

КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ПРИ ОБОГАЩЕНИИ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ*

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

Виолета Мионовна Ле, канд. хим. наук, научный сотрудник

E-mail: ya808@yandex.ru

Александр Юрьевич Просеков, д-р техн. наук, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, профессор кафедры

Андрей Сергеевич Сухих, канд. фармацевт. наук, доцент, заведующий лабораторией

Ирина Сергеевна Милентьева, д-р техн. наук, доцент кафедры

Владимир Петрович Юстратов, д-р хим. наук, профессор кафедры
Кемеровский государственный университет, г. Кемерово

Функциональные продукты, содержащие природные антиоксиданты, способствуют улучшению показателей здоровья человека и тем самым способствуют увеличению продолжительности жизни. Молоко является ценным солюбилизатором, способствующим растворению труднорастворимых (липофильных) веществ в жидкости. В работе представлены результаты исследования в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии с амперометрическим детектированием антиоксидантных свойств вторичных метаболитов растений для обогащения молочных продуктов. Объектами исследования являлись биологически активные соединения, выделенные из экстрактов каллусных культур растений, выращенных в условиях *in vitro* на жидких питательных средах. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии с амперометрическим детектором для анализа антиоксидантных свойств биологически активных веществ растительного происхождения позволило определить из 8 видов индивидуальных соединений с выраженным потенциалом биологической активности следующие вещества: рутин, розмариновая кислота из *Pulmonaria officinalis*, транс-коричная кислота из *Scutellaria baicalensis*, рутин из *Filipéndula ulmária*. Данные соединения способны эффективно ингибировать свободнорадикальные процессы. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии с амперометрическим детектированием может использоваться как критерий оценки антиоксидантных свойств биологически активных веществ, выделенных из экстрактов каллусных культур.

Ключевые слова: молочные продукты, каллусные культуры, биологически активные вещества, антиоксидантная активность, высокоэффективная хроматография, амперометрическое детектирование

Для цитирования: Критерии оценки антиоксидантных свойств вторичных метаболитов при обогащении молочных продуктов / В. М. Ле, А. Ю. Просеков, А. С. Сухих [и др.] // Молочная промышленность. 2024. № 4. С. 32–40. <https://doi.org/10.21603/1019-8946-2024-4-4>

ВВЕДЕНИЕ

Применение биологически активных веществ растительного происхождения в составе молочных продуктов позволяет обогащать палитру ценных биологических свойств. Это способствует созданию новых продуктов с функциональной направленностью [1, 2]. Значительное количество работ подтверждает антиоксидантное действие полифенолов растительного происхождения [3]. С другой стороны, молоко и молочные продукты являются ценной основой для создания продукта, функциональные свойства которого можно моделировать добавлением специализированных бактериальных или грибковых культур (*Lactobacillus* spp. *Bifidobacterium* spp., *Torula* spp. *Sakharomyces* и др.) [4], а также природных первичных и вторичных растительных метаболитов. Именно низкомолекулярные вторичные метаболиты, представляющие собой ароматические или гетероциклические производные с кислород- или серосодержащими заместителями проявляют свойства антиоксидантов. Биологически активные вещества, выделенные из растительных объектов, являются

более предпочтительным как натуральный источник биологически активных соединений [5]. В свою очередь, молоко является ценным солюбилизатором, способствующим растворению труднорастворимых веществ в жидкости. Фенолы и полифенолы, как биологически активные вещества с высокими антиоксидантными свойствами, являются наиболее приемлемым вариантом для расширения функциональных свойств молочных продуктов [6].

В последнее время среди растительных метаболитов большое внимание уделяется молекулам, проявляющим свойства антиоксидантов [7, 8]. Функциональные продукты, содержащие природные антиоксиданты, способствуют улучшению показателей здоровья человека, и тем самым, способствуют увеличению продолжительности жизни. Вторичные метаболиты растений, в частности полифенолы, включая все многообразие флавоноидов (флавоны, флавонолы и др.), а также их гликозидированные аналоги рассматриваются как перспективные соединения с различными биологическими и физиологическими эффектами.

*Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Разработка биологически активных добавок, состоящих из метаболитов растительных объектов *in vitro*, для защиты населения от преждевременного старения» (проект FZSR-2024-0008).

Указанные группы соединений находят активное применение и в пищевой промышленности в качестве антиоксидантов, стабилизаторов, красителей и др. Многие соединения находят самостоятельное применение как фармакотерапевтические агенты, профилактические средства (рутин, кверцетин, дигидрокверцетин и др.). Рассматриваемые в исследовании соединения востребованы в различных областях науки и практики и способны эффективно ингибировать свободнорадикальные процессы.

Поиск источников для получения безопасных растительных экстрактов с постоянным компонентным составом и необходимыми свойствами остается актуальной проблемой. Одним из возможных направлений решения является наработка экстрактов биотехнологически, с использованием каллусных культур растительных тканей. Однако требуется разработка и адаптация инструментальных методов анализа для оценки качественных характеристик экстрактов каллусных культур. Поиск новых источников биологически активных веществ растительного происхождения, изучение их свойств, разработка аналитических методов для их качественной оценки являются актуальными междисциплинарными задачами.

Новизна работы заключается в разработке критериев оценки антиоксидантных свойств вторичных метаболитов при обогащении молочных продуктов с применением обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с амперометрическим детектированием. Для оценки антиоксидантных свойств используют различные методы, такие как спектральные, электрохимические, биологические и другие методы, основанные на протекании реакций по радикальному механизму, где происходит окисление индивидуального соединения. В данной работе предложен метод определения критериев оценки антиоксидантных свойств вторичных метаболитов при обогащении молочных продуктов с применением амперометрического детектирования сигнала реакции окисления в условиях ВЭЖХ, которая позволяет селективно определять антиоксидантную активность компонентов образца.

На основе полученных результатов подобраны условия получения биологически активных веществ из каллусных культур востребованных растений. Предложен доступный аналитический метод, позволяющий устанавливать подлинность, количественное содержание

Источник изображения: unsplash.com



и антиоксидантные свойства полученных экстрактов и индивидуальных соединений, позволяя стандартизировать полученные экстракты по показателям: подлинность экстракта (компонентный состав), антиоксидантная активность, количественное содержание.

Цель работы – исследование в условиях ВЭЖХ с амперометрическим детектированием критериев оценки антиоксидантных свойств вторичных метаболитов, выделенных из экстрактов каллусных культур растений.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Объектами исследования являлись биологически активные вещества, выделенные из каллусных культур четырех видов растений: *Ginkgo biloba* (L.), *Filipéndula ulmária* (L.), *Scutellaria baicalensis* [9, 10], *Pulmonaria officinalis*, выращенных в условиях *in vitro*. Для получения каллусных культур клеток в качестве исходного материала использовали семена растений (2017 год урожая), полученные и пророщенные в Ботаническом саду Балтийского федерального университета им. И. Канта (г. Калининград, Россия) [11].

Ginkgo biloba (L.), *Filipéndula ulmária* (L.), *Scutellaria baicalensis*, *Pulmonaria officinalis* внесены в реестр лекарственных средств и являются перспективными источниками биологически активных компонентов. Растительные объекты достаточно хорошо изучены с точки зрения их компонентного и химического состава и свойств. Препараты на основе экстрактов этих растений или отдельных групп биологически активных соединений широко применяются как фармацевтические препараты, так и биологически активные добавки. Перспективными направлениями применения являются геронтология, спортивная медицина, восстановительная медицина и реабилитология. Растения и их вторичные метаболиты рассматриваются как ноотропные, стресспротективные, геропротекторные и ангиопротекторные средства.

Получение каллусных культур. Для получения стерильного материала семена растений, пропитанные 96 % этиловым спиртом, трехкратно обжигали в пламени спиртовки с погашением огня через 4–5 сек, после чего удаляли твердую оболочку и стерилизовали в 70 % этиловом спирте в течение 1 мин и 0,1 % растворе сулемы в течение 7 мин. После стерилизации материал трехкратно отмывали в течение 20 мин в дистиллированной стерильной воде. Для получения стерильных проростков семена высаживали на агаризованные среды в чашки Петри диаметром 60 мм и 90 мм, а также в баночки с вентилируемыми крышками [11, 12, 13].

Состав питательной среды для получения стерильных проростков:

- гинкго двулопастного: макросоли 20× MS (среда Мурасиге – Скуга) (по Т. Murashige, [14]), микросоли 20× MS (по Т. Murashige, [14]), Fe-ЭДТА (хелат железа) (по Т. Murashige [14]), сахароза, никотиновая кислота, пиридоксин, тиамин, инозит, гидролизат казеина, агар;
- таволги вязолистной: макросоли 20× MS (по Т. Murashige, [14]), микросоли 20× SH (SH – среда Шенка Хильдебрандта), Fe-ЭДТА (по Т. Murashige, [14]), сахароза, никотиновая кислота, пиридоксин, тиамин, инозит, 2,4-Д, кинетин, агар;
- шлемника байкальского: макросоли 20× B5 (среда Гамборга) [15], микросоли 20× B5 [15], Fe-ЭДТА [15], сахароза, никотиновая кислота, пиридоксин, тиамин, инозит, агар;
- медуницы лекарственной: макросоли 20× MS, микросоли 20× MS, Fe-ЭДТА, сахароза, никотиновая кислота, пиридоксин, тиамин, б-БАП (б-бензиаминопурин), активированный уголь, агар.

Из образовавшихся проростков в качестве эксплантов использовали стебли и листья (через 8 суток после появления первого листа). Все типы эксплантов помещали на соответствующие среды и инкубировали около 25 суток.

Используемые питательные среды автоклавировали при 15 мин подготовительного и 15 мин основного режима при добавочном давлении 0,7–0,8 атм. Колбы, инструменты стерилизовали в течение 60 минут при 180 °С в сухожаровом шкафу.

Минеральный и гормональный состав питательной среды для культивирования каллусных культур клеток:

- гинкго двулопастного: макросоли 20× MS – 50,00 мл, микросоли MS – 1,00 мл, Fe-ЭДТА – 5,00 мл; тиамин – 5,00 мг; пиридоксин – 0,50 мг; никоти-



новая кислота – 5,00 мг; сахароза – 30,00 г; гидролизат казеина – 500,00 мг; инозит – 100,00 мг; 2,4-Д – 2,00 мг; кинетин – 0,10 мг; агар – 20,00 г.
 – таволги вязолистной: макросоли 20×MS – 50,00 мл, микросоли SH – 1,00 мл, Fe-ЭДТА – 5,00 мл; тиамин – 5,00 мг; пиридоксин – 0,50 мг; никотиновая кислота – 5,00 мг; сахароза – 30,00 г; инозит – 100,00 мг; 2,4-Д – 1,00 мг; кинетин – 0,10 мг; агар – 20,00 г.
 – шлемника байкальского: макро-соли 20× B5 – 50,00 мл, микросоли B5 – 10,00 мл, Fe-ЭДТА – 5,00 мл; тиамин – 10,00 мг; пиридоксин – 1,00 мг; никотиновая кислота – 1,00 мг; сахароза – 30,00 г; инозит – 100,00 мг; 6-БАП – 0,05 мг; ИУК (индолилуксусная кислота) – 1,00 мг; агар – 20,00 г.
 – медуницы лекарственной: макро-соли 20× MS – 50,00 мл, микросоли MS – 1,00 мл, Fe-ЭДТА – 5,00 мл, тиамин – 0,10 мг; пиридоксин – 0,50 мг; никотиновая кислота – 0,50 мг; сахароза – 30,00 г; кинетин – 2,00 мг; 6-БАП – 0,50 мг; НУК (надуксусная кислота) – 3,00 мг; агар – 20,00 г.

Первичный каллус отделяли от остатков растительных эксплантов и переносили на свежую питательную среду. Дальнейший цикл выращивания культуры составлял 4–5 недель.

Получение экстрактов из каллусных культур.

Для получения экстрактов из каллусных культур растений был проведен подбор рациональных параметров экстракции комплекса биологически активных веществ с потенциальными антиоксидантными свойствами из биомассы каллусных культур. В качестве экстрагента выступал этиловый спирт 70 %, температура экстракции 50 °С, время экстракции – 6 ч, условия подобраны экспериментально [11]. Высушенный каллус измельчали в мельнице и просеивали через сито с размером отверстия 1 мм. Мелкодисперсный порошок изучаемого растения (3,0 г) экстрагировали в 260 мл этилового спирта в статических условиях для получения биологически активного вещества. Экстрагирование растительного материала осуществлялось на водяной бане с обратным холодильником.

Получение индивидуальных биологически активных веществ. Для препаративного выделения суммарное сконцентрированное извлечение подвергали фракционированию в условиях колоночной хроматографии низкого давления на хроматографе Biologik LP (Bio Rad, США). В качестве сорбента использован октадецилсиликагель фракции 10 мкм, упакованного в колонку 15 × 300 мм. Элюцию осуществляли в градиентном режиме смесью вода:метанол (90:10 → 10:90)

при скорости элюции 0,2 мл/мин с объемом фракции 1,5 мл. Были выделены и накоплены фракции следующих индивидуальных биологически активных веществ: розмариновая кислота из медуницы лекарственной; кверцетин, кемпферол из гинкго двулопасного; транс-коричная кислота, байкалин, вогонин из шлемника байкальского; рутин из таволги вязолистной.

Подтверждение однокомпонентности выделенных фракций проводили на хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором SPD20MA и флюориметрическим детектором RF-20AXS (Shimadzu, Япония). Опорная длина волны 254 нм. Флюориметрический детектор $\lambda_{\text{возб}} = 254 \text{ нм}$, $\lambda = 360 \text{ нм}$. Использовалась хроматографическая колонка Gemini 5 мкм C18, 110 A, 250 × 4,6 мм (Phenomenex, США), объем инъекции 20 мкл с использованием автосемплера. Температура термостата колонки 40 °С [11, 12, 13].

Методика определения степени окисления биологически активных веществ по стеклоуглеродному электроду. Исследование степени окисления биологически активных веществ по стеклоуглеродному электроду выполнено на ВЭЖХ-хроматографе Цвет Яуза-04 (НПО «Химавтоматика», Россия). В работе использовался УФ/Вид-детектор с фотодиодной матрицей с заданными длинами волн 255, 280, 370 нм. Управление прибором и обработка полученных данных осуществлялась с использованием программного обеспечения МультиХром, версия 3.1.1550 (ООО «Амперсэнд», Россия), хроматографическая колонка: Hyper Clone 5 мкм C18 110A, размер 250 × 4,6 мм (Phenomenex, США), предколонка Analytical Guard (KJO-4282).

Источник изображения: unsplash.com



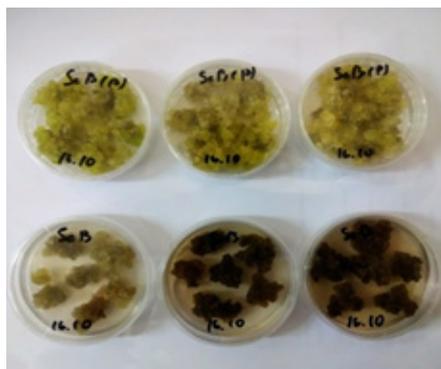
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Большинство полученных линий каллусных культур имело плотную консистенцию и низкую степень оводненности клеток (соотношение сухая масса клеток/сырая масса клеток было в диапазоне 1/8–1/10). Цвет культур желтоватый и желтовато-бурый, иногда коричневый, реже образовывался более рыхлый светлый каллус.

Степень извлечения индивидуальных биологически активных веществ – не менее 80 %.



а



б



в

Рисунок 1. Каллусные культуры клеток лекарственных растений: а) таволга вязолистная; б) шлемник байкальский; в) медуница лекарственная

В результате очистки фракций биологически активных веществ из экстрактов каллусных культур растений удалось получить индивидуальные биологически активные вещества со степенью очистки индивидуальных веществ – не менее 95 % [11, 12, 13].

Получение биологически активных веществ из объектов природного происхождения достаточно сложная и комплексная задача. С одной стороны, растения-дикоросы как источник сырья требуют особых территорий произрастания (экологически безопасных), строго определенные временные параметры сбора, связанные с периодом вегетации растения и тем самым количественным содержанием вторичных метаболитов. Существует необходимость планомерного сбора сырья с учетом годовых ритмов. Другим немаловажным фактором является реликтовость некоторых растений, таких как гинкго билоба. Во многом эти факторы затрудняют планомерное использование растений-дикоросов как источников ценных биологически активных веществ для нужд пищевой промышленности. Одним из вариантов решения непрерывного получения растительных экстрактов является получение биологически активных веществ из тканевых растительных культур.

Применение биотехнологических подходов для получения суммы растительных метаболитов обуславливают необходимость в разработке адекватных методов выделения вторичных метаболитов, а также аналитических подходов для их стандартизации.

Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с амперометрическим стеклоуглеродным детектором для анализа биологически активных веществ растительного происхождения активно стали развиваться благодаря разработкам и исследованиям проф. Я. И. Яшина. Стеклоуглеродный амперометрический детектор обладает достаточно высокой селективностью, позволяя визуализировать компоненты, проявляющие свойства восстановителей (антиоксидантов). С другой стороны, данный тип детекторов экономически доступнее, а чувствительность превосходит фотометрический. Достаточно высокий диапазон варьирования электродным потенциалом позволяет настроить детектор для визуализации веществ с определенным порогом редокс-свойств. Это позволяет провести в данном исследовании анализ индивидуальных биологически активных соединений, выделенных из экстрактов каллусных культур выбранных растений.

Хроматограмма рутина, выделенного из таволги вязолистной, представлена на рисунке 2.

Как видно из полученных данных, степень отклика детектора коррелирует с количественным содержанием в образце вещества проявляющего свойства антиоксиданта. Высокая чувствительность позволяет детектировать вещества минорного характера. Вместе с этим, при записи хроматограммы формируется уникальный хроматографический профиль, позволяющий четко идентифицировать продуцирующий объект экстракта по принципу «отпечатков пальцев» (finger print). Рассматривая анализируемый экстракт с позиции единой системы, следует обратить внимание на количественное содержание веществ-восстановителей в образце. Так известными веществами, содержащимся в таволге вязолистной, являются кверцетин, кемпферол, гликозилированные флавоноиды, такие как, рутин, гиперозид, кверцитрин, авикуларин, астрагалин [16].

Благодаря большому содержанию биологически активных соединений, растение можно использовать для профилактики и лечения диабетических заболеваний, болезней иммунной системы, к тому же растение обладает антиоксидантной активностью [17].

Различные структурные свойства определяют отличительную гидрофильность детектируемых компонентов. В условиях обращено-фазовой ВЭЖХ данные вещества будут обладать отличительными временами удерживания.

На рисунке 3 представлена ВЭЖ-хроматограмма анализа кверцетина, выделенного из гинкго билоба. Степень отклика детектора коррелирует с количественным содержанием в образце вещества, проявляющего

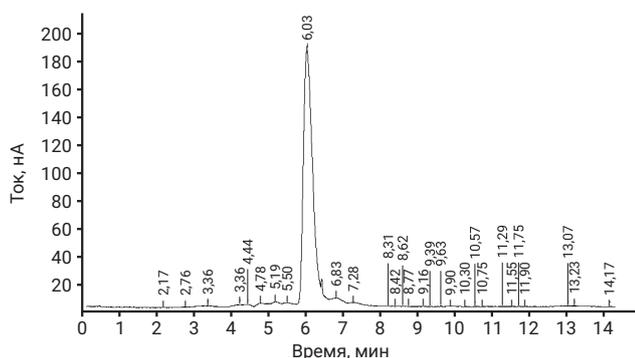


Рисунок 2. ВЭЖ-хроматограмма анализа рутина из таволги вязолистной с применением стеклоглеродного датчика в качестве амперометрического детектора

свойства антиоксиданта. Полученные индивидуальные вещества по данным ВЭЖХ анализа с амперометрическим детектированием обладают незначительным количеством родственных примесей, проявляющих свойства восстановителя. На рисунке 3 такие компоненты имеют времена удерживания 4,80, 9,88 мин, их общее суммарное содержание не превышает 0,2 %.

На рисунке 4 представлена хроматограмма анализа транс-коричной кислоты из шлемника байкальского, проведенного с применением стеклоглеродного датчика в качестве амперометрического детектора. Высокая чувствительность амперометрического детектора обусловлена малой величиной шумов (порядка 10^{-12} А), во избежание зашкаливания сигнала раствор транс-коричной кислоты был разбавлен в 1000 раз. Пик со временем удерживания 9,79 мин соответствует отклику детектора на транс-коричную кислоту. Результаты анализа с использованием амперометрического детектора в образце очищенной коричной кислоты позволяет зафиксировать наличие неиден-

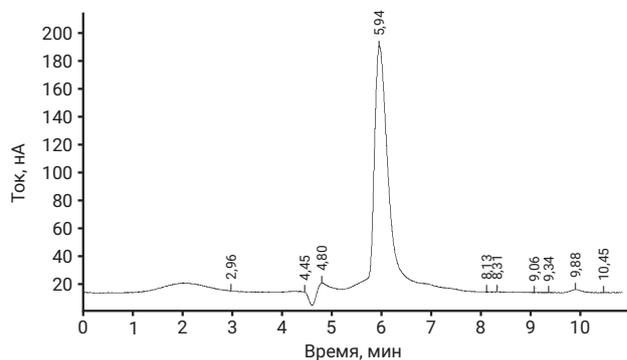


Рисунок 3. ВЭЖ-хроматограмма анализа кверцетина из гинкго билоба с применением стеклоглеродного датчика в качестве амперометрического детектора. Разведение $\times 1000$

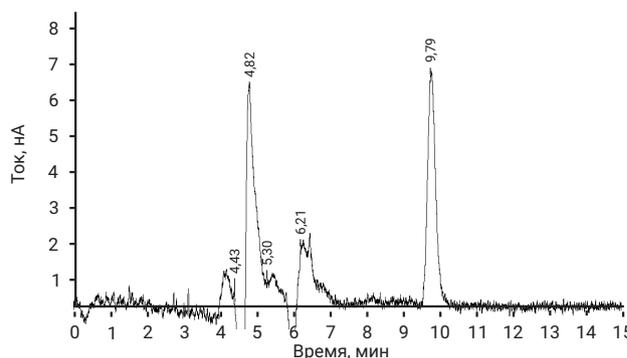


Рисунок 4. ВЭЖ-хроматограмма анализа транс-коричной кислоты из шлемника байкальского с применением стеклоглеродного датчика в качестве амперометрического детектора. Разведение $\times 1000$



Источник изображения: splash.com

тифицированной примеси (4,82 мин), проявляющей физико-химические характеристики свойственные транс-коричной кислоте. В контексте структурных особенностей коричной кислоты нами предполагается, что полученная субстанция представляет собой рацемическую смесь, содержащую цис-транс-изомеры.

На рисунке 5 представлена хроматограмма анализа розмариновой кислоты из медуницы лекарственной, отклик розмариновой кислоты амперометрического детектора соответствует 12,95 мин. Подобные эффекты на хроматограмме наблюдаются при анализе субстанции розмариновой кислоты. Выделенная розмариновая кислота по своим хроматографическим характеристикам обладает чистотой более 95%. Близкородственная примесь, соответствующая времени выхода 13,63, помимо общего времени удерживания в условиях амперометрического детектора, имеет близкие спектральные

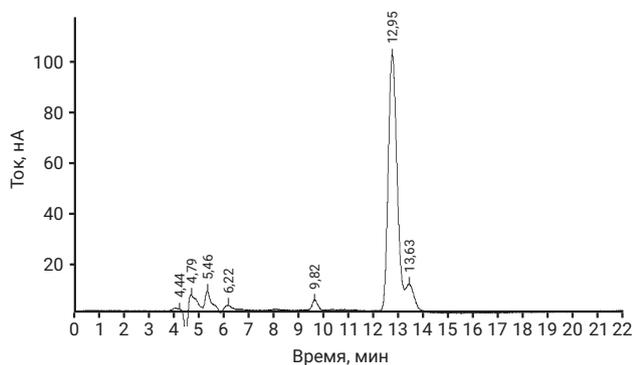


Рисунок 5. ВЭЖ-хроматограмма анализа розмариновой кислоты из медуницы лекарственной с применением стеклоуглеродного датчика в качестве амперометрического детектора

характеристики. Это может говорить о содержащемся изомере или об окислении по некоторым гидроксилам или диеновому фрагменту в процессе выделения.

Кемпферол дал отклик единичным пиком с минимальными пиками шума (рис. 6). Время нахождения молекул вещества на поверхности электрода составляет миллисекунды. Величина тока зависит от природы анализируемого вещества, материала рабочего электрода и потенциала, приложенного к электроду. Выделенный образец кемпферола представлен небольшим и относительно невысоким содержанием основного компонента (кемпферола) с общим содержанием 2 мг/г.

На рисунке 7 представлена хроматограмма амперометрического детектирования байкалина из шлемника байкальского. В образце отмечено значительное содержание байкалина. Выделенный и очищенный в наших условиях образец по частоте соответствует 98%.

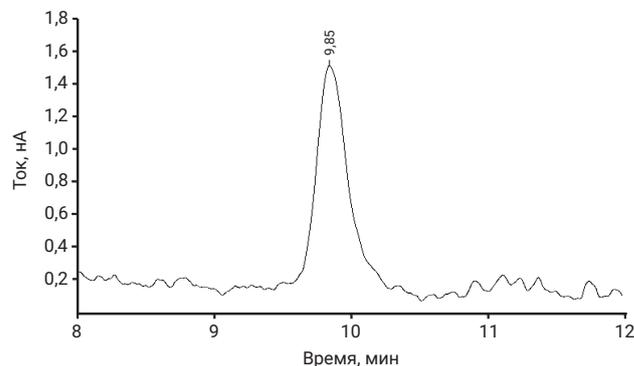


Рисунок 6. ВЭЖ-хроматограмма анализа кемпферола из гинкго билоба с применением стеклоуглеродного датчика в качестве амперометрического детектора

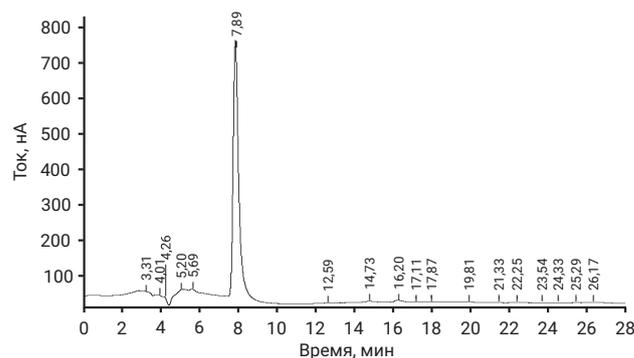


Рисунок 7. ВЭЖ-хроматограмма анализа байкалина из шлемника байкальского с применением стеклоуглеродного датчика в качестве амперометрического детектора

На рисунке 8 представлена хроматограмма амперометрического детектирования вогонина из шлемника байкальского. Значительно лучше в наших исследованиях удалось очистить образец вогонина. В условиях ВЭЖХ анализа с амперометрическим детектированием его элюция составила 5,49 мин (рис. 8).

Изучена восстановительная активность индивидуальных биологически активных веществ относительно стеклоглеродного детектора. Данное свойство соответствует потенциалу антиоксидантной активности изученных веществ. Полученные эффекты восстановителей по амперометрическому детектированию позволяют спрогнозировать биологическую и фармакологическую активность применительно к антиоксидантным свойствам веществ. Так, результаты (см. табл.) показали, что из 8 видов индивидуальных биологически активных веществ выраженным потенциалом анти-

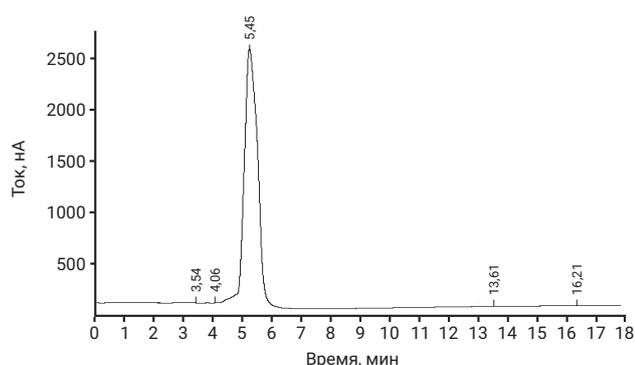


Рисунок 8. ВЭЖ-хроматограмма анализа вогонина из шлемника байкальского с применением стеклоглеродного датчика в качестве амперометрического детектора

Таблица

Физико-химические характеристики образцов в условиях окисления стеклоглеродным датчиком

№ п.п.	Вещество	нА /сек	Время удерживания, мин.
1	рутин из <i>Filipéndula ulmária*</i>	3402,45	6,050
2	кверцетин из <i>Ginkgo biloba</i>	4950,07	5,940
3	транс-коричная кислота из <i>Scutellaria baicalensis*</i>	103,36	9,798
4	розмариновая кислота из <i>Pulmonaria officinalis*</i>	2554,49	12,950
5	кемпферол из <i>Ginkgo biloba</i>	2503,30	9,865
6	байкалин из <i>Scutellaria baicalensis</i>	15971,60	7,890
7	вогонин из <i>Scutellaria baicalensis</i>	82356,91	5,490
8	рутин из <i>Pulmonaria officinalis*</i>	3285,45	6,030

*разведение в 1000

оксидантной активности обладают следующие вещества: рутин, розмариновая кислота из медуницы лекарственной, транс-коричная кислота из шлемника байкальского, рутин из таволги вязолистной. Данные соединения способны эффективно ингибировать свободнорадикальные процессы. Обобщая полученный результат для флавоноидов и ксантонов, следует отметить, что у данных соединений активные гидроксилы преимущественно расположены в 5, 7 и (4'), а также 3, 4 или 4' положении структуры. Добавление биологически активных веществ с антиоксидантными свойствами в молочные продукты могут замедлять реакции окисления. Также они могут применяться для увеличения срока годности молочных продуктов [18].

По мнению ряда авторов, именно комбинирование веществ с антиоксидантной активностью способствует наилучшему антиоксидантному эффекту. В настоящее время известно свыше 400 различных методов определения антиоксидантной активности, среди них принципиально можно выделить биохимические, химические, физические и физико-химические. Биохимические и химические методы требуют особых реактивов, а проведение реакции должно быть при соблюдении строгих условий. Данное обстоятельство накладывает отпечаток на воспроизводимость и достоверность результатов. Физические методы, в том числе инверсионная вольтамперометрия, обладая высокой чувствительностью, требует селективных электродов, а также соблюдения условий, обеспечивающих чистоту рабочей поверхности электрода. При работе со сложными природными образцами, данный фактор не всегда выполним, а дополнительные манипуляции, направленные на обеспечение сохранности электрода, могут потребовать дополнительного времени и трудозатрат.

Все эти трудности во многом удается преодолеть, используя обращено-фазовую ВЭЖХ с амперометрическим детектором. Сочетая качества высокой чувствительности электрохимического детектора, в данном варианте электрод омывается новой порцией подвижной фазы, а присутствующие компоненты (элюируемые с колонки) вызывают на его поверхности разность потенциалов. При этом образец преодолевает внутренние среды колонки с сорбентом, что позволяет защитить рабочую поверхность стеклоглеродного детектора от загрязнения. Особо следует отметить, что сочетание хроматографического принципа (последовательность элюции компонентов) позволяет селективно определять антиоксидантную активность компонентов образца.

Выводы

Впервые показана возможность применения образцово-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с амперометрическим детектированием для определения антиоксидантной активности функциональных ингредиентов полученных из каллусных культур растительных объектов. Применение высоко-

коэффициентной жидкостной хроматографии с амперометрическим детектированием показало высокую информативность по показателям антиоксидантные свойства биологически активных веществ, выделенных из экстрактов каллусных культур. Данный вариант может использоваться для оценки экстрактов каллусных культур клеток по показателю подлинность. ■

CRITERIA FOR EVALUATING THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SECONDARY PLANT METABOLITES IN THE FORTIFICATION OF DAIRY PRODUCTS

Violeta M. Le, Alexander Yu. Prosekov, Andrey S. Sukhikh, Irina S. Milenteva, Vladimir P. Yustratov
Kemerovo State University, Kemerovo

ORIGINAL ARTICLE

Functional products containing natural antioxidants contribute to the improvement of human health indicators, and thus contribute to an increase in life expectancy. Milk is a valuable solubilizer that promotes the dissolution of insoluble substances in a liquid. The paper presents the results of a study under conditions of high-performance liquid chromatography (HPLC) with amperometric detection of antioxidant properties of secondary plant metabolites for the enrichment of dairy products. The objects of the study were biologically active compounds isolated from extracts of callus cultures of plants grown in vitro on liquid nutrient media. The use of HPLC chromatography with an amperometric glass-carbon detector to analyze the antioxidant properties of biologically active substances of plant origin made it possible to identify the following substances from 8 types of individual compounds with a pronounced potential for biological activity: rutin, rosemary acid from *Pulmonaria officinalis*, trans-cinnamic acid from *Scutellaria baicalensis*, rutin from *Filipendula ulmaria*. These compounds are able to effectively inhibit free radical processes in dairy products. The use of high-performance liquid chromatography with amperometric detection can be used as a criterion for evaluating the antioxidant properties of biologically active substances isolated from extracts of callus cultures.

Keywords: dairy products; callus cultures; antioxidant activity; highly effective chromatography; biologically active substances

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ullah, H. Natural Polyphenols for the Preservation of Meat and Dairy Products / H. Ullah [et al.] // *Molecules*. 2022. Vol. 27(6). P. 1906. <https://doi.org/10.3390/molecules27061906>
2. Cerdá-Bernad, D. Microencapsulated saffron floral waste extracts as functional ingredients for antioxidant fortification of yogurt: Stability during the storage / Débora Cerdá-Bernad [et al.] // *LWT*. 2023. Vol. 184. P. 114976. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114976>.
3. Luo, Y. Flavanols from Nature: A Phytochemistry and Biological Activity Review / Yu Luo [et al.] // *Molecules*. 2022. Vol. 27(3). P. 719. <https://doi.org/10.3390/molecules27030719>
4. Zahrani, A. J. Viability of probiotics and antioxidant activity of soy and almond milk fermented with selected strains of probiotic *Lactobacillus* spp. / A. J. Zahrani [et al.] // *LWT*. 2023. Vol. 176. 114531. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114531>
5. Park, H. Antioxidant and antigenotoxic effect of dairy products supplemented with red ginseng extract / H. Park [et al.] // *Journal of Dairy Science*. 2018. Vol. 101. Iss. 10. P. 8702–8710 <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14690>
6. Avila-Nava, A. Supplementation with antioxidants and phenolic compounds in ruminant feeding and its effect on dairy products: a systematic review / A. Avila-Nava [et al.] // *The Journal of dairy research*. 2023. Vol. 90 (3). P. 216–226. <https://doi.org/10.1017/S0022029923000511>
7. Manzoor, A. Plant-derived active substances incorporated as antioxidant, antibacterial or antifungal components in coatings/films for food packaging applications / A. Manzoor [et al.] // *Food Bioscience*. 2023. Vol. 53. 102717. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102717>
8. Adinepour, F. Fortification/enrichment of milk and dairy products by encapsulated bioactive ingredients. / F. Adinepour [et al.] // *Food Research International*. 2022. Vol. 157. 111212. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111212>
9. Dinda, B. Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders / B. Dinda [et al.] // *European journal of medicinal chemistry*. 2017. Vol. 131. P. 68–80. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.004>
10. Baygildieva, D. I. Simultaneous Determination of Wogonin, Scutellarin, Baicalin, and Baicalein in Extracts from *Scutellariae Baicalensis* by High-Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry / D. I. Baygildieva [et al.] // *Journal Analytical Chemistry*. 2018. Vol. 73. P. 1317–1322. <https://doi.org/10.1134/S1061934818140022>
11. Le, V. Isolation of the main biologically active substances and phytochemical analysis of ginkgo biloba callus culture extracts / V. Le [et al.] // *Molecules*. 2023. Vol. 28. № 4. P. 1560. <http://doi.org/10.3390/molecules28041560>
12. Le, V. Effects of rutin produced by *Filipendula ulmaria* callus cultures on the lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. / V. Le [et al.] // *Caspian Journal of Environmental Science*. 2023. <http://doi.org/10.22124/CJES.2023.7316>
13. Milentyeva, I. S. Biologically active compounds in *Scutellaria baicalensis* L. Callus extract: phytochemical analysis and isolation/ I. S. Milentyeva [et al.] // *Foods and raw materials*. 2023. Vol. 11(1). P. 172–186. <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-1-564>
14. Murashige, T. A. Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Culture / T. Murashige, F. Scog // *Physiology Plantarum*. 1962. № 15. P. 473–497
15. Gamborg, O. L. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells / O. L. Gamborg, R. A. Miller, O. Ojima // *Experimental cell research*. 1968. № 50 (1). P. 151–158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
16. Bijttebier, S. A. First Step in the Quest for the Active Constituents in *Filipendula ulmaria* (Meadowsweet): Comprehensive Phytochemical Identification by Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry / S. Bijttebier [et al.] // *Planta Medica* 2016. № 82 (6). P. 559–72. <https://doi.org/10.1055/s-0042-101943>.
17. Savina, T. Variation in Phenolic Compounds, Antioxidant and Antibacterial Activities of Extracts from Different Plant Organs of Meadowsweet (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) / T. Savina [et al.] // *Molecules*. 2023. Vol. 28(8). P. 3512. <https://doi.org/10.3390/molecules28083512>