

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ В.А. Кратасюк

« _____ » _____ 20__ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02 Физика

БИОФИЗИЧЕСКИЙ И БИОМОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ *ACHILLEA*
MILLEFOLIUM L. В Г. КРАСНОЯРСКЕ И ЕГО ОКРЕСТНОСТЯХ

Руководитель _____ д-р. биол наук, доцент И.Е. Ямских

Выпускник _____ О.В. Слатинская

Красноярск 2016

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Биофизический и биоморфологический анализ *Achillea millefolium* L. в г. Красноярске и его окрестностях» содержит 53 страницы текстового документа, 10 иллюстраций, 16 таблиц, 60 использованных источников.

ТЫСЯЧЕЛИСТНИК ОБЫКНОВЕННЫЙ, ЛЕКАРСТВЕННОЕ РАСТЕНИЕ, БИОФИЗИКА, ОПТИЧЕСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ, УРОЖАЙНОСТЬ, МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ, БИОТЕСТИРОВАНИЕ, ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ.

Объект аудита – популяции лекарственного сырья тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium*), собранные в пределах города Красноярска и его окрестностях.

Цель работы - оценка качества лекарственного сырья тысячелистника обыкновенного, произрастающего в местах с различной степенью антропогенной нагрузки, методами оптической спектроскопии, биотестирования и биоморфологии

Гипотеза - накопление токсикантов в растениях тысячелистника обыкновенного, произрастающего в различных экологических зонах, влияет на изменение структуры его фармакологических компонентов.

Комплексная оценка качества растительного сырья при помощи биофизических методов является актуальной в связи с высокой скоростью получения результатов и минимальным количеством необходимых реагентов по сравнению с наиболее распространённым, но продолжительным по времени химическим анализом. Исследование вносит вклад в разработку новых подходов к анализу растительных объектов.

В работе проводился комплексный анализ *A. millefolium* методами оптической спектроскопии, биотестирования и биоморфологии. В результате проведения исследований установлено, что накопление токсичных веществ не влияет на габитус тысячелистника, а его химический состав проявляет меньшую устойчивость к антропогенным нагрузкам в листьях растения. Проанализирована фармакологическая активность растения из зон с различной степенью антропогенной нагрузки. Даны рекомендации по местам сбора лекарственного сырья тысячелистника обыкновенного в г.Красноярске и его окрестностях.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. Обзор литературы	6
1.1. Ботанико-географическая и фармакологическая характеристика тысячелистника обыкновенного	6
1.2. Методы оценки химического состава и биологической активности лекарственного сырья	9
1.2.2. Биофизический анализ	9
1.2.2.1. Характеристика тест-объектов, основанных на использовании ферментативных реакций светящихся бактерий	9
1.2.2.2. Ультрафиолетовая (электронная) спектроскопия	12
1.2.2.3. ИК-Фурье спектроскопия	13
1.3. Популяционный подход к изучению лекарственных видов растений	14
1.4. Характеристика района исследований	16
1.5. Экологические проблемы г. Красноярска	17
2. Материалы и методы	19
2.1. Объекты исследований	19
2.2. Ботанические методы исследований	19
2.3. Химический метод	21
2.4. Биофизические методы	21
2.4.1. Методы спектроскопии	21
2.4.2. Метод биотестирования при помощи биолюминесцентных тест-объектов	22
3. Результаты и обсуждение	24
3.1. Характеристика местообитаний и оценка урожайности <i>Achillea millefolium</i>	24
3.2. Морфологическая изменчивость популяции тысячелистника обыкновенного	26
3.3. Корреляционная структура популяций <i>A. millefolium</i> L.	30
3.4. Анализ сходства популяций <i>Achillea millefolium</i> по морфологическим признакам	31
3.5. Исследование состава <i>A. millefolium</i> с помощью химического анализа ...	35
3.6. Исследование состава <i>A. millefolium</i> с помощью УФ-спектроскопии	36
3.7. Исследование состава <i>A. millefolium</i> с помощью ИК-спектроскопии	41
3.8. Определение токсичности с помощью биолюминесцентного анализа	44
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	47
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	50

ВВЕДЕНИЕ

В Красноярском крае широко распространены виды дикорастущих растений, обладающие ярко выраженным физиологическим действием на организм человека. Одним из таких растений является *Achillea millefolium* L. (семейство *Asteraceae*) – широко распространенный в северном полушарии вид, одной из особенностей которого является антропогенная устойчивость, что означает сохранение его фармакологической ценности при сборе в условиях различной экологической нагрузки. Этот вид весьма полиморфен и имеет много форм различного таксономического значения, обычно неясно ограниченных друг от друга [1].

Тысячелистник обыкновенный является ценным лекарственным растением и представляет большой интерес в связи с широким спектром своих фармакологических свойств. Для приготовлений настоев, отваров и фармацевтических препаратов используют его листья и соцветия. Траву тысячелистника используют для лечения желудочно-кишечных заболеваний, улучшения обмена веществ в организме, как ранозаживляющее, антимикробное, противовоспалительное, спазмолитическое средство. [2]. Биологически активный комплекс тысячелистника обыкновенного известен и представляет собой комплекс из таких веществ, как фенольные соединения, ахиллин, сложные эфиры, органические кислоты, полисахариды, витамины и другие вещества [3].

Нельзя забывать и о том, что качественный и количественный состав веществ, содержащихся в растительном сырье, в значительной мере определяется условиями их произрастания, фазой развития, временем сбора, способами консервации и другими факторами [4]. Действие антропогенного фактора привело к трансформации природных экосистем практически во всех частях нашей планеты. В отдельных случаях, выброс антропогенных веществ делает лекарственное сырьё непригодным к дальнейшему использованию. Лекарственные растения, к которым относится тысячелистник обыкновенный, способны накапливать различные химические соединения из окружающей среды, потому для непосредственного использования в фармакологических целях их сбор необходимо производить в местах с минимальной антропогенной нагрузкой. Потому главной проблемой при сборе лекарственного сырья следует считать оценку его пригодности к использованию в фармакологических целях.

Цель работы - оценка качества лекарственного сырья тысячелистника обыкновенного, произрастающего в местах с различной степенью антропогенной нагрузки, методами оптической спектроскопии, биотестирования и биоморфологии.

Для решения цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить морфологическую изменчивость и урожайность популяций тысячелистника обыкновенного;

2. Определить химический состав фармакологических компонентов *Achillea millefolium* с помощью методов УФ-спектроскопии;
3. Оценить устойчивость химического состава образцов сырья *Achillea millefolium*, в зависимости от степени антропогенной нагрузки;
4. Определить токсичность *Achillea millefolium* методом биотестирования при помощи биолюминесцентных тест-объектов.

1. Обзор литературы

1.1. Ботанико-географическая и фармакологическая характеристика тысячелистника обыкновенного

Латинское родовое название *Achilléa* происходит от субстантивированной формы прилагательного женского рода к др.-греч. ἄχιλλειος (*achilleios*, «Ахиллов»). Так в Греции называлось некое растение, которое получило своё название в честь Ахилла, Ахиллеса (*Achilleus*, -eos = *Achilles*), сына Пелея и Фетиды, мифологического героя Троянской войны, воспитанника кентавра Хирона, который применял это растение как средство, излечивающее раны [5].

Свой видовой эпитет лат. *millefolium* («тысячелистник», от *mille* — «тысяча» и *folium* — «лист») растение получило по многочисленным сегментам листа. У Жозефа Турнефора это название растения, у Линнея — видовой эпитет. Дословный русский перевод названия лат. *Achilléa millefolium* L.— «Тысячелистник-тысячелистник». В русской ботанической номенклатуре видовой эпитет не переводится, а заменяется словом «обыкновенный» [5].

Тысячелистник обыкновенный *Achillea millefolium* L. (семейство *Asteraceae*) — широко распространенное растение. Этот вид весьма полиморфный и имеет много форм различного таксономического значения, обычно неясно ограниченных друг от друга. *Achillea millefolium* часто делят на тысячелистник азиатский (*Achillea asiatica* Serg.) и тысячелистник щетинистый (*Achillea setacea* Waldst. et Kit.) из-за различного ареала произрастания [1]. *Achillea asiatica* — растение габитуально сходное с *Achillea setacea*, но имеющее свои морфолого-географические особенности. Другие авторы считают выделение *Achillea asiatica* в самостоятельный вид нецелесообразным, и во «Флоре Красноярского края» [6] его рассматривают в составе *Achillea millefolium*. В сводке «Флора Сибири» [7] все вышеперечисленные виды признаются самостоятельными. В нашей работе вид тысячелистник обыкновенный рассматривается в широком смысле.

Тысячелистник обыкновенный — многолетнее травянистое растение с ползучим, шнуровидным корневищем, от которого отходят надземные побеги. Стебли прямые, высотой 20—80 см, пушистые. Пластинка листа ланцетовидная, продолговатая, длиной 3—15 см, шириной 0,5—3 см, снизу с точечными железками, дважды- или трижды- не до самого основания перисто-рассеченная (листовой стержень шириной 1—2 мм), с многочисленными (15—30) значительно отставленными первичными долями, имеющими 9—15 зубчатых долек. Общий стержень листа плоский, с узкой (1—2 мм) каймой. Корзинки собраны на верхушке стебля в щитки. Обертки продолговатые, яйцевидные, тупые, гладкие или слегка опушенные, с перепончатым, нередко буроватым краем. Язычковых цветков 5, они белые, редко розовые; трубчатых цветков 14—20, они обоеполые. Завязь нижняя, одногнездная. Семянки плоские, продолговатые серебристо-серые, длиной 1,5—2 мм. Тысячелистник

обыкновенный цветет с конца мая по август, сбор сырья для лекарственного применения происходит в период цветения. Тысячелистник обыкновенный произрастает повсеместно на территории России по лугам, степям, склонам, лесным полянам, опушкам, садам. Часто встречается по окраинам полей, у дорог, в лесополосах; на залежах иногда образует сплошные заросли [3].

A. millefolium — евроазиатский вид. В европейской части России распространен повсеместно от государственной границы на юге (кроме восточных районов Закавказья) до побережья Ледовитого океана. Охватывает о. Колгуев, южную половину о. Вайгач, Югорский п-ов. В Сибири, начиная от 68° в. д., граница ареала резко смещается к югу, до 62° с. ш. Эта широта является пределом массового распространения вида в Западной и Средней Сибири; лишь по долинам крупных рек тысячелистник распространяется севернее, доходя до 70° с. ш. В Восточной Сибири местонахождения вида немногочисленны и приурочены к долинам рек (Лены, Алдана и их притоков). Изолированные местонахождения имеются в верхнем течении Индигирки, нижнем течении Лены и Оленека. Восточная граница ареала проходит по правобережью Алдана, смещаясь на юге до низовьев Шилки. Отдельные местонахождения отмечены на Дальнем Востоке — о. Сахалин (средняя и южная часть) и южная часть Хабаровского края. В Приморском крае тысячелистник обыкновенный растет в юго-западной части и по долине р. Уссури. Южная граница в пределах СНГ следует от устья р. Вахш по предгорным районам Кугитангтау и Зеравшанского хребтов на Самарканд до среднего течения р. Зеравшан, поворачивает к Ташкенту, проходит через среднюю часть хребта. Сырдарьинского Каратау к предгорьям Киргизского хребта и Джунгарского Алатау, идет до 77° в. д., где поворачивает на север к Балхашу, проходит по территории Казахстана по 48—49° с. ш., пересекает р. Урал и выходит к Волге. Изолированные местонахождения имеются в долинах небольших рек Центрального Казахстана и в предгорных районах Копетдага.

A. millefolium распространен в лесной, лесостепной и степной зонах. Постоянно присутствует на разнотравно-вейниковых и разнотравно-злаковых суходольных лугах юга, в тимофеечных, полевицево-овсяницевых и овсяницевых ассоциациях настоящих суходольных лугов, в лесных суходольных злаково-разнотравных, щучково-ежовых, разнотравно-ежовых и высокотравных лугах. Встречается по низинным заболоченным разнотравно-злаковым лугам, в парковых лиственничниках со злаково-разнотравным покровом, разреженных березово-лиственничных лесах с зарослями кустарников и лиственнично-кедровых травянистых лесах. Часто встречается по окраинам полей, у дорог, в лесополосах; на залежах иногда образует сплошные заросли. Чувствителен к затенению, нетребователен к почве, но избегает солонцеватых почв [8].

Надземная часть тысячелистника в период цветения содержит флавоны, алкалоид ахиллеин, кумарины, аконитовую кислоту, горькие и дубильные вещества, смолы, органические кислоты, инулин, аспарагин, минеральные соли,

аскорбиновую кислоту, филлохинон, каротин, холин. В семенах содержится до 21 % жирного масла. В листьях и соцветиях содержится эфирное масло (до 0,85%) желтовато-зелёного или синего цвета, в состав которого входят монотерпеноиды (цинеол (8—10 %), камфора, туйол), сесквитерпеноиды — ахиллин (0,05%), ацетилбалхинолид, кариофиллен, азулены, сложные эфиры, L-борнеол, β-пинен, L-лимонен, туйон, борнилацетат; смолы, органические кислоты, аспарагин, каротин (провитамин А), витамин С, большое количество витамина К, фитонциды и эфирное масло (до 0,8%). Эфирного масла больше в цветках, чем в листьях. Для медицинских целей используют цветки, листья, соцветия. [9, 10].

Тысячелистник — древнее лекарственное растение. Он издавна широко использовался в русской народной медицине. Трава тысячелистника обладает кровоостанавливающими и противовоспалительными свойствами. В эксперименте настой травы, а также сок из растения ускоряет свертывание крови. По силе действия на процессы свертывания крови 0,5% настой тысячелистника превосходит раствор хлорида кальция в концентрации 1:2000—1:5000. Растение обладает вяжущим, мочегонным, потогонным свойствами и способствует правильному обмену веществ. Оно возбуждает аппетит, усиливает деятельность пищеварительных желез и улучшает пищеварение, увеличивает выделение молока у кормящих женщин. Тысячелистник ускоряет заживление ран, улучшает кровообращение и обладает «кровоочистительным», противосудорожным, обезболивающим, противовоспалительным, противомикробным, инсектицидным и антиаллергическим действием. Трава тысячелистника входит в состав желудочных, аппетитных и других микстур и чаев [11].

Одно растение тысячелистника может дать от 0,4 до 1,4 г воздушно-сухого сырья [9]. Продуктивность тысячелистника обыкновенного на разнотравных лугах составляет 282 кг/га (сырой вес). Заготовки сырья тысячелистника проводят в основном в европейской части страны. В Ставропольском крае ежегодно заготавливают около 10 т травы (запасы сырья в предгорных районах края составляют 25 т). В Башкирии ежегодно собирают до 73 т сырья. По предварительным подсчетам запасы сырья тысячелистника на остепненных лугах северо-восточного Алтая составляют около 107 т, на пойменных лугах — 357 т.

Сырье тысячелистника является предметом экспорта. Заготавливают два вида его сырья — траву и соцветия. Траву собирают в фазу цветения (июнь — первая половина августа), срезая верхушки стеблей длиной до 15 см. При заготовке соцветий срезают отдельные цветочные корзинки или щитки со стеблем не длинее 2 см. Недопустимо вырывать растения с корнем, что приводит к уничтожению зарослей. При правильном режиме заготовок одни и те же участки можно использовать несколько лет подряд, давая затем «отдых» зарослям на один — два года [12-14].

1.2. Методы оценки химического состава и биологической активности лекарственного сырья

1.2.1. Химический анализ

Раздел химии, изучающий химический состав и отчасти структуру веществ; имеет целью определение химических элементов или групп элементов, входящих в состав веществ. Предмет её как науки— совершенствование существующих и разработка новых методов анализа, поиск возможностей их практического применения, исследование теоретических основ аналитических методов.

В зависимости от задач, аналитическая химия включает качественный анализ, нацеленный на определение того, что (или какие вещества), в какой форме находится в образце, и количественный анализ, нацеленный на определение сколько данного вещества (элементов, ионов, молекулярных форм и др.) находится в образце [15].

1.2.2. Биофизический анализ

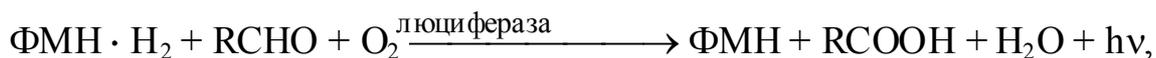
Биологические объекты, как правило, очень сложны и на протекающие в них процессы влияют многие факторы, которые часто зависят друг от друга. Физика позволяет создать упрощенные модели объекта, которые описываются законами термодинамики, электродинамики, квантовой и классической механики. С помощью корреляции физических данных с биологическими можно получить более глубокое понимание процессов в исследуемом биологическом объекте.

В физике имеется множество методов, которые в своей первоначальной форме не могут быть использованы для исследований биологических объектов. Поэтому ещё одной задачей биофизики является приспособление этих методов и методик для решения задач биологии. Сегодня для получения информации в биологических системах применяют различные оптические методы, рентгено-структурный анализ, ЯМР- и ЭПР-спектроскопию, 7-резонансную спектроскопию, различные электрометрические методы, микроэлектродную технику, методы хемилюминесценции, лазерную спектроскопию, метод меченых атомов и др. Они применяются, в частности, для медицинской диагностики и терапии [16]. В данной работе используются методы оптической спектроскопии и биотестирования при помощи биолюминесцентных тест-объектов на основе люциферазы.

1.2.2.1. Характеристика тест-объектов, основанных на использовании ферментативных реакций светящихся бактерий

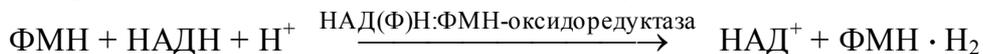
Химической основой свечения бактерий является ферментативное окисление восстановленного флавинмононуклеотида ФМН·Н₂ и

длинноцепочечного альдегида RCHO кислородом воздуха. Суммарное уравнение процесса может быть записано так:



где ФМН и RCOOH – флавиномононуклеотид и длинноцепочечная карбоновая кислота соответственно

Считается, что восстановление ФМН в бактериях происходит в реакции, катализируемой НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой:



где НАДН и НАД⁺ – окисленная и восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида.

Сопряженная система NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза в настоящее время широко используется в исследованиях. NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза содержится в экстрактах светящихся бактерий и присутствует в препаратах высокоочищенной люциферазы, с ее помощью возможно определять микроколичества NAD(P)H и NAD(P)⁺-зависимых дегидрогеназ, играющих ключевую роль во многих метаболических путях. Последнее обстоятельство обусловило широкую популярность этой сопряженной системы в аналитической биохимии.

Вопрос о механизме переноса восстановленного флавина между оксидоредуктазой и бактериальной люциферазой остается до сих пор открытым. Существуют косвенные свидетельства как независимой работы этих ферментов, так и образования прочного комплекса между ними.

Долгое время, в экологическом мониторинге использовался только интегральный тест из биолюминесцентных систем на светящихся бактериях [17, 18]. Вместе с тем в литературе имелось достаточно большое количество данных, убедительно демонстрирующих высокую чувствительность люциферазных реакций к действию токсических веществ [19]. Использование тест-объектов из ферментов, отвечающих за один из параметров жизнедеятельности бактерий (светоизлучение) считается правомерным, в связи с тем, что все изменения, происходящие в организме под действием поллютантов начинаются на молекулярном уровне.

В настоящее время известно, что бактериальная люцифераза представляет собой гетеродимер с молекулярным весом 79 кДа, состоящий из двух неидентичных субъединиц (42 и 37 кДа соответственно). Молекула люциферазы не содержит металлов, простетических групп, неаминокислотных остатков и дисульфидных связей. Бактериальная люцифераза имеет по одному центру связывания для своих субстратов - флавиномононуклеотида и альдегида. Сродство люциферазы к своим субстратам велико.

Светоизлучение бактериальной биолюминесценции наблюдается в синезеленой части видимого спектра с максимумом 478-505 нм. Количество

излученного света пропорционально количеству люциферазы и каждого из субстратов [20].

Люминесцентные бактерии оптимальным образом сочетают в себе различные типы чувствительных структур, ответственных за генерацию биоповреждения (клеточная мембрана, цепи метаболического обмена, генетический аппарат), с экспрессностью, объективным и количественным характером отклика целостной системы на интегральное воздействие токсикантов. Это обеспечивается тем, что люминесцентные бактерии содержат фермент люциферазу, осуществляющую эффективную трансформацию энергии химических связей жизненно важных метаболитов в световой сигнал на уровне, доступном для экспрессных и количественных измерений [21]. Возможные пути воздействия химических соединений на светящиеся бактерии схематично показаны на рисунке 1.

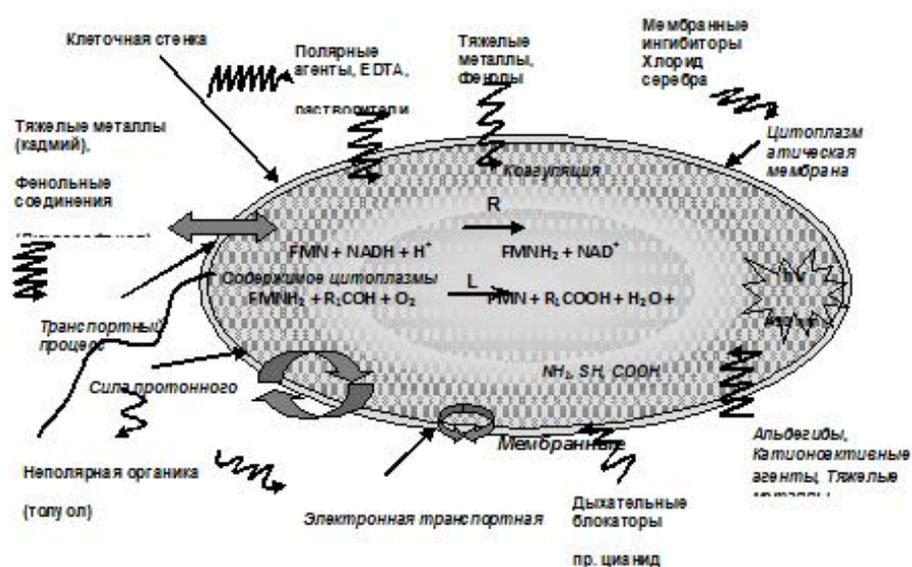


Рисунок 1 – Пути воздействия химических соединений на светящиеся бактерии

Ингибиторы и активаторы биолюминесценции можно классифицировать в соответствии с механизмом их влияния на элементарные физико-химические процессы (миграция энергии, миграции электрона и миграция водорода, который в полярных растворителях можно рассматривать как сумму протона и электрона ($e^- + H^+$)) [22].

Изменение эффективности данных процессов при добавлении молекул загрязнителей к биолюминесцентной системе зависит от физико-химических характеристик молекулы ксенобиотика, таких, как сродство к электрону, редокс-потенциал, квантовый выход флуоресценции, энергия и природа

электронно-возбужденных состояний, перекрывание спектра поглощения молекулы ксенобиотика и спектра биолюминесценции, количество и размер гидрофобных заместителей, включение в структуру поллютанта тяжелых атомов и т.п. [23].

В литературе встречается перечень возможных механизмов действия разных веществ на биолюминесценцию *in vitro*. При добавлении поллютанта (ингибитора) в реакционную смесь, могут проходить следующие процессы [20, 24]:

1. Химическая модификация аминокислотных остатков, в том числе в активном центре фермента;
2. Конкурентные и другие типы отношений между субстратами люциферазы, НАДН:ФМН-оксидоредуктазы и ингибиторами;
3. Тушение возбуждения и разрушение интермедиатов [25];
4. Действие на дегидрогеназы через неспецифические акцепторы электронов и ингибиторы дыхательной цепи;
5. Взаимодействие с альдегидами в зависимости от липофильности вводимых соединений. В силу многокомпонентности биферментной системы один ингибитор может влиять по нескольким из этих путей.

1.2.2.2. Ультрафиолетовая (электронная) спектроскопия

Ультрафиолетовая (УФ) спектроскопия охватывает коротковолновую область оптического диапазона и, с одной стороны примыкает к видимой области спектра, а с другой – к рентгеновской. При воздействии электромагнитного излучения с длиной волны более 100 нм происходит возбуждение электронных оболочек молекул, что обусловлено переходом валентных σ - и π -электронов, а также неспаренных (не участвующих непосредственно в образовании связей) электронов из основного состояния в возбуждённое, с более высокой энергией.

В том случае, когда разность между двумя энергетическими уровнями отвечает энергии кванта, происходит поглощение излучения:

$$\Delta E = h\nu = E_2 - E_1.$$

Это сопровождается появлением полос поглощения в спектре при длинах волн, соответствующих разности энергий возбуждённого и не возбуждённого уровней. Каждому электронному уровню соответствует набор колебательно-вращательных уровней. Так как энергия возбуждения электронных оболочек молекулы значительно больше энергии возбуждения колебаний, то переход электронов обычно сопровождается изменением колебательно-вращательного состояния молекулы. Поэтому молекулярно-электронные спектры жидкостей и твёрдых тел состоят из широких полос.

Для возбуждения валентных электронов, участвующих в образовании разных связей, требуется разная энергия. Наибольшая энергия требуется для возбуждения электронов, участвующих в образовании ординарных связей (σ -

связей), наименьшая – для электронов, участвующих в образовании ненасыщенных сопряжённых связей. Поэтому большинство насыщенных соединений имеет поглощение в вакуумной УФ-области (до 200 нм). Возбуждённые уровни расположены настолько густо, что поглощение насыщенных соединений сплошное. Избирательное поглощение в УФ-области спектра характерно для ненасыщенных соединений. Их поглощение определяется наличием в ненасыщенных связях легко возбудимых π -электронов. Группы атомов, ответственные за избирательное поглощение, называют хромофорами. Положение полос поглощения хромофоров (максимум поглощения $\lambda_{\text{макс}}$) и их интенсивность могут значительно изменяться в зависимости от природы групп атомов, присоединённых к молекуле, содержащей хромофор, и не имеющей собственного поглощения. Такие группы называются ауксохромами.

В ряде случаев сильное влияние на УФ-спектр оказывает растворитель, в котором находится исследуемое вещество.

Количественный анализ в УФ-спектроскопии основан на использовании основного закона светопоглощения (Бугера-Ламберта-Бера):

$$A = \lg(I_0/I) = \epsilon c l,$$

где I_0 – интенсивность падающего излучения; I – интенсивность излучения, прошедшего через раствор; $\lg(I_0/I)$ называется поглощением (A) раствора, а также оптической плотностью (D) или экстинкцией (ϵ); ϵ – коэффициент молярной экстинкции ($\text{л.моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), c – концентрация (моль.л^{-1}), l – толщина кюветы (см). Коэффициент ϵ является постоянной величиной для данного соединения при данной длине волны. При больших значениях удобно пользоваться его логарифмом ($\lg \epsilon$) [26].

1.2.2.3. ИК-Фурье спектроскопия

Инфракрасная спектроскопия (ИК-спектроскопия) – раздел молекулярно-оптической спектроскопии, изучающий спектры поглощения и отражения электромагнитного излучения в ИК области, т. е. в диапазоне длин волн от 10^{-6} до 10^{-3} м. ИК-спектроскопия основана на явлении поглощения химическими веществами инфракрасного излучения с одновременным возбуждением колебаний молекул. Инфракрасное излучение представляет собой электромагнитную волну и характеризуется длиной волны λ , частотой ν и волновым числом, которые связаны следующей зависимостью:

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{(c/n)} = \frac{1}{\lambda},$$

где c — скорость света, а n — показатель преломления среды.

Метод ИК спектрометрии с Фурье-преобразованием (ИК-Фурье) был разработан с целью устранить ограничения, встречающиеся при работе с дисперсионным оборудованием. Потому в фурье-спектрометрах отсутствуют входная и выходная щели, а основным элементом является интерферометр.

Интерферометр производит единственный тип сигнала, в котором «закодированы» все инфракрасные частоты. Сигнал можно измерить очень быстро, за время порядка одной секунды. Таким образом, время, затрачиваемое на образец, уменьшается с нескольких минут до нескольких секунд. В поток излучения от источника делится на два луча, которые проходят через образец и интерферируют. Разность хода лучей варьируется подвижным зеркалом, отражающим один из пучков. Первоначальный сигнал зависит от энергии источника излучения и от поглощения образца и имеет вид суммы большого числа гармонических составляющих. Для получения спектра в обычной форме производится соответствующее фурье-преобразование с помощью встроенной ЭВМ. Поскольку для идентификации требуется спектр частот (значения интенсивности в зависимости от отдельной частоты), полученная интерферограмма может быть обработана при помощи преобразования Фурье, который осуществляется компьютером при обработке сигнала. Твердые образцы часто измельчают, смешивают с порошком KBr и прессуют таблетки. Обычно в эксперименте прибор испускает одновременно все длины волн инфракрасного излучения, включая ближнюю ИК-область ($14\ 000 — 4000\ \text{см}^{-1}$), среднюю ИК-область ($4000 — 400\ \text{см}^{-1}$) и дальнюю ИК-область ($400 — 10\ \text{см}^{-1}$). Поглощение излучения веществом количественно описывается законом Бугера-Ламберта-Бера, а спектр получается при построении зависимости пропускания ($T, \%$) или оптической плотности (D) от длины волны (частоты, волнового числа). Получение ИК-спектров для высокомолекулярных соединений затруднено тем, что они сильно поглощают ИК-излучение.

Достоинства фурье-спектрометра: высокое отношение сигнал-шум, возможность работы в широком диапазоне длин волн без смены диспергирующего элемента, быстрая (за секунды и доли секунд) регистрация спектра, высокая разрешающая способность (до $0,001\ \text{см}^{-1}$) [27-32].

1.3. Популяционный подход к изучению лекарственных видов растений

Популяционный подход к изучению видов растений в последние годы получил широкое распространение [33-36]. Наиболее удобной единицей для такого рода исследований является популяция растений.

Ю.А. Злобин [37, 38] подчеркивает важность учета морфологических признаков при проведении популяционных исследований растений. Морфологический статус и, в значительной степени, жизненное состояние растений проявляется в совокупности их качественных и количественных признаков. А наиболее ценными и информативными, по мнению автора, являются параметры, которые изменяются в зависимости от эколого-ценотической обстановки и отражают адаптацию организма к среде обитания. Большинство таких признаков связано с ростовыми процессами.

Важными показателями адаптации особей популяций к условиям среды

являются изменчивость и скоррелированность морфологических признаков, оценивающие целостность особей растений [38]. Внутрипопуляционная изменчивость характеризует варьирование признаков от особи к особи в пределах популяции. Изучение различных типов изменчивости имеет важное теоретическое и практическое значение. Внутрипопуляционное разнообразие особей может быть обусловлено как генетическим полиморфизмом, так и модификационной изменчивостью растений в пределах генотипа. Гетерогенность популяций повышает интенсивность использования ресурса и является поводом для процессов микроэволюции, которые наиболее выражены в условиях нарушенных местообитаний при ослаблении конкуренции. В сомкнутых сообществах, напротив, гетерогенность снижается [39]. Таким образом, внутрипопуляционная изменчивость в конечном итоге может объяснить механизмы приспособительных реакций и их разнообразие при изменении экотопических условий [40]. Исследование внутрипопуляционной изменчивости также позволяет определить таксономическую значимость разных видовых признаков и выбрать из них признаки-маркеры [41].

В качестве мер изменчивости используют среднее квадратичное отклонение и коэффициент вариации. Последний показатель является универсальным и позволяет сравнивать параметры, имеющие разные размерности [37, 42]. Межпопуляционная (эколого-географическая) изменчивость, или, пластичность по Ю.А. Злобину [37, 38], оценивается при сопоставлении средних арифметических значений растений различных популяций. Как изменчивость, так и пластичность связаны с жизненными формами и стратегиями развития видов растений. Способность растений сохранять на фоне антропогенных стрессов исходный уровень изменчивости является важным индикатором антропогенной толерантности [37].

Не менее важным показателем целостности особей популяций является скоррелированность их морфологических параметров. Корреляционные связи хорошо отражают состояние особей растений в обычных и стрессовых условиях и могут являться индикаторами их состояния [37]. По данным некоторых авторов [43, 44], при воздействии неблагоприятных факторов у различных видов растений происходит увеличение уровня скоррелированности признаков. Аналогичное явление наблюдается и для физиологических параметров человека, живущего в условиях Крайнего Севера [44, 45]. Масштабы изменений системы корреляций тем больше, чем сильнее воздействие и чем больше различие между объектами (по среднепопуляционным значениям и размаху их изменчивости), что позволяет считать их отражением не случайных отклонений, а направленных перестроек морфогенетических процессов.

1.4. Характеристика района исследований

Работа проводилась в городе Красноярск и его окрестностях (Емельяновский район – окрестности д. Плоское, д. Зелеево).

Красноярский край занимает центральное положение в Азиатской части Российской Федерации. Обширностью и большой протяженностью территории обусловлены исключительное разнообразие и богатство природных условий и ресурсов. Долина Енисея, протекающего через всю территорию края с юга на север, делит ее на две части: западную пониженную, являющуюся окраиной Западно-Сибирской низменности, и восточную возвышенную, занятую обширным Среднесибирским плоскогорьем, ограниченным на юге межгорной котловиной. Юг района занят Алтае-Саянской горной страной, в которой выделяются Восточный Саян, Западный Саян. Климат резко континентальный на севере и умеренный на юге. Это разнообразие усугубляется горами, которые создают свои, «азональные» варианты ландшафтов [46].

Красноярская лесостепь представляет собой островной участок, находящийся на стыке Восточного Саяна, Западной Сибири и Средне-Сибирского плоскогорья. Общая площадь лесостепи - около 400 тыс. км². В районе южных и западных участков лесостепи высоты колеблются в пределах 300-350 м, а относительные превышения – 200 м. Современный рельеф Красноярской лесостепи образовался в результате эрозионных процессов.

Резкой температурной границей внутри района исследования (г. Красноярск) является река Енисей. Его влияние хорошо выражено во все сезоны. Летом в дневные часы на набережной и островах на 2,5 – 3°С прохладнее, чем в городе. В зимний период термические различия больше, чем в летний, что связано с дополнительными тепловыми выделениями от сжигания большого количества топлива. Самыми тёплыми районами является прибрежная часть правобережья. Весной в апреле-мае в прибрежной части Енисея на 0,4–0,6°С холоднее, чем во внутренних районах города, так как после зимы воды Енисея понижают температуру воздуха. Осенью же наоборот, Енисей оказывает обогревающее воздействие, и температура воздуха на берегах повышается на 0,5–0,7°С.

Влажность воздуха на набережной и островах значительно выше, чем в городе, что связано с непосредственным влиянием реки, то есть с непрерывным потоком водяного пара и с более низкой температурой воздуха на набережной. Здесь летом в ясную погоду относительная влажность воздуха на 10-20% выше, чем в городе [47].

Почвенный покров Красноярской лесостепи комплексный. Он представлен чередованием черноземов, серых лесных и дерново-подзолистых почв. В долинных пологих участках на черноземных почвах представлены вторичные суходольные остепненные луга. В небольшом количестве встречаются островками ковыльные участки крупнопольно-ковыльно-разнотравных степей. По террасам распространена лесная растительность,

представленная производными березняками, осинниками, а на песчаных почвах – сосняками остепненными, с изреженным травяным ярусом и простой фитоценотической структурой. По долине и на первой террасе реки Качи узкой лентой идут еловые леса. Они связаны непосредственно с рекой и ей обязаны своим продвижением из таежной зоны.

Естественная лесная растительность представлена формациями сосновых и березовых лесов. Степную растительность формируют луговые, настоящие степи и степные петрофитные группировки. Луговая растительность представлена формациями пойменных и суходольных лугов. Кустарниковые, водные сообщества, болота, а также синантропные участки растительности существенно дополняют фитоценотическое разнообразие городской среды [48].

1.5. Экологические проблемы г. Красноярск

Красноярск входит в двадцатку самых загрязненных городов России, ведь город позиционируется, прежде всего, как промышленный гигант.

Высокие показатели загрязнения окружающей природы осложняются совокупностью природно-климатических факторов, масштабом и структурой техногенных воздействий на городскую среду, спецификой внутриквартального расположения основных индустриальных объектов. Лесной фонд по санитарно-гигиеническим показателям характеризуется второй стадией дигрессии и нуждается не только в культивировании, но и целенаправленном формировании и обустройстве зелёных насаждений. Зелёные зоны Красноярск не полностью соответствуют требованиям, которые предъявляются к зонам для отдыха. К положительным моментам относится достаточная устойчивость к интенсивным рекреационным нагрузкам, разнообразие породного состава, а также высокие показатели ландшафтной и эстетической характеристик [49].

В Красноярске источники загрязнения атмосферы многообразны, а состав выбросов отличается многокомпонентностью. Красноярск относится к городам, характеризующимся сверхвысоким уровнем загрязнения атмосферных слоёв поллютантами I и II класса опасности.

Красноярск — крупнейший транспортный узел Восточной Сибири. Наличие Транссибирской железнодорожной магистрали, грузового маршрута на реке Енисей, крупного аэропорта, а также автодорог общегосударственного, республиканского и краевого значения оказывает сильное негативное влияние на общую экологическую обстановку Красноярск.

В городе расположены очень крупные предприятия металлургической, машиностроительной и химической промышленности, оказывающие активное влияние на процессы, происходящие в биогеоценозах. Практически все районы Красноярск буквально утопают в пыли. При допустимой норме 116-132 кг\кв.км, в краевом центре каждый день выпадает от 500 до 900 кг пыли на квадратный километр в зависимости от района города. Немалую лепту вносят промышленные предприятия и транспорт. А ветер разносит пылевые частички

с токсическими веществами по всему городу и далеко за его пределы. Роза ветров в Красноярске расположена таким образом, что 70% времени ветер дует с юго-западной и западной стороны. Поэтому районы города с наветренной стороны - самые чистые. На левом берегу реки самым экологически чистым районом остается Академгородок, Ветлужанка и другие микрорайоны Октябрьского района. Правый берег никогда не был чистым с экологической точки зрения, хотя и здесь можно найти хорошее место для проживания. Одно из таких мест – микрорайон Пашенный, а также район заповедника «Столбы».

Показатели суммарного индекса загрязнения атмосферных слоёв на основании исследования пяти приоритетных для города загрязняющих веществ находятся на максимально предельном уровне значения. Основные вещества, создающие очень высокие или просто высокие уровни атмосферного загрязнения, представлены:

- бензопиреном,
- формальдегидом,
- взвешенными веществами,
- диоксидом и оксидом азота.

Согласно исследованиям ученых, в городской пыли содержится почти вся таблица Менделеева. Красноярские предприятия вырабатывают медь, свинец, цинк, никель, кобальт, ртуть и другие элементы-токсиканты. От ГЭС идет испарение воды, а пар имеет свойство впитывать в себя пыль, грязь и токсины. Выпадает на почву вся эта грязь только через пять суток. Вся токсичная пыль с дождем впитывается в почву, а из почвы - в растения. Анализ почвы в Красноярске и пригородах показал, что овощи и фрукты здесь недопустимо выращивать в открытом грунте, а зелень, собранная на грядках Николаевки или Покровки, может быть опасна для здоровья.

Очень распространенный экологический миф - в пригороде гораздо чище, чем в Красноярске. Там больше зелени, поблизости нет промышленных предприятий. По определению воздух не может быть чище в нескольких километрах от города. Вредные вещества, которые вырабатывают предприятия, распространяются на несколько десятков километров. Ореол распространения пылевого облака от краевого центра достигает 10.856 кв. км, тогда как сам Красноярск занимает 300 кв.км. Потому, думать о том, что в Емельяново или в Березовке намного чище, чем в Красноярске, ошибочно [49-51].

2. Материалы и методы

2.1. Объекты исследований

Объектом исследования служили 11 популяций *Achillea millefolium*, произрастающие в зонах с различной степенью антропогенного загрязнения в г. Красноярске и его окрестностях (таблица 1). Для выявления химического состава и токсичности лекарственного сырья использовались надземные части (листья и цветки) растений тысячелистника. Пробоподготовка проводилась согласно методике заготовки лекарственных растений [13]. Для сравнения был выбран препарат ЗАО фирмы «Здоровье».

Таблица 1 - Места сбора образцов тысячелистника обыкновенного

№ образца	Место сбора	Экологическая нагрузка
Am1	Окр. пос. Удачный, пойма р. Собачья речка, г. Красноярск	умеренная
Am2	Академгородок, г. Красноярск	умеренная
Am3	Берёзовая роща, зелёная зона, Октябрьский р-н г. Красноярск	низкая
Am4	Берег р. Енисей, ст. «Телефонисты», 10 км от г. Красноярска	низкая
Am5	Берег протоки р. Енисей, напротив о. Овсянский, 9 км от г. Красноярск	низкая
Am6	Р-н. скалы Голубка, берег р. Енисей, 7 км от г. Красноярск	низкая
Am7	Учебные посадки лесоинженерного факультета КГТУ, 5 км от г. Красноярск	низкая
Am8	Село Зелеево (Восточный Саян), 96 км от г. Красноярска	умеренная
Am9	Мкр-н Взлётка, г. Красноярска	высокая
Am10	Деревня Плоское, Емельновский р-н, 42 км от г. Красноярска	умеренная
Am11	О. Татышев, зелёная зона, г. Красноярск	низкая
Am12	Тысячелистника трава. ЗАО Фирма «Здоровье», 50 гр, Россия, 2015г.	низкая

2.2. Ботанические методы исследований

Геоботаническое описание сообществ проводили по стандартным методикам [52]. В луговых сообществах при описании травянистого яруса определяли доминирующие виды, видовой состав, проективное покрытие видов. Для оценки проективного покрытия на пробных площадях было заложено по 10 площадок размером 1 м x 1 м. Затем рассчитывали среднее проективное покрытие для каждого вида.

В лесных сообществах отдельно производилось описание древесного яруса с указанием состава и сомкнутости древостоя, подлеска и травянистого яруса.

На следующем этапе наших исследований проводили определение урожайности тысячелистника в различных местообитаниях по методу учётных площадок [42]. Для этого было заложено по 10 площадок площадью 1 м² в каждом изучаемом сообществе. Площадки закладывались так, чтобы охватить всю популяцию вида. На каждой пробной площади подсчитывали количество экземпляров изучаемого растения, отбирали фитомассу для определения воздушно-сухой массы.

Для изучения модификационной изменчивости вида был проведен сбор гербарного материала 11 популяций тысячелистника обыкновенного. В каждой популяции было собрано по 30 генеративных особей *Achillea millefolium*, выбранных случайным образом. Замерялись следующие признаки: высота растения (x1), количество листьев (x2), длина черешка (x3), длина (x4) и ширина (x5) листа низовой формации, отношение длины листа низовой формации к ширине (форма) (x6), длина (x7), ширина (x8) и форма (x9) листа срединной формации, глубина (x10) и порядок (x11) рассечения листа срединной формации, длина (x12) и ширина (x13) листа верховой формации, количество щитков (x14), количество корзинок (x15), длина общего соцветия (x16).

Полученные данные обработаны статистическими методами [37]. Для каждого параметра определены пределы варьирования признака (*lim*), среднее арифметическое значение (*M*), ошибка репрезентативности среднего (*m_M*), среднее квадратичное отклонение (*σ*), коэффициент вариации (*V*). Коэффициент вариации используется в качестве меры внутривидовой изменчивости, а его оценка проводится с помощью эмпирической шкалы уровней изменчивости С.А. Мамаева, имеющей следующие градации:

- V < 7% - очень низкий уровень изменчивости;
- 8-12% - низкий уровень изменчивости;
- 13-20% - средний уровень;
- 21-40% - высокий уровень;
- V > 40% - очень высокий уровень изменчивости.

Характер распределения значений признаков оценивали с помощью коэффициентов ассиметрии и эксцесса и критерия Колмогорова-Смирнова (приведенные выше выборочные параметры целесообразно использовать при нормальном распределении).

Для установления достоверных различий между среднепопуляционными значениями одноименных признаков использован однофакторный дисперсионный анализ. Различие считалось достоверным при уровне значимости $p < 0,05$. Статистическая обработка проведена в программе «Statistica 7».

2.3. Химический метод

Наличие присутствия биологически активных веществ в водных экстрактах тестировали при помощи качественных реакций для фенольных соединений и дубильных веществ: 5% водным раствором хлорида алюминия и 1% раствором железно-аммониевых квасцов. В ходе реакции регистрировали окрашивание растворов в жёлтый и синий цвет соответственно, что свидетельствует о присутствии гидролизуемых дубильных веществ и фенольных соединений [11].

При помощи качественных реакций, были определены фенольные соединения, на долю которых приходится основной вклад фармакологического эффекта [53]

2.4. Биофизические методы

2.4.1. Методы спектроскопии

Биофизические методы позволяют получить более точные данные о том, какие именно химические вещества входят в состав раствора лекарственного сырья или эфирного масла, полученного из исследуемого образца.

Водные экстракты соцветий и листьев из растений каждой исследуемой популяции готовились по стандартной методике: 2 г навески измельчённого образца (не менее 15 растений), помещали в колбу (250 мл) и заливали горячей водой, затем инкубировали в кипящей водяной бане в течение 30 минут. Далее пробу охлаждали до комнатной температуры (25°C) без доступа света, после чего процеживали через вату и фильтровали (диаметр пор - 0,45 мкм), доливая дистиллированной водой до первоначального объема (ГОСТ 24027.2-80 [54]).

Регистрация УФ-спектров водных экстрактов образцов проводилась с помощью спектрометра Cary Series UV-Vis-NIR Spectrophotometr (Agilent Technologies) в диапазоне 200-500 нм в кварцевых кюветах (с толщиной 1 мм) с шагом 1 нм, шириной щели 1 нм и автоматическим скринингом. Наличие полос поглощения при 290-320 нм [55] характерно для соединений фенольного ряда. Регистрация спектров проводится в растворе тысячелистника (отвара из листьев и цветков растений) с добавлением комплекса $AlCl_3 \cdot 6H_2O$.

Регистрацию ИК- спектров осуществлялась на Фурье-ИК спектрометре Vertex 8 V (Bruker Optics). Для регистрации ИК-спектров листьев и цветков растений, по методике [56] были приготовлены таблетки с бромидом калия. Навеска образца составляла 4 мг на 0,2 г KBr. Сравнение полученных в ходе работы параметров с табличными данными произведено по таблицам из книги «Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts» (George Socrates) [29].

2.4.2. Метод биотестирования при помощи биолюминесцентных тест-объектов

Измерение токсичности водных экстрактов производили при помощи комплекта реактивов аналитической биолюминесценции (КРАБ), произведенный лабораторией бактериальной биолюминесценции Института биофизики СО РАН (Красноярск). Один флакон КРАБ содержал 0,5 мг/мл люциферазы *Photobacterium leiognathi* ЕС 1.14.14.3 из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* и 0,18 ед. активности НАДН:ФМН-оксидоредуктазы ЕС 1.5.1.29 (*Vibrio fischeri*), НАДН (“Sigma”, США), ФМН (“Serva”, Германия), тетрадеканаль (“Merck”, Германия). Остаточное свечение биферментной сопряженной системы НАДН:ФМН– оксидоредуктаза-люцифераза измеряли в исследуемых экстрактах на Биолюминометре 20/20n Single Tube Luminometer (GloMax).

Для измерения контрольного свечения в кювету последовательно добавляли все компоненты реакционной смеси (таблица 2), помещали кювету в биолюминометр и регистрировали величину максимальной интенсивности свечения (I_0).

Таблица 2 - Используемая реакционная смесь для тестирования с помощью биолюминесцентных тест-объектов на основе люциферазы

Компонент реакционной смеси	Объём
Фосфатный буфер (0,05М; pH 6,8)	300 мкл
КРАБ	5 мкл
Тетрадеканаль (0,0025%)	50 мкл
NADH ($4 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	100 мкл
FMN ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	10 мкл

Далее измеряли интенсивность свечения в присутствии исследуемой пробы (I), для этого помимо компонентов реакционной смеси в кювету вносили 50 мкл исследуемой пробы. Каждое измерение проводили в трех повторностях.

Реакцию биотестов определяли по величине остаточного свечения:

$$T = (I / I_0) \cdot 100\%,$$

где I – интенсивность свечения в присутствии исследуемой пробы, I_0 – контрольная интенсивность свечения.

В случае если величина T отличается больше чем на 20% от 100%, пробу разводят и тестируют ее вновь. По количеству разведений необходимых для получения остаточного свечения в диапазоне 80%-120% делают вывод о токсичности пробы (таблица 3) [56]. Для статистической обработки результатов использовали пакет прикладных программ EXCEL («Microsoft», США).

Таблица 3 - Оценка токсичности по количеству разведений пробы

Количество разведений, раз	Токсичность пробы
1	Слаботоксичная
3	Среднетоксичная
9	Токсичная
27	Сильнотоксичная
81 и более	Гипертоксичная

3. Результаты и обсуждение

3.1 Характеристика местообитаний и оценка урожайности *Achillea millefolium*

Исследования проводились в г. Красноярске и его окрестностях в пределах Красноярской лесостепи. Для сравнительного изучения были собраны материалы в окр. с. Зелеево (Восточный Саян). Характеристика пробных площадей приведена в таблице 4.

Выявлено, что тысячелистник обыкновенный является часто встречающимся видом и произрастает на лугах различной степени увлажнения (остепненных, мезофильных, пойменных), в разреженных березняках, в нарушенных местообитаниях (на пустырях, обочинах дороги). Сопутствующими видами, отмеченными в большинстве изученных сообществ, являются типично луговые и синантропные виды: *Bromopsis inermis* (Leys.) Holub, *Centaurea scabiosa* L., *Artemisia vulgaris* L., *Festuca pratensis* Huds., *Elytrigia repens* (L.) Nevski, *Taraxacum officinale* F.H. Wigg., *Trifolium pratense* L., *Trifolium repens* L., *Plantago major* L., *Plantago media* L.

Проективное покрытие вида варьирует от 5 до 50%. Высокие показатели численности *Achillea millefolium* зафиксированы в луговых и антропогенно-нарушенных сообществах: на пойменном разнотравном лугу (Am4, 30%), на суходольном лугу (Am10, 50%), на обочине дороги (Am5, 45%), на пустыре (Am2, 20%). Это свидетельствует о широкой экологической толерантности изучаемого вида к различным факторам среды (увлажнению, почвенным условиям), в том числе и антропогенным. Особи вида, произрастающие на обочине дороги в мкр. Взлетка также характеризуются относительно высоким проективным покрытием (15%) и крупными размерами. Снижение проективного покрытия вида зафиксировано в разреженном березняке разнотравном (Am3, 10%) и в зоне экотона (переход от лесного к луговому фитоценозу) между лугом разнотравным и тополево-березовым лесом (Am11, 5%), что, видимо, связано с высокой конкуренцией со стороны лесных видов и узкой экологической амплитудой по отношению к освещению. Популяция Am8, также произрастающая в зоне экотона в среднегорной полосе Восточного Саяна, также характеризуется невысокой численностью (5%), однако габитус растений тысячелистника из данного местообитания имеет значительные отличия от других популяций.

Таблица 4 - Характеристика местообитаний *Achillea millefolium* L.

№ поп.	Название сообщества, местоположение	Характеристика древесной растительности	Доминанты травянистого яруса (в скобках указано проективное покрытие в %)
Am1	Остепненный луг злаково-разнотравный (окр. пос. Удачный, пойма р.Собачья речка)	Единичные сосны, береза	Bromopsis inermis (20%), Melilotus officinalis (20%), Achillea millefolium (15%), Medicago falcata (12%), Phleum pratense (8%), Centaurea scabiosa (7%)
Am2	Пустырь, возникший на месте картофельного поля (Академгородок)	Древесная растительность отсутствует	Achillea millefolium (20%), Festuca pratensis (20%), Pastinaca sylvestris (15%), Convolvulus arvensis (10%)
Am3	Березняк злаково-разнотравный (Академгородок, Берёзовая роща)	Сомкнутый березняк с примесью сосны, осины (состав древостоя 9Б1С+Ос, сомкнутость крон 0,7)	Achillea millefolium (10%) Festuca pratensis (10%), Artemisia vulgaris (10%), Geum aleppicum (10%), Agrostis gigantea (8%)
Am4	Пойменный разнотравный луг (берег р.Енисей, ст. «Телефонисты»)	Единичные сосны, береза, ива, свида белая, черёмуха	Geranium pratense (40%), Achillea millefolium (30%), Pulmonaria mollis (8%), Vicia cracca (10%), Agrimonia pilosa (25%)
Am5	Обочина дороги (берег протоки р.Енисей, напротив о.Овсянский)	Единичные сосны, береза	Achillea millefolium (45%), Centaurea scabiosa (30%), Pastinaca sylvestris (10%)
Am6	Луг разнотравный (р-он скалы Голубка)	подрост сосны, берёзы	Achillea millefolium (15%), Urtica dioica (11%), Galium verum (10%), Artemisia vulgaris (10%)
Am7	Учебные посадки лесоинженерного факультета КГТУ	Искусственные посадки кедра	Bromopsis inermis (25%), Agrimonia pilosa (20%), Achillea millefolium (15%), Elytrigia repens (15%)
Am8	Мезофильный луг высокотравно-злаковый (окр. с. Зелеево (Восточный Саян))	Единичная осина, пихта	Deschampsia cespitosa (30%), Cirsium setosum (15%), Dactylis glomerata (10%), Urtica dioica (10%), Artemisia vulgaris L. (10%), Achillea millefolium L. (5%)
Am9	Обочина дороги (г.Красноярск, мкрн. Взлётка)	Древесная растительность отсутствует	Bromopsis inermis (60%), Artemisia vulgaris (30%), Phleum pratense (20%), Achillea millefolium (15%), Polygonum aviculare (15%)

Продолжение таблицы 4

№ поп.	Название сообщества, местоположение	Характеристика древесной растительности	Доминанты травянистого яруса (в скобках указано проективное покрытие в %)
Am 10	Суходольный луг разнотравный (окр. д. Плоское, Емельяновский район)	Древесная растительность отсутствует	<i>Achillea millefolium</i> (50%), <i>Elytrigia repens</i> (11%), <i>Arctium tomentosum</i> (10%), <i>Vicia cracca</i> (7%)
Am 11	Луг разнотравный (о. Татышев)	Единичные березы, тополя	<i>Artemisia vulgaris</i> (18%), <i>Plantago major</i> (13%), <i>Tanacetum vulgare</i> (10%), <i>Elytrigia repens</i> (10%), <i>Koeleria cristata</i> (8%), <i>Achillea millefolium</i> (5%)

Урожайность, рассчитанная нами с использованием метода учетных площадок, варьирует в разных популяциях от $49,77 \pm 1,90$ до $266,64 \pm 12,35$ г/м² (таблица 5). Максимальной урожайностью характеризуются популяции тысячелистника, произрастающие на суходольных лугах в окрестностях г. Красноярска (окр. с. Плоское, окр. скалы Голубка) и на пустыре в районе Академгородка. Минимальные значения данного показателя отмечены для особей, произрастающих в окрестностях пос. Удачный.

Таблица 5 - Оценка урожайности лекарственного сырья *A. millefolium*

№ популяции	Урожайность, г/м ²
Am1	$49,77 \pm 1,90$
Am2	$198,41 \pm 5,06$
Am3	$156,60 \pm 4,64$
Am4	$74,96 \pm 3,60$
Am5	$154,37 \pm 6,53$
Am6	$196,48 \pm 8,44$
Am7	$77,89 \pm 2,03$
Am8	$114,88 \pm 8,69$
Am9	$101,95 \pm 3,74$
Am10	$266,64 \pm 12,35$

3.2 Морфологическая изменчивость популяции тысячелистника обыкновенного

Оценка индивидуальной изменчивости морфометрических признаков проводилась с помощью коэффициента вариации (Cv). В результате проведенных исследований выявлено, что для большинства изученных

параметров характерна высокая вариабельность, а значения коэффициентов вариации варьируются в широких пределах (от среднего до очень высокого уровня). К таким признакам относятся: количество листьев (x2, C_v варьирует в пределах: $C_v = 14,59 - 58,40\%$), длина прикорневого листа (x4, $C_v = 16,51 - 71,90 \%$), ширина прикорневого листа (x5, $C_v = 16,86 - 82,40 \%$), форма прикорневого листа (x6, $C_v = 16,12 - 74,43 \%$), ширина листа срединной формации (x8, $C_v = 15,04 - 61,99\%$), ширина листа верховой формации (x13, $C_v = 19,30 - 106,75 \%$).

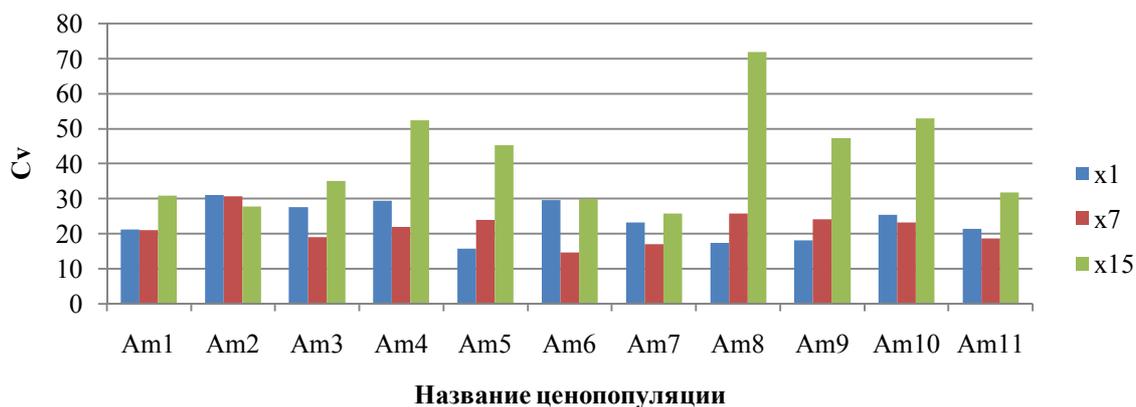


Рисунок 2 - Внутрипопуляционная изменчивость некоторых признаков тысячелистника обыкновенного. X1 – длина стебля; X7 – длина листа срединной формации; X15 – количество корзинок

Высоким – очень высоким уровнем изменчивости характеризуется длина черешка прикорневого листа (x3, $C_v = 31,83 - 92,89 \%$), глубина рассечения листа срединной формации (x10, $C_v = 26,43 - 53,20 \%$), количество корзинок (x15, $C_v = 25,79 - 72,03 \%$) и длина общего соцветия (x16, $C_v = 24,61 - 85,41 \%$). Средний – высокий уровень изменчивости отмечен для высоты растения (x1, $C_v = 15,90 - 31,10 \%$) длины и формы среднего листа (x7, $C_v = 14,67 - 30,88 \%$ и x8, $C_v = 15,04 - 61,99\%$ соответственно). Самым вариабельными признаками, значения коэффициентов вариации которых варьируют в очень широких пределах, являются ширина листа нижней формации (x5, $C_v = 16,86 - 82,40 \%$) и ширина листа верховой формации (x13, $C_v = 19,3 - 106,75 \%$). Самый низкий уровень изменчивости отмечен для порядка рассечения листа (x11, $C_v = 8,98 - 20,55 \%$). Наиболее стабильными признаками, варьирующими в относительно узких пределах являются высота растения (x1, $C_v = 15,90 - 31,10 \%$), длина листа срединной формации (x7, $C_v = 14,67 - 30,88 \%$), степень рассечения листа срединной формации (x10, $C_v = 26,43 - 53,20 \%$) и количество щитков (x14, $C_v = 21,47 - 37,87 \%$). Данные признаки можно использовать как диагностические при определении видов.

Значения среднего коэффициента вариации колеблются в пределах от 30,17 % до 63,82 % в различных популяциях *A. millefolium* и, как следствие, характеризуются высоким и очень высоким уровнями изменчивости (рисунок

2). Наименьшие значения коэффициента вариации приходятся на популяции Am1 и Am7 (окрестности посёлка Удачный, ЛИФ) – 31,75 и 30,17 % соответственно, а также Am1 (о. Татышев) – 39,28 %.

Максимальная изменчивость совокупности изучаемых признаков зафиксирована в популяциях Am4, Am8, Am 9, Am 10 ($C_v = 63,82\%$, $58,22\%$, $54,64\%$ и $55,50\%$ соответственно). Am 4 произрастает на берегу реки Енисей в сообществе, характеризующемся гетерогенными условиями. Для особей популяции Am8 отмечены очень крупные размеры, значительно превосходящие растения из окрестностей г. Красноярск. Am9 произрастает на обочине дороги (микрорайон Взлётка) также в условиях неоднородности растительного покрова (особи, произрастающие в зарослях полыни обыкновенной, костреца безостого имеют крупные размеры по сравнению с особями на открытом месте). Растения Am 10 произрастают на открытом участке и характеризуются относительно мелкими размерами и большим количеством листьев и корзинок на побеге.

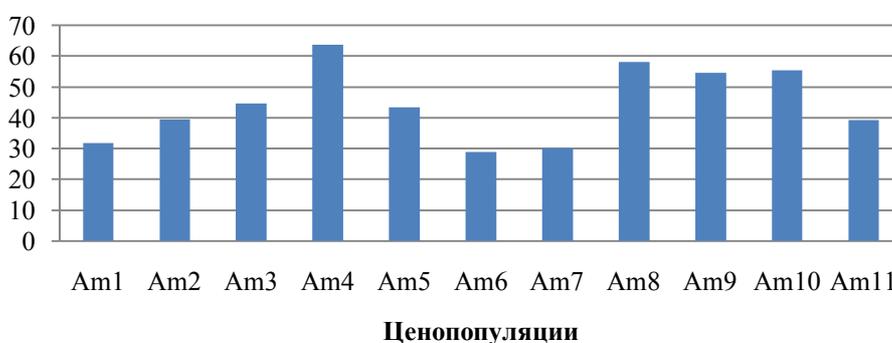


Рисунок 3 - Изменчивость признаков *Achillea millefolium* L. по среднему коэффициенту вариации

При изучении межпопуляционной изменчивости, было выявлено, что наибольшие размеры вегетативных органов отмечены для популяций Am8, (окрестности пос. Зелеево). Для особей данной популяции характерна максимальная высота растения, размеры прикорневых и стеблевых листьев, отмечается максимальное количество корзинок, значительно превышающие значение для данного показателя в других популяциях. Также крупными размерами осевых органов и листьев характеризуются особи популяции Am4 и Am9 (станция «Телефонисты» и микрорайон Взлётка, соответственно). Вытянутая форма прикорневого листа отмечена для популяций Am1, Am3 и Am11. Максимальное количество щитков наблюдается в Am1 и Am6. Минимальная длина стебля и размеров листа срединной формации отмечаются для растения популяции Am2. Особи Am10 характеризуются минимальным размером прикорневых листьев, а для Am11 отмечено минимальное количество листьев на растении и количество щитков (таблица 6).

Таблица 6 - Среднепопуляционные значения признаков *Achillea millefolium*

№ поп При знак	Am1	Am2	Am3	Am4	Am5	Am6	Am7	Am8	Am9	Am 10	Am 11
x1	49,91	35,65	52,33	65,22	69,74	53,71	41,24	74,62	67,76	43,01	58,48
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	1,95	2,02	2,64	3,52	2,02	2,92	1,76	2,39	2,25	2,00	2,29
x2	9,03	14,70	16,73	18,93	19,37	16,07	17,07	24,40	19,70	26,70	10,23
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,31	0,71	0,87	2,02	0,67	0,93	0,45	2,17	1,33	2,21	0,49
x3	2,66	2,44	4,33	4,93	3,51	2,25	2,95	5,24	2,78	2,09	4,03
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,15	0,29	0,47	0,84	0,35	0,20	0,20	0,66	0,37	0,33	0,36
x4	12,10	9,67	10,76	10,21	8,40	7,83	9,16	15,73	13,18	5,14	11,94
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,63	0,55	0,71	1,34	0,83	0,24	0,28	1,53	1,25	0,60	1,21
x5	1,00	0,84	0,92	1,29	0,87	1,14	1,17	2,61	1,14	0,73	0,94
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,06	0,05	0,08	0,17	0,08	0,04	0,04	0,39	0,14	0,09	0,09
x6	12,97	11,91	12,48	6,74	9,35	7,00	8,08	7,22	10,72	6,94	12,02
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,92	0,64	0,69	0,92	0,88	0,21	0,35	0,71	1,16	0,65	0,95
x7	4,70	3,54	3,90	5,10	4,30	4,90	4,38	6,44	6,66	4,55	4,67
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,18	0,20	0,14	0,21	0,19	0,13	0,14	0,31	0,29	0,19	0,16
x8	0,59	0,43	0,58	1,17	0,62	0,60	0,68	1,38	1,08	0,75	0,70
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,02	0,04	0,03	0,13	0,03	0,02	0,02	0,11	0,08	0,04	0,04
x9	8,28	9,25	7,12	5,22	7,23	8,23	6,58	5,09	6,69	6,54	7,15
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,44	0,67	0,29	0,37	0,32	0,23	0,23	0,30	0,35	0,40	0,38
x10	0,33	0,28	0,32	0,57	0,39	0,36	0,35	0,82	0,60	0,43	0,41
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,06	0,06	0,02	0,02
x11	2,00	2,03	2,07	2,27	2,00	2,00	2,10	2,33	2,23	2,23	2,00
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,00	0,03	0,05	0,08	0,00	0,00	0,06	0,09	0,08	0,08	0,00
x12	1,23	1,21	1,27	1,96	1,49	1,25	1,56	2,74	2,06	1,94	1,35
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,06	0,03	0,07	0,12	0,10	0,03	0,07	0,17	0,14	0,16	0,07
x13	0,20	0,21	0,33	0,34	0,24	0,22	0,28	0,71	0,43	0,40	0,22
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,01	0,01	0,06	0,03	0,02	0,01	0,02	0,08	0,04	0,04	0,01
x14	7,03	4,80	4,33	5,00	4,60	7,03	6,70	6,23	5,97	5,73	4,10
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,39	0,19	0,18	0,35	0,26	0,35	0,29	0,34	0,36	0,25	0,22

Продолжение таблицы 6

№ поп	Am1	Am2	Am3	Am4	Am5	Am6	Am7	Am8	Am9	Am 10	Am 11
x15	14,17	14,33	14,20	18,03	11,47	16,97	14,63	42,97	22,97	26,70	14,23
	± 0,80	± 0,73	± 0,91	± 1,73	± 0,95	± 0,93	± 0,69	± 5,65	± 1,99	± 2,58	± 0,83
x16	2,99	2,40	3,53	7,56	3,87	5,39	3,33	14,73	6,19	10,08	3,56
	± 0,13	± 0,23	± 0,27	± 1,18	± 0,33	± 1,74	± 0,36	± 2,00	± 0,77	± 1,21	± 0,27

При проведении однофакторного дисперсионного анализа было выявлено, что особи *A. millefolium* из различных местообитаний достоверно различаются по высоте растения, форме листа низовой и срединной формации, глубине рассечения листа срединной формации, длине листа верхней формации и количеству щитков (уровень значимости $p < 0,05$). Исходя из однофакторного дисперсионного анализа, можно сделать вывод о том, что популяция Am9, произрастающая в городской зоне, имеет много достоверных различий по сравнению с популяциями, произрастающими за пределами города. Высокое количество достоверных отличий от других популяций также демонстрирует Am8, что, вероятно, связано с тем, что в данном случае мы имеем дело с особями, относящимися к другому подвиду или даже виду. У остальных популяций различия обусловлены разнообразием условий произрастания: освещенностью, влажностью, типом почв.

3.3. Корреляционная структура популяций *A. millefolium* L.

Помимо изучения внешних особенностей растений достаточно важным считается исследование взаимозависимости признаков, выявление их корреляционной структуры. Для изучения структуры популяций *A. millefolium* был проведен корреляционный анализ, в процессе которого были выявлены парные коэффициенты корреляции 11 признаков.

Из оценки взаимосвязи вегетативных признаков *Achillea millefolium* видно, что общее количество достоверных корреляционных связей варьирует от 10 до 61 ($r > 0,36$), при уровне достоверности $P = 0,95$ (таблица 7). Максимальное количество достоверных связей (61) приходится на популяцию Am4, произрастающую на территории станции «Телефонисты». Данная территория представляет собой пойменный участок с меняющимся рельефом различной степени освещенности. Достаточно высокое количество достоверных связей (51) зафиксировано в популяции Am9, произрастающей в микрорайоне Взлётка г. Красноярска. Также высокий уровень скоррелированности отмечен для Am8 и Am10. Следует отметить, что для данных популяций также был отмечен

очень высокий уровень изменчивости (рисунок 3). Максимальное количество сильных связей приходится на популяции Am9 (11) и Am4 (9). Наименьший уровень скоррелированности признаков наблюдается в Am1 (Академгородок, бывшее картофельное поле), в данном местообитании процент достоверных корреляционных связей от общего числа рассматриваемых составляет всего 9,3%.

Таким образом, уровень скоррелированности морфологических признаков тысячелистника напрямую связан с их изменчивостью и также зависит от степени гетерогенности условий произрастания.

Таблица 7 - Количество достоверных корреляционных связей между морфологическими признаками *Achillea millefolium* L.

№ ценопопуляции	Количество статистически достоверных связей				R*, %
	Общее число достоверных связей	Сильные связи $r \geq 0,7$	Средние связи $0,7 > r \geq 0,5$	Слабые связи $0,5 > r \geq 0,36$	
Am1	10	1	4	5	9,3
Am2	28	1	10	17	25,9
Am3	36	3	10	23	33,3
Am4	61	8	24	29	56,5
Am5	43	4	19	20	39,8
Am6	25	1	15	9	23,1
Am7	21	3	6	12	19,4
Am8	45	3	17	25	41,7
Am9	51	11	22	18	47,2
Am10	46	4	19	23	42,6
Am11	27	4	10	13	25,0

* R- процент достоверных корреляционных связей от общего числа рассматриваемых; r- коэффициент корреляции.

3.4. Анализ сходства популяций *Achillea millefolium* по морфологическим признакам

В ходе сравнительного анализа популяций тысячелистника обыкновенного и выявления диагностических признаков использовался метод главных компонент. Данный метод позволяет выявить характер сопряженности в изменчивости морфометрических признаков, объективно решить, какое их количество необходимо для оценки состояния популяций [42]. Этот метод эффективно сводит множество коэффициентов корреляции к небольшому числу внутренних функциональных единиц – факторов. Значимыми, как правило, являются первые 2-4 фактора, собственные значения которых

превышают 1 (критерий Кайзера), а совместный вклад в общую дисперсию – более 80%. Такая структура факторных матриц может свидетельствовать о том, что выделяемые факторы действительно дают интегральную оценку морфогенетическим явлениям [42].

При изучении сопряженной изменчивости морфометрических признаков популяций тысячелистника выявлено, что первые три фактора (компоненты) являются значимыми. Их собственные значения превышают 1, а суммарный вклад в общую дисперсию равен 87,14% (таблица 8). Следовательно, вклад остальных компонент составляет только 12,86%, и их без ущерба можно исключить из дальнейшего анализа.

Таблица 8 - Вклад главных компонент в общую дисперсию

Компонента	Дисперсия	Процент дисперсии	Накопленная дисперсия	Накопленный процент
1	10,15516	63,46974	10,15516	63,4697
2	2,30636	14,41477	12,46152	77,8845
3	1,48657	9,29108	13,94810	87,1756

Первая главная компонента имеет весовые коэффициенты, связывающие ее с каждым из признаков, превышающие значение 0,1 (таблица 9), следовательно, является генеральной компонентой. Поэтому можно заключить, что все использованные морфометрические признаки (их совокупность) достаточно полно характеризуют тысячелистник обыкновенный. Значения весовых коэффициентов каждого признака при этой компоненте позволяют предположить, что наиболее тесно с ней связаны отрицательной связью параметры листьев срединной и верховой формации (x7-x12), а так же, количество корзинок и длина соцветия (x15, x16).

Минимальная связь с первой компонентой отмечена для количества щитков (x14). Следовательно, первая компонента указывает на достаточно высокую сопряженную изменчивость параметров роста и развития листьев и генеративных органов.

Вторую компоненту следует отнести к общим главным компонентам, поскольку один признак (x9) имеет с ней слабую связь (менее 0,1). Высокие весовые коэффициенты с данным фактором отмечены для параметров, характеризующих размеры и форму прикорневого листа (x4, x5, x6, x7). Причем связаны данные признаки со второй компонентой положительной связью (кроме признака x2). Для остальных изученных параметров отмечены невысокие значения весовых коэффициентов при второй компоненте (таблица 7).

Третья компонента, также относящаяся к общим, имеет сильную связь только с признаком x14, характеризующим количество щитков на побеге.

Таблица 9 - Собственные веса признаков в главных компонентах

Признак	1 компонента	2 компонента	3 компонента
x1	-0,679735	0,444702	-0,116180
x2	-0,676306	-0,590601	-0,300683
x3	-0,583934	0,582117	-0,435901
x4	-0,507083	0,769124	0,338934
x5	-0,847660	0,200996	0,250605
x6	0,559401	0,650581	0,141040
x7	-0,818466	0,137675	0,375116
x8	-0,961418	0,119109	-0,011456
x9	0,849636	0,000808	0,343114
x10	-0,979520	0,129053	0,043324
x11	-0,895896	-0,210949	-0,120118
x12	-0,976717	-0,108555	-0,020883
x13	-0,944922	-0,038064	0,019530
x14	-0,173540	-0,400567	0,828669
x15	-0,899137	-0,163584	0,180366
x16	-0,917910	-0,266428	-0,012944

Ординация популяций тысячелистника в плоскости главных компонент (рисунок 4 а) демонстрирует, что наиболее сильно от остальных отличаются популяции Am8 и Am9, Am4, Am10. Популяция Am8 характеризуется крупными размерами вегетативных органов. Am4 произрастает в условиях избыточного увлажнения на пойменном лугу. Am9 обитает в пределах города Красноярска с высокой степенью антропогенной нагрузки (мкр-н. Взлётка). Расхождение данных популяций отмечается в плоскости первой компоненты.

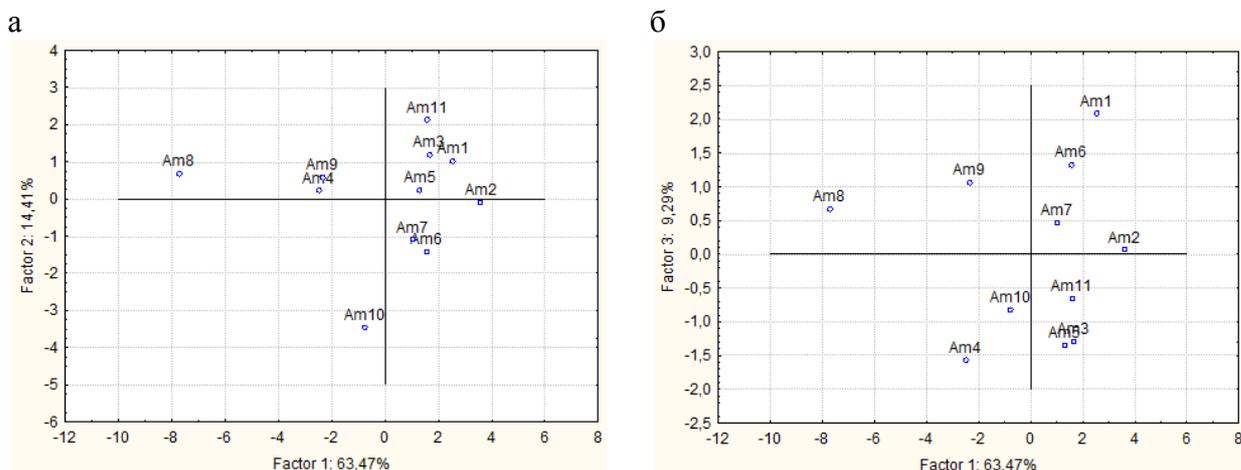


Рисунок 4 - Ординация ценопопуляций тысячелистника обыкновенного в плоскости: а- 1 и 2 главных компонент; б – 1 и 3 главных компонент

Am4 и Am9 отличаются друг от друга по количеству щитков (рисунок 4 б), о чем свидетельствует их сильное расхождение в области третьей компоненты. Остальные популяции образуют единое облако и имеют слабые различия по признакам второй компоненты. Наиболее сильно от них отличается

Am10, описанная на остепнённом лугу и характеризующаяся небольшими размерами вегетативных органов.

Таким образом, методом главных компонент установлено, что высокий уровень сопряженной изменчивости характерен для размеров стеблевых листьев и генеративных органов. Диагностическими признаками, имеющими максимальные значения весовых коэффициентов при первой компоненте, являются параметры листьев срединной и верховой формации (x7-x12), а также, количество корзинок и длина соцветия (x15, x16). Важным параметром, характеризующим реакцию особей *Achillea millefolium* на действие антропогенных факторов, является количество щитков (x14).

Анализ сходства 11 популяций *A. millefolium* был проведен с помощью кластерного анализа по 14 морфологическим признакам (x4, x5, x7-16), имеющим диагностическое значение и выявленным в ходе проведения компонентного анализа. В обработке применялся метод Уорда. В качестве меры сходства использовалось Евклидово расстояние.

На дендрограмме (рисунок 5) отмечается разделение совокупности популяций на два кластера. Первый кластер образуют популяции Am4, Am9 и Am10, особи которых, несмотря на различные условия произрастания (пойменный и суходольный луга, обочина дороги в пределах города Красноярск), характеризуются крупными размерами осевых органов и листьев срединной формации. Следует отметить, что на данные местообитания в той или иной степени отмечено влияние деятельности человека (рекреационная нагрузка, захоронение отходов, свалка мусора). Второй кластер сформирован популяциями Am1-Am3, Am5- Am7, Am11, а наибольшее сходство обнаруживают Am3 и Am11, произрастающие в лесных фитоценозах. Обособленное положение на дендрограмме сходства занимает восточная популяция Am8, характеризующаяся очень крупными размерами осевых органов, листьев и количеством корзинок.

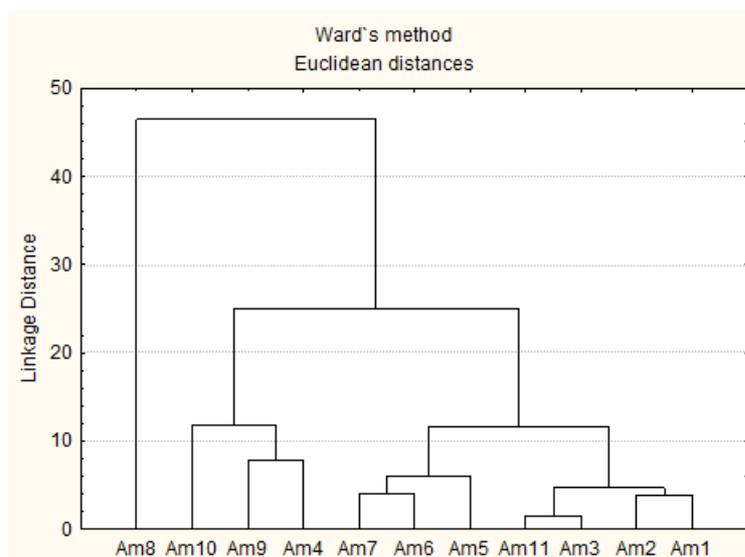


Рисунок 5 - Дендрограмма сходства ценопопуляций *Achillea millefolium*

Таким образом, проведенный биоморфологический анализ показал, что популяций тысячелистника обыкновенного, произрастающие на лугах с различным уровнем увлажнения, а также в антропогенно-нарушенных сообществах, не имеют четких морфологических отличий друг от друга. Более того, особи, произрастающие в нарушенных местообитаниях, характеризуются относительно крупными размерами вегетативных органов. Снижение проективного покрытия, урожайности, размеров растений зафиксировано для лесных фитоценозов. Особи восточносаянской популяции, взятые нами в качестве контроля, значительно превосходят растения красноярских популяций по изученным параметрам и, вероятно, относятся к другому подвиду.

3.5. Исследование состава *A. millefolium* с помощью химического анализа

В первой серии экспериментов исследовали наличие флавоноидов в водных экстрактах соцветий и листьев тысячелистника.

Наличие в исследуемых экстрактах фенольных соединений, на которые приходится основной вклад фармакологической активности, установлено с помощью качественных реакций, а именно, путем добавления к 10 мл исходного водного экстракта 0,5 мл 1% раствора железосамонийных квасцов. После добавления $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ к водным экстрактам наблюдалось изменение окраски с жёлтого до синего цвета разной интенсивности. Наибольшей интенсивностью синего цвета характеризовались водные экстракты образцов Am8 и Am1 (с. Зелеево и пос. Удачный соответственно), что может свидетельствовать о высоком содержании в них соединений фенольной природы. Наименьшей интенсивностью синего окрашивания характеризовались образцы Am9 и Am10. Также установлено, что для большинства рассмотренных образцов в листьях содержание фенольных соединений выше, чем в цветках.

При добавлении к 10 мл исходного водного экстракта 0,5 мл 5% водного раствора хлорида алюминия, исходный раствор изменял интенсивность окрашивания, однако, в связи с тем, что растворы имели изначально жёлто-коричневый оттенок, данная качественная реакция (соединения AlCl_3 с фенолами имеет жёлтый оттенок) не даёт достоверных результатов при органолептическом методе исследования.

Таблица 10 – интенсивность окрашивания водных растворов тысячелистника обыкновенного при добавлении 1% раствора железосамонийных квасцов

№ образца	Лист	Соцветие	Растение
Am1	синий	синий	синий
Am2	светло-синий	светло-синий	светло-синий
Am3	светло-синий	светло-голубой	светло-синий
Am4	голубой	голубой	голубой

Продолжение таблицы 10

№ образца	Лист	Соцветие	Растение
Am5	светло-синий	светло-синий	светло-синий
Am6	светло-синий	светло-синий	светло-синий
Am7	светло-синий	светло-синий	светло-синий
Am8	тёмно-синий	синий	тёмно-синий
Am9	светло-голубой	очень светло-голубой	светло-голубой
Am10	голубой	светло-голубой	голубой
Am11	светло-синий	голубой	светло-синий
Am12	-	-	голубой

3.6. Исследование состава *A. millefolium* с помощью УФ-спектроскопии

В данной работе наличие соединений фенольной природы определялось посредством оптических методов УФ-спектроскопии в УФ- и видимом диапазоне в диапазоне 200-500 нм. Из литературных источников известно, что для соединений фенольного ряда характерны максимумы поглощения в диапазоне 260-350 нм [55]. Для получения достоверных результатов, необходимо, чтобы оптическая плотность (D) измерялась в интервале от 0 до 2, поэтому, исходные водные экстракты были разведены в 20 раз. Возможность применения данного разведения при исследовании, наглядно показана на рисунке 6.

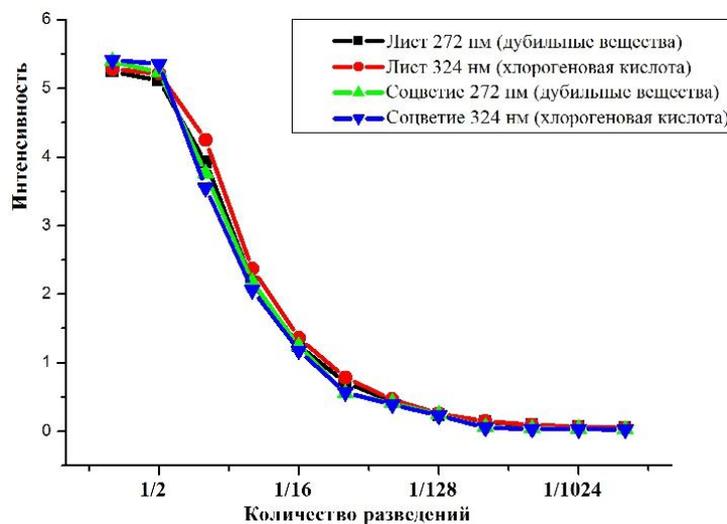
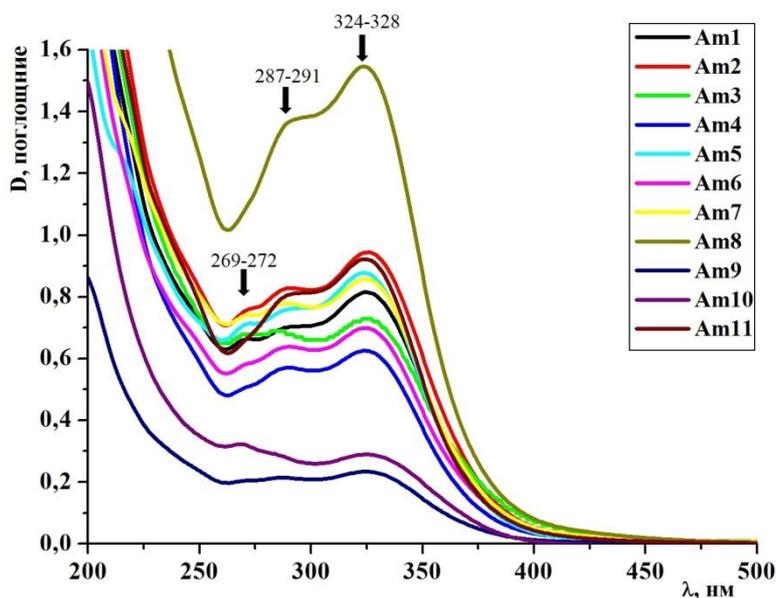


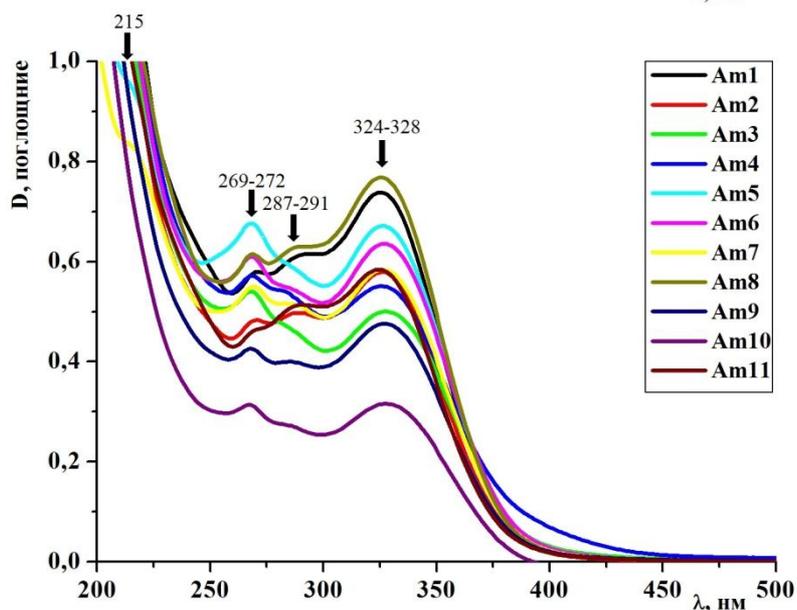
Рисунок 6 -Кривая титрования концентрации по закону Бугера-Ламберта-Бера

Установлено, что спектры водных экстрактов образцов (рисунок 7) характеризуются максимумом поглощения на длинах волн $\lambda_{\max} = 270-273$ нм и $\lambda_{\max} = 324-339$ нм. Полученные спектры характеризуются смещением максимума поглощения в пределах 1-2 нм, что связано с изменением содержания исследуемого вещества.

Образец Am12, приобретённый в аптеке представлял собой смесь из соцветий, листьев и стеблей тысячелистника обыкновенного. Потому для возможности сравнения собранных образцов и аптечного сырья была приготовлена эквивалентная смесь из образцов Am1-Am11 (рисунок 7 в).



б



В

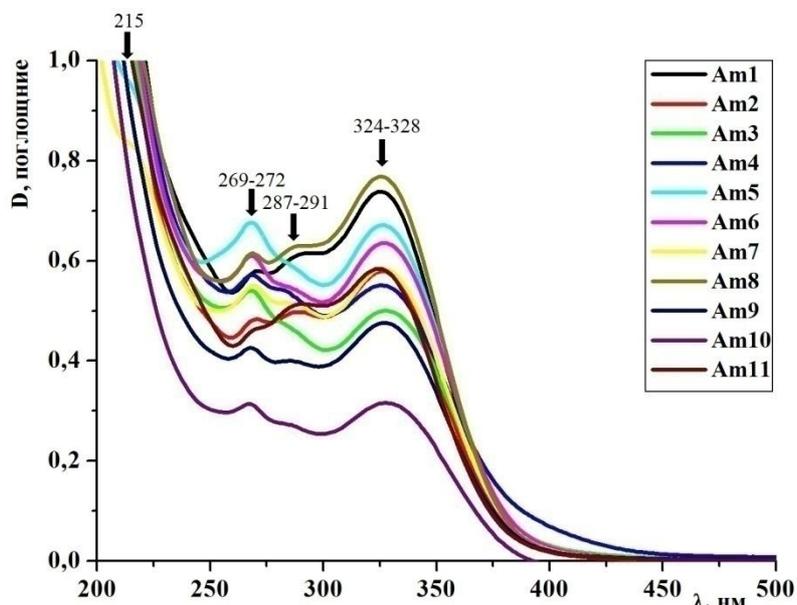


Рисунок 7 - УФ-спектры наземных частей тысячелистника обыкновенного
а - листья, б - соцветия, в – растение

Для полученных спектров установлено, что наибольшей оптической плотностью обладает образец Am8 (популяция, характеризующаяся крупными размерами вегетативных органов, и, видимо, относящаяся к другому подвиду). Наименьшие значения содержания фенольных веществ в листьях установлено для образцов Am9 и Am10 (D меньше 0,384). Для остальных образцов значение оптической плотности ($D = 0,922 - 0,628$) варьируется в нешироких пределах.

Максимальные значения D водных экстрактов соцветий наблюдается для образцов Am1, Am5, Am8 ($D = 0,768 - 0,671$). Минимальные - характерны для образцов Am9 и Am10, произрастающих в зонах с повышенной антропогенной нагрузкой, здесь значения оптической плотности не превышают 0,45.

Из анализа графиков эквивалентной смеси растения (рисунок 7 в) предполагается, что основной вклад в вид спектра вносит навеска листьев. В соответствии с этим, делается предположение, что основная фармакологическая ценность лекарственного сырья тысячелистника обыкновенного приходится на листья растения. Исключение составляют образцы с явным преобладанием значений D в водных экстрактах соцветий (Am1, Am5). Аптечный образец Am12 характеризуется значением D не превышающим 0,580.

В соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера, оптическая плотность (D) в УФ-спектрах изменяется в соответствии с концентрацией определяемых веществ:

$$\lg I_0/I = \epsilon c b \text{ или } D = \epsilon c l,$$

где ϵ – коэффициент экстинкции (л/(моль*см)), c – концентрация вещества (моль/л), l – толщина поглощающего слоя (см).

В соответствии с тем, что для одного и того же вещества при одинаковых условиях характерен один и тот же коэффициент экстинкции, можно установить, что образцы Am1 Am5, Am8 и Am11, характеризующиеся

высокими значениями D, имеют высокое содержание фенольных соединений. Спектры образцов Am9 и Am10 D имеет наименьшие значения, а значит, фармакологическое действие образцов из мкр-на Взлётка и деревни Плоское, менее эффективно (фармакологическое действие образцов определяется по количеству фенольных соединений в исследуемом объекте по отношению к лекарственному сырью). Концентрационное соотношение дубильных веществ и хлорогеновой кислоты, содержащихся в исследуемых образцах к аптечному сырью представлено в таблице 11. В работе принято считать, что высокое фармакологическое действие характеризуется при соотношении концентраций исследуемого сырья к аптечному в диапазоне от 1:1,5 и выше; низкое фармакологическое действие при значении соотношения концентраций от 1:0,7 и меньше.

Таблица 11 - Концентрационное соотношение дубильных веществ и хлорогеновой кислоты в эквивалентных смесях и аптечном сырье

№ популяции	Дубильные вещества	Хлорогеновая кислота
Am1	1:1,58	1:1,61
Am2	1:0,84	1:0,68
Am3	1:1,10	1:0,84
Am4	1:0,92	1:0,64
Am5	1:1,61	1:1,44
Am6	1:1,00	1:0,85
Am7	1:1,01	1:0,86
Am8	1:1,54	1:1,73
Am9	1:0,73	1:0,65
Am10	1:0,86	1:0,61
Am11	1:0,98	1:1,04
Am12	1:1	1:1

Методом УФ- и видимой спектроскопии были определены основные классы органических соединений и индивидуальные вещества, входящие в состав экстрактивных компонентов данного растения. Результаты показали наличие в экстрактах различных классов биологически активных соединений (таблица 12).

В ходе исследования установлено, что для всех образцов характерно содержание дубильных веществ и хлорогеновой кислоты. Так же, в большинстве образцов (Am2 - Am9) наблюдается высокое содержание флаволигнанов.

Таблица 12 - Химические вещества, обнаруженные в наземных частях тысячелистника обыкновенного методом UV-VIS-спектроскопии

№ образца		Вещество	Максимумы полос поглощения экстрактами УФ – и видимого диапазона, нм
лист	соцветие		
-	Am5, 7	транс-фируловая кислота, шафтозид	215
-	Am3, 9	галловая кислота	267
Am10, 12	Am4-8, 10	изокверцитин	269
Am10, 12	Am4-8, 10	коричная кислота, шафтозид, витамин К, ксантон	270
Am1-12	Am 1-11	дубильные вещества (катехины)	272
Am 6, 10	Am 7, 9, 10	скутеллярин	283-285
Am 3	Am 11	тофизолам	286
Am 3, 7-9	Am 2, 5, 6, 8	флаволигнаны	287-289
Am 4, 8, 11	Am 8	транс-кофейная кислота	290
Am 2, 5	Am 1	кверцетин	291
Am 12	Am 12	ксантон	316
Am 1-12	Am 1-11	хлорогеновая кислота	324-328

Для образцов Am 4-8, Am 10 характерно присутствие в следовых количествах коричной кислоты, шафтозида, витамина К и ксантона. Стоит учитывать, что метод УФ-спектроскопии позволяет обнаружить вещества, содержание которых в исследуемом растворе более 0,05М. Исходя из этого, можно предположить, что вещества, указанные в таблице 12 содержатся во всех исследуемых образцах при разведении 1:1. Однако, в некоторых образцах, их количество превышает 1 моль.

По значениям оптической плотности, полученным в ходе эксперимента, было определено содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин и абсолютно сухое сырье в процентах (таблица 13) по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{764,6 \cdot m \cdot 2 \cdot (100 - W)}$$

где D - оптическая плотность исследуемого раствора; 764,6 - удельный показатель поглощения комплекса кверцетина с алюминия хлоридом при 430 нм; m - масса сырья в граммах; W - потеря в массе при высушивании сырья в процентах [56].

Образец Am12 нельзя отнести к листьям или соцветиям, так как он представляет собой смесь указанных компонентов. В результате расчета было установлено, что содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин и абсолютно сухое сырье в процентах составляет 138,475 мг/г и 7,3% соответственно, что не противоречит данным из таблицы 11.

Таблица 13 - Содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин (302,236 г/моль) и абсолютно сухое сырье в процентах

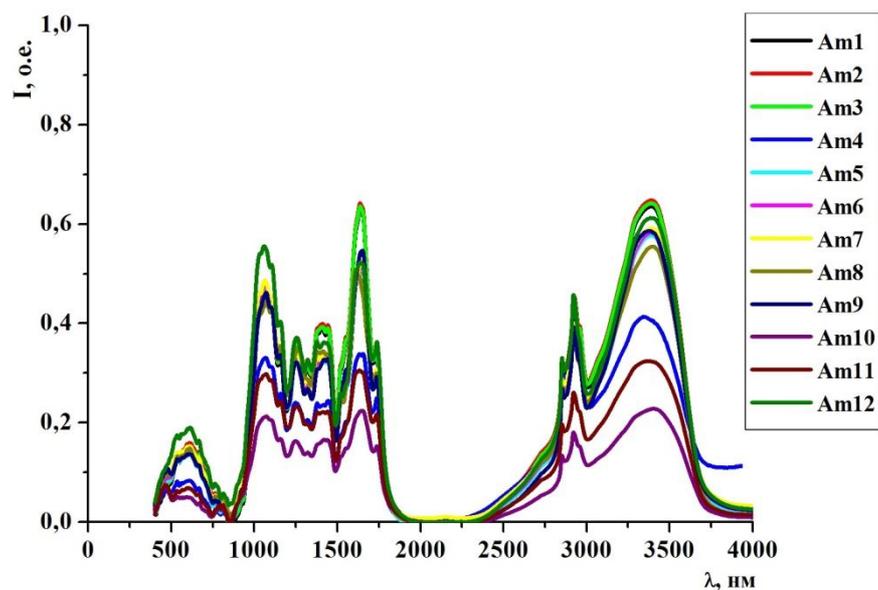
№ популяции	Лист		Соцветие	
	%	мг/г	%	мг/г
Am1	5,9	119,529	2,1	43,650
Am2	3,4	67,488	1,7	35,149
Am3	10,9	219,012	4,4	87,872
Am4	5,8	116,631	10,4	208,098
Am5	4,4	88,629	2,8	56,943
Am6	7,9	158,405	3,7	60,415
Am7	8,9	178,269	2,6	53,309
Am8	13,7	273,933	2,2	44,975
Am9	1,7	35,149	2,8	55,756
Am10	1,8	37,846	7,1	143,049
Am11	6,1	121,877	6,4	131,878

3.7. Исследование состава *A. millefolium* с помощью ИК-спектроскопии

Для исследования молекулярного строения компонентов лекарственного сырья, во второй серии экспериментов регистрировали ИК-спектры (рисунок 8). В ИК-спектрах при помощи литературных источников [29, 55] обнаружены характерные для растительного объекта полосы на частотах 1109, 1161, 1256, 1320, 1378, 1513, 2854, 2925, 3370 см^{-1} , что свидетельствует о колебаниях отдельных связей молекул целлюлозы, жиров, белков, углеводов, карбоксильных кислот, эфиров, фенолов, фуранов, фосфатных групп. Основные изменения в амплитуде ИК-спектров были установлены в диапазоне частот 500-2000 см^{-1} .

Анализ также показал, что для Am8 и Am10 происходит смещение валентных колебаний группы ОН ($\nu_{\text{ОН}}$) фенольных соединений, которые лежат в области частот 3390-3500 см^{-1} . Были обнаружены деформационные колебания С-ОН для Am10 (1073 см^{-1}), и деформационные колебания О-Н, N-H групп (1620 см^{-1}) для Am8, что говорит о снижении фармакологического действия исследуемого образца. Установлено, что образцы Am8 и Am10 содержат в себе MnO_4 (840-850 см^{-1}) и соединения ртути (1603 см^{-1}), которые, согласно ГОСТу 937616 [58], не должны содержаться в лекарственном сырье. Обнаруженные деформационные колебания ОН групп в образце Am2 (Академгородок) и смещение валентный колебаний группы ОН в образцах Am8 и Am10 (с.Зелеево и д. Плоское) говорят о присутствии незамещённой оксигруппы в молекулах флавонов, а так же флавонолов с замещённой С3-оксигруппой.

Во всех образцах присутствуют колебания ионов PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , фосфоринов, нитросоединений и неорганического HCO_3^- (таблица 14). Вероятно, данные ионы были получены растениями из почвы через корневую систему.



б

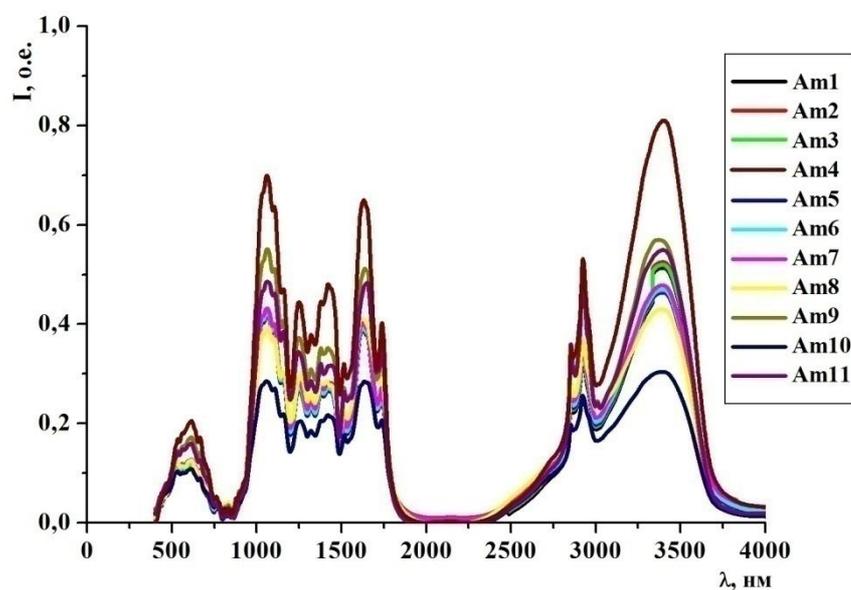


Рисунок 8 - ИК-спектры наземных частей тысячелистника обыкновенного, а – листья, б – соцветия

При расшифровке и анализе интенсивности колебаний в полученных ИК-спектрах (таблица 14), установлено, что концентрация загрязнителей выше в листьях, чем в соцветиях. Из этого следует, что листья тысячелистника поглощают газообразные загрязнения при дыхании.

Таблица 14 - Химические вещества, обнаруженные в наземных частях тысячелистника обыкновенного методом ИК-спектроскопии

№ образца		Структурные фрагменты	Максимумы полос поглощения экстрактами ИК-диапазона, см ⁻¹
Лист	Соцветие		
Am1-12	Am1-11	Фенолы монозамещённые	730-770
Am1-12	Am1-11	Фураны	740-800
Am 8, 9, 10	-	Деформационные колебания сульфогруппы	778
Am1-12	Am1-11	Фенолы 1,2,4-замещённые, 1,4-замещённые	830 (800-860)
Am8, 10	Am8, 10	MnO ₄	840-850
Am10	Am3, 4, 10	Фосфиты	875
Am1-12	Am1-11	Колебания С-О-С в сложных эфирах	1000-1300
Am5	Am5	Деформационные колебания С-ОН	1073
Am1-12	Am1-11	H ₂ PO ₄ , PO ₄ ³⁻ , HPO ₄ ²⁻	1100
Am1-12	Am1-11	Целлюлоза, жиры, белки, углеводы, карбоксильные кислоты, эфиры, фенолы, фосфатные группы	1109, 1161, 1256, 1320, 1378, 1513, 2854, 2925, 3370
Am1-12	Am1-11	Формиаты (НСOOR)	1180-1200
Am1-12	Am1-11	Оксиды фосфориноров (R ₃ P ⁺)	1197-1296 (1190)
Am1-12	Am1-10	Эфиры ароматических аминокислот	1250-1300
Am1-12	Am1-11	Нитросоединения	1320
Am1-12	Am1-11	Борные эфиры	1380
Am1-12	Am1-11	Неорганические HCO ₃ ⁻	1400-1420
Am9, 12	4, 9, 10, 11	Фосфины	1405-1440
Am1-12	Am1-11	Неорганические CO ₃ ²⁻	1410-1450
-	Am11	Амид II	1519
Am1-12	Am1-11	Пиридины и холины	1580-1650
Am8, 9, 10	-	Соединения ртути	1603
Am2	Am2	Деформационные колебания О-Н, N-Н	1620
Am1-12	Am1-11	Валентные колебания карбоксильной группы (С=О) в сложных эфирах	1732
Am1-12	Am1-11	Карбоксильные кислоты	1739
-	Am9, 11	Соли аминов (RNH ⁺)	3000
Am1-9, 10-12	Am1-11	Первичные и вторичные амины	3381
Am8, 10	-	Смещение валентных колебаний группы ОН	3390-3500

3.8. Определение токсичности с помощью биолюминесцентного анализа

В данной серии экспериментов для определения токсичности среды использовалось биотестирование при помощи биолюминесцентных тест-объектов на основе люциферазы [57].

Результаты оценки токсичности представлены на рисунках 9-10 и в таблице 15.

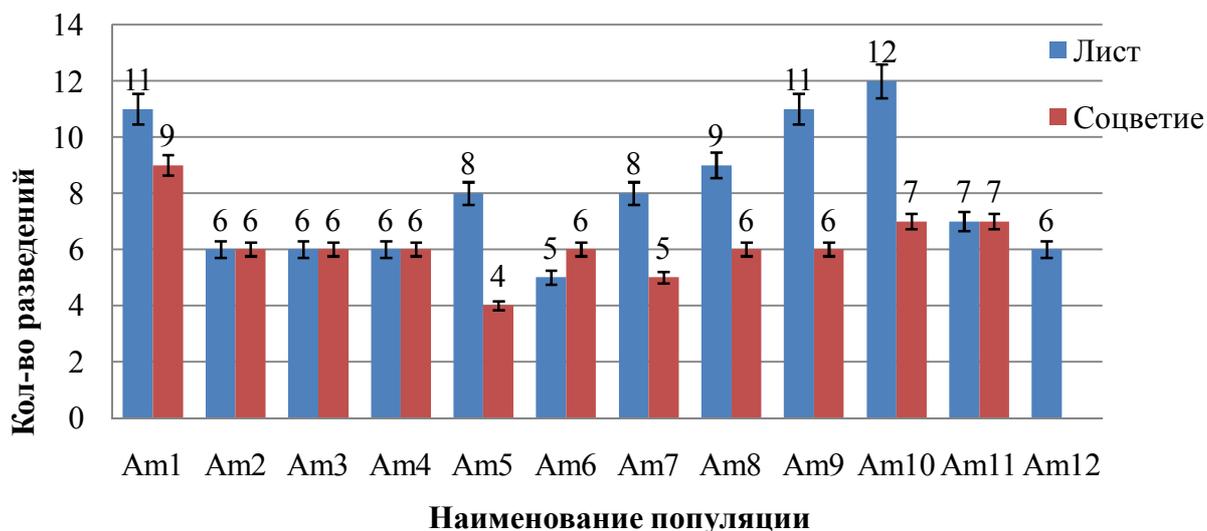


Рисунок 9 - Количество разведений, необходимых для установления степени токсичности водных экстрактов тысячелистника обыкновенного

В качестве контроля использовался аптечный образец ЗАО Фирма «Здоровье», обозначенный в работе, как Am12. Было установлено, что для растений тысячелистника обыкновенного характерно фоновое значение токсичности при количестве разведений, равных шести (рисунок 10).

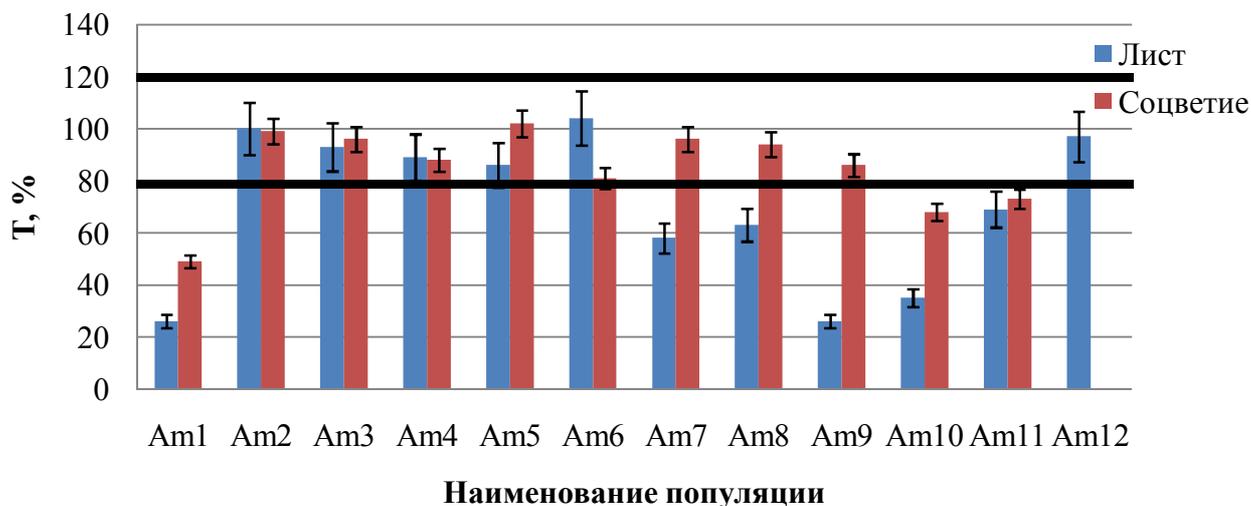


Рисунок 10 - Величина остаточного свечения в процентах при разведении в 6 раз

Установленное количество разведений водных проб для всех типов водных экстрактов позволяет классифицировать образец Am1 как токсичный, также, как и водные экстракты листьев образцов Am5, Am7, Am8, Am 9 и Am10. Водные экстракты остальных образцов среднетоксичны, что позволяет судить об относительной безопасности их использования в фармакологических целях.

Сравнение разведений для водных экстрактов показало, что листья содержат максимальное количество токсинов среди исследуемых образцов, а значит, более подвержены влиянию поллютантов по сравнению с соцветиями одного и того же растения. Из этого следует, что листья поглощают газообразные загрязнители вследствие наличия на их поверхности устьиц. Соцветия могут получить поллютанты через корневую систему растения. Таким образом, очевидно, что образец Am1 произрастал в почве, загрязнённой продуктами антропогенного загрязнения.

Также имеет место предположение, что пониженное значение количества токсинов в цветках по сравнению с их содержанием в листьях связано с толерантностью биферментной системы к тому классу поллютантов, которые присутствуют в образце. Либо какой-то из компонентов стимулирует светоизлучение бактерий, компенсируя тушение другими компонентами. Реакции тушения биолюминесценции (основным ферментом реакции которой является люцифераза) посредством присутствия в лекарственном сырье полезных для организма антиоксидантов исключается, исходя из предположения, что, биолюминесценция возникла как защитная реакция бактерий на кислород и имеет антиоксидантную природу [59, 60].

Таблица 15 - Количество разведений пробы для тест-объектов

Тип водного экстракта	№ пробы	Кол-во разведений, раз	I, отн.ед	Степень токсичности
Лист	Am1	11	89,6±21,9	токсично
	Am2	6	100,1±33,3	умеренно
	Am3	6	92,7±28,57	умеренно
	Am4	6	89,4±14,8	умеренно
	Am5	8	86,4±19,3	умеренно
	Am6	5	119,4±24,8	умеренно
	Am7	8	95,3±32,1	умеренно
	Am8	9	116,9±18,6	токсично
	Am9	11	84,7±26,8	токсично
	Am10	12	86,9±29,3	токсично
	Am11	7	118,3±33,4	умеренно
Соцветие	Am1	9	89,6±20,4	токсично
	Am2	6	99,6±18,3	умеренно
	Am3	6	95,6±19,6	умеренно
	Am4	6	88,4±32,9	умеренно
	Am5	4	114,8±37,2	умеренно

Продолжение таблицы 15

Тип водного экстракта	№ пробы	Кол-во разведений, раз	I, отн.ед	Степень токсичности
Соцветие	Am6	6	81,4±25,2	умеренно
	Am7	5	82,8±25,6	умеренно
	Am8	6	94,5±21,7	умеренно
	Am9	6	86,4±27,3	умеренно
	Am10	7	86,4±33,4	умеренно
	Am11	7	115,5±28,6	умеренно
Лекарственное сырье	Am12	6	96,5±31,2	умеренно

Таким образом, установлено, что химический состав проявляет меньшую устойчивость к антропогенным нагрузкам в листьях образцов *A. millefolium* по сравнению с соцветиями. Показано, что повышенная токсичность влияет на снижение содержания фармакологических компонентов.

Также было установлено, что по истечении трёхдневного срока хранения экстрактов (при комнатной температуре, холодильнике и морозильной камере) происходит их прокисание, что в несколько раз увеличивает степень тушения люциферазы и необходимо учитывать при исследовании растительного сырья.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ качества сырья тысячелистника обыкновенного показал, что относительной безопасностью характеризуется образцы Am3 – Am7, собранные в лесных (берёзовая роща Академгородка) и луговых фитоценозах (на левобережье реки Енисей за пос. Удачный) в г. Красноярске и его окрестностях. В таблице 16 представлены данные, полученные в ходе исследования растительного объекта биофизическими методами.

Таблица 16 – Сводная таблица

№ образца	Экологическая зона*	Фармакологическая активность**	Биоиндикатор***	Обнаруженные отклонения состава от нормы	Возможность применения
Am1	умеренное	высокая	токсично	—	нет
Am2	умеренное	умеренно	нетоксично	деформационные колебания ОН и NH	нет
Am3	низкое	умеренно	нетоксично	—	да
Am4	низкое	умеренно	нетоксично	—	да
Am5	низкое	высокая	умеренно	Деформационные колебания С-ОН	да
Am6	низкое	умеренно	нетоксично	—	да
Am7	низкое	умеренно	умеренно	—	да
Am8	умеренное	высокая	токсично	MnO ₄ , соединения Hg, смещение валентных колебаний ОН	нет
Am9	высокое	низкая	токсично	соли аминов, соединения Hg	нет
Am10	умеренное	низкая	токсично	MnO ₄ , соединения Hg, смещение валентных колебаний ОН	нет
Am11	низкое	умеренно	умеренно	повышенное содержание PO ₄ , амид II	да
Am12	низкое	эталон	эталон	—	да

* в соответствии с данными, приведёнными в источниках [46-48];
 ** в соответствии с таблицей 11;
 *** в соответствии с фоновым значением токсичности эталонного образца.

Обнаруженные деформационные колебания ОН групп в образце Am2 (Академгородок) Am8 и Am10 (с.Зелеево и Емельяново) говорят о невозможности применения данных образцов в фармакологических целях. Соединения ртути не должны присутствовать в образцах, а значит, образцы Am8-Am10 нельзя использовать как лекарственное сырьё. Образцы, собранные на о.Татышев близ реки Енисей не рекомендуется употреблять в больших количествах из-за повышенного содержания PO_4 .

В ходе проведённого эксперимента для наибольшего количества популяции обнаружена обратная зависимость биологической активности фармакологического состава (определяемой степенью содержания фенольных соединений в образцах) от интенсивности антропогенного воздействия.

В соответствии с данными морфологического анализа установлено, что популяции *A. millefolium*, произрастающие в зонах с различной степенью антропогенной нагрузки не имеют выраженных морфологических отличий. Таким образом, накопление токсичных веществ не влияет на габитус тысячелистника, что может быть связано с высокой антропогенной устойчивостью растения.

ВЫВОДЫ

1. Популяции *A. millefolium*, произрастающие в зонах с различной степенью антропогенной нагрузки, не имеют выраженных морфологических отличий. Таким образом, накопление токсичных веществ не влияет на габитус тысячелистника, что связано с его высокой антропогенной устойчивостью. Урожайность варьирует в разных местообитаниях от 49 до 267 г/м².

2. Для большинства изученных популяций обнаружена обратная зависимость биологической активности фармакологического состава образцов *Achillea millefolium* от интенсивности антропогенного воздействия.

3. Методом ИК-спектроскопии и биотестирования установлено, что химический состав проявляет меньшую устойчивость к антропогенным нагрузкам в листьях образцов *Achillea millefolium*.

4. Методом биотестирования установлено, что повышенная токсичность сырья тысячелистника влияет на содержание фармакологических компонентов. Повышенный уровень токсичности отмечен для популяций, произрастающих в окрестностях посёлков Удачный, Зелёное, Плоское, а так же мкр-не Взлётка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афанасьев К.С. Род тысячелистник *Achillea L.* / К.С. Афанасьев // Флора СССР. - М.-Л., 1961. Т. 24.
2. Лекарственное растительное сырьё. М.: Издательство стандартов, 1980. – С. 143-148.
3. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование: семейство Asteraceae. – Л., 1993. – 350 с.
4. Ушанова В.М. Исследование влияния компонентов лекарственного растительного сырья на состав получаемых экстрактов. / В.М. Ушанова // Химия растительного сырья. – 2001. № 3. – С. 105–110.
5. Каден Н. Н. Этимологический словарь латинских названий растений, встречающихся в окрестностях агробиостанции МГУ «Чашниково». / Н. Н. Каден, Н. Н. Терентьева. — М.: Изд-во МГУ, 1975. — 205 с.
6. Ревердатто В. В. Флора Красноярского края: к изучению дисциплины. / В. В. Ревердатто. – Новосибирск, Наука, 1967. - 126 с.
7. Кашина Л. И. Флора Сибири. / Л. И. Кашина, И. М. Красноборов, Д. Н. Шауло. - Новосибирск, «Наука». Сибирское отделение. 1988 - 2003. 3500 стр. с ил.
8. Библиотека "Жизнь растений" [Электронный ресурс] URL: <http://plant.geoman.ru> (дата обращения 20.10.2015).
9. Турова А.Д. Лекарственные растения СССР и их применение. / А.Д. Турова, Э.Н. Сапожникова. - М.: «Медицина», 1984. Т.86. – 304с.
10. Блинова К. Ф. Ботанико-фармакогностический словарь: Справ. Пособие / Под ред. К. Ф. Блиновой, Г. П. Яковлева. — М.: Высш. шк., 1990. — С. 248—249.
11. Махлаюк В. П. Лекарственные растения в народной медицине. / В. П. Махлаюк. – Нива России, 1992. – 478 с.
12. Муравьева Д. А. Возможности заготовок лекарственного растительного сырья в Ставропольском крае. / Д. А. Муравьева, Р. М. Середин, Е. К. Денисова, А. Д. Даукша, Д. А. Бочарова, Е. З. Асоева, М. А. Цоколаева, Т. П. Куликова // Ресурсы дикорастущих лекарственных растений СССР. – Л.: «Наука», 1968.
13. Инструкция по сбору и сушке сырья тысячелистника обыкновенного// Методические рекомендации и указания по организации, учету и планированию аптечного дела. – М.: Изд. Всес. конъюнктурно-информ. бюро Минздрава СССР, 1972. Вып. 6. – 30 с.
14. Кучеров Е. В. Дикорастущие лекарственные растения в районах южного Урала и перспективы их использования. / Е.В. Кучеров, И.Б. Гуфранова // Дикорастущие и интродуцируемые полезные растения в Башкирии. – Казань: изд-во Казанск. ун-та, 1968. Вып. 2. – 206 с.
15. Сапожников, А.В. Анализ химический или аналитическая химия / А.В. Сапожников // Большая советская энциклопедия. - М.: Советская энциклопедия, 1926. Т. 2. – С. 592.

16. Рубин А. Б. Биофизика (учебник) / А.Б. Рубин // Теоретическая биофизика: Учебник для вузов — М., 2002. Т.1.:— 448 с., ил.
17. Bulich A.A Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity / A.A. Bulich, D.Z. Isenberg // Instrum. Soc. Am. Trans., 1981. - V.20, N1. - P. 29-33.
18. Кратасюк В.А. Использование светящихся бактерий в биолюминесцентном анализе / В.А. Кратасюк, И.И. Гительзон // Успехи микробиологии, 1987 - N21 - С. 3-30.
19. Гительзон И.И. Светящиеся бактерии / И.И. Гительзон, Э.К. Родичева, С.Е. Медведева и др. – Новосибирск: Наука, 1984.- 298 с.
20. Kratasyuk V.A. Polymer Immobilized Bioluminescent System for Biosensor and Bioinvestigations / V.A. Kratasyuk, E.N. Esimbekova // PBM Series – 2003.- V.1 - P 307-341.
21. Ревазова Ю.А. Методические рекомендации 01.020-07 Определение токсичности воздушной среды с помощью биотеста «Эколюм» / Ревазова Ю.А., Хрипач Л.В., Данилов В.С., Князев Т.А., Брагина И.В., Ластенко Н.С., Федосеева Т.А. – М., 2007. – 15с.
22. Ярошенко, П.Д. Геоботаника / П.Д. Ярошенко. – М.–Л., 1961. – 474 с.
23. Кудряшева Н.С. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа / Н.С. Кудряшева, В.А. Кратасюк, Е.Н. Есимбекова// Учебное пособие, - Красноярск: Изд-во КрасГУ, 2002. - 154 с.
24. Кратасюк В.А. Бактериальная биолюминесценция и биолюминесцентный анализ / В.А. Кратасюк, И.И. Гительзон // Биофизика.- 1982. Т. 27.- 6. – С. 937 - 953.
25. Кудряшева Н.С. Действие солей металлов на бактериальные биолюминесцентные системы различной сложности / Н.С. Кудряшева, Е.В. Зюзикова, Т.В. Гутник, А.М. Кузнецов // Биофизика. – 1996. - Т. 41. – 6. - С. 1264 - 1269.
26. Дормидонтов Ю.П. Методы УФ, ИК и ЯМР спектроскопии и их применение в органической химии. / Ю.П. Дормидонтов // Учебное пособие. — Пермь: ПГУ химический факультет, 2001. - 79 с.
27. Химическая энциклопедия: А-Дарзана / Кнунянц И. Л. и др. - М.: Сов. энцикл., 1988. Т. 1. - 623 с.: ил.
28. Смит А. Прикладная ИК-спектроскопия: основы, техника, аналитическое применение / Пер. с англ. Б. Н. Тарасевича, под ред. А. А. Мальцева // - М.: Мир, 1982. — 328 с.
29. Larkin P.J. Infrared and raman spectroscopy: principles and spectral interpretation / P.J. Larkin // Elsevier , 2011. — 230 p. — ISBN 978-0-12-386984-5.
30. Lindon J. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry — 2nd Ed. /J. Lindon // Academic Press, 2010. — 3312 p.

31. Сайт фирмы ООО «Промэнерголаб» - Лабораторно оборудование и приборы. [Электронный ресурс] URL: <http://www.czl.ru> (дата обращения 20.10.2015).
32. Сайт компании Компания INTERTECH Corporation [Электронный ресурс] URL: <http://www.intertech-corp.ru> (дата обращения 20.10.2015).
33. Harper, J.L. Population biology of plant / J.L. Harper// Acad. Press, 1977. – 856 p
34. Дюрягина, Г.П. К методике интродукции редких и исчезающих растений / Г.П. Дюрягина // Ботан. журн. – 1982. – Т.67, №5. – С.679–687.
35. Денисова, Л.В. Состояние популяций рябчика русского в различных частях ареала в связи с проблемой его охраны / Л.В. Денисова, Л.Б. Заугольнова, С.В. Никитина // Популяционные исследования растений в заповедниках. – М: Наука, 1989. – С.9–18.
36. Заугольнова, Л.Б. Типы функционирования популяций редких видов растений / Л.Б. Заугольнова, С.В. Никитина, Л.В. Денисова // Бюллетень МОИП. – 1992. – Т. 97, вып. 3. – С.80–91.
37. Злобин, Ю.А. Принципы и методы изучения ценологических популяций растений: учеб.–метод. пособие / Ю.А. Злобин.– Казань: Изд-во Казан, ун-та, 1989. – 146 с.
38. Злобин, Ю.А. Популяционная экология растений: современное состояние, точки роста / Ю.А. Злобин. – Сумы: Университетская книга, 2009. – 263 с.
39. Миркин, Б.М. Теоретические основы современной фитоценологии / Б.М. Миркин. – М: Наука, 1985. – 136 с.
40. Уранов, А.А. Ценопопуляции растений (развитие и взаимоотношения) / А.А. Уранов, Л.Б. Заугольнова, О.В. Смирнова и др.. – М: Наука, 1977. – 131 с.
41. Кричфалуший, В.В. Биология редких видов растений / В.В. Кричфалуший, В.И. Комендар. – Львов: Свит, 1990. – 160 с.
42. Шмидт, В.М. Математические методы в ботанике. / В.М. Шмидт // - Л.: Изд-во ЛГУ, 1984.- 288 с.
43. Строкова, О.М. Корреляционный анализ вегетативных признаков в популяциях терескена серого / О.М. Строкова // Ботанические исследования в Сибири. – Красноярск, 1998. – Вып.6. – С.106–111.
44. Ростова, Н.С. Структура и изменчивость корреляций морфологических признаков цветковых растений: дис...докт. биол. наук: 03.00.05 / Ростова Наталья Семеновна. – СПб, 2000. – 388 с.
45. Горбань, А.Н. О механизме повышения корреляций между физиологическими параметрами при увеличении адаптационного напряжения / А.Н. Горбань, В.Т. Манчук, А.В. Перфильева, Е.В. Смирнова, Е.П. Чеусова // Сибирский экологический журнал. – 2001. – № 5. — С. 651–655.
46. Лысенко Ю. Ф. Атлас Красноярского края и республики Хакасии. / Ю. Ф. Лысенко // Новосибирск: Роскартография, 1994. -20 с.

47. Швер Ц.А. Климат Красноярска. / Ц.А. Швер, А. С.Герасимова // Гидрометеоздат, 1982. - 231 с. ил.
48. Электронный научный журнал «Современные проблемы науки и образования» ISSN 2070-7428 «Перечень» ВАК. [Электронный ресурс] URL: <http://www.science-education.ru> (дата обращения 15.10.2015).
49. Жизнь города. Жить в экологически чистом районе [Электронный ресурс] URL: <http://sibian.ru/publication/60> (дата обращения 23.03.2016).
50. Интернет издание. [Электронный ресурс] URL: <http://greenologia.ru> (дата обращения 02.05.2016).
51. Информационный портал X-LIBRI. [Электронный ресурс] URL: <http://www.x-libri.ru> (дата обращения 04.11.2015)
52. Сорокина Г.А. Учебная полевая практика по геоботанике: учебно-методическое пособие / Г.А. Сорокина, Н.В. Пахарькова, Т.Л. Шашкова, М.А. Субботин // – Красноярск: СФУ, 2012. – 30 с.
53. Benedek B. *Achillea millefolium* L. s.l. revisited: Recent findings confirm the traditional use / B. Benedek, V. Kopp // - Wien Med Wochenschr (157/13-14). 2007. 312-314 p.
54. ГОСТ 24027.2-80. Сырьё лекарственное растительное. Методы определения влажности, содержания золы, экстрактивных и дубильных веществ, эфирного масла. 06.03.1980.
55. Блажей А.Фенольные соединения растительного происхождения. / А. Блажей, Л. Шутый // - М. Мир, 1977. 240 с.
56. Колесник И.В. Инфракрасная спектроскопия: Методическая разработка. / И.В. Колесник, Н.А. Саполетова // Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова факультет наук о материалах, 2011. – М. 88 с.
57. Кратасюк В.А. Люциферазное биотестирование: биофизические основы, методы и применение: Дис. ... док. биолог. наук / В.А. Кратасюк – Красноярск, 1994. - 377 с
58. Некоммерческий научно-практический информационный ресурс юридической фирмы "Интернет и Право" [Электронный ресурс] URL: <http://www.internet-law.ru> (дата обращения 24.03.2016).
59. Кацев А.М.. Ферментативная активность светящихся бактерий черного и азовского морей и их антиоксидантная защита / А.М. Кацев // - Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского Серия «Биология, химия». Том 27 (66). 2014. № 3. С. 184-193.
60. Marcelo P. Barros. Daily variations of antioxidant enzyme and luciferase activities in the luminescent click-beetle *Pyrearinus termitilluminans*: cooperation against oxygen toxicity. / Marcelo P. Barros, Etelvino J.H. Bechara // Insect Biochemistry and Molecular Biology V. 31, 2001, p. 393–400.