

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт
Водных и наземных экосистем
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

подпись инициалы, фамилия

«_____» _____ 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - биология

код – наименование направления

Изучение межпопуляционной изменчивости содержания флавоноидов в
листьях тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.)

тема

Руководитель _____
подпись, дата

проф. д-р б.н.
должность, ученая степень

Н.А. Гаевский
инициалы, фамилия

Выпускник _____
подпись, дата

М. А. Забродина
инициалы, фамилия

Красноярск 2017

Оглавление

Введение.....	4
1. Обзор литературы	5
1.1 Экологические особенности тысячелистника обыкновенного (<i>Achillea millefolium</i> L).....	6
1.2 Химический состав тысячелистника обыкновенного. Применение в медицине	9
1.3. Заготовка лекарственного сырья	14
1.4.Флавоноиды	15
1.5.Методы извлечения и изучения флавоноидов лекарственных растений..	17
2. Объекты и методы исследования	20
2.1 Экстракция растительного сырья	20
2.2 Спектрофотометрический анализ водно-спиртовых экстрактов <i>Achillea millefolium</i> L. с добавлением с $AlCl_3$	21
2.3 УФ - спектрофотометрический анализ водно-спиртовых экстрактов <i>Achillea millefolium</i> L.....	21
2.4 Анализ водно-спиртовых экстрактов листьев <i>Achillea millefolium</i> L. методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	22
3. Результаты и их обсуждение	Ошибка! Закладка не определена.
3.1 Качественный и количественный анализ водно-спиртовых экстрактов <i>Achillea millefolium</i> L. спектрофотометрическим методом с добавлением с $AlCl_3$	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Качественный и количественный анализ водно-спиртовых экстрактов листьев <i>Achillea millefolium</i> L. спектрофотометрическим методом в УФ- и видимой областях.....	Ошибка! Закладка не определена.

3.3 Качественный и количественный анализ водно-спиртовых экстрактов листьев <i>Achillea millefolium</i> L. методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	Ошибка! Закладка не определена.
Заключение	23
Список литературы	24
ПРИЛОЖЕНИЕ А	28
Результаты спектрометрирования спиртовых экстрактов тысячелистника обыкновенного (<i>Achillea millefolium</i>)	28
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	29
ПРИЛОЖЕНИЕ В	30
Концентрация хлорофилла в листьях <i>Achillea millefolium</i> L.	30
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	31
Графическое отображение результатов ВЭЖХ водно-спиртовых экстрактов <i>Achillea millefolium</i> L.	31

Введение

Тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium* L.) хорошо известен своими лекарственными свойствами и применяется в народной и официальной медицине. Растение обладает широким спектром действия, его применяют как противовоспалительное, ранозаживляющее, спазмолитическое средство (Покровская и др., 2009).

Тысячелистник не является прихотливым, в природе растение произрастает на открытой местности, в светлых лесах. Тысячелистник встречается по всей России, Средней Азии и на Дальнем Востоке. Растение предпочитает расти на опушках, полянах в лесу, по обочинам дорог. Тысячелистник растет в садах, населенных пунктах, в парках на освещенных и чистых от сорняков местах (Головкин и др., 1986).

Тысячелистник обыкновенный обладает богатым химическим составом, рассматривается как перспективный источник физиологически активных веществ, таких как антоцианидины, флавоноиды и сесквитерпеновые лактоны - азулены (Покровская и др., 2009).

Целью данной работы является изучение межпопуляционной изменчивости содержания флавоноидов в листьях тысячелистника обыкновенного под действием различных абиотических факторов.

В задачу исследования входило:

1. Сбор и подготовка растительного материала;
2. Определение содержания флавоноидов в листьях *Achillea millefolium* L методами спектрофотометрии с добавлением $AlCl_3$, УФ-спектрометрии и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Выражаю благодарность ассистенту кафедры биофизики Гульнову Дмитрию Валерьевичу за помощь проведения УФ-спектрометрического анализа, а также Ефремова Александра Алексеевича за помощь в проведении высокоэффективной жидкостной хроматографии.

1. Обзор литературы

Тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium* L.) занимает важное место в практической жизни человека, как лекарственное растение и, как часть декора растительного ландшафта. Как декоративное растение тысячелистник стал прародителем множества декоративных сортов для сада, которые отличаются выносливостью и яркими окрасами, которые украсят любой цветник.

Характеристики тысячелистника обыкновенного:

1. обладает сильным ароматом и небольшой горечью;
2. цветет с июня по сентябрь, период цветения зависит от вида;
3. для употребления и лечения используются цветки и листья;
4. является универсальным средством при многих заболеваниях.

Самый распространенный в природе вид — тысячелистник обыкновенный. Разрастаясь, он образует пышные объемные заросли высотой до 70 см, состоящие из тонких плотных стеблей, густо покрытых листьями. В природе встречается на сухих лугах, опушках лесов, по межам и краям дорог. Окраска цветка у тысячелистников очень разнообразна — от белой, как у дикорастущего вида, до красной, фиолетовой, малиновой, бордовой как у культурных видов. В настоящее время выращивают в основном садовые, ярко окрашенные формы тысячелистника. Тысячелистники эффектно и разнообразно используются в современном садовом дизайне. Благодаря широкому выбору сортов и окрасов, неприхотливости растения и его хорошей сочетаемости со многими традиционными садовыми растениями, тысячелистнику найдется применение практически в любом уголке сада. Посаженные группой тысячелистники создают в цветнике структурирующую горизонтальную линию, а посаженные вразбивку — отличное дополнение к цветочной композиции в естественном и садовом ландшафте. Засухоустойчивость тысячелистника благоприятствует использованию его в

рокарии. Тысячелистники легко поддаются натурализации в луговой зоне сада. (Головкин и др., 1986)

Тысячелистник обыкновенный (*A. millefolium* L) используется в различных сферах (медицине, кулинарии, косметологи), что также свидетельствует о важности этого растения в жизни человека.

Вся надземная масса тысячелистника обладает пряным ненавязчивым запахом и терпким, пряным, горьковатым вкусом, поэтому растение входит в состав горьких настоек и ликеров. Тысячелистник используют в кулинарии, как приправу (Кузнецова, 1987).

Тысячелистник используют в косметологии, так как он является прекрасным средством для кожи лица и тела, тонизирует, укрепляет и дезинфицирует. На его основе изготавливают различные маски, отвары, настои, компрессы и т. д. Растение помогает устранить аллергические реакции на лице, избавляет от угревой сыпи (Ягодка, 1991; Kazemi, 2015).

1.1 Экологические особенности тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L)

В результате антропогенного воздействия в атмосферу попадают тяжелые металлы в составе газообразных выделений и дымов, а также в виде техногенной пыли. С осадками тяжелые металлы попадают в почву, которая обладает способностью удерживать положительно заряженные ионы тяжелых металлов. Развитие промышленности и автотранспорта обостряет проблему загрязнения растений тяжелыми металлами, так как почва является не единственным источником поступления их в растения. Тяжелые металлы могут поступать в растения непосредственно из атмосферы. Следует отметить, что содержание тяжелых металлов зависит от содержания гумуса и рН почвы. Например, в почве, где рН 6.5 происходит накопление свинца и кадмия в растениях, но в почвах с рН равной 8 накопления этих металлов не происходит. Это можно объяснить тем, что свинец и кадмий при подкислении среды переходят в подвижные формы доступные для растений,

а при высоких значениях рН они закрепляются в почве химически (Семенова, 2014).

Загрязнение окружающей среды приводит к изменению анатомо-морфологических особенностей тысячелистника обыкновенного. В техногенных зонах под действием токсических веществ нередко нарушается целостность кутикулярного покрова листа, расширяются его поры и водные каналы, что приводит к усилению внеустьичной транспирации и увяданию, затем иссушению листа. Недостаток влаги приводит к повышению чувствительности растений к действию токсичных загрязнителей и возрастанию уровня окислительного стресса. Сравнение анатомо-морфологических особенностей тысячелистника произрастающего в естественных местах обитания и промышленной зоне, позволило выявить некоторые особенности. Тысячелистник промышленной зоны отличается от растения естественного местообитания тем, что высота стебля несколько уменьшается, а также количество листьев тысячелистника промышленной зоны больше, но длина и ширина листовой пластинки уменьшается, что может свидетельствовать о процессах ксерофитизации и снижении ассимиляционных процессов. Можно отметить увеличение толщины листа и кутикулярного слоя, размеров клеток мезофилла, по сравнению с тысячелистником естественных мест обитания. Еще одна особенность растений техногенной зоны – повышение репродуктивности, увеличение числа цветков и плодов с одновременным снижением массы семян. (Немерешина и др., 2014)

Антропогенное воздействие на некоторые места произрастания тысячелистника, делает его не пригодным для использования в фармакологических целях. Одним из путей поступления тяжелых металлов в организм человека являются лекарственные растения, служащие сырьем для производства лекарственных средств (Егорова и др., 2009). Известно, что тысячелистник может накапливать тяжелые металлы (кобальт, медь, марганец, цинк, железо, свинец, кадмий, никель, ртуть), поэтому его сбор

необходимо производить в местах с минимальной антропогенной нагрузкой. Вследствие этого анализ растительного сырья является важным этапом в производстве лекарственных препаратов. Изходя из этого провели исследование влияния поллютантов на химический состав и содержимое биологически активных веществ тысячелистника обыкновенного методом ИК- и УФ-спектроскопии. Для исследования химического состава взяли тысячелистник обыкновенный (надземная часть), произрастающий в местах с различной антропогенной нагрузкой. В результате работы было установлено, что химический состав образцов *A. millefolium* чувствителен к антропогенному воздействию, что важно учитывать при изготовлении из него различных фармакологических препаратов (Оленева и др., 2013).

Микроэлементы и макроэлементы действуют по-разному на рост и развитие растений, а также влияют на содержание эфирного масла и состав летучих фракций. В теплице при естественном освещении, культивировали тысячелистник обыкновенный в гидропонных условиях с дефицитом макро- и микроэлементов. Микроэлементы и макроэлементы действуют по-разному на рост и развитие растений, а также влияют на содержание эфирного масла и состав летучих фракций. В теплице при естественном освещении, культивировали тысячелистник обыкновенный в гидропонных условиях с дефицитом макро- и микроэлементов. Питательный раствор содержал все элементы, либо один из элементов находился в дефиците (N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, B, Zn, V, Mo или Cu). Выявлено, что отсутствие P, S, B и Mn способствовало увеличению содержания эфирных масел. Кальций оказывает большее влияние на рост *A. millefolium* L, чем другие элементы. Основные компоненты летучих фракций чувствительны к дефициту макро- и микроэлементов (Caldeira и др., 2015).

1.2 Химический состав тысячелистника обыкновенного.

Применение в медицине

В траве тысячелистника содержится около 0,25–0,8% (иногда до 1,4%) эфирного масла, количество которого зависит от периода вегетации растения: в раннем периоде вегетации его содержание составляет 0,13%, во время цветения — 0,34%. В состав эфирного масла входят сесквитерпеноиды: ахиллин, ацетилбалхинолид, кариофиллен, проазулен; монотерпеноиды: камфора, туйол, цинеол, пинен, борнеол. Кроме того, в траве тысячелистника обыкновенного обнаружены алкалоид ахилеин, флавоноиды, в том числе флавоновые гликозиды, апигенин и лютеолин; дубильные вещества, горькое соединение ахилеин, витамины К, С, А; амины: холин, стахидрин; сложные эфиры, кариофиллен, муравьиная, уксусная и изовалериановая кислоты (Юсубов и др., 2000).

Трава тысячелистника обладает гемостатическими (кровоостанавливающими) и противовоспалительными свойствами (Лесиовская и др., 2003; Носов, 2003). В современной медицине препараты, из надземной части тысячелистника обыкновенного применяют как кровоостанавливающее средство при местных кровотечениях (носовых, зубных, из мелких ран; при легочных, фибромиомах, воспалительных процессах). Используют при заболеваниях желудочно-кишечного тракта таких как: колит, язвенные болезни; рекомендуют также при воспалении мочевыводящих путей (Самылиной и др., 1999; Куцики др., 2002; Teixeira Rosangela de Oliveira и др., 2003).

Кровоостанавливающее действие травы тысячелистника напоминает участие ионов кальция в процессе свертывания крови. Кровоостанавливающая активность растения связана с содержанием в нем витамина К. Кровоостанавливающие свойства проявляют также α -филохинон и алкалоид ахилеин. Однако окончательно механизм гемостатического действия тысячелистника не выяснен, так как его препараты никогда не

приводят к образованию тромбов. Влияние фитопрепаратов тысячелистника на процесс гемокоагуляции выражен умеренно и проявляется лишь при продолжительном применении — как при наружном, так и внутреннем (Турова, 1974).

Горечи (сесквитерпеновые лактоны и ахилеин) раздражают окончания вкусовых нервов, возбуждают аппетит и усиливают секрецию желудочного и других пищеварительных соков. При этом повышается желчеотделение и внешнесекреторная функция поджелудочной железы, нормализуется моторика желудочно-кишечного тракта, уменьшается метеоризм. Желчегонные свойства лекарственных средств из тысячелистника вызваны также содержанием ненасыщенных жирных кислот, стеролов и тритерпеновых гликозидов.

Вторичные метаболиты растений семейства *Asteraceae* обладают антиоксидантной активностью. Антиоксидантные соединения могут быть выделены из различных частей растений (цветы, листья), они оказывают благотворное влияние на поддержание здоровья и профилактики заболеваний (Sílvia и др., 2015).

Следует сказать, что лекарственные препараты на основе тысячелистника обладают некоторым токсическим действием, поэтому при употреблении его внутрь необходимо соблюдать определённую осторожность и избегать передозировок, особенно при долгом применении. У некоторых пациентов продолжительное применение препаратов на основе тысячелистника может вызывать побочные явления в виде головокружений, появлению кожной сыпи, и тошноты. Отвары травы при длительном употреблении могут вызвать изжогу, особенно к этому склоны те люди, которые имеют повышенную кислотность желудка. В таких случаях применение препаратов следует прекратить. Имеются следующие противопоказания к применению препаратов из тысячелистника обыкновенного, не следует его принимать при: беременности, повышенной

свёртываемости крови, при тромбозе, детям до 6 лет и соответственно при индивидуальной непереносимости. (Кузнецова, 1987)

Флавоноиды и эфирное масло тысячелистника оказывают спазмолитическое действие на гладкие мышцы кишечника, мочевыводящие и желчевыводящие пути. Они расширяют желчные протоки, а также повышают диурез и могут притуплять боль, обусловленную спазмами кишечника.

Дубильные вещества, цинеол и азулены обуславливают противовоспалительные, бактерицидные, противоаллергические и ранозаживляющие свойства тысячелистника.

Эфирное масло тысячелистника проявляет антибактериальную и противогрибковую активность. Оно угнетает рост бактерий устойчивых к действию антибиотиков. Было установлено, что настои из травы тысячелистника обыкновенного проявляют слабое противомикробное действие в отношении протей, сальмонелл брюшного тифа и паратифа. Экстракт травы и сок тысячелистника обыкновенного обладают бактериостатическим эффектом в отношении золотистого и эпидермального стафилококка, негемолитического стрептококка (Турова, 1974).

Для хемотаксономии тысячелистника обыкновенного наиболее подходящими соединениями являются сесквитерпеноиды, так как использование всего набора соединений, содержащихся в растении, в качестве хемотаксономических маркеров не имеет смысла. Потому что, суммарный состав эфирных масел по веществам весьма непостоянен, особенно это касается минорных компонентов. Использование же для этой цели нелетучих веществ растения весьма затруднительно в экспериментальном исполнении. В то же время из всего набора терпеноидов эфирных масел для целей хемотаксонометрии, следует исключить монотерпеноиды ввиду их высокой летучести, так как произойдет большая потеря последних при сушке и пробоподготовке. Для исследования хемотаксономии тысячелистника авторы статьи используют растения, собранные из разных регионов России. Установлено, что химический состав

эфирных масел из образцов соцветий тысячелистника обыкновенного (*A. millefolium* L.), собранных в различных регионах России, содержит в себе сесквитерпеноиды, кариофиллен, гермакрен и хамазулен, которые собственно и являются хемотаксономическими признаками этого растения. Считается, что постоянными компонентами во всех случаях являются кариофиллен, гермакрен и хамазулен, которые можно рассматривать в качестве хемотаксономических признаков растения *A. millefolium* L. Эфирные масла сложноцветных, в частности, таких как тысячелистники (*Achilea* sp.), полыни (*Artemisia* sp.), ромашки (*Chamomilla* sp.), пижма (*Tanacetum* sp.) и др., представлены богатым набором соединений, главным образом терпеноидами (монотерпенами и сесквитерпенами в наибольшей степени) (Покровская и др., 2009).

Калинкина Г.И. и соавторы [8, с. 13] провели исследования сравнительного химического состава эфирных масел трех близких видов тысячелистников: обыкновенного (*A. millefolium* L.), азиатского (*A. asiatica* Serg.) и благородного (*A. nobilis* L.). Был изучен химический состав эфирных масел, полученных из надземной части тысячелистника азиатского, собранного в различных областях Сибири также тысячелистника обыкновенного и тысячелистника благородного. При этом преследовалась цель сопоставить состав эфирных масел систематически близких видов тысячелистника азиатского и тысячелистника обыкновенного для обоснования их видовой самостоятельности, и для получения объективного заключения исследовали состав систематически близкого, но достоверного вида тысячелистника благородного. В составе эфирных масел исследуемых видов тысячелистника было обнаружено более 50 компонентов, из которых 32 идентифицировали.

Качественный и количественный состав эфирного масла тысячелистников азиатского и обыкновенного близок по некоторым компонентам. Некоторые различия в содержании отдельных компонентов связаны, вероятно, не с видовыми различиями, а с местом произрастания

растений (эколого-географический фактор) или систематической неоднородностью вида. При этом заметно отличие состава эфирного масла тысячелистника благородного от первых двух, особенно по содержанию сесквитерпеноидов. Так, если в эфирных маслах тысячелистников азиатского и обыкновенного преобладают монотерпеноиды, в основном за счет высокого содержания β -пинена+сабинена (22,56–28,35%) и цинеола (5,21–12,78%), то более 60% эфирного масла тысячелистника благородного составляют сесквитерпеноиды, преимущественно γ -кадинен (46,72%) и альфа-кадинол (8,6%). В то же время в сесквитерпеновой части эфирного масла тысячелистника благородного отсутствует углеводород гермакрен D и ряд спиртов, характерных для двух других видов тысячелистника. Редким исключением для видов рода тысячелистника является наличие тимола и карвакрола, обнаруженных в эфирном масле тысячелистника благородного, а хамазулен присутствует в эфирном масле данного вида в следовых количествах. На основании этого можно предположить, что близкие по составу не только монотерпеноидов, но и сесквитерпеноидов тысячелистники азиатский и обыкновенный действительно представляют собой единый вид. Это подтверждает мнение ботаников рассматривать тысячелистник азиатский в составе полиморфного вида *A. millefolium* L. По мнению авторов, тысячелистник азиатский представляет особый интерес как хемораса тысячелистника обыкновенного, характеризующаяся высоким содержанием проазуленов и однородностью проазуленовых популяций (Покровская и др., 2009).

Проверка эфирных масел *Achillea biebersteinii*, *Achillea fragrantissima*, *Achillea santolina* и *Achillea millefolium* на антибактериальную активность против пищевых бактерий, показала, что грамположительные бактерии (*Staphylococcus aureus* и *Listeria monocytogenes*) более восприимчивы, чем грамотрицательные (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Salmonella enteritidis*). Масла растений показали антимикробную активность в

отношении пяти видов пищевых бактерий, но масла *A. biebersteinii* и *A. fragrantissima* были наиболее эффективными (Abdulrhman и др., 2016).

Экспериментально доказана антимикробная, антиоксидантная активность и противовоспалительный потенциал тысячелистника обыкновенного. Методами газовой хроматографии и масс-спектрометрическим анализом выявлено, что тимол основной компонент *A. millefolium*, его содержание составляет примерно 26,47%. Выявлено, что эфирное масло *A. millefolium* значительно ингибирует производство оксида азота в липополисахаридных активированных макрофагах.

1.3. Заготовка лекарственного сырья

Заготовление растительного сырья производят из всех надземных частей растения - цветки, стебли, листья. В период цветения (июнь - первая половина августа) секатором просто срезают мягкие облиственные верхушки побегов длиной около 15 см (грубое основание стебля не срезают) с цветками. Собранное сырье разрезают на части, раскладывают на льняное полотенце (или чистую бумагу) в один слой и сушат, периодически перемешивая, на открытом воздухе или на веранде (главное, не допускать прямых солнечных лучей, держать в темном месте). Конец сушки определяют по ломкости стеблей. Хранят высушенное сырье в холщовых мешочках или бумажных пакетах в сухом прохладном месте (Соколов и др., 1993).

Растения, выращенные на культивируемой земле, имеют в отваре менее терпкий, и намного менее плотный вкус. Для лечебно-профилактического применения, лучше собирать именно дикий тысячелистник - то есть растущий самостоятельно в открытом поле, лесных просветах, заброшенных лугах.

1.4. Флавоноиды

Флавоноиды являются фенольными соединениями, содержащими в своей структуре фрагмент дифенилпропана (С6-С3-С6) и представляющие собой чаще всего производные 2-фенилхромана (флаван) или 2-фенилхромона (флаванон). Химическая классификация флавоноидов основана на трех основных признаках: степень окисленности углеродного кольца или пропанового фрагмента; величина гетероцикла (С); положение бокового фенила. В зависимости от степени окисления углеродного скелета флавоноидов различают несколько групп: флавоны, флавонолы, флаваноны, изофлавоны, антоцианы, хальконы, катехины, ауроны и прочие (Первышина и др., 2006).

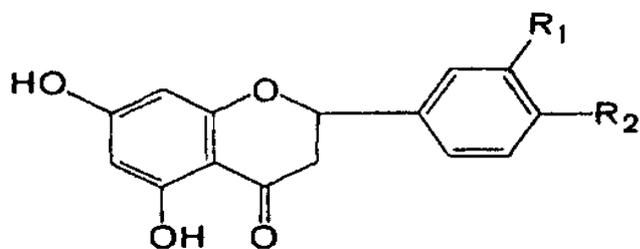


Рисунок 1 — Структурная формула флавана

Флавоноиды принадлежат к классу полифенольных соединений растительного происхождения. Их можно отнести к вторичным продуктам метаболизма растений. Однако среди вторичных продуктов эта группа веществ является одной из наиболее значимых, благодаря тому, что принимают участие во многих ключевых процессах роста и развития растений. Флавоноиды не только участвуют в пигментации растений и могут определять окраску цветов, но и играют заметную роль в процессах клеточной сигнализации и сами могут служить в качестве мессенджеров химических сигналов. Они участвуют в процессах репродукции растений, а так же принимают участие в процессах развития и функционирования пыльцы, накоплении нектара, в созревании плодов и семян. Были получены новые данные, которые позволяют предположить, что флавоноиды могут

участвовать в процессах экспрессии генов, изменять активность регуляторных белков и участвовать в регуляции клеточного деления. Однако наиболее заметную роль флавоноиды играют в защите растений от различных неблагоприятных факторов окружающей среды (действие ультрафиолета, температурный стресс, повышенные концентрации тяжелых металлов). Флавоноиды играют большую роль в защите растений от бактериальной, вирусной и грибковой инфекции, от проникновения паразитов и повреждения насекомыми. Одной из наиболее значимых функций флавоноидов является их участие в защите растений от окислительного стресса благодаря их выраженной антиоксидантной активности (Тараховский и др., 2013).

Исследования подтвердили, что флавоноиды проявляют биологическую активность в организме человека. Экспериментально подтверждена способность большинства флавоноидов, улучшать эластичность стенок кровеносных сосудов, регулировать их проницаемость, предотвращать склеротические поражения.

Флавоноиды являются прекрасными антиоксидантами. Природные антиоксиданты способны нейтрализовать свободные радикалы, которые образуются под воздействием радиации, ультрафиолетового излучения в организме человека. Таким образом, флавоноиды защищают от разрушения внутриклеточные структуры и мембраны клеток. Флавоноиды способны защитить ткани от повреждений, связанных с избыточным выбросом гистамина (высвобождающегося при аллергии, воспалительных процессах). Это очень неплохое подспорье в лечении аллергии (Silvia и др., 2015).

Флавоноиды обладают Р – витаминной активностью. В медицине флавоноиды активно применяются при лечении атеросклероза, гипертонии, ревматизма, язвенных болезней. Витамин Р «близкий родственник» витамина С и может замещать некоторые функции аскорбиновой кислоты. Например, флавоноиды способны регулировать образование коллагена (одного из

основных компонентов кожи, без него кожа теряет упругость и эластичность) (Первышина и др., 2006).

1.5. Методы извлечения и изучения флавоноидов лекарственных растений

Для выделения флавоноидов проводят экстракцию растительного материала, как правило, этиловым или метиловым спиртом разной концентрации, чаще всего используют 70% спирт. Идентификацию флавоноидов проводят, основываясь на их физико-химических свойствах. Проводят определение температуры плавления, удельного вращения гликозидов, сравнение УФ-, ИК-, масс ПМР-спектров со спектрами известных образцов.

Флавоноиды способны к реакции комплексообразования с некоторыми металлами и их солями, например, с солями алюминия, такими как алюминия хлорид. Комплексные соединения с 1-2% спиртовым раствором хлористого алюминия имеют желтое или желто-зеленое окрашивание (Тараховский др., 2013).

Рассмотрим несколько вариантов извлечения и определения флавоноидов в растительном сырье. Для количественного определения флавоноидов в сырье манжетки обыкновенной предлагается методика, основанная на их способности образовывать окрашенный комплекс со спиртовым раствором алюминия хлорида, который вызывает батохромный сдвиг длинноволновой полосы поглощения и при этом дает основной максимум поглощения при длине волны 400 нм. Было установлено, что наиболее полное извлечение целевых веществ достигается при соотношении сырья и экстрагента 1:30. Для экстракции использовался 70%-ный этанол, так как гликозиды флавоноидов манжетки практически равнозначно извлекаются как 40%, так и 70%-ным этанолом. Максимальное извлечение флавоноидов из сырья происходило при нагревании на кипящей водяной бане с обратным холодильником двукратно в течение 45 и 30 мин. При определении

оптимального количества 2% раствора алюминия хлорида, используемого в качестве комплексообразующего реагента, установлено, что наиболее стабильные результаты получаются при соотношении экстракта и раствора комплексообразователя 1:1. Фотометрировали на волновом диапазоне 280-480 нм. Установлены условия извлечения и спектрофотометрического определения флавоноидов из надземной части манжетки обыкновенной по реакции с алюминия хлоридом (Андреева и др., 2000).

Количественное определение флавоноидов в надземной части василька шероховатого (*Centaurea scabiosa L.*) проведено методом дифференциальной спектрофотометрии. Ларькина М. С. и соавторы [14, с. 15] предложили модифицированную методику комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом в присутствии кислоты хлороводородной. Экстракты получали при нагревании до 60°C с использованием в качестве экстрагента 70 % этанол. Для определения количественного содержания флавоноидов использовали дифференцированный спектрофотометрический метод, основанный на их способности образовывать с алюминия хлоридом комплексы по пери-гидрокси и орто-гидрокси-оксо-группам, устойчивые в кислой среде. Проведенные исследования позволили оценить содержание флавоноидов в надземной части василька шероховатого.

Калинкина Г.И. и соавторы [8, с. 14] в своей работе «Химический состав эфирных масел некоторых видов тысячелистника флоры Сибири» предложили исследовать химический состав из надземных частей трех близких видов тысячелистника тысячелистников; обыкновенного (*A. millefolium L.*), азиатского (*A. asiatica Serg.*) и благородного (*A. nobilis L.*). Тысячелистники собраны в различных областях Сибири, изучены методом газо-жидкостной хроматографии. В качестве сырья использовали воздушно-сухую массу растений. Анализ проводили на двух колонках с фазами различной полярности (полиметилсилоксан, полиэтиленгликоль) для повышения достоверности идентификации. В результате получили различия качественного и количественного состава всех компонентов химического

состава, во всех растительных образцах, что связано, как полагают авторы статьи, не с видовыми различиями, а с местом произрастания растений (эколого-географический фактор) или систематической неоднородностью вида.

Верниковская Н.А. и Темердашев З.А. [3, с. 190] предложили анализ водных экстрактов тысячелистника обыкновенного, определение фенольных соединений и флавоноидов методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии и определение этих компонентов методом высокоактивной жидкостной (ЖХ-МС), а так же использовали спектрофотометрическое детектирование. Этот метод является одним из самых распространенных, используют как способ идентификация и определение фенольных соединений. В качестве подвижной фазы использовался ацетонитрил и дигидроортофосфат калия (KH_2PO_4), подкисленный H_3PO_4 до рН 2.8. Благодаря выше упомянутым методам получили разделение на различные вещества, некоторые из них удалось идентифицировать.

Многие авторы используют метод водно-спиртового извлечения флавоноидов из растительного сырья (Куркина, 2015; Смирнова и др., 2014). При экстрагировании 70% этиловым спиртом в течение 30 минут происходит полное извлечение флавоноидов из растительного сырья. Самые распространенные методы анализа флавоноидов: УФ- спектроскопия, высокоэффективная хроматография.

2. Объекты и методы исследования

Объектом исследования служила надземная часть (листья) тысячелистника обыкновенного (*A. millefolium*). Материал был заготовлен на территории Ермаковского района Красноярского края, стационаре Института леса им. В.Н.Сукачева СО РАН летом 2015 года, на суходольном и пойменном лугах. Также сбор материала провели на территории г. Красноярска, Октябрьском районе, Нижнем Академгородке летом 2016 года, на трех площадках суходольном лугу, опушке березового леса и березовом лесу, различающихся по абиотическим факторам. Растения высушили и хранили в бумажных пакетиках, в сухом прохладном месте.

2.1 Экстракция растительного сырья

Листья растерли в фарфоровой ступке до гомогенной массы, без добавлений растворителя. Среднюю пробу для каждой ценопопуляции разделили на 3 навески по 0,5 г ($\pm 0,002$ г). Подготовили пробы для экстракции в следующей пропорции экстрагента (этилового спирта) к навеске: 25:0,5.

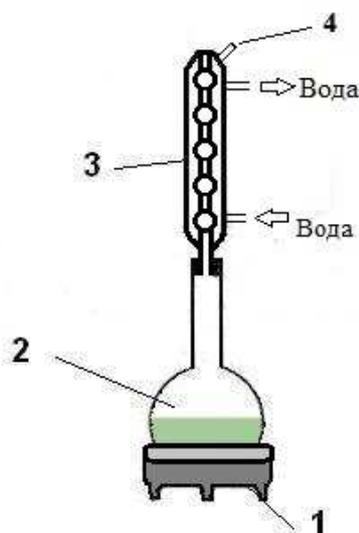


Рисунок 2 — Установка для водно-спиртового экстрагирования, где 1- нагревательный элемент («Kavalier», Чехословакия); 2- круглодонная колба; 3- обратный холодильник; 4- выход в атмосферу.

Навеску поместили в колбу со шлифом вместимостью 200 мл, прибавили 25 мл 70% этилового спирта. Колбу присоединили к обратному холодильнику и нагревали на плитке с добавлением песка, экстрагировали в течение 30 минут, при $t = 80,2^{\circ}\text{C}$. Экстракт поместили в колбу вместимостью 25 мл. Полученное извлечение охладили, отфильтровали через бумажный фильтр синяя лента, затем возместили потери при кипячении 70% этанолом, и использовали для проведения дальнейшего анализа на содержание флавоноидов (Абрамова и др., 2011).

2.2 Спектрофотометрический анализ водно-спиртовых экстрактов *Achillea millefolium* L. с добавлением с AlCl_3

Флавоноиды способны образовывать комплексные соединения с AlCl_3 , что способствует увеличению плотности экстрактов. Образующиеся комплексы флавоноидов и AlCl_3 способствуют сдвигу спектра поглощения по сравнению с исходными растворами экстрактов (Кузнецова, 2015; Куркина, 2011).

Исходный экстракт темно-зеленого цвета развели в 5 раз 70% этанолом. Пробы для анализа с 2%-ным алюминия хлоридом готовили следующим образом: 0,4 мл спиртового экстракта довели до 10 мл; водно-спиртовое извлечение 0,4 мл; алюминия хлорида 0,8 мл, затем довели до 10 мл. 70 % этиловым спиртом. Спектральный анализ проводили следующим образом; в кюветное отделение спекрофотометра поместили кюветы с раствором экстракта *A. millefolium* L. против 70% этилового спирта. Измерения проводили на спектрофотометре Specol-1300, на диапазоне длин волн 400-440 нм.

2.3 УФ - спектрофотометрический анализ водно-спиртовых экстрактов *Achillea millefolium* L.

Исходный экстракт темно-зеленого цвета был разведен в 5 раз 70% этанолом. Спектральный анализ проводили следующим образом; в кюветное

отделение спектрофотометра поместили кюветы с раствором экстракта *A. millefolium* L. против 70% этилового спирта. Измерения проводили на спектрофотометре Cary – 5000 Agilent на диапазоне длин волн 250 – 750 нм.

2.4 Анализ водно-спиртовых экстрактов листьев *Achillea millefolium* L. методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Метод ВЭЖХ широко используется в анализе растительного сырья и биологически активных веществ, выделенных из него (Миназова, 2010).

Спиртовые экстракты по отдельности хроматографировали на жидкостном хроматографе Agilent 1200 при следующих условиях: колонка Luna 5u C18(2) 100A (250x4,6mm5 мкм); температура термостата - 25°C; длина волны детектирования - 290 нм; подвижная фаза: ацетонитрил; 0,01 % раствор фосфорной кислоты в воде; режим элюирования градиентный (таблица 1). Сбор данных, обработка хроматограмм и спектров поглощения проводили с помощью программы AgilentChemStation.

Таблица 1 – Условия проведения ВЭЖХ анализа

Время, мин	Содержание ацетонитрила, об. %
0-10	15-40
10-30	40-15

Оценку и обработку полученных данных провели статистическим анализом. В каждой ценопопуляции выделили по 3 повторности, провели расчет средних значений, стандартного отклонения, расчет различия средних значений по t-критерий Стьюдента.

Оценку и обработку полученных данных провели статистическим анализом. В каждой ценопопуляции выделили по 3 повторности, провели расчет средних значений, стандартного отклонения, расчет различия средних значений по t-критерий Стьюдента.

Заключение

Получены неоднозначные данные по качественному и количественному составу экстрактов листьев *A. millefolium*. Результаты спектофотометрического анализа с добавлением $AlCl_3$ и спектрального анализа в УФ- и в видимых областях показывают, что наибольшее количество полифенольных соединений приходится на тысячелистник ценопопуляции суходольный луг. Согласно методу высокоэффективной жидкостной хроматографии по суммарному количеству наибольший запас флавоноидов имеет тысячелистник ценопопуляции опушка березового леса. В то время, как тысячелистник ценопопуляции суходольный луг по данным ВЭЖХ обладает наиболее разнообразным составом флавоноидов.

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии целесообразно использовать, при оценке качественного и количественного состава, и оценке разнообразия компонентного состава. УФ- спектрофотометрический метод может использовать для анализа выхода флавоноидов.

Список литературы

1. Абрамова Я. И., Разработка методики количественного определения фенольных соединений в желчегонном сборе №2/ Калинкина Г.И., Чучалин В. С. // Химия растительного сырья. 2011. №4.С.265-268
2. Андреева В.Ю.. Разработка методики количественного определения флавоноидов в манжетке обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L.S.L./ Андреева В.Ю. ,Калинкина Г.И // Химия растительного сырья. —2000. —№1.— С. 85–88
3. Верниковская Н. А. Идентификация и хроматографическое определение фенольных соединений в тысячелистнике обыкновенном / Н. А. Верниковская, З. А. Темердашев // Аналитика и контроль. — 2012. — № 2. — С. 188-195
4. Головкин Б. Н. Декоративные растения СССР: Справочники-определители географа и путешественника./ Головкин Б. Н., Китаева Л. А., Немченко Э. П. — М.: Изд-во Мысль, 1986. — С. 305. —
5. Егорова И.Н. Содержание тяжелых металлов в тысячелистнике обыкновенном, произрастающем на территории Кемеровской область/ Егорова И.Н, Григорьева Т.И., Просяникова О.И., Громов К.Г, Мухамадияров Р.А // Фундаментальные исследования. – 2009. – № 7. – С. 80-82.
6. Зайдель, А.Н. Основы спектрального анализа. – М. : Наука, 1965. – 322 с.
7. Зеленая аптека [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.fito.nnov.ru/special/aether/achillea_millefolium/
8. Калинкина Г. И., Дембицкий А. Д., Березовская Т. П. Химический состав эфирных масел некоторых видов тысячелистника флоры Сибири // Химия растительного сырья. 2000. №3 С.13-17.
9. Копынева Г.А. Род *Achillea* L. – тысячелистник // Флора Красноярского края. Томск — 1980. -№10.— С. 28-29.

10. Кузнецова И.В. Определение флавоноидов в листьях стевии // Химия растительного сырья. — 2015. — №4. — С. 57-61.
11. Кузнецова М. А. Лекарственное растительное сырьё и препараты. — М.: Высш. шк., 1987. — С. 61—62.
12. Куркина А.В. Ресурсосберегающие аспекты исследования сырья эфиромасличных лекарственных растений, содержащих флавоноиды// Биологические ресурсы: флора.— 2011.— С 853-856.
13. Куцик Р.В., Зузук Б. М. «Тысячелистник обыкновенный». //Провизор. — 2002. — №14
14. Ларькина М.С. Количественное определение флавоноидов в надземной части висилька шероховатого (*Centaurea scabiosa L.*)/ Ларькина М.С Кадырова Т.В., Ермилова Е.В., Краснов Е.А.//Химико-фармацевтический журнал. — 2009.— №4.— С. 14-17
15. Лесиовская Е.Е., Пастушенков Л.В. Фармакотерапия с основами фитотерапии : учебное пособие./ Лесиовская Е.Е., Пастушенков Л.В.: – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003.
16. Миназова Г.И. Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе природного сырья//Башкирский химический журнал. – 2010. – №4. – С.134 – 136
17. Немерешина О. Н, Гусев Н. Ф, Филиппова А. В. Анатомо-морфологические изменения тысячелистника обыкновенного в техногенной зоне // Известия ОГАУ. 2014. №4 (48) С.158-161
18. Носов А. М. Лекарственные растения. – М.: ЭКСМО-Пресс, 2000. – 350 с.
19. Оленева Ю. Г. Влияние антропогенного фактора на химический состав тысячелистника обыкновенного/Оленева Ю. Г., Хижняк С.Д, Пахомов П.М. //Вестник ТвГУ. Серия Химия.-2013.— №16. — С. 150-159
20. Первышина Г.Г. Возможности комплексного использования некоторых видов растительных ресурсов Красноярского края: монография/ Первышина Г.Г., Ефремов А.А. ; Краснояр. гос. торг.- экон. лин-т. – Красноярск, 2006 – 254 с.

21. Покровская И.С. Хемотаксономия тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.)/ Покровская И.С, Мазова О.В., Апыхтин Н.Н, Племенков В.В. //Химия растительного сырья. — 2009. — №3. — С. 85–88.
22. Семенова В.В. Содержание тяжелых металлов в растениях тысячелистника обыкновенного в условиях антропогенного воздействия// Труды института геологии Дагестанского научного центра РАН. 2014. №63 С.179-182
23. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям (фитотерапия). – М.: ВИТА, 199
24. Тараховский Ю.С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина./ Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н.— М: Изд-во Пушкино, 2013.-311с
25. Турова А.Д. Лекарственные растения СССР и их применение. –М: Изд-во Медицина, 1974.-304с
26. Юсубов М. С., Калинкина Г. И., Дрыгунова Л. А., Покровский Л. М., Королюк Е. А., Ткачев А. В. Химический состав эфирного масла тысячелистников обыкновенного (*Achillea millefolium* L.) и азиатского (*Achillea asiatica* Serg.) // Химия растительного сырья. 2000. №3 С.25-32
27. Ягодка В.С. Лекарственные растения в дерматологии и косметологии/ Ягодка В.С. Научная думка, 1991 – 296с
28. Abdulrhman A. Almadiy, Chemical composition and antibacterial activity of essential oils and major fractions of four *Achillea* species and their nanoemulsions against foodborne bacteria/ Gomah E. Nenaah, Basma A. Al Assiuty, Eman A. Moussa, Nabila M. Mira//, LWT - Food Science and Technology. – 2016.- № 69. – P. 529-537
29. Caldeira I. Effects on growth, essential oil content and composition of the volatile fraction of *Achillea millefolium* L. cultivated in hydroponic systems deficient in macro- and microelements/ Almeida Alvarenga, Paulo Fernandes Boldrin, Fernanda Ventrini Pacheco, Sâmia Torres Silva, Suzan Kelly Vilela Bertolucci, José Eduardo Brasil Pereira Pinto// Scientia Horticulturae. – 2015. -№197. – P. 329-338

- 30.M. Kazemi, Chemical composition and antimicrobial, antioxidant activities and anti-inflammatory potential of *Achillea millefolium* L., *Anethum graveolens* L., and *Carum copticum* L. essential oils, *Journal of Herbal Medicine*. – 2015.- №4. P.217-222
- 31.Sílvia M.F. Bessada, João C.M. Barreira, M.Beatriz P.P. Oliveira, Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review, *Industrial Crops and Products*.- 2015. - №15. P. 604-615
- 32.Teixeira Rosangela de Oliveira. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in in vitro and in vivo assays/ Camparoto Marjori Leiva, Mantovani Mário Sérgio, Vicentini Veronica Elisa Pimenta// *Genetics and Molecular Biology*. – 2003.- № 26(4). P. 551-555

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Результаты спектрометрирования спиртовых экстрактов тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium*)

Таблица А.4 — Результаты спектрометрирования без добавления хлорида алюминия.

Длина волны, нм	Оптическая плотность экстрагированных образцов тысячелистника обыкновенного.			
	1 суходольный луг	2 суходольный луг	1 пойменный луг	2 пойменный луг
400	1,174	1,086	1,180	1,056
405	1,013	0,975	1,092	0,951
410	0,910	0,907	1,036	0,883
415	0,810	0,833	0,963	0,812
420	0,697	0,721	0,842	0,714
425	0,565	0,588	0,686	0,607
430	0,463	0,496	0,578	0,524
435	0,410	0,446	0,523	0,479
440	0,379	0,415	0,488	0,449

Таблица А.2 — Результаты спектрального анализа с добавлением $AlCl_3$

Длина волны, нм	Оптическая плотность экстрагированных образцов тысячелистника обыкновенного.			
	1 суходольный луг	2 суходольный луг	1 пойменный луг	2 пойменный луг
400	3,000	2,301	2,046	1,959
405	2,699	2,097	1,886	1,796
410	2,301	1,886	1,721	1,62
415	2,000	1,658	1,538	1,42
420	1,658	1,387	1,301	1,194
425	1,347	1,125	1,046	0,957
430	1,092	0,921	0,857	0,804
435	0,910	0,785	0,735	0,684
440	0,754	0,654	0,629	0,575

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Результаты ВЭЖХ водно-спиртовых экстрактов *Achillea millefolium* L.

Таблица Б.3 – Усредненные результаты по ВЭЖХ водно-спиртовых экстрактов *Achillea millefolium* L.

№	Березовый лес		Опушка березового леса		Суходольный луг	
	Время удержания, мин	Площадь	Время удержания, мин	Площадь	Время удержания, мин	Площадь
1	11,8±0,078	1,6±0,021	–	–	–	–
2	12,1±0,076	0,5±0,004	12,0±0,121	2,1±0,270	12,1±0,170	0,9±0,060
3	12,5±0,080	4,7±0,031	12,6±0,132	6,9±0,285	12,4±0,162	0,7±0,052
4	–	–	–	–	12,7±0,157	7,1±0,194
5	12,9±0,072	1,0±0,004	13,1±0,098	0,8±0,094	13,1±0,157	0,9±0,047
6	13,4±0,075	18,8±0,168	13,5±0,098	21,9±0,882	13,7±0,157	17,5±0,371
7	14,1±0,074	0,7±0,008	–	–	–	–
8	14,3±0,076	0,6±0,018	–	–	14,4±0,154	1,0±0,017
9	–	–	14,6±0,300	1,2±0,678	14,6±0,155	0,9±0,015
10	15,1±0,135	1,5±0,452	14,9±0,360	0,8±0,179	15,0±0,156	1,5±0,025
11	15,6±0,072	0,921±0,013	–	–	15,5±0,160	9,2±0,113
12	–	–	15,9±0,582	2,7±0,085	16,1±0,161	8,5±0,165
13	–	–	16,4±0,590	1,4±0,276	–	–
14	17,2±0,057	2,7±0,076	–	–	–	–
15	–	–	17,5±0,187	20,7±18,012	17,4±0,158	7,2±0,346
16	–	–	17,7±0,010	2,1±0,005	–	–
17	17,9±0,050	65,0±0,307	18,1±0,018	58,6±0,728	18,7±0,355	28,3±13,951
18	–	–	18,9±0,001	0,7±0,089	–	–
19	19,8±0,048	1,4±0,341	–	–	–	–
20	–	–	–	–	20,8±0,386	1,0±0,036
21	–	–	–	–	26,3±8,393	14,3±13,911
22	–	–	–	–	31,3±9,463	1,0±0,029
Σ	–	100,0±0,341	–	120,5±1,799	–	100,7±1,955

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Концентрация хлорофилла в листьях *Achillea millefolium* L.

Таблица В.3 – Концентрация хлорофилла в траве тысячелистника обыкновенного

Ценопопуляции	Хлорофилл А, мкг/г сух массы	Хлорофилл Б, мкг/г сух массы	Суммарная концентрация хлорофилла, мкг/г сух. массы
Березовый лес	3,1	2,2	5,3±0,45
	3,5	2,8	6,3±0,32
	2,3	1,7	4,0±0,31
Опушка березового леса	3,4	2,7	6,1±0,35
	4,8	3,4	8,2±0,70
	3,5	2,6	6,1±0,48
Суходольный луг	2,1	1,7	3,8±0,18
	2,3	2,0	4,3±0,17
	3,6	3,0	6,6±0,33

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Графическое отображение результатов ВЭЖХ водно-спиртовых экстрактов *Achillea millefolium* L.

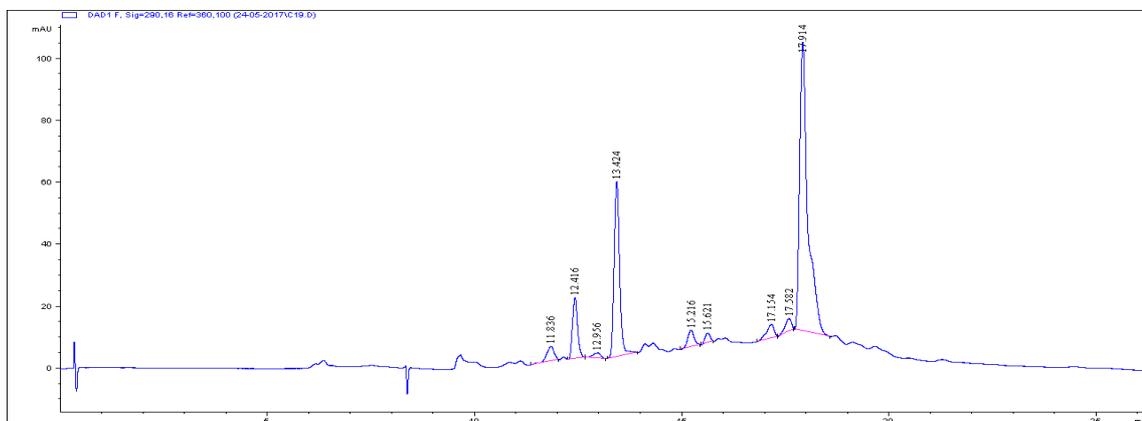


Рисунок Г.10 – Проба №1 водно-спиртового извлечения *A. millefolium* L. (опушка березового леса)

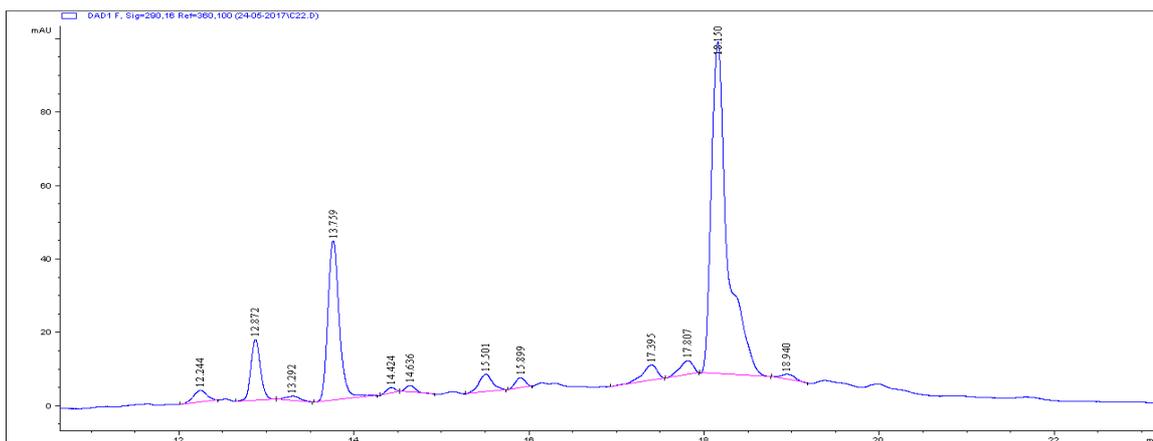


Рисунок Г.11 – Проба №2 водно-спиртового извлечения *A. millefolium* L. (опушка березового леса)

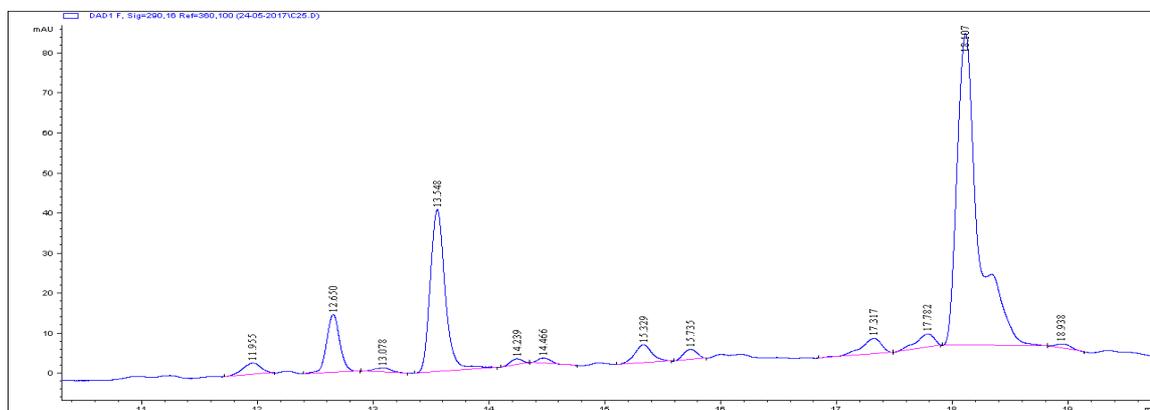


Рисунок Г.12 – Проба №3 водно-спиртового извлечения *A. millefolium* L. (опушка березового леса)

ПРОДОЛЖЕНИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ Г

Электронные спектры ВЭЖХ водно-спиртовых экстрактов *Achillea millefolium* L.

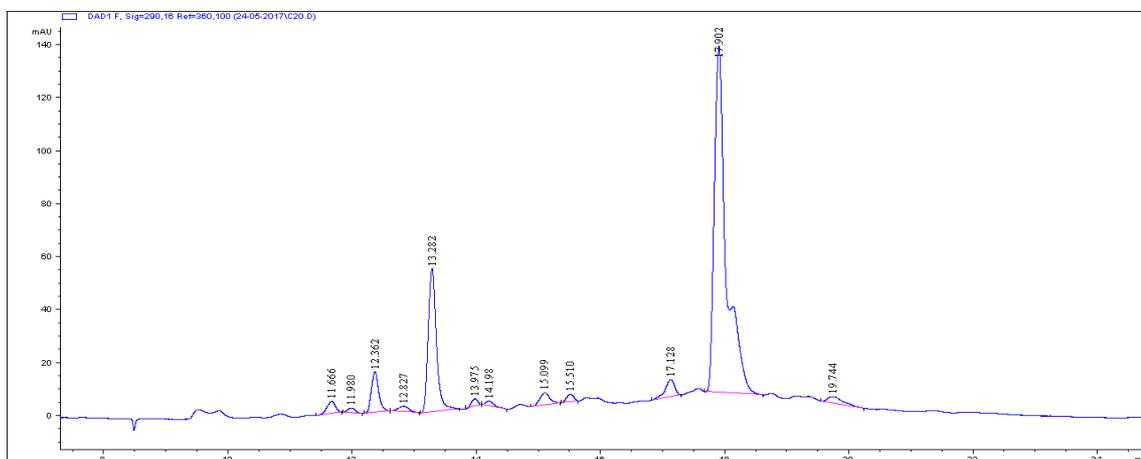


Рисунок Г.13 – Проба №1 водно-спиртового извлечения *A. millefolium* L. (березовый лес)

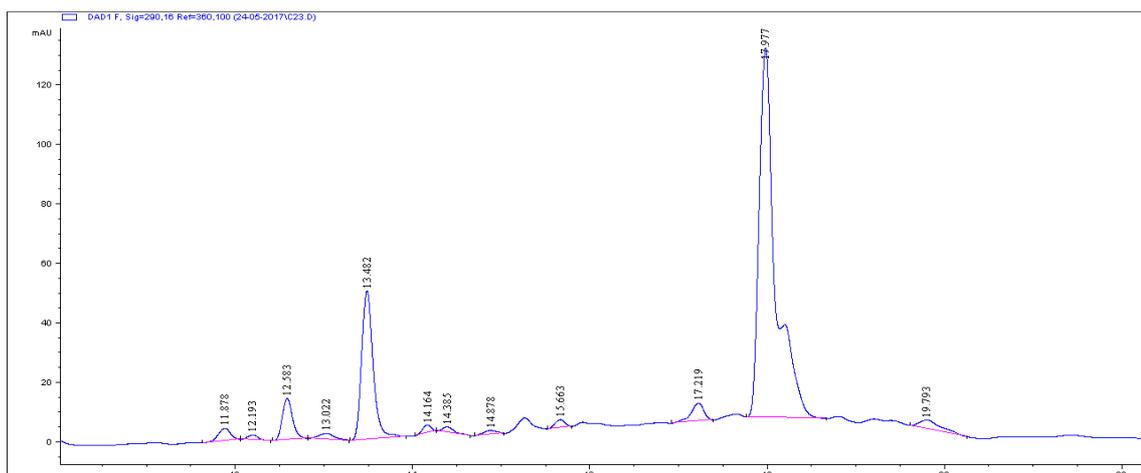


Рисунок Г.14 – Проба №2 водно-спиртового извлечения *A. millefolium* L. (березовый лес)

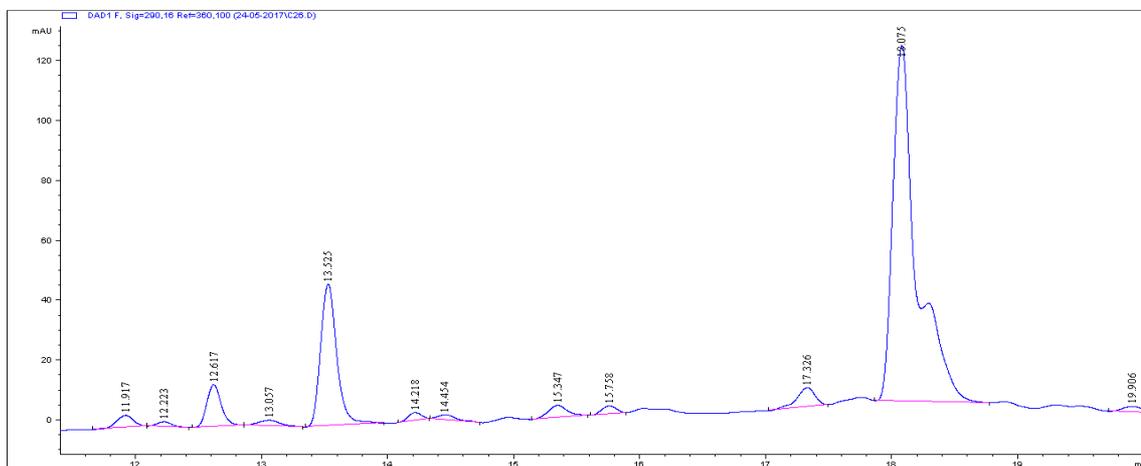


Рисунок Г.15 – Проба №3 водно-спиртового извлечения *A. millefolium* L. (березовый лес)

ПРОДОЛЖЕНИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ Г

Графическое отображение результатов ВЭЖХ водно-спиртовых экстрактов *Achillea millefolium* L.

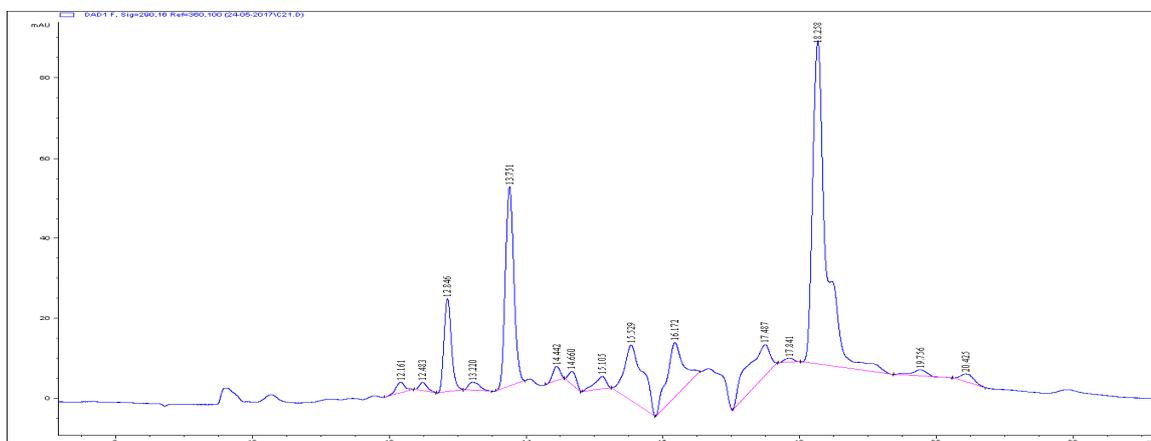


Рисунок Г.16 – Проба №1 водно-спиртового извлечения *A. millefolium* L. (суходольный луг)

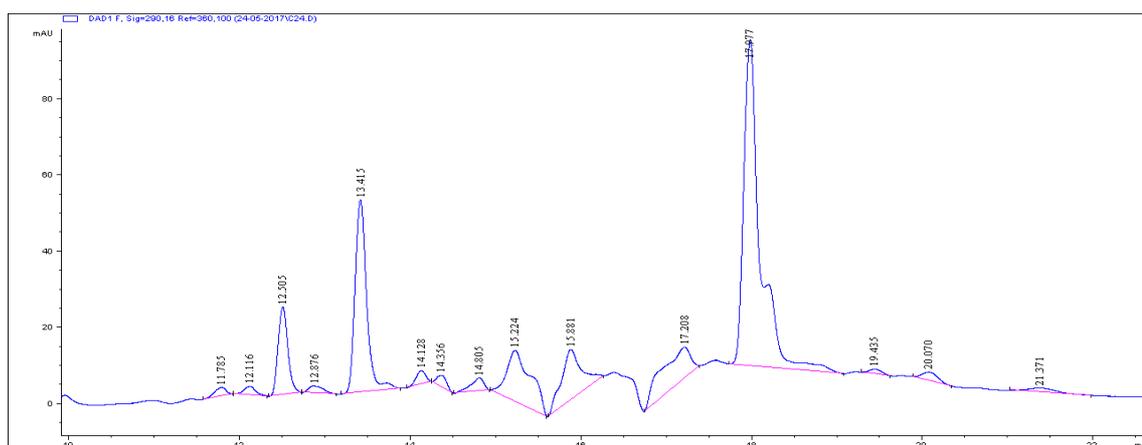


Рисунок Г.17 – Проба №2 водно-спиртового извлечения *A. millefolium* L. (суходольный луг)

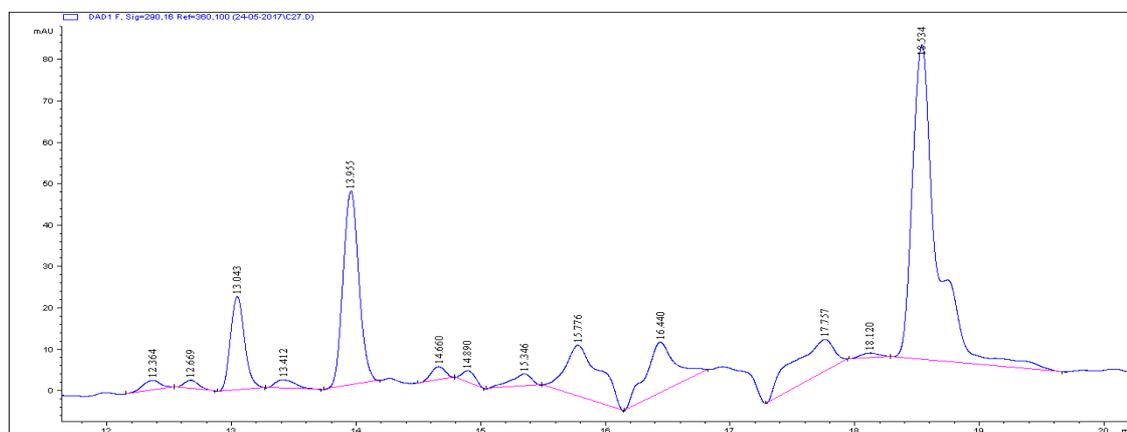


Рисунок Г.18 – Проба №3 водно-спиртового извлечения *A. millefolium* L. (суходольный луг)