

Vascular Biology, 30 (12), 2362–2367. doi: 10.1161/atvbaha.110.207514

21. Cleveland. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis / Cleveland, Don W. // Journal of Biological Chemistry. – 1977. – 252(3). – P.1102-1106.

22. Harrison, P., Mackie, I., Mumford, A., Briggs, C., Liesner, R., Winter, M., Machin, S. (2011). Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. British Journal of Haematology, 155 (1), 30–44. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08793.x

23. Timmons, S., Hawiger, J. (1989). Isolation of human platelets by albumin gradient and gel filtration. Platelets: Receptors, Adhesion, Secretion Part A, 11–21. doi: 10.1016/0076-6879(89)69046-5

24. Groscurth, P., Cheng, S., Vollenweider, I., von Felten, A. (2009). Effects of Washing and Gel Filtration on the Ul-

trastructure of Human Platelets. Acta Haematologica, 77 (3), 150–155. doi: 10.1159/000205980

25. Jesty, J., Bluestein, D. (1999). Acetylated Prothrombin as a Substrate in the Measurement of the Procoagulant Activity of Platelets: Elimination of the Feedback Activation of Platelets by Thrombin. Analytical Biochemistry, 272 (1), 64–70. doi: 10.1006/abio.1999.4148

26. Moran, N., Kiernan, A., Dunne, E., Edwards, R. J., Shields, D. C., Kenny, D. (2006). Monitoring modulators of platelet aggregation in a microtiter plate assay. Analytical Biochemistry, 357 (1), 77–84. doi: 10.1016/j.ab.2006.06.037

27. Katrii, T. B., Vovk, T. B., Kravchenko, N. K., Savchuk, O. M., Ostapchenko, L. I. (2015). Influence of IgG Separated from Blood Plasma of Patients with Ischemic Stroke on the Process Platelet's Proteins Secretion. Intern. J. Chem. Biol. Science, 1 (4), 278–283.

Дата надходження рукопису 06.10.2016

Галенова Тетяна Іванівна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, кафедра біохімії, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, Україна, 01601

E-mail: galenovatanya@rambler.ru

Рослова Наталія Миколаївна, провідний інженер, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, Україна, 01601

E-mail: tereska@bimir.net

Савчук Олексій Миколайович, доктор біологічних наук, професор, кафедра біохімії, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, Україна, 01601

E-mail: olexiy.savchuk@yandex.ru;

УДК 582.929.4 : [57.045+581.192.2]

ВМІСТ ФЛАВОНОЇДІВ У СИРОВИНІ *ISODON JAPONICUS* VAR. *GLAUCOCALYX* (*LAMIACEAE*) НА ФОНІ ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ РОСЛИН

© С. М. Ковтун-Водяницька, В. Ф. Левон

Досліджено сумарний вміст флавоноїдів у Isodon japonicus var. glaucocalyx (Maxim.) H.W. Li за стресових умов зростання. Виявлено, що при наявному водному дефіциті понад 30 % надземна частина рослин містить доволі велику кількість флавоноїдів – 61,79 мг/г. Намагання рослиною призвичаїтися до несприятливих умов таким чином сприяє підвищенню цінності її сировини

Ключові слова: *Isodon, інтродукція, кліматичні умови зростання, водний дефіцит, сировина, сума флавоноїдів*

The total content of flavonoids in Isodon japonicus var. glaucocalyx (Maxim.) H.W. Li for stressful growing conditions is investigated. It was revealed that in the case of water deficit of more than 30 % the aboveground part of the plant contains a large amount of flavonoids – 61,79 mg/g. Attempts of a plant to adapt to adverse conditions, thus, contributes to its value of raw materials

Keywords: *Isodon, introduction, climatic conditions of growth, water deficit, raw materials, amount of flavonoids*

1. Вступ

Володіння інформацією щодо біохімічного складу того чи іншого виду рослин дозволяє більш цілеспрямоване використання їх сировини на практиці. Серед численого переліку біологічно активних сполук та широкого спектру їх дії на організм людини чільне місце займають флавоноїди.

Флавоноїди є біологічно активними поліфенольними сполуками. На даний час їх кількість сягає по-

над 6000 і вони передують за поширеністю серед решти біологічно активних рослинних сполук. Початок дослідження хімічної структури і властивостей флавоноїдів відноситься до початку XIX сторіччя. Флавоноїди можуть бути різних кольорів і відтінків – від безбарвних до жовтих, синіх, червоних тощо та проявляти різноманітну клініко-фармакологічну активність, зумовлену їх природним походженням і впливом на обмінні процеси організму та функцію окремих органів.

2. Літературний огляд

Біологічна дія флавоноїдів зумовлена здатністю до регуляції окисно-відновних процесів, стабілізації клітинних мембран, модуляції активності ферментів і рецепторів. На разі спектр їх фармакологічної дії на організм людини визначають достатньо широко: антиоксидантна, капіляррозміцнююча, спазмолітична, антистресова, протисклеротична, противиразкова, протитоксична, протиалергічна, протиідиабетична, протигіпертензійна, імуномодулююча, протиканцерогенна, нефро- та гепатопротекторна, естрогеноподібна. Згідно досліджень останніх років існує підтвердження про позитивні наслідки при використанні флавоноїдів в комплексі заходів для зниження ризику виникнення злоякісних пухлин. Доведена сумісність використання флавоноїдів з іншими фізіологічно активними сполуками, зокрема алкалоїдами, сапонінами, пектинами [1–3].

Вміст найбільшої кількості флавоноїдів прияманий органам рослин, які активно функціонують – листки, квітки, плоди, проростки тощо. Дія на рослину флавоноїдів, які є активними метаболітами клітин, також є достатньо широкою. Насамперед, флавоноїди приймають участь в окисно-відновних процесах, в якості сигнальних молекул впливають на розподіл і локальну концентрацію ауксину, завдяки переважно вакуолярній локалізації забезпечують захист від негативної дії ультрафіолетових променів, є універсальними протекторами проти біотичних і абіотичних стресів – антистресові агенти, що забезпечують фізіологічний адаптогенез, задіяні в процесах проростання, росту, запилення рослин та у формуванні симбіотичних відносин з бульбочковими бактеріями і мікоризними грибами [4].

Вважається, що серед низки видів культурної та дикорослої флори за вмістом в сировині вирізняється арніка, ромашка (квітки), петрушка, солодка (корінь), береза (листки) та інші. Згідно останніх досліджень вітчизняних вчених кількісний міст флавоноїдів в траві *Arnica foliosa* складає 1,59 %, *Petroselinum tuberosum* – 2,22 % [5]. Серед традиційних ефіроолійних рослин зарубіжними вченими визначено вміст суми флавоноїдів у сировині ряду видів: *Mentha piperita* – 25,17 мг/г, *Salvia officinalis* – 27,54, *Melissa officinalis* – 45,06 [6], *Echinacea purpurea* – 86,0 [7], *Mentha longifolia* – 106,7 мг/г. Причому експериментально доведено, що для максимального збереження вмісту флавоноїдів найкращим режимом сушки рослинної сировини є притінок на протязі, в той час як у сушильній шафі за температури 35 °С і 45 °С – їх вміст зменшується на третину [8].

Серед видів рослин, які на сьогодні привертають увагу дослідників багатим комплексом та широким спектром дії біологічно активних сполук є *Isodon japonicus* var. *glauco-calyx* (Maxim.) H.W. Li із родини *Lamiaceae* Lindl. Це трав'яниста полікарпічна рослина, ареал поширення якої охоплює Японію, Корею і Далекій Схід Росії. Надземна частина (сировина) здавна використовується у народних медицинах східних країн як традиційна рослина з низькою токсичністю при застуді, гепатиті, гастриті, маститі, тонзиліті, раку печінки та раку молочної залози. Останні дослідження фармакологічних властивостей виявили про-

тибактеріальні і протишечічні властивості. Сировина містить в основному дитерпеноїди, флавоноїди і стероїди. Згідно досліджень вчених Китаю загальний вміст флавоноїдів у сировині рослин *I. japonicus* var. *glauco-calyx* із природних місцезростань складає 12,9 % [9; 10]. На разі в Україні рослина практично не відома, незважаючи на її корисні властивості, тому потребує комплексних інтродукційних досліджень, зокрема і з'ясування кількісного і якісного вмісту біологічно активних сполук.

3. Мета та задачі дослідження

В даній роботі ми мали за мету встановити кількісний вміст флавоноїдів у сировині *I. japonicus* var. *glauco-calyx* за умов інтродукції в Національному ботанічному саду ім. М. М. Гришка НАН України (НБС).

Для досягнення поставленої мети були вирішені наступні задачі:

- встановити відповідність нормі кліматичних умов місцезростання інтродукта;
- визначити вміст суми флавоноїдів у надземній частині *I. japonicus* var. *glauco-calyx* у взаємозв'язку із показниками температури та вологості поточного літнього періоду.

4. Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були дорослі генеративні особини *I. japonicus* var. *glauco-calyx*, інтродуковані у відділі культурної флори НБС (Правобережний Лісостеп).

Аналізували свіжозібрану сировину (надземну частину) рослин, які перебували у фазі інтенсивного вегетативного розвитку.

В роботі використано кліматичні показники Центральної геофізичної обсерваторії (м. Київ) [11].

Водний дефіцит визначали методом, який застосовують у фізіології рослин [12]. Для цього із листків різних ярусів (верхнього, середнього і нижнього) взято по 10 висічок діаметром 16 мм. Проби зважували до і після занурювання у воду на 90 хв до повного насичення. Затим листові проби висушували до постійної маси у сушильній шафі при температурі 105 °С.

Обрахунки водного дефіциту листків проводили за формулою:

$$ВД = 100 \times \frac{b - a}{b - n} \%,$$

де а – маса проби до насичення водою, г; в – маса проби після насичення водою, г; n – вміст сухої речовини в пробі, г.

Для кількісного визначення загального вмісту суми флавоноїдів у сировині *I. japonicus* var. *glauco-calyx* застосовано спектрофотометричний метод із використанням реакції комплексотворення флавоноїдів із алюмінієм хлоридом. Як стандартний зразок застосовано рутин. Під час проведення дослідів керувалися методикою В. Ю. Андрєєвої і Р. В. Калінкіної [13], адаптованої автором В. Ф. Леоном. Для визначення флавоноїдів аналітичну пробу висушеної подрібненої сировини масою 0,5 г перенесли в колбу зі шліфом, додавали 3 мл 80 % етило-

вого спирту і нагрівали зі зворотним холодильником протягом 45 хв на водяній бані. Після цього колбу охолоджували до кімнатної температури і суспензію фільтрували через паперовий фільтр у мірну колбу на 100 мл. Отриманий розчин доводили до мітки 80 % спиртом (розчин А). 2 мл розчину А поміщали у мірну колбу на 25 мл, додавали 1 мл 2 % розчину хлориду алюмінію в 95 % етанолі і доводили об'єм розчину 95 % спиртом до мітки. Оптичну густину розчину вимірювали через 20 хвилин на спектрофотометрі Zalimp KF 77 (Польща) при довжині хвилі 390 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм Контролем служила суміш розчинів хлориду алюмінію і оцтової кислоти.

Сумарний вміст флавоноїдів в перерахунку на рутин в повітряно-сухій сировині обраховували за формулою:

$$C = 0,1062 \times D \times \frac{K}{M} \times A, \text{ мг / г}$$

де цифровий показник – тангенс кута нахилу прямої на калібрувальному графіку залежності оптичної густини досліджуваного розчину від концентрації флавоноїдів, D – оптична густина; K – коефіцієнт перерахунку на повітряно-суху вагу (у нас 1); M – наважка, г; A – аліквота. Число паралельних визначень дорівнює 3. Точність методу знаходиться в межах 0,3–2 %.

5. Результати та їх обговорення

За інтродукції у рослин під впливом цілого комплексу природних чинників та біологічних факторів формується певний цикл розвитку із відповідною сукупністю біологічних особливостей, морфологічних ознак, які відображають пристосувальні кроки рослини до нових умов зростання. Це безпосередньо впливає і на сировинну продуктивність та її корисний потенціал з огляду на кількісний та якісний склад біологічно активних сполук.

За період інтродукції *I. japonicus* var. *glaucocalyx* в умовах НБС (2012–2016 рр.) виявлено низку особливостей у ритміці розвитку, питанні розмноження, морфологічних і анатомічних ознаках, як наслідки реакції рослин на умови зростання. Зокрема встановлено, що найбільш впливовими чинниками на ріст і розвиток рослин, на тривалість фенологічних фаз є температура і опосередковано – вологість (повітря та ґрунту). Рослини припиняють вегетацію при зниженні температури до 6–10 °С, проте добре зимують. Навесні надземна частина рослин вразлива до приморозків, влітку відмічена їх реакція на тривалу посуху (понад 30 діб), що зовні проявляється в'яненням листків та верхівок пагонів. В поточному році період інтенсивного росту і розвитку надземної частини рослин *I. japonicus* var. *glaucocalyx*, який зазвичай припадає в умовах НБС на кінець червня-першу половину серпня, співпав із тривалим посушливим періодом (рис. 1, 2).

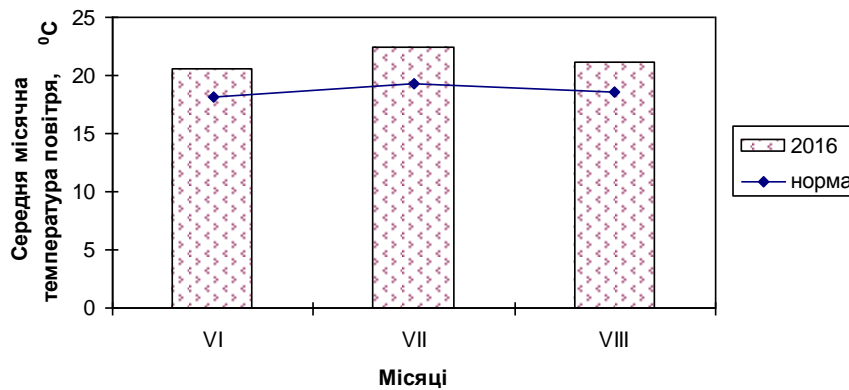


Рис. 1. Відповідність середньої місячної температури повітря до норми протягом літнього періоду по м. Києву (2016 р.)

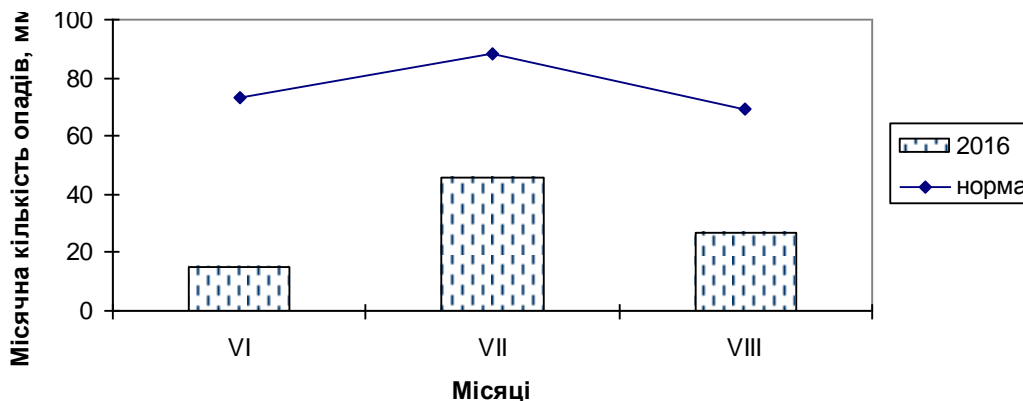


Рис. 2. Відповідність кількості опадів до норми протягом літнього періоду по м. Києву (2016 р.)

Протягом літніх місяців відхилення від норми за температурним показником склало 13–16 % перевищення, а за кількістю опадів – 48–79 % дефіциту. Такі кліматичні умови: спека на фоні значної недостатності вологи негативно вплинули на фізіологічний стан рослин *I. japonicus* var. *glaucocalyx*,

зокрема спостерігалось незначне в'янення та обгорання листків в особливо спекотні дні. Поліпшували умови для рослин періодичним штучним зволоженням. Результати експериментальних досліджень підтвердили наявний водний дефіцит у інтродуцентів (табл. 1).

Таблиця 1

Водний дефіцит листків *Isodon japonicus* var. *glaucocalyx* в умовах інтродукції, 2016 рік

Формація листків, ярус	а, г	в, г	п, г	ВД, %
Верхній	0,2858	0,3689	0,1094	32,02
Середній	0,2719	0,3244	0,1052	23,95
Нижній	0,2310	0,3503	0,0776	43,75
Середній показник: 33,24 ± 5,74				

Найбільш чутливими до недостатності зволоження виявилися листкові формації нижнього ярусу – їх водний дефіцит склав понад 40 %.

При зазначених стресових умовах зростання не менш важливим було визначення вмісту біологічно активних сполук у сировині *I. japonicus* var. *glaucocalyx*, зокрема флавоноїдів. Враховуючи, що

флавоноїди відомі антистресові сполуки для рослинного організму, то цілком очікувано, що їх вміст не повинен був бути замалим. В експерименті встановлено, що на фоні стресових кліматичних умов влітку поточного року та як наслідок водного дефіциту в рослин вміст флавоноїдів у сировині склав в середньому 61,79 мг/г (табл. 2).

Таблиця 2

Сумарний вміст флавоноїдів у сировині *Isodon japonicus* var. *glaucocalyx* (липень, 2016 р.)

Наважка, г	Аліквота	Коефіцієнт перерахунку на суху вагу	Оптична густина	Сумарний вміст флавоноїдів, (мг/100 г повітряно-сухої речовини)
0,5051	0,2	1	0,59	62,03
0,5042	0,2	1	0,58	61,08
0,5074	0,2	1	0,595	62,27
Середній вміст: 61,79±0,36				

Відтак, значний вміст флавоноїдів у сировині *I. japonicus* var. *glaucocalyx* є безпосереднім наслідком реакції рослинного організму на стрес. Проте, зважаючи на корисні властивості флавоноїдів для організму людини, умови зростання, що склалися цього горіч сприяли підвищенню фармакологічної цінності сировини.

6. Висновки

За інтродукції в умовах Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України (Правобережний Лісостеп) *I. japonicus* var. *glaucocalyx* виявляє високу чутливість до температури повітря та дещо меншу – до вологості. У тривалі посушливі періоди, які спостерігали протягом літа 2016 року з використанням періодичного штучного зволоження рослини мали дефіцит вологи 33,24 %. Вміст суми флавоноїдів у сировині рослин на фоні зазначених стресових кліматичних умов склав 61,79 мг/г повітряно-сухої сировини.

Література

- Чекман, І. С. Натуропатичні препарати в кардіологічній практиці [Текст]: метод. реком. / І. С. Чекман, Г. І. Лисенко, О. Б. Ященко, В. І. Джимаїло та ін. – К., 2001. – 14 с.
- Сімахіна, Г. О. Біофлавоноїди у системі антиоксидантного захисту біологічних структур [Електронний ресурс] / Г. О. Сімахіна. – 2011. – Режим доступу: <http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/>
- Моисеев, Д. В. Идентификация флавоноидов в растениях методом ВЭЖХ [Текст] / Д. В. Моисеев, Г. Н. Бу-

зук, В. Л. Шелото // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45, № 11. – С. 35–38.

4. Макаренко, О. А. Физиологические функции флавоноидов в растениях [Текст] / О. А. Макаренко, А. П. Левичкий // Физиология и биохимия культ. растений. – 2013. – Т. 45, № 2. – С. 100–112.

5. Вельма, В. В. Дослідження флавоноїдів в коренях петрушки листової та кореневої [Текст]: зб. наук. пр. / В. В. Вельма // НМАПО ім. П.Л. Шупика. – 2015. – Т. 24, № 5. – С. 57–60.

6. Atanassova, M. Total Phenolic and Total Flavonoid Contents, Fntioxidant Capacity and Biological Contaminants in Medicinal Herbs [Text] / M. Atanassova, S. Georgieva, K. Ivancheva // Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy. – 2011. – Vol. 46, Issue 1. – P. 81–88.

7. Lee, T.-T. Flavonoid, Phenol and Polysaccharide Contents of *Echinacea purpurea* L. and Its Immunostimulant Capacity In Vitro [Text] / T.-T. Lee, C.-C. Huang, X.-H. Shieh, C.-L. Chen, L.-J. Chen, B. Yu // International Journal of Environmental Science and Development. – 2010. – Vol. 1, Issue 1. – P. 5–9. doi: 10.7763/ijesd.2010.v1.2

8. Stanislavljevic, D. V. Antioxidant Activity, The Content of Total Phenols and Flavonoids in the Ethanol Extracts of *Mentha longifolia* (L.) Hudson Dried by The Use of Different Techniques [Text] / D. V. Stanislavljevic, S. S. Sto-icevic, S. V. Dordevoc, B. P. Zlatkovic, D. Velickovic, I. Karabegovic, M. Lazic // Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly. – 2012. – Vol. 18, Issue 3. – P. 411–420. doi: 10.2298/ciceq110919017s

9. Xiang, Z. Chemical Constituents of *Rabdosia japonica* var *glaucocalyx* [Text] / Z. Xiang, X. Liu, X. Li // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2015. – Vol. 48, Issue 12. – P. 804–814. doi: 10.1007/s11094-015-1200-5

10. Chu, C. Rabdosia japonica var. glaucocalyx Flavonoids Fraction Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice [Text] / C. Chu, N. Xu, X. Li, L. Xia, J. Zhang, Z. Liang et al. // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2014. – Vol. 2014. – P. 1–12. doi: 10.1155/2014/894515

11. Кліматичні дані по м. Києву [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.cgo.kiev.ua/>

12. Навчально-виробнича практика з фізіології рослин. Водний дефіцит рослин. Тернопільський нац. педагогічний ун-т ім. В. Гнатюка [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://mir.zavantag.com/>

13. Андреева, В. Ю. Разработка методики количественного определения флавоноидов в манжетке обыкновенной *Alhsemilla vulgaris* L.S.L. [Текст] / В. Ю. Андреева, Г. И. Калинкина // Химия растительного сырья. – 2000. – № 1. – С. 85–88.

References

1. Chekman, I. S., Lysenko, G. I., Yashchenko, O. B., Jimalo, V. I., Shlykova, N. O., Davydova, I. V. (2001). Naturopathic drugs in cardiology practice. Kyiv, 14.

2. Simakhina, G. A. (2011). Bioflavonoids in the system of antioxidant protection of biological structures. Available at: <http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/>

3. Moiseev, D. V., Buzuk, G. N., Shelyuto, V. L. (2011). Identification of flavonoids in plants by HPLC. Chem. pharm. Zh., 45 (11), 35–38.

4. Makarenko, O. A., Levitsky, A. P. (2013). Physiological functions of flavonoids in plants. Physiol And biochem. of the cult. Plants, 45 (2), 100–112.

5. Velma, V. V. (2015). Investigation of flavonoids in the roots of parsley leaf and root. NMAPO im. PL. Shupika, 24 (5), 57–60.

6. Atanassova, M., Georgieva, S., Ivancheva, K. (2011). Total Phenolic and Total Flavonoid Contents, Antioxidant Capacity and Biological Contaminants in Medicinal Herbs. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy, 46 (1), 81–88.

7. Lee, T. T., Huang, C. C., Shieh, X. H., Chen, C. L., Chen, L. J., Yu, B. (2010). Flavonoid, Phenol and Polysaccharide Contents of *Echinacea purpurea* L. and Its Immunostimulant Capacity In Vitro. International Journal of Environmental Science and Development, 1 (1), 5–9. doi: 10.7763/ijesd.2010.v1.2

8. Stanislavjevic, D. V., Stolcevic, S. S., Dordevoc, S. V., Zlatkovic, B. P., Velickovic, D. T., Karabegovic, I. T., Lazic, M. L. (2012). Antioxidant Activity, The Content of Total Phenols and Flavonoids in the Ethanol Extracts of *Mentha longifolia* (L.) Hudson Dried by the Use of Different Techniques. Chemical Industry Chemical Engineering Quarterly, 18 (3), 411–420. doi: 10.2298/ciceq110919017s

9. Xiang, Z., Liu, X., Li, X. (2015). Chemical Constituents of *Rabdosia japonica* var. *glaucocalyx*. Pharmaceutical Chemistry Journal, 48 (12), 804–814. doi: 10.1007/s11094-015-1200-5

10. Chu, C., Xu, N., Li, X., Xia, L., Zhang, J., Liang, Z. et. al. (2014). *Rabdosia japonica* var. *glaucocalyx* Flavonoids Fraction Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014, 1–12. doi: 10.1155/2014/894515

11. Climate data for Kyiv. Available at: <http://www.cgo.kiev.ua/>

12. Field practice in plant physiology. Water deficit plants. V. Hnatiuk Ternopil NAT pedagogical University. Available at: <http://mir.zavantag.com>

13. Andreeva, Y. V., Kalinkina, G. I. (2000). Development of methods of quantitative determination of flavonoids in the *Alhsemilla vulgaris* L. *Chimiya rastitelnogo syrja*, 1, 85–88.

*Рекомендовано до публікації д-р біол. наук Булах П. Є.
Дата надходження рукопису 04.10.2016*

Ковтун-Водяницька Світлана Михайлівна, кандидат біологічних наук, відділ культурної флори, Національний ботанічний сад ім. М. М. Гришка НАН України, вул. Тімірязєвська, 1, м. Київ, Україна, 01014
E-mail: chanya-s@yandex.ua

Левон Володимир Федорович, кандидат хімічних наук, Відділ акліматизації плодів рослин, Національний ботанічний сад ім. М. М. Гришка НАН України, вул. Тімірязєвська, 1, м. Київ, Україна, 01014
E-mail: vflevon@gmail.com