

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПОБЕГАХ *CALLUNA VULGARIS* L

Н. А. ЗАБОКРИЦКИЙ,

доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, доцент,
Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук
(620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, д. 106)

О. Е. ЧЕРЕПАНОВА,

кандидат биологических наук, научный сотрудник,
Ботанический сад Уральского отделения Российской академии наук
(620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, д. 202а)

Н. Н. ДУДУКИНА,

старший научный сотрудник,
Уральский научно-исследовательский ветеринарный институт
(620142, г. Екатеринбург, ул. Белинского, д. 112а)

Ключевые слова: *Calluna vulgaris*, кверцетин, лист, вегетационный период, высокоэффективная жидкостная хроматография.

На сегодняшний день, в научной литературе достаточно подробно описан перечень веществ, выделенных из различных частей растения *C. vulgaris*, проявляющих лекарственные свойства и интересных с точки зрения медицины. Изучение лекарственных свойств вереска, произрастающего на территории нашей страны, началось сравнительно недавно и ограничилось лишь территорией Русской равнины, где вереск занимает большие площади. Генетическая неоднородность восточной части ареала вереска обуславливает необходимость изучения качественного и количественного состава экстрактов, полученного от разных популяций, с целью выявления наиболее ценных по своим фармакологическим свойствам популяций. В статье представлены результаты изучения сезонной динамики накопления биологически активных веществ (на примере кверцетина) в листьях *C. vulgaris*, произрастающего в подзоне предлесостепи Западной Сибири. Определение сезонной динамики накопления биологически активных веществ проводили методом обращеннофазной ВЭЖХ с фотометрическим детектированием. В результате оценки динамики накопления биологически активных веществ за вегетационный период (на примере накопления кверцетина) выявили, что содержание кверцетина в популяции, произрастающей в предлесостепи Западной Сибири более чем в 2,5 раза выше, по сравнению с популяциями Русской равнины. Оптимальным временем заготовки сырья можно считать август – сентябрь, когда содержание кверцетина максимально. Вероятнее всего, увеличение содержания кверцетина связано с увеличением числа хлоропластов в клетках листа, число которых, в свою очередь, также увеличивается в этот период. Увеличение линейных размеров листа вереска, возможно, связано со снижением освещенности под пологом леса.

SEASONAL DYNAMICS OF ACCUMULATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN THE SHOOTS *CALLUNA VULGARIS* L

N. A. ZABOKRITSKIY,

doctor of medical sciences, senior researcher, associate professor
Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences
(106 Pervomayskaya Str., 620049, Ekaterinburg)

O. E. CHEREPANOVA,

candidate of biological sciences, researcher,
Botanic Garden of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences
(202a 8 Marta Str., 620144, Ekaterinburg)

N. N. DUDUKINA, senior researcher,

Ural Scientific Research Veterinary Institute
(112a Belinskogo Str., 620142, Ekaterinburg)

Keywords: *Calluna vulgaris*, quercetin, leaf, growing season, high performance liquid chromatography.

To date, the scientific literature is described in detail a list of substances extracted from various parts of the plant *Calluna vulgaris*, showing a medicinal properties and being interesting from the medical point of view. The study of medicinal properties the heather which is growing on the territory of our country has begun comparatively recently and was limited to only the territory of the Russian Plain, which occupies large areas of heather. Genetic heterogeneity of the eastern part of its range the heather makes it necessary for studying the qualitative and quantitative composition of the extracts obtained from different populations in order to identify the most valuable populations on their pharmacological properties. There are the results of biologically active substance accumulation seasonal dynamics study (for the quercetin) in the leaves of *C. vulgaris*, which grows in the subzone of Western Siberia predlesostepare presented in the article. The determination of the seasonal dynamics of accumulation of biologically active substances was performed by reversed-phase HPLC with photometric detection. The evaluation of the biologically active substances accumulation dynamic for the growing season (quercetin accumulation) is revealed that the quercetin content in the population which are grown in the West Siberia more than 2.5 times higher as compared to the populations of the Russian plain. August - September is the best time of preparation of raw materials, when quercetin content as much as possible. Most likely that the increase in quercetin content associated with the number of chloroplasts in the leaf cells, the number of which in turn, also increases in this period. The increase in the linear dimensions of the heather sheets, perhaps due to a decrease of illumination under the forest canopy.

Положительная рецензия предоставлена Л. П. Ларионовым, доктором медицинских наук, профессором кафедры фармакологии и клинической фармакологии Уральского государственного медицинского университета.

Вереск обыкновенный (*Calluna vulgaris* L.) – низкорослый вечнозеленый кустарник, размножающийся преимущественно вегетативным путем, а также ежегодно продуцирующий большое количество семян [6, 9].

На территории Европы ареал вида сплошной, наиболее часто встречается вереск в северных районах (Англия, Шотландия, Ирландия). На территории России сплошным ареалом характеризуются популяции, произрастающие на Русской равнине, а в Западной Сибири популяции вереска сильно разрознены и малочисленны [1, 15].

В Европе вереск произрастает на олиготрофных болотах и под пологом в смежных сосновых лесах зеленомошниках. В некоторых странах Евросоюза существуют также плантации вереска, где он в больших количествах выращивается как культурное растение, главным образом для фармацевтической отрасли.

Он давно используется в народной медицине в качестве антисептического, антибактериального, желчегонного, мочегонного, отхаркивающего, противовоспалительного и противоревматического средства. В современных научных работах показана его противоопухолевая, противовоспалительная и антиоксидантная активность. Отмечается положительное влияние экстракта вереска при лечении депрессии и состояниях тревожности. В Германии и Франции вереск отнесен к фармакопейным растениям [2, 7].

В России вереск также внесен в перечень лекарственных растений, его популяции большей частью приурочены к сухим песчаным увалам в сосняках бруснично-зеленомошных, лишайниковых и на верховых болотах отмечены лишь на Русской равнине [1, 4, 5]. Популяции вереска, произрастающие на территории Западной Сибири, длительно изолированы от основной части ареала вида и разрознены, а также вереск отмечен в нескольких региональных красных книгах, что затрудняет его промышленное применение и использование в медицинских целях [16].

Вместе с тем на сегодняшний день в литературе достаточно подробно описан перечень веществ, выделенных из различных частей растения *C. Vulgaris* и проявляющих лекарственные свойства и интересных с точки зрения медицины [14].

Изучение лекарственных свойств вереска, произрастающего на территории нашей страны, началось сравнительно недавно и ограничилось лишь территорией Русской равнины, где вереск занимает большие площади [2]. Генетическая неоднородность восточной части ареала вереска обуславливает необходимость изучения качественного и количественного состава экстрактов, полученного от разных популяций, с целью выявления наиболее ценных по своим фармакологическим свойствам популяций [3].

Цель и методика исследований. Цель – изучить сезонную динамику накопления флавоноидов на примере кверцетина. Кверцетин содержится в облиственных побегах вереска, оказывает противовоспалительное, антигистаминное, противоопухолевое, противовирусное действие.

Сбор материала (молодые облиственные побеги) для лабораторного анализа проводили в подзоне предлесостепи Западной Сибири на территории Свердловской области, близ п. Заводоуспенское, где вереск произрастает в достаточном объеме.

Выборка была расположена под пологом сосняка зеленомошника, возраст которого не превышал 80 лет, где *C. vulgaris* произрастает в ассоциации со мхами (*Pleurozium Schreberi* Willd. ex Brid., *Ptilium crista-castrensis* Hedw., *Polytrichum commune* Hedw.) для поддержания оптимальной приземной влажности [4, 12].

Однолетние побеги с 30 кустарничков вереска (5–10 см длины) собирались на расстоянии не менее 50–100 м друг от друга. Высушивание материала проводили открытым способом в тени до воздушно-сухого состояния в хорошо проветриваемом помещении. После сушки материал полностью измельчался до порошкообразного состояния и хранился в темной посуде при постоянной температуре.

Для изучения сезонной динамики накопления веществ вторичного обмена (флавоноиды), на основе литературных данных [8], были выбраны 4 календарные точки: начало вегетационного периода (май 2015 г.), середина вегетационного периода (июль 2015 г.), период массового цветения (сентябрь 2015 г.), окончание вегетационного периода (октябрь 2015 г.).

Экстракт *C. vulgaris* был получен по общепринятой методике [13]: 1 г измельченных побегов вереска переносили в колбу на водяную баню и добавляли 10 мл 96 % этанола, экстрагировали 15 минут. После чего экстракт сливали через фильтровальную бумагу в темную посуду с плотной крышкой. К остатку снова приливали 10 мл 96 % этанола. Процедуру повторяли трижды. Полученный экстракт упаривали до воздушно-сухого состояния.

Определение сезонной динамики накопления биологически активных веществ проводили методом обращеннофазной ВЭЖХ с фотометрическим детектированием на приборе Aligent 1100 [8]. Были использованы следующие стандарты: Кверцетин (Диаэм, Россия). Для приготовления стандартного образца с концентрацией 0,05 мг/см³ 5 мг стандарта помещали в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводили объем до метки метанолом. Для анализа использовали тот же экстракт, что и для определения суммы флавоноидов.

Условия хроматографического анализа. Колонка: октадецилсиликагель 5 мкм, 250 × 4,6 (например,

Phenomenex Luna 5мкм C18(2)); Подвижная фаза: ацетонитрил – раствор трифторуксусной кислоты рН 2,6 (40:60); Скорость подвижной фазы: 1,0 см³/мин; Температура колонки: 30°C; детектирование: УФ, λ = 365 нм. Объем вводимой пробы: 10 мм³.

Расчет содержания индикаторных компонентов осуществляют по градуировочному графику или по формуле:

$$X = C \times S_1 \times V S_2 \times m,$$

где C – концентрация соответствующего стандартного раствора, мг/см³;

S₁ – площадь пика определяемого компонента в анализируемой пробе;

S₂ – площадь пика определяемого компонента в стандартном образце;

V – общий объем разведения образца, см³;

m – масса навески, г.

Результаты исследований. Накопление биологически активных веществ в лекарственных растениях – это процесс, который зависит от многих факторов и изменяется, в частности, в ходе онтогенеза или при смене внешних условий среды [7].

Из литературных источников [10] известно, что содержание БАВ в растении может изменяться в течение вегетативного сезона, а также сильно зависит от положения по рельефу (увеличение высотной поясности) [11]. Так, кверцетин к началу вегетационного периода (май 2015 г.) активно начинает синтезироваться и накапливаться в листе – 0,15 ± 0,017 мг/г.

В конце июня – середине июля 2015 г. содержание кверцетина увеличивается в 10,7 раза и составляет 1,61 ± 0,007 мг/г. Максимальное содержание

кверцетина наблюдается в августе – сентябре, составляя 3,22 ± 0,005 мг/г, а к середине октября содержание его снова падает до минимальных значений – 0,19 ± 0,012 мг/г.

Для вереска, произрастающего на территории Русской равнины, максимум содержания флавоноидов приходится на июнь – июль, а их количество более чем в 2,5 раза (1,164 ± 0,004) меньше [2].

Известно, что накопление флавоноидов находится в прямой зависимости от условий среды. Так, с увеличением освещенности отмечается и увеличение содержания флавоноидов в листьях [7].

Количество синтезируемого кверцетина зависит также от числа хлоропластов в клетке. Вереск, произрастающий на территории Западной Сибири, обладает большей толщиной листа по сравнению с вереском, произрастающим на Русской равнине [3]. Вероятнее всего, увеличение содержания кверцетина связано с увеличением числа хлоропластов в клетках листа, число которых, в свою очередь, также увеличивается в этот период. Увеличение линейных размеров листа вереска, возможно, связано со снижением освещенности под пологом леса.

Выводы. Рекомендации. В результате оценки динамики накопления биологически активных веществ за вегетационный период (на примере накопления кверцетина) выявили, что содержание кверцетина в популяции, произрастающей в предлесостепи Западной Сибири более чем в 2,5 раза выше по сравнению с популяциями Русской равнины. Оптимальным временем заготовки сырья можно считать август – сентябрь, когда содержание кверцетина максимально.

Литература

1. Горчаковский П. Л. География, экология и история формирования ареала вереска // Ботанический журнал. 1962. Т. 47. Вып. 9. С. 1244–1257.
2. Онегин С. В. Фармакогностическое изучение вереска обыкновенного (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.) : дис. ... канд. фарм. наук. Пермь, 2008. 141 с.
3. Cherepanova O. E., Petrova I. V., Mishchikhina Yu. D. Leaf morphology and anatomy in marginal populations of Scotch heather, *Calluna vulgaris* (L.) Hull. from West Siberia (Tobol River Basin) and Atlantic Europe // International journal of salicology and plant biology. № 3.
4. Delany M. J. Studies on the microclimate of *Calluna* heathland // Journal of Animal Ecology. 1953. № 22. P. 227–239.
5. Elliott R. J. The effects of burning on heather moors of the South Pennines : unpublished thesis. Sheffield, 1953.
6. Gimingham C. H. Biological flora of British Isles: *Calluna* Salisb. A monotypic genus // Journal of Ecology. 1960. Vol. 48. № 2. P. 455–483.
7. Йорданов Д., Николов П., Бойчинов А. Фитотерапия. Лечение лекарственными травами. София, 1972. 347 с.
8. Канунникова Ю. С., Джавахян М. А. Определение флавоноидов в траве Володушки золотистой (*Herba Vupleuri aurei*) методом ВЭЖХ // Новые задачи современной медицины : мат. II междунар. науч. конф. СПб., 2013. С. 88–90.
9. Leyton L. The influence of artificial shading of the ground vegetation on the nutrition and growth of Sitka spruce (*Picea sitchensis* Carr.) in a heathland plantation // Forestry. 1955. № 28. P. 1–6.
10. Mahbulul A. F. Jalal, Read David J., Haslam E. Phenolic composition and its seasonal variation in *Calluna vulgaris* II // Phytochemistry. 1982. Vol. 21. № 6. P. 1397–1401.

11. Monschein M., Neira Iglesias J., Kunert O., Bucar F. Phytochemistry of heather (*Calluna vulgaris* (L.) Hull) and its altitudinal alteration // *Phytochemical Review*. 2010. № 9. P. 205–215.
12. Mork E. On the dwarf shrub vegetation on forest ground // *Medd. Nor. Skogforsoekso*. 1946. № 9. P. 269–392.
13. Муравьева Д. А., Самылина И. А., Яковлев Г. П. Фармакогнозия : учебник. М. : Медицина, 2002. 656 с.
14. Буданцев А. Л. Растительные ресурсы России. Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 2. СПб., 2009. 513 с.
15. Санников С. Н., Петрова И. В., Полежаева М. А., Мищикина Ю. Д., Черепанова О. Е., Дымшакова О. С. Генетическая дивергенция восточноевропейских и притобольских популяций *Calluna vulgaris* (L.) Hull // *Экология*. 2013. № 2. С. 110–114.
16. Большаков В. Н., Горчаковский П. Л. Красная книга Среднего Урала (Свердловская и Пермская области). Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды редких животных и растений : справочник. Екатеринбург, 1996. 279 с.

References

1. Gorchakovsky P. L. Geography, ecology and history of formation of the area of heather // *Botanical journal*. 1962. Vol. 47. Issue 9. P. 1244–1257.
2. Onegin S. V. Pharmacognostic study of a heather ordinary (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.) : dis. ... cand. of pharm. sciences. Perm, 2008. 141 p.
3. Cherepanova O. E., Petrova I. V., Mishchikhina Yu. D. Leaf morphology and anatomy in marginal populations of Scotch heather, *Calluna vulgaris* (L.) Hull. from West Siberia (Tobol River Basin) and Atlantic Europe // *International journal of salicology and plant biology*. № 3.
4. Delany M. J. Studies on the microclimate of *Calluna* heathland // *Journal of Animal Ecology*. 1953. № 22. P. 227–239.
5. Elliott R. J. The effects of burning on heather moors of the South Pennines : unpublished thesis. Sheffield, 1953.
6. Gimingham C. H. Biological flora of British Isles: *Calluna* Salisb. A monotypic genus // *Journal of Ecology*. 1960. Vol. 48. № 2. P. 455–483.
7. Jordanov D., Nikolov P., Boychinov A. Phytotherapy. Treatment with officinal herbs. Sofia, 1972. 347 p.
8. Kanunnikova Yu. S., Dzhavakhyan M. A. Definition of flavonoids in *Herba Bupleuri aurei* by HPLC method // *New problems of modern medicine : proc. of the 2nd intern. scient. and pract. symp.* SPb., 2013. P. 88–90.
9. Leyton L. The influence of artificial shading of the ground vegetation on the nutrition and growth of Sitka spruce (*Picea sitchensis* Carr.) in a heathland plantation // *Forestry*. 1955. № 28. P. 1–6.
10. Mahbubul A. F. Jalal, Read David J., Haslam E. Phenolic composition and its seasonal variation in *Calluna vulgaris* II // *Phytochemistry*. 1982. Vol. 21. № 6. P. 1397–1401.
11. Monschein M., Neira Iglesias J., Kunert O., Bucar F. Phytochemistry of heather (*Calluna vulgaris* (L.) Hull) and its altitudinal alteration // *Phytochemical Review*. 2010. № 9. P. 205–215.
12. Mork E. On the dwarf shrub vegetation on forest ground // *Medd. Nor. Skogforsoekso*. 1946. № 9. P. 269–392.
13. Muravyeva D. A., Samylina I. A., Yakovlev G. P. Pharmacognosy : textbook. M. : Medicine, 2002. 656 p.
14. Budantsev A. L. Vegetable resources of Russia. Wild-growing flowering plants, their component structure and biological activity. Vol. 2. SPb., 2009. 513 p.
15. Sannikov S. N., Petrov I. V., Polezhayeva M. A., Mishchikhina Yu. D., Cherepanova O. E., Dymshakova O. S. Genetic divergence East European and Tobol populations of *Calluna vulgaris* (L.) Hull // *Ecology*. 2013. № 2. P. 110–114.
16. Bolshakov V. N., Gorchakovsky P. L. Red Book of Central Ural Mountains (Sverdlovsk and Perm regions). The rare and being under the threat of disappearance species of rare animals and plants : reference book. Ekaterinburg, 1996. 279 p.