



ISSN 1818-8575

**3/2010**

# ВЕСЦІ БДПУ

РЕДАКТОРІЙ БГПУ



**Серыя 3**

ФІЗІКА

МАТЭМАТЫКА

ІНФАРМАТЫКА

БІЯЛОГІЯ

ГЕАГРАФІЯ

УДК 581.1:582.632.1

**Ж.Э. Мазец**, кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и основ сельского хозяйства БГПУ;

**Л.В. Шаститко**, магистрант БГПУ;

**Г.Н. Бузук**, доктор фармацевтических наук, заведующий кафедрой фармакогнозии и ботаники Витебского государственного Ордена дружбы народов медицинского университета;

**Е.В. Спиридович**, кандидат биологических наук, зав. сектором прикладной биохимии ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»

## ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ СОЕДИНЕНИЙ ФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ В ЛИСТЯХ *BETULA PENDULA*

**Введение.** В области изучения целебных свойств лекарственных растений достигнуты большие успехи. Многие из лекарственных препаратов растительного происхождения являются исключительно ценными лечебными средствами, без которых невозможно было бы лечение ряда заболеваний.

В настоящее время растения являются незаменимым источником получения очень многих важных веществ, таких как сердечные гликозиды, флавоноиды, кумарины, эфирные масла и другие. Промышленное получение этих соединений достигается только путем выделения их из растительного сырья. Как правило, лекарства, созданные на основе растительного сырья не вызывают побочных явлений, в том числе и распространенных сегодня аллергических реакций. Достижения современной науки позволяют не только расширять спектр действия уже применяемых лекарственных растений, но и постоянно внедрять в практику здравоохранения все новые их виды [1, с. 150–163]. К веществам, широко используемым в фармакологии, относятся соединения фенольной природы. Соединения фенольной природы – это вещества, которые во многом определяют лекарственные свойства растительного сырья. Фенольные соединения широко распространены в растительном мире и являются наиболее часто встречаемыми продуктами метаболизма растений. Фенольные вещества или полифенолы включают в себя множество классов веществ – фенолокислоты, окрашенные антоцианы, простые и сложные флавоноиды. Фармакологическая ценность фенольных ве-

ществ обуславливается их антиоксидантными и антирадикальными свойствами. Фенольные соединения способны нейтрализовывать свободные радикалы, а их антиоксидантные свойства выше таковых для витаминов С и Е в 4–5 раз. Они также влияют на хелатную активность металлов.

Флавоноиды являются одним из самых больших классов фенольных соединений. В зависимости от степени окисления трехуглеродного участка флавоноиды разделяют на флавоны, антоцианы, флавонолы и изофлавонолы. Из флавоноидов также синтезируются танины. Наибольший фармакологический интерес представляют флавоны, флавононы, флавонолы. В разных сочетаниях и количествах флавоноиды присутствуют почти во всех растениях [2, с. 288–317; 3, с. 14–26]. Лечебный эффект, как правило, обусловлен их суммой, так как действие отдельных компонентов менее результативно. В связи с этим, важным было исследовать именно суммарное содержание соединений фенольной природы для оценки терапевтического действия листьев *Betula pendula* Roth.

Кроме того, фенольные соединения играют активную роль в самых различных физиологических процессах – фотосинтезе, дыхании, росте, защитных реакциях растительного организма. Поэтому актуальной является оценка динамики накопления соединений фенольной природы у *Betula pendula* – одного из представителей семейства *Betulaeae* в течение вегетационного периода.

О целебных свойствах березы известно давно. В лечебных целях применяют почки, сок, кору, листья и даже паразитирующий на

березе гриб чагу. Листьям березы свойственен широкий спектр фармакологического действия и им приписываются те же свойства, что и почкам, но в меньшей степени. Однако в литературе отсутствуют точные сведения о сроках заготовки листьев, которые соответствовали бы максимальному накоплению БАВ. Это, видимо, послужило отправной точкой для избрания динамики содержания соединений фенольной природы в листьях березы бородавчатой как маркера, определяющего сроки заготовки листьев березы.

#### **Объекты и методы исследования.**

Настоящее исследование проводилось в период с мая по август 2009 года в районе зоны отдыха «Лучеса» г. Витебска.

Объектом исследования служила *Betula pendula* (береза повислая).

Сбор растительного сырья проводили через определенные интервалы времени (7–10 дней). Листья собирали в сухую погоду. Отбор лекарственного растительного сырья проводили с нижних ветвей 6–7-ми летних здоровых, хорошо развитых, не поврежденных насекомыми и микроорганизмами растений [4, с. 10–12]. Сушка растительного сырья проводилась воздушно-теневым способом, в хорошо вентилируемом помещении, без доступа прямых солнечных лучей. Растительный материал раскладывали тонким слоем и регулярно переворачивали.

Приведение растительного материала в стандартное состояние достигалось очисткой материала от некондиционных частей, то есть от заплесневевших или изменивших естественную окраску растений, от излишне измельченного сырья и других посторонних примесей [5].

Для наилучшей сохранности полученного сырья использовалась упаковка его в соответствующую тару, для чего использовали двойные бумажные пакеты, предварительно вложенные друг в друга.

**Методы исследования.** За день-два до проведения анализа листья измельчали на кофемолке. Определение содержания различных групп фенольных соединений проводили спектрофотометрически.

Для получения экстракта брали навеску около 0,25 г измельченного сырья, помещали в колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 10 мл 70 % спирта. Колбу с содержимым соединяли с обратным холодильником и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, затем охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через вату в мер-

ную колбу вместимостью 50 мл. Вату промывали небольшим количеством 70 % этанола и доводили им же до метки [6].

Затем определяли количественное содержание суммарной фракции флавоноидов (FS) в листьях березы. Для этого к 0,1 мл полученного экстракта прибавляли 0,4 мл раствора алюминия хлорида 2 % в этаноле, 1 каплю уксусной кислоты, разведенную до 30 %. Раствор доводили 96 % спиртом до 5 мл. В качестве контроля использовали следующий раствор: к 0,1 мл экстракта добавляли 1 каплю 30 % уксусной кислоты и доводили до 5 мл 96 % спиртом. Через час измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм.

Содержание суммы флавоноидов в процентах (X) в пересчете на гликозиды кверцетина в абсолютно сухом сырье вычисляли по формуле (1):

$$X = \frac{A \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100}{V_3 \cdot m \cdot (100 - W) \cdot E_{1\text{см}}^{1\%}} \quad (1),$$

где

A – оптическая плотность исследуемого раствора;

V<sub>1</sub> – объем экстракта, мл;

V<sub>2</sub> – объем раствора для спектрофотометрирования, мл;

V<sub>3</sub> – объем экстракта, взятый для определения, мл;

E<sub>1см</sub><sup>1%</sup> – удельный показатель поглощения гликозидов кверцетина в комплексе с алюминия хлоридом в этаноле при длине волны 410 нм, равный 330;

m – масса сырья в граммах;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах [7, с. 26–37].

Количественное определение суммы фенольных соединений (FS) проводили по следующей схеме. Помещали 1 мл насыщенного экстракта 30 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в мерную колбу и доводили до 10 мл дистиллированной водой, перемешивали. К 0,2 мл полученного извлечения прибавляли 5 мл воды очищенной, 0,5 мл реактива Фолина-Чиокальтеу и 1 мл 30 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и 5 мл H<sub>2</sub>O, все тщательно перемешивали и выдерживали при комнатной температуре 1 час. После измеряли оптическую плотность полученного раствора на фотокolorиметре при длине волны 765 нм. Контролем служил раствор следующего состава: 5 мл H<sub>2</sub>O; 0,5 мл Фолина-Чиокальтеу; 1 мл 30 % натрия карбоната и 5,2 мл H<sub>2</sub>O.

Содержание суммы фенольных соединений в процентах (X) в пересчете на галловую кислоту в абсолютно сухом сырье вычисляли по формуле (2):

$$X = \frac{A \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100}{V_3 \cdot m \cdot (100 - W) \cdot E_{1cm}^{1\%}} \quad (2),$$

где

$A$  – оптическая плотность исследуемого раствора;

$V_1$  – объем экстракта, мл;

$V_2$  – объем раствора для спектрофотометрирования, мл;

$V_3$  – объем экстракта, взятый для определения, мл;

$E_{1cm}^{1\%}$  – удельный показатель поглощения галловой кислоты в комплексе с реактивом Фолина-Чиокальтеу при длине волны 765 нм, равный 90;

$m$  – масса сырья в граммах;

$W$  – потеря в массе при высушивании сырья в процентах [7, с. 26 – 37].

Все анализы проводились в четырёхкратной повторности, полученные результаты обрабатывались с использованием компьютерной программы «Microsoft Excel, 2007». Величины расхождения между исследуемыми данными в выборке и генеральной совокупности рассчитывали с использованием статистической ошибки для среднего.

**Результаты и их обсуждение.** Фенольные соединения являются большой и довольно широко распространенной группой соединений, которая играет важную роль в обмене веществ растительной клетки и имеет большое практическое значение [2, с. 288–317].

На рисунке 1 представлена динамика накопления фенольных соединений в листьях *Betula pendula* Roth в зависимости от сроков сбора. В соответствии с данными графика на 2 мая 2009 общее количество фенольных соединений составило  $128,95 \pm 0,65$  мг/г. Затем в мае месяце наблюдается постепенный рост содержания фенольных соединений

в листьях березы и к 26 мая 2009, согласно данным рисунка 1, приходится максимум в накоплении биологически активных соединений для *B. pendula*, который составляет  $146,56 \pm 1,46$  мг/г. В последующем происходит постепенное снижение количества фенольных соединений в листьях березы повислой и к 29 июля 2009 отмечается минимальное количество, при котором этот показатель составляет  $60,73 \pm 3,1$  мг/г. Затем в начале августа происходит повторное увеличение количества фенольных соединений (второй пик) и на 11 августа 2009 равно  $142,39 \pm 7,1$  мг/г. Вероятно, такое увеличение количества фенольных соединений к концу вегетации можно объяснить подготовкой к зимнему периоду покоя, а также функцией фенолов как вторичных метаболитов.

Произведенный анализ варьирования содержания суммы фенолов в листьях берез по исследованным точкам 2009 г. в процентах показал, что различные этапы вегетационного периода характеризовались неодинаковым варьированием уровня фенольных соединений в листьях (рисунок 2). Так максимальное накопление отмечалось в конце мая (26.05.09 – 19,14 %), а также в конце августа (18,46 %). В мае высокий процент содержания фенольных соединений связан с активным формированием всех компонентов листа, а в августе фенолы вовлекаются в процесс биосинтеза лигнина, связанный с вызреванием (одревеснением) побегов годичного прироста [8]. Наименьшее содержание суммы фенольных соединений в процентах в пересчете на галловую кислоту в абсолютно сухом сырье приходится на конец июля (29 июля 2009) и составляет соответственно 8,17 %.

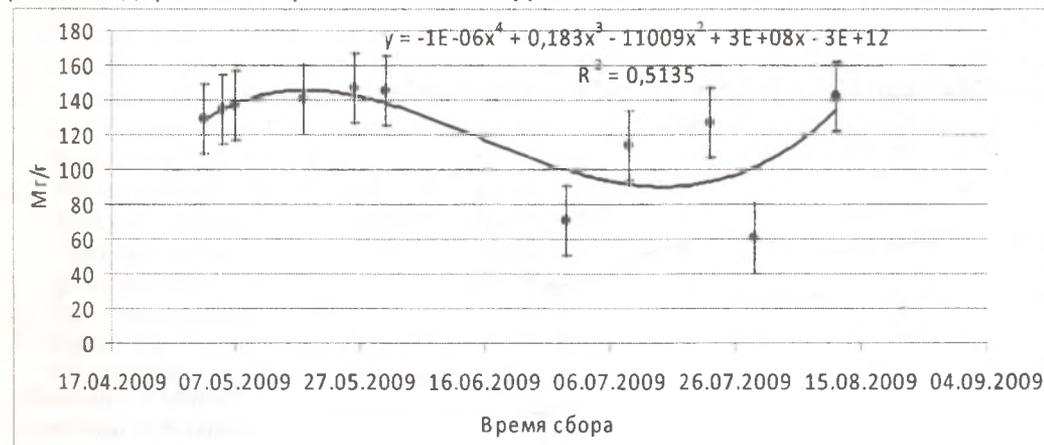


Рисунок 1 – Сумма фенольных соединений в листьях *Betula pendula* Roth в зависимости от сроков сбора, (мг/г)

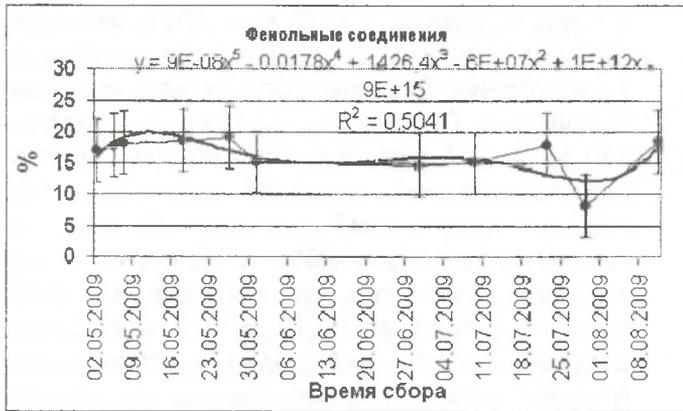


Рисунок 2 – Содержание суммы фенольных соединений в листьях *Betula pendula* Roth в процентах (%) в пересчете на галловую кислоту

Как известно, флавоноидам принадлежит решающая роль в защитной системе растения, так как они являются наиболее распространенными и многочисленными антиоксидантами. Хотя ранее их считали конечными продуктами обмена, в свете современных взглядов их относят к необходимым клеточным метаболитам [9, с. 145].

На рисунке 3 представлена динамика накопления флавоноидов в листьях *Betula pendula* Roth в зависимости от сроков сбора. На первом этапе сбора (02.05.2009) регистрировали низкий уровень содержания флавоноидов, который составил  $11,72 \pm 0,58$  мг/г. Затем в течение всего мая наблюдается постепенное увеличение количества флавоноидов в листьях березы. Максимальное содержание биологически активных соединений для *B. pendula*, согласно рисунку 3, приходится на 26 мая 2009 и составляет  $13,31 \pm 0,66$  мг/г. Высокий уровень накопления биологически активных соединений можно рассматривать как результат снижения скорости синтеза данных метаболитов или увеличения интенсивности их расхода [10, с. 921–931]. В последующем происходит постепенное снижение количества

флавоноидов в листьях березы повислой. Наименьшее содержание флавоноидов наблюдается 29 июля 2009 и составляет  $7,58 \pm 0,37$  мг/г. Затем в начале августа отмечается второй пик количества флавоноидов и на 11 августа 2009 составляет  $12,93 \pm 0,64$  мг/г. Это, вероятно, связано с основной функцией флавоноидов – защитой растительных тканей (в первую очередь, эпидермальных) от ультрафиолетовой радиации [11].

Анализ содержания суммы флавоноидов в % показывает (рисунок 4), что на определенных этапах вегетационного периода их количество, также как и фенольных соединений, было различным. Так максимум приходится на конец мая (26.05.09) и равен 4,46 %. Вероятно, это связано с основной функцией флавоноидов – защитой растительных тканей (в первую очередь, эпидермальных) от ультрафиолетовой радиации [12, с. 299–309]. Минимальное количество флавоноидов приходится на конец июля и составляет 2,90 %, после чего наблюдается второй пик (в конце первой декады августа – 4,30%) как и у фенольных соединений.

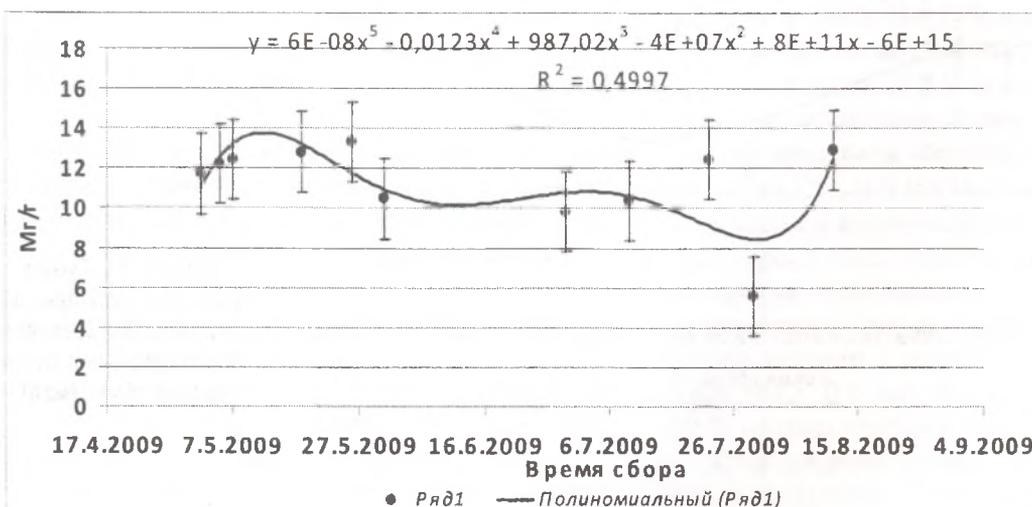


Рисунок 3 – Динамика накопления флавоноидов в листьях *Betula pendula* Roth на различных сроках сбора, в мг/г

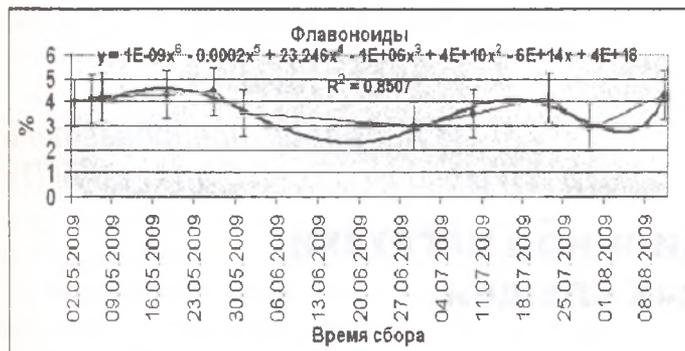


Рисунок 4 – Содержание суммы флавоноидов в листьях *Betula pendula* Roth в процентах (%) в пересчете на гликозиды кверцетина

**Заключение.** На основании полученных данных о наличии двух пиков в накоплении в листьях березы соединений фенольной природы можно рекомендовать производить заготовку листьев березы повислой, произрастающей в северной агроклиматической зоне Республики Беларусь в качестве лекарственного растительного сырья в сроки, которые соответствуют периоду май – первая половина июня. Эти данные подтверждаются многими другими источниками [9; 12; 13], в которых заготавливать листья рекомендуется, когда они молодые и клейкие, то есть в мае – начале июня. Но на наш взгляд, заготовка в этот период времени трудоемка и связано это со сбором большого количества листьев для получения необходимого объема фитосырья. Мы предполагаем, что заготовку можно производить и в начале августа, когда сформирована основная листовая масса, с высоким содержанием флавоноидов и других фенольных соединений. Это, в свою очередь, нанесет меньший вред растению и поможет, сбором меньшего количества, достичь нужного объема.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Epstein, R.J. Human Molecular Biology: An Introduction to the Molecular Basis of Health and Disease / R.J. Epstein. – Cambridge: Cambridge University Press, 2003. – P. 150–163.
2. Кретович, В.Л. Биохимия растений: учебник для биологических факультетов ун-тов / В.Л. Кретович. – М.: Высш. школа, 1980. – С. 288–317.
3. Информационное обеспечение для идентификации фенольных соединений растительного происхождения в обращенно-фазовой ВЭЖХ. Флавоны, флавонолы, флаваноны и их гликозиды / В.М. Косман, И.Г. Зенкевич // Растительные ресурсы. – 1997, Т. 33 – № 2 – С. 14–26.
4. Куркин, В.А. Стандартизация листьев березы / В.А. Куркин, В.В. Стеняева // Фармация. – 2004. – № 6. – С. 10–12.
5. Ёршик, О.А. Фармакогностический анализ Сабельника болотного: автореф. дис. ... канд фармац.наук 15.00.02 / О.А. Ершик. – Витебск, 2009. – 22 с.
6. Башилов, А.В. Особенности биохимического состава и антиоксидантная активность представителей *Filipendula mill.* и *Polemonium L.*: автореф. дис. ... канд биол.наук 03.00.12 / А.В. Башилов. – Минск, 2008. – 22 с.
7. Бузук, Г.Н. Морфометрия лекарственных растений. *Vaccinium Myrtillus L.*: взаимосвязь размеров, формы и химического состава листьев / Г.Н. Бузук, О.А. Ершик // Вестник фармации. – Витебск, 2007. – С 26–37.
8. Лищинская, С.Н. Эколого-биологические особенности березы повислой (*BETULA PENDULA ROTH.*) как компонента антропогенных лесонасаждений г. Самары: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16 / С.Н. Лищинская. – Самара, 2003. – 18 с.
9. Swern, D. In Bailey's Industrial Oil and Fat Products / D. Swern. – New York: Wiley Interscience Publication, 1979. – P. 145.
10. Запроматов, М.Н. Физиология и биохимия флавоноидов / М.Н. Запроматов // Физиология растений. – 1993. – Т. 40. – № 6. – С. 921–931.
11. Медведев, С.С. Физиология растений: учебник. – СПб.: Изд-во С.- Петерб. ун-та, 2004. – С. 299–309.
12. Лекарственные растения и их применение / Акад. наук Бел. ССР, Ин-т эксперим. ботаники им. В.Ф. Купревича. – 7-е изд. – Мн.: Наука и техника, 1976. – С. 111–114.
13. Лекарственные растения. Энциклопедия / Сост. И.Н. Путьрский, В.Н. Прохоров. – Мн.: Книжный Дом, 2003. – С. 77–79.

#### SUMMARY

*Dynamics of accumulation of connections of the phenolic nature in leaves **Betula pendula** during the vegetative period is investigated. As a result of researches two peaks in accumulation of phenols and flavonoids in birch leaves are revealed. The first peak in the maintenance of connections of the phenolic nature is necessary at the end of May, and the second – at the beginning of August. Based on these data it is recommended to make harvesting birch leaves growing in northern agroclimatic zone of the Republic of Belarus as a medicinal plant material in late May – first half of June and in early August.*

Поступила в редакцию 25.02.2010 г.