicinal species using FRAP assay. *J. Medicinal Plants*, 2011, 10(37), 54–60.
23. Ricci A., Olejar K.J., Parpinello G.P., Kilmartin P.A., Versari A. Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in the characterization of tannins. *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2015, 50(5), 407–442. <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.1000461>
24. Дмитриук А.Ф., Лесишина Ю.О., Володченко И.И. Антирадикальная активность растительных экстрактов, полученных в среде субкритической воды. *Сверхкритические флюиды: теория и практика*, 2012, 1, 13–20.
25. Анисимова Н.А. Идентификация органических соединений: учебное пособие (для студентов, обучающихся по специальности “химия”), Горно-Алтайск: РИО ГАГУ, 2009, 95.

Study of Antioxidant Properties of Extracts and Biologically Active Substances from *Calluna vulgaris*

O. O. Babich^a, A. Kh. Bakhtiyarova^a, O. V. Krol^a,
I. G. Samusev^a, A. V. Tsibulnikova^a, and S. A. Sukhikh^{a, #}

^a*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad 236016, Russia*

[#]*e-mail: stas-asp@mail.ru*

Abstract—The antioxidant activity of extracts and bioactive compounds isolated from flowering shoots of common heather (*C. vulgaris* L.) growing in Kaliningrad region (Russia) was studied, as well as the phytochemical profile of the extracts. The highest antioxidant activity was found in methanol extracts. Its values correspond to the total amount of phenolic substances in them. The extracts contained at least 92.0 relative % hyperoside and chlorogenic acid, the structure of which was confirmed by UV and IR spectroscopy. Individual bioactive substances had significantly higher antioxidant activity than methanol extracts. Thus, extracts and bioactive substances obtained from *C. vulgaris* L. growing in the Kaliningrad region have great potential as a source of natural antioxidants for their use in functional foods to slow down aging processes and improve the quality of life.

Keywords: aging, *Calluna vulgaris*, antioxidant activity, free radicals, chlorogenic acid, hyperoside, biologically active substances