

Е.В. Томтосова, Е.К. Румянцев, В.М. Николаев,
Н.К. Чирикова

ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ВОДНЫХ И СПИРТОВЫХ ЭКСТРАКТОВ ЛИСТЬЕВ *VACCINIUM VITIS-IDAEAE L. in vitro*

DOI 10.25789/YMJ.2024.85.06

УДК 615.322

Биологически активные вещества, содержащиеся в листьях брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.), обладают антиоксидантными свойствами. В данном исследовании подобран оптимальный способ экстрагирования для получения экстрактов с высоким содержанием биологически активных компонентов, обладающих антиоксидантной активностью, из листьев *Vaccinium vitis-idaea*, произрастающей в Якутии. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что биологически активные вещества, выделенные спиртовой экстракцией из листьев *Vaccinium vitis-idaea*, могут быть использованы в медицине для поиска подходов к регулированию прооксидантных процессов в организме человека при различных патологических состояниях.

Ключевые слова: брусника обыкновенная, биологически активные вещества, гравиметрический метод, модельная система.

Biologically active substances contained in lingonberry leaves (*Vaccinium vitis-idaea* L.) have antioxidant properties. In this study, the optimal extraction method was selected to obtain extracts with a high content of biologically active components with antioxidant activity from the leaves of *Vaccinium vitis-idaea*, growing in Yakutia. The data obtained allow us to conclude that biologically active substances isolated by alcoholic extraction from the leaves of *Vaccinium vitis-idaea* can be used in medicine to find approaches to regulating pro-oxidant processes in the human body under various pathological conditions.

Keywords: lingonberry, biologically active substances, gravimetric method, model system.

Введение. На сегодняшний день идет поиск лекарственных и профилактических препаратов с высоким содержанием биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения в связи с их безопасностью, доступностью и возобновлением биологических ресурсов. Количественное и качественное содержание БАВ растительного сырья зависит от природных условий [6]. Например, на накопление БАВ растениями могут оказывать влияние следующие факторы: условия региона произрастания, способ выращивания, погодные условия, стадии созревания, почва и метод извлечения [4, 5]. Так, суровые и уникальные абиотические факторы среды произрастания растений на территории Якутии способствуют активному накоплению биологически активных соединений в

растениях за относительно короткий вегетационный период.

В фармацевтической практике наибольший интерес представляют лекарственные растения, содержащие фенольные соединения с выраженными антиоксидантными свойствами.

Брусника обыкновенная (*Vaccinium vitis-idaea* L.) – многолетний кустарничек, относится к семейству Вересковые (*Ericaceae*). *Vaccinium vitis-idaea* растет в хвойных и смешанных лесах, горных и равнинных тундрах, иногда на торфяниках. В качестве лекарственного сырья используют всю надземную часть *Vaccinium vitis-idaea*: побеги, листья и ягоды. В 2018 г. брусника обыкновенная была включена в государственную фармакопею Российской Федерации (XIV издание). В медицине листья *Vaccinium vitis-idaea* используются в комплексной терапии воспалительных заболеваний мочевого пузыря и мочевыводящих путей, таких как цистит и уретрит, в связи с противовоспалительным, бактерицидным и диуретическим действием данного растения.

По литературным данным, компоненты *Vaccinium vitis-idaea* проявляют противовоспалительные, нейпротекторные, гипогликемические, антиоксидантные и противоопухолевые свойства, что определяется наличием биологически активных веществ различной природы [7, 8, 9]. Как было показано, листья *Vaccinium vitis-idaea*

содержат фенольные гликозиды – арбутин, метиларбутин, вакцинин, гидрохинон, органические кислоты, среди которых галловые, винные, эллаговые, хинные, урсоловые кислоты и флавоноиды, представленные кверцетином, кверцитрином, изокверцитрином и кверцетин-3-арабинозидом, в том числе танины и катехины [11].

В связи с вышесказанным брусника является ценным растительным сырьем для поиска биологически активных веществ (БАВ), обладающих антиоксидантными свойствами.

Цель исследования – поиск оптимального способа экстрагирования для получения экстрактов с высоким содержанием биологически активных компонентов, обладающих антиоксидантной активностью, из листьев *Vaccinium vitis-idaea*, произрастающей в Якутии.

Материал и методы. Работа была проведена в лаборатории преканцерогенеза и злокачественных опухолей отдела эпидемиологии хронических неинфекционных заболеваний ФГБНУ «ЯНЦ КМП» в рамках НИР «Региональные особенности биохимических, иммунологических и морфологических показателей у коренного и пришлого населения Республики Саха (Якутия) в норме и патологии».

В данном исследовании были использованы этиловые и водные экстракты листьев *Vaccinium vitis-idaea*.

Якутский научный центр комплексных медицинских проблем: **ТОМТОСОВА Евгения Викторовна** – м.н.с., ytomtsova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9037-9266>, **РУМЯНЦЕВ Егор Константинович** – м.н.с., tzeentch1993@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9843-3098>, **НИКОЛАЕВ Вячеслав Михайлович** – к.б.н., с.н.с., Nikolaev1126@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4490-8910>.

ЧИРИКОВА Надежда Константиновна – д.фарм.н., проф. Института естественных наук СВФУ им. М.К. Аммосова, г. Якутск, hofnung@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1130-3253>.

Растительное сырье было собрано в фазу плодоношения (август-сентябрь) в Намском районе Республики Саха (Якутия). Листья были высушены естественным способом при комнатной температуре, без доступа прямых солнечных лучей. После этапа сушки растительный материал подвергали измельчению на вибрационной шаровой мельнице «GT-200» («GRINDER»). Экстракцию проводили методом однократной мацерации в течение 60 мин при температуре 60 °С. Для экстрагирования использовали дистиллированную воду и этиловый спирт в разных концентрациях от 20 до 95% с шагом 10%. По массе соотношения высушенного сырья листьев *Vaccinium vitis-idaea* и водного/спиртового экстрагента составило 1:10. Полученные извлечения центрифугировали, затем растворимую фракцию экстракта пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 м («Membrane Solutions»).

Для общего количественного анализа экстрактивных веществ и выявления условий, обладающих максимумом извлечения, определяли количество биологически активных компонентов и балластных веществ в зависимости от типа используемого экстрагента.

Количественное определение содержания экстрактивных веществ проводили гравиметрическим способом по методу, описанному в государственной фармакопее «ОФС.1.5.3.000615», с применением лиофилизации. После этапа экстрагирования этиловые и водные экстракты переносили в точно взвешенные емкости для сушки. Лиофилизацию экстрагируемых веществ проводили на лиофильной сушилке «FreeZone» («Labconco») (150Па, -52 °С) до полной сублимации растворителя. Для определения всей массы экстрагируемых веществ измеряли вес экстракта до и после лиофилизации.

Содержание экстрактивных веществ вычисляли по формуле, указанной в методике «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Для оценки антиоксидантной активности (АОА) исследуемых экстрактов использовали стандартную методику перекисного окисления липидов (ПОЛ) на модельной системе желточных липопротеидов (ЖЛП) [2]. Окисление ненасыщенных жирных кислот инициировали добавлением сернокислого железа (II). Оптическую плотность измеряли при длине волны 530 нм на спектрофотометре «Cary 100 UV-Vis»

(«Agilent Technologies»). Антиоксидантную активность (X) рассчитывали в процентах по формуле:

$$X = \frac{E_k - E_0}{E_k} \times 100,$$

где E_k – показатель оптической плотности в контрольной пробе без экстракта листьев *Vaccinium vitis-idaea*; E_0 – показатель оптической плотности в опытной пробе.

В данном исследовании статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения «SPSS Statistics» (версия 27.0.1). Проверку нормальности распределения совокупности полученных данных осуществляли с помощью критерия Колмогорова. Совокупности данных с нормальным распределением сравнивали с использованием t-критерия Стьюдента, данные, отличавшиеся от нормального распределения, сравнивались с помощью статистического U-критерия Манна – Уитни. Уровень значимости для принятия нулевой гипотезы принимался при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В исследовании Bujor et al. методом оценки антиоксидантной активности по способности исследуемых объектов восстанавливать стабильный радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH) было показано, что антиоксидантные свойства БАВ спиртовых экстрактов, выделенных из листьев, выше, чем из плодов *Vaccinium vitis-idaea* [10]. Данное исследование позволяет предположить, что именно листья *Vaccinium vitis-idaea* являются ценным биологическим сырьем, имеющим уникальный качественный и количественный состав БАВ. В связи с этим в данной работе были исследованы антиоксидантные свойства водных и спиртовых экстрактов листьев *Vaccinium vitis-idaea*.

Определение содержания экстрагируемых веществ после фильтрации через мембрану с размером пор 0,22 м водных и спиртовых экстрактов листьев *Vaccinium vitis-idaea* показало, что с увеличением концентрации этилового спирта в экстрагенте уменьшается выход суммарного содержания действующих и балластных веществ. Согласно литературным данным, в листьях *Vaccinium vitis-idaea* Центральной Якутии содержится до 9,5% арбутина, до 35% дубильных веществ и аскорбиновой кислоты – 27% [1]. Результаты исследования по определению содержания экстрагируемых веществ подтверждают, что экстрагируемые вещества листьев *Vaccinium vitis-idaea* представлены в основном водорастворимыми соединениями: простыми фенолами, углеводами, дубильными веществами и органическими кислотами (рис. 1).

Исследование антиоксидантной активности экстрактов листьев *Vaccinium vitis-idaea* проводилось на модельной системе желточных липопротеидов. Модельная система имеет постоянный липидный состав и содержит два типа липидно-белковых комплексов, которые соответствуют липидному и белковому составу плазмы крови человека очень низкой и низкой плотности [2]. При разведении в фосфатном буфере фосфолипиды яичного желтка образуют двухслойные мицеллы – липосомы. В этой системе окисление происходит на поверхности липосом, несущих заряд на полярных головках фосфолипидов. Введение сернокислого железа (II) в систему сопровождается ускорением процессов свободнорадикального окисления, при этом спонтанное

Исследование антиоксидантной активности экстрактов листьев *Vaccinium vitis-idaea* проводилось на модельной системе желточных липопротеидов. Модельная система имеет постоянный липидный состав и содержит два типа липидно-белковых комплексов, которые соответствуют липидному и белковому составу плазмы крови человека очень низкой и низкой плотности [2]. При разведении в фосфатном буфере фосфолипиды яичного желтка образуют двухслойные мицеллы – липосомы. В этой системе окисление происходит на поверхности липосом, несущих заряд на полярных головках фосфолипидов. Введение сернокислого железа (II) в систему сопровождается ускорением процессов свободнорадикального окисления, при этом спонтанное

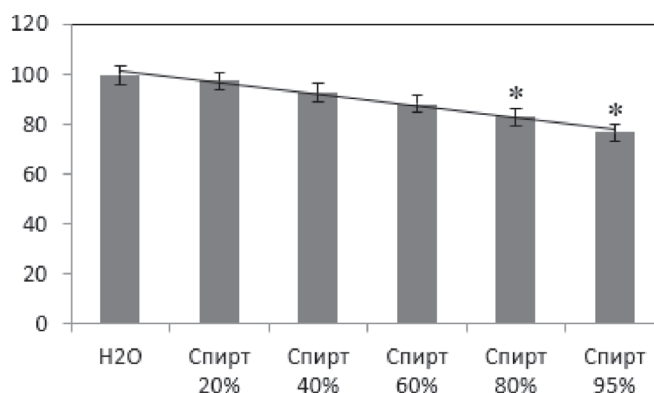


Рис. 1. Содержание экстрактивных веществ в водных и этиловых экстрактах листьев *V. vitis-idaea*: на оси ординат указано содержание экстрактивных веществ, выраженное в процентах, на оси абсцисс - тип используемого экстрагента; * - $p < 0,05$

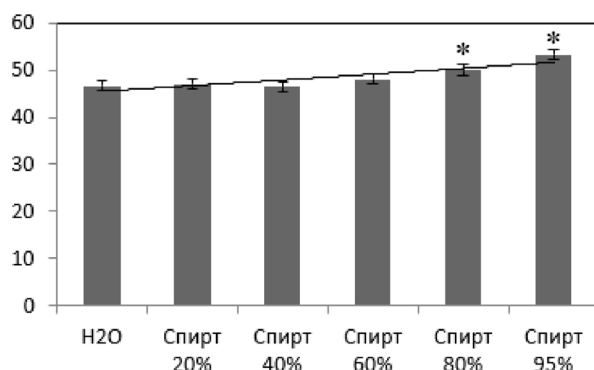


Рис. 2. Общая антиоксидантная активность водных и этиловых экстрактов листьев *V. vitis-idaea* в модельной системе желточных липопротеидов: на оси ординат указана антиоксидантная активность, выраженная в процентах, на оси абсцисс - тип используемого экстрагента; * - $p < 0,05$

окисление плазмы крови и липосом яичного желтка крайне незначительно. Следовательно, модельная система желточных липопротеинов может служить для поиска биологических антиоксидантов, компенсирующих недостаток эндогенных антиоксидантов или активирующих ферменты перекисной защиты.

Результаты нашего исследования показали, что антиоксидантные свойства экстрактов имеют тенденцию к увеличению в зависимости от повышения концентрации этилового спирта. Было отмечено, что увеличение антиоксидантных свойств экстрактов начинается с 60%-ного спиртового экстракта и далее (рис. 2).

Спиртовая экстракция листьев *Vaccinium vitis-idaea* позволяет более интенсивно выделить активные вещества (фенолы, флавоноиды и катехины) из объекта исследования. Интересными являются работы, проведенные Raudone et al., где авторами показано, что спиртовые экстракты листьев *Vaccinium vitis-idaea* отличаются высоким содержанием фенольных веществ и от их состава зависит антиоксидантная активность экстрактов [3].

Предварительные данные позволяют сделать вывод о том, что уникальные биологически активные компоненты, выделенные спиртовой экстракцией из листьев *Vaccinium vitis-idaea*, могут быть использованы в медицине для поиска подходов к регулированию прооксидантных процессов в организме человека при различных патологических состояниях.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют, что извлечение биологически активных фенольных соединений из листьев *Vaccinium vitis-idaea* происходит интенсивнее в 95%-ном этиловом спирте по сравнению с водным и другими водно-спиртовыми растворами, о чем свидетельствует повышение общей антиоксидантной активности, проведенной на модели желточных липопротеидов.

Литература

1. Борисова Н.И., Тимофеев П.А. Запасы листьев брусники в лесах Якутии. Тезисы докладов конференции II(X) съезду Русского ботанического общества «Проблемы ботаники на рубеже XX-XXI веков» 1. Санкт-Петербург, 333. 1988.

Borisova N.I., Timofeev P.A. Stocks of lingon-

berry leaves in the forests of Yakutia // Abstracts of reports of the conference II (X) Congress of the Russian Botanical Society "Problems of botany at the turn of the XX-XXI centuries" 1. St. Petersburg, 333. 1988.

2. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов / Г.И. Клебанов [и др.] // Лабораторное дело 5, 59-62. 1988.

Assessment of the antioxidant activity of blood plasma using yolk lipoproteins / Klebanov, G.I. [et al.] // Laboratory Science. 5, 59-62. 1988.

3. Antioxidant Activities of *Vaccinium vitis-idaea* L. Leaves within Cultivars and Their Phenolic Compounds / Raudone L. [et al.] // Molecules 24(5), 844. 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24050844>

4. Chemical Composition and Biological Activities of the Nord-West Romanian Wild Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) Leaves / Ștefănescu B.E. [et al.] // Antioxidants 9(6), 495. 2020. <https://doi.org/10.3390/antiox9060495>

5. Comprehensive phytochemical analysis of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) from different regions of China and their potential antioxidant and antiproliferative activities / Xu J. [et al.] // RSC advances 13(42), 29438–29449. 2023. <https://doi.org/10.1039/d3ra05698h>

6. Effects of ecological factors on the antioxidant potential and total phenol content of *Scrophularia striata* Boiss / Zargoosh Z. [et al.] // Sci. Rep. 9, 16021. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52605-8>

7. Inhibitory effects of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) fruit extract on obesity-induced inflammation in 3T3-L1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages / Kowalska K. [et al.] // English. Journal of Functional Foods 54, 371–380, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.01.040>

8. Lingonberry Extract Provides Neuroprotection by Regulating the Purinergic System and Reducing Oxidative Stress in Diabetic Rats / Reichert K.P. [et al.] // Molecular nutrition & food research 62(16), e1800050. 2018. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800050>

9. Nutritional and Physicochemical Properties of Wild Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.)-Effects of Geographic Origin / Urbonaviciene D. [et al.] // Molecules 28, 4589. 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28124589>

10. Phenolic compounds and antioxidant activity of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaf, stem and fruit at different harvest periods / Bujor O. [et al.] // Food chemistry 252, 356–365. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.052>

11. Vilickyte G., Raudone L., Petrikaite V. Phenolic Fractions from *Vaccinium vitis-idaea* L. and Their Antioxidant and Anticancer Activities Assessment // Antioxidants 9(12), 1261. 2020. <https://doi.org/10.3390/antiox9121261>