

## Chromatographic Study of Phenolic Compounds in Medicinal Plants *Alchemilla subcrenata* Buser and *Veronica chamaedrys* L.

Zhivetev M.A.<sup>1</sup>, Dudareva L.V.<sup>1</sup>, Graskova I.A.<sup>1,2</sup>,  
Voinikov V.K.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS, Irkutsk, 664033, Russia

<sup>2</sup> The Irkutsk Scientific Center of SB RAS

\*E-Mail: [nik.19@mail.ru](mailto:nik.19@mail.ru)

Received October 28, 2015

The objects of investigation were leaves and inflorescences of *Alchemilla subcrenata* and *Veronica chamaedry*, growing on the left bank at 700 m from the edge of Lake Baikal. Some small differences in the quantity and quality of phenolic compounds in the leaves of one species even selected at one time were found. At the same time, differences in the quantity and quality of phenolic compounds in the different times of the day were even more pronounced. In the inflorescences of *Alchemilla subcrenata* the dynamics of flavonoids has been characterized by more stable composition than in its leaves. For *Veronica's* tissues and organs more variety of seasonal cocktail of phenolic compounds than in the *Alchemilla subcrenata* was detected. Expect a variety of phenolic compounds in inflorescences of *Veronica* seasonal cocktail was higher than in the leaves.

*Key words:* daily adaptation, medicinal plants, *Alchemilla subcrenata*, *Veronica chamaedrys*, leaves, inflorescence, phenolic compounds

Растения подвергаются значительному воздействию условий окружающей среды, и в первую очередь температуры, изменяющейся не только в течение года, но и в течение суток. На территории Сибири такие перепады особенно выражены и достигают вне зависимости от времени года 15-20 °С в сутки, что не может не влиять на вторичный метаболизм растений. Из вторичных метаболитов растений наиболее значимыми являются фенольные соединения и, в частности, флавоноиды, роль которых как показателя устойчивости растений только возрастает (Pell, 1984).

Необходимость изучения лекарственных растений в Прибайкалье возрастает с учетом серьезных изменений в содержании биологически активных веществ в зависимости от района произрастания (Shaldaeva, 2009). Суточная и сезонная динамика лекарственных компонентов важна для научного обоснования оптимальных сроков и времени сбора растительного сырья применительно к конкретному региону.

В связи с этим, целью наших исследований было изучить изменения качественного состава флавоноидов и других фенольных соединений в листьях и соцветиях двух видов лекарственных растений: манжетки городковатой *Alchemilla subcrenata* Buser и вероники дубравной *Veronica chamaedrys* L. в условиях суточных перепадов температур атмосферного воздуха летом и ранней осенью.

## MATERIALS AND METHODS

Пробы отбирались в 8-9<sup>00</sup>, 14-15<sup>00</sup> и 20-21<sup>00</sup> 25 июня, 15 августа и 19 сентября 2013 г. и 16 июня 2014 г. Для уменьшения влияния разрушающего солнечного света на фенольные соединения в листьях растений пробы отбирались в пасмурные дни, сопровождаемые более мягкими перепадами температур (табл. 1).

Общее содержание фенольных соединений после последовательной экстракции 80% метанолом, очистки объединенного экстракта хлороформом от липофильных пигментов и экстракции фенольного комплекса этиловым эфиром уксусной кислоты, определяли спектроскопическим методом с помощью реактива Фолина-Дениса (Zaprometov, 1971). Качественный состав экстракта исследовали на микроколоночном хроматографе «Милихром А-02» (Россия) с УФ-детектором при градиентном режиме хроматографирования (градиент 40 мин от 5 до 100 % ацетонитрила), колонка длиной 75 мм, диаметром 2 мм, скорость потока 100 мкл/мин, сорбент ProntoSil 120-5-C 18 AQ # 2362 (обращено фазный), объем пробы 4 мкл. Элюенты: 0,2 М LiClO<sub>4</sub> – 0,005 М HClO<sub>4</sub> в H<sub>2</sub>O; CH<sub>3</sub>CN. Идентификацию полученных хроматографических пиков проводили путем сравнения их УФ-спектров на длинах волн 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм с базами данных в программе МультиХром-СПЕКТР для Windows.

## RESULTS AND DISCUSSION

Динамика общего содержания фенол

содержащих веществ демонстрировала не только тканевую, но и видовую специфичность (табл. 2). Так, 25 июня у вероники дубравной содержание фенольных соединений в соцветиях было стабильно выше, чем в листьях, однако динамика изменений их содержания была сходной. Максимум приходился на 9<sup>00</sup> (4,22 и 4,10 мг/г сырого веса для соцветий и листьев, соответственно), после чего наблюдалось уменьшение их содержания в течение дня (2,79 и 2,29 мг/г в 14<sup>00</sup> и 2,30 и 1,69 мг/г в 21<sup>00</sup>). Соцветия манжетки городковатой продемонстрировали стабильно высокие содержания фенольных соединений (от 3,95 мг/г сырого веса утром до 3,12 мг/г вечером), в то время как в листьях этого растения в 15<sup>00</sup> наблюдали скачкообразное увеличение содержания (5,31 мг/г) с последующим минимумом в 21<sup>00</sup> (1,25 мг/г) (при исходном содержании в 9<sup>00</sup> 3,28 мг/г). Если в теплое время года для листьев манжетки городковатой характерен суточный максимум днем (5,31 в июле и 8,13 мг/г 15 августа), то в сентябре после полудня наблюдается, наоборот, суточный минимум (2,43 мг/г). Для листьев вероники дубравной картина несколько иная: в августе максимум – в 14<sup>00</sup> (2,03 мг/г), а в июне и сентябре высокое содержание фенолов приходится на 9<sup>00</sup> (4,10 и 4,84 мг/г) и постепенно снижается к вечеру в течение дня до 1,69 и 2,06 мг/г, соответственно.

С помощью ВЭЖХ показано, что в течение периода вегетации и даже в течение одних суток происходят изменения и в составе фенольных соединений и флавоноидов (табл. 3). Это

детектируется изменением количества пиков и появлением соединений, не регистрируемых в другое время суток. Например, кемпферол 3-б-D-глюкопиранозид в листьях манжетки обнаружен только днем в августе и сентябре, и рано утром в июне, а кверцетин – утром и вечером в июне и только вечером в августе. Следует отметить, что спектр полифенолов, свойственных манжетке, ограничивается 21-32 соединениями, а для вероники характерно наличие 33-44 соединений во всех изученных частях растения. Уменьшение общего содержания фенольных соединений в листьях или соцветиях исследованных растений нередко сопровождалось увеличением их разнообразия. Так, вопреки ожиданиям, в июне спектр полифенолов, особенно у вероники, оказался выше в листьях, чем в соцветиях по данным за оба года исследований (табл. 3). В стеблях вероники в июне 2014 содержание фенольных соединений было средним. Не исключено, что в середине и конце лета эта закономерность может быть другой.

В июне наибольшее разнообразие фенольных веществ наблюдается вечером в листьях обоих исследованных видов лекарственных растений (но утром и вечером – в соцветиях), что может быть обусловлено необходимостью адаптации к ночной прохладе. В августе ситуация иная: в 9<sup>00</sup> у листьев вероники и в 9-14<sup>00</sup> у листьев манжетки наблюдается максимум количества полифенолов при более затянутом прогреве атмосферного воздуха днем и наступлением тепла только во второй половине дня. Для сентября,

характеризующегося в Сибири холодными вечерами, увеличение числа хроматографических пиков особенно сильно проявляется в 21<sup>00</sup> как у вероники дубравной, так и у манжетки городковатой.

По-всей видимости, у этих растений фенольные соединения выполняют важную адаптационную роль к суточным температурным колебаниям в условиях резко-континентального климата Сибири и Предбайкалья. Не исключено, что эти вещества

вторичного метаболизма растений активно задействуются и при других видах температурных воздействий, в том числе при адаптации к гипотермии и гипертермическому стрессу.

Очевидно, что для более полного проявления лекарственных свойств сбор представленных растений должен быть приурочен к утреннему или вечернему времени суток в зависимости от срока сбора.

**Table 1.** Метеорологические условия в течение суток (температура атмосферного воздуха и облачность) в даты отбора проб лекарственных растений

Метеорологические условия в течение суток в даты отбора проб								
Время суток	2 <sup>00</sup>	5 <sup>00</sup>	8 <sup>00</sup>	11 <sup>00</sup>	14 <sup>00</sup>	17 <sup>00</sup>	20 <sup>00</sup>	23 <sup>00</sup>
16 июня								
Температура воздуха	+13,3	+12,2	+10,1	+13,9	+18,7	+20,3	+13,6	+13,0
Облачность	облачно	облачно	облачно	облачно	облачно	облачно	облачно	облачно
15 августа								
Температура воздуха	+17,3	+17,1	+15,1	+17,5	+15,9	+16,2	+15,3	+19,1
Облачность	облачно	облачно	облачно	облачно	облачно	облачно	облачно	облачно
19 сентября								
Температура воздуха	+8,1	+8,0	+7,7	+6,9	+7,0	+8,5	+4,7	+3,4
Облачность	облачно	облачно	облачно	облачно	облачно	облачно	облачно	облачно

**Table 2.** Общее содержание фенольных соединений, мг/ г сырой массы в листьях и соцветиях манжетки городковатой и вероники дубравной

Вид растения	Время суток	Общее содержание фенольных соединений, мг/ г сырой массы			
		Соцветия	Листья		
		25 июня	25 июня	15 августа	19 сентября
<i>Alchemilla subcrenata</i>	9.00	<b>3,95±0,43</b>	3,28±0,73	3,22±0,21	<b>4,84±0,34</b>
	14.00	<b>3,81±0,18</b>	<b>5,31±0,57</b>	<b>8,13±0,41</b>	2,43±0,20
	21.00	3,12±0,15	1,25±0,06	2,92±0,20	<b>4,17±0,69</b>
<i>Veronica chamaedris</i>	9.00	<b>4,22±0,29</b>	<b>4,10±0,27</b>	1,04±0,08	<b>4,00±0,30</b>
	14.00	<b>2,79±0,40</b>	<b>2,29±0,14</b>	<b>2,03±0,45</b>	3,64±0,20
	21.00	2,30±0,26	1,69±0,11	1,76±0,16	2,06±0,09

**Table 3.** Сводные данные ВЭЖХ тканей манжетки гороdkоватой и вероники дубравной

Орган растения	Дата отбора	Время суток	Число пиков		Из них идентифицировано:
			<i>Veronica chamaedrys</i>	<i>Alchemilla subcrenata</i>	<i>Alchemilla subcrenata</i>
соцветия	25 июня 2013 г	9 <sup>00</sup>	36	26	
		14 <sup>00</sup>	34	22	
		21 <sup>00</sup>	36	24	
лист	25 июня 2013 г	9 <sup>00</sup>	34	23-24	кемпферол 3-б-D-глюкопиранозид, фенилуксусная кислота, рутин, гиперозид, протоцеанидин В1, кверцетин 3-б-D-глюкозид, кверцетин
		14 <sup>00</sup>	41	22	
		21 <sup>00</sup>	44	32-35	кверцетин, периндопил
лист	15 августа 2013 г	9 <sup>00</sup>	43	30	
		14 <sup>00</sup>	37	31	кемпферол 3-б-D-глюкопиранозид
		21 <sup>00</sup>	36	24	кверцетин, кемпферол
лист	19 сентября 2013 г	9 <sup>00</sup>	33	24	
		14 <sup>00</sup>	28	21	кемпферол 3-б-D-глюкопиранозид
		21 <sup>00</sup>	38-39	26	
лист	16 июня 2014 г	14 <sup>00</sup>	41	-	-
соцветия		14 <sup>00</sup>	36	-	-
стебель		14 <sup>00</sup>	38	-	-

В таблицах 4 и 5 приведены характерные результаты хроматографического исследования листьев манжетки гороdkоватой утром (9<sup>00</sup>) и вечером (21<sup>00</sup>), отобранных в течение одних суток (25 июня 2013) с одной экспериментальной площадки. Вечером разнообразие фенольных соединений в данном случае увеличилось на треть и дополнилось восемью новыми соединениями. При этом в обоих пробах идентифицированный рутин утром (пик № 23, табл. 2) содержится в количестве всего 0,007 ± 0,001 мкг/мкл а вечером (пик № 24, табл. 3) его содержание заметно выше

(0,046±0,005 мкг/мкл). В то же время, в утренней пробе (9<sup>00</sup>) идентифицирован еще один пик (№ 15, табл. 2), который вероятно представлен несколькими соединениями (рутин 0,125 ± 0,012 мкг/мкл, гиперозид 0,075 ± 0,007 мкг/мкл, протоцеанидин В1 0,167 ± 0,017 мкг/мкл и кверцетин 3-б-D-глюкозид 0,171 ± 0,017 мкг/мкл). Не менее заметный на хроматограмме пик № 15 в пробе, отобранной в 21<sup>00</sup> (табл. 3), имеющий большую площадь (53,2 мкл), очевидно, тоже соответствует рутину.

**Table 4.** Выявленные пики и их УФ-спектры в листьях манжетки городковатой, отобранных утром в 9<sup>00</sup> 25 июня 2013 г.

№	время, мкл (объем удерживания, мкл)	высота пика, AU	площадь пика, AU*мкл	УФ-спектры относительно 210 нм					
				220 нм	230 нм	240 нм	250 нм	260 нм	280 нм
1	273,71	0,34	2,409	0,428	0,293	0,210	0,131	0,102	0,177
2	709,40	0,01	0,160	1,051	1,046	0,802	0,658	0,654	0,294
3	773,57	0,09	2,255	0,708	0,256	0,111	0,078	0,042	0,059
4	816,33	0,01	0,106	0,238	0,168	0,124	0,214	0,238	0,062
5	828,40	0,03	0,350	0,265	0,189	0,005	-0,059	-0,030	0,024
6	860,58	0,01	0,109	1,121	1,564	1,039	0,446	0,546	1,366
7	911,34	0,04	0,977	0,978	0,780	0,565	0,510	0,531	0,574
8	948,37	0,02	0,190	0,774	0,437	0,464	0,517	0,468	0,516
9	982,56	0,07	1,369	1,043	0,799	0,763	0,667	0,461	0,498
10	1003,86	0,05	0,731	0,924	0,793	0,538	0,417	0,427	0,286
11	1037,84	0,15	1,639	1,160	0,943	0,617	0,493	0,444	0,518
12	1055,40	1,03	14,696	1,032	0,958	0,686	0,552	0,552	0,394
13	1085,51	0,32	5,855	0,998	0,860	0,611	0,514	0,497	0,354
14	1136,83	0,05	0,870	1,048	0,922	0,374	-0,011	0,039	0,300
15	1181,13	1,34	26,178	0,586	0,434	0,399	0,555	0,593	0,242
16	1230,09	0,01	0,142	0,667	0,333	0,231	0,362	0,431	0,314
17	1261,68	0,08	1,306	0,669	0,622	0,506	0,514	0,692	0,497
18	1296,18	0,08	0,885	0,580	0,523	0,468	0,541	0,717	0,342
19	1330,86	0,37	4,977	0,686	0,541	0,427	0,416	0,537	0,352
20	1364,09	0,11	1,221	0,663	0,494	0,461	0,543	0,511	0,281
21	1403,21	0,03	0,439	0,135	-0,095	-0,089	-0,065	-0,018	-0,057
22	1423,06	0,05	0,593	0,867	0,763	0,630	0,560	0,644	0,394
23	1448,82	0,22	2,907	0,578	0,444	0,424	0,611	0,595	0,252
24	1954,71	0,01	0,317	0,318	0,100	-0,019	-0,008	0,032	0,057

**Table 5.** Выявленные пики и их УФ-спектры в листьях манжетки городковатой, отобранных вечером в 21<sup>00</sup> 25 июня 2013 г.

№	время, мкл (объем удерживания, мкл)	высота пика, AU	площадь пика, AU*мкл	УФ-спектры относительно 210 нм					
				220 нм	230 нм	240 нм	250 нм	260 нм	280 нм
1	273.43	2.01	15.508	0.422	0.291	0.211	0.128	0.092	0.167
2	774.24	0.19	5.116	0.750	0.288	0.139	0.084	0.030	0.068
3	816.61	0.14	1.438	0.432	0.321	0.242	0.339	0.369	0.136
4	828.02	0.19	2.476	0.389	0.285	0.109	0.068	0.091	0.078
5	861.38	0.02	0.267	1.179	1.409	0.880	0.272	0.343	1.350
6	895.30	0.01	0.081	0.769	0.763	0.410	0.059	0.277	0.676
7	913.60	0.02	0.194	1.152	0.602	0.363	0.353	0.345	0.637
8	952.18	0.04	0.509	1.041	0.687	0.614	0.561	0.395	0.581
9	978.33	0.22	4.241	1.171	0.851	0.891	0.802	0.437	0.726
10	1008.37	0.01	0.119	0.242	0.202	-0.471	-0.679	-0.074	-0.649
11	1034.38	0.22	3.128	1.125	0.785	0.792	0.706	0.386	0.666
12	1054.93	0.33	4.106	0.912	0.862	0.574	0.459	0.496	0.256
13	1083.93	0.13	2.449	0.714	0.570	0.335	0.391	0.552	0.118
14	1136.69	0.05	0.748	0.867	0.737	0.717	0.914	0.825	0.177
15	1182.52	2.74	53.189	0.607	0.443	0.402	0.557	0.583	0.261
16	1229.49	0.03	0.407	0.603	0.361	0.338	0.727	0.514	0.295
17	1253.90	0.08	1.006	0.552	0.397	0.334	0.564	0.547	0.249
18	1267.80	0.14	1.796	0.755	0.662	0.472	0.406	0.596	0.648
19	1295.85	0.02	0.260	0.614	0.433	0.396	0.555	0.594	0.279
20	1329.57	1.50	21.712	0.669	0.517	0.406	0.377	0.538	0.384
21	1362.34	0.65	9.770	0.621	0.449	0.421	0.506	0.493	0.299
22	1401.73	0.13	2.201	0.308	0.112	0.089	0.111	0.132	0.057
23	1420.34	0.26	3.915	0.626	0.536	0.465	0.477	0.582	0.326
24	1447.00	1.25	18.088	0.572	0.442	0.417	0.592	0.581	0.252
25	1486.53	0.02	0.321	0.564	0.286	0.181	0.269	0.289	0.171
26	1532.52	0.01	0.072	0.639	0.742	0.402	0.078	0.150	0.698
27	1546.56	0.01	0.094	0.531	0.391	0.208	0.081	0.044	0.427
28	1566.01	0.02	0.234	0.648	0.512	0.395	0.352	0.538	0.399
29	1601.12	0.01	0.154	0.562	0.391	0.422	0.503	0.352	0.253
30	1683.68	0.02	0.220	0.511	0.423	0.421	0.619	0.581	0.225
31	2251.99	0.01	0.191	0.539	0.063	0.209	0.535	0.808	0.269
32	2579.34	0.02	0.318	0.825	0.043	-0.001	0.015	0.035	-0.006

## CONCLUSIONS

Изучение суточных и сезонных изменений количественного и качественного состава фенольных соединений в листьях двух видов травянистых лекарственных растений: манжетки городковой *Alchemilla subcrenata* и вероники дубравной *Veronica chamaedrys* выявило, на наш взгляд, существенные особенности содержания фенольных соединений и флавоноидов в зависимости от сроков сбора лекарственного сырья и времени суток.

## ACKNOWLEDGMENT

Работа выполнена при поддержке Интеграционной программы «Фундаментальные исследования и прорывные технологии как основа

опережающего развития Байкальского региона и его межрегиональных связей».

## REFERENCES

- Pell E.J. (1984) Secondary metabolism and air pollutants. In: Gaseous air pollutants and plant metabolism, Koziot M.J., Wrattley F.R. (ed.) Butterworths: London, 222-237.
- Shaldaev T.M. (2009) Soderzhanie flavonoidov v prirodnyh populjazijah *Artemisia absinthium* L., proizrastajushchej v lesostepnoj zone zapadnoj Sibiri. *Himija rastitel'nogo syrja*, **2**, 169-170.
- Zaprometov M.N. (1971) Fenolnye soedinenija i metody ih issledovanija. In: Biohimicheskie metody v fiziologii rastenii, pod red. Pavlinoj O.A. M.: Nauka, 185-197.