

**ОСОБЕННОСТИ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА
ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МОЖЖЕВЕЛЬНИКА ВЫСОКОГО (*JUNIPERUS
EXCELSA* VIEB.) И МОЖЖЕВЕЛЬНИКА КОЛЮЧЕГО (*JUNIPERUS OXYCEDRUS* L.),
ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА ЮЖНОМ БЕРЕГУ КРЫМА**

А.Е. ПАЛИЙ, кандидат биологических наук;

Е.С. КРАЙНЮК, кандидат биологических наук

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Род можжевельник (*Juniperus* L.) относится к семейству кипарисовых (*Cupressaceae* Neger.), одному из самых больших семейств голосеменных растений. Можжевельники светолюбивы, засухоустойчивы и нетребовательны к почвенным условиям. Благодаря мощной корневой системе они имеют большое водоохранное, водорегулирующее и почвозащитное значение. На Южном берегу Крыма наиболее распространены *Juniperus excelsa* Bieb. – можжевельник высокий и *J. oxycedrus* L. – можжевельник колючий. Ароматные шишкоягоды можжевельников содержат до 5% эфирных масел и используются для получения пряно-ароматического сырья в пищевой промышленности [3]. Эфирными маслами, обеспечивающими фитонцидное действие можжевельников, богаты не только шишкоягоды, но и хвоя, побеги и древесина можжевельников. Эфирные масла достаточно хорошо изучены, известен их состав, способы выделения и фармакологические свойства. В литературе также встречаются сведения о других биологически активных веществах можжевельников, в том числе и фенольных соединениях. В частности, из хвои можжевельника казацкого (*Juniperus sabina*) выделены и идентифицированы производные кумарина [15]. Однако практически отсутствуют сведения о фенольных соединениях крымских представителей можжевельника высокого и можжевельника колючего. Многими авторами показано, что фенольные вещества имеют отношение к росту, развитию, холодостойкости, устойчивости к вредным излучениям, дыханию и фотосинтезу, т. е. почти ко всем жизненным процессам растений [1, 6, 9]. Значение фенольных веществ как группы соединений, играющих важную роль в адаптивных реакциях растений, в фитоиммунологии общепризнано.

Одна из наиболее распространенных в природе групп фенольных соединений – флавоноиды. Наличие фенольных гидроксильных групп обуславливает кислые свойства флавоноидов и их способность к образованию фенолятов в щелочной среде, кроме того, благодаря фенольным гидроксилам они легко окисляются [14]. Присутствие в молекулах флавоноидных соединений двух или более бензольных колец в значительной мере определяет такие их свойства, как поглощение света определенной длины волн. Система сопряженных двойных и одинарных связей в А- и В-кольцах облегчает делокализацию электронов и обуславливает то, что основная масса растительных полифенолов является красителями или пигментами [2, 5].

Обладая сравнительно низкой токсичностью и избирательным фармакологическим действием, флавоноидные соединения и растения их содержащие широко используются для создания новых лекарственных препаратов [7]. В связи с этим изучение фенольных соединений крымских можжевельников представляет определенный научный интерес.

Целью наших исследований явилось установление особенностей качественного и количественного состава фенольных соединений в побегах и шишкоягодах *Juniperus excelsa* Bieb. и *J. oxycedrus* L. на разных стадиях их развития.

Материалы и методы

Объектами исследований избраны виды: можжевельник высокий *Juniperus excelsa* Bieb. и можжевельник колючий *Juniperus oxycedrus* L. Образцы растений отбирали на территории НБС–ННЦ ежемесячно. Содержание суммарной фракции фенольных соединений определяли колориметрически, используя реактив Фолина-Чиокалтео. Количественное определение суммы флавоноидов в сухом экстракте осуществляли, используя спектрофотометрический

метод (растворитель этанол) в присутствии комплексообразующей добавки – 10%-ного спиртового раствора хлорида алюминия. В качестве стандарта использовали рутин. Регистрацию спектров проводили при длине волны 410 нм [13].

Для изучения компонентного состава использовали бумажную хроматографию. Разделение фенольных веществ проводили в системах растворителей: н-бутанол – уксусная – кислота – вода (4:1:5). Экстракцию фенольных соединений из воздушно-сухого растительного материала осуществляли горячим 70%-ным этиловым спиртом (гидромодуль 7,0). Полученный экстракт упаривали и наносили на бумагу марки «Filtrak» №11. Фенольные соединения на хроматограммах определяли по окраске при дневном и УФ-свете с парами аммиака и без них, а также по реакциям с рядом специфических проявителей – диазотированной сульфаниловой кислотой, 1%-ным спиртовым раствором хлорида железа (III), 1%-ным спиртовым раствором хлорида алюминия и др. [9].

Экстракты для определения биологической активности фенольных соединений шишкоягод и побегов двух изучаемых видов готовили следующим образом. Растительное сырье, отобранное в период максимального содержания общих фенольных соединений, последовательно обрабатывали гексаном и 80%-ным этиловым спиртом (гидромодуль 15,0; длительность настаивания 24 ч). Спиртовый экстракт упаривали до водной фазы, которую обрабатывали эфиром, этилацетатом и бутанолом. Эфирные экстракты содержат кумарины и фенольные кислоты; этилацетатные – следовые количества флавоноидов и фенольных кислот; бутанольные – флавоноиды. Ростингибирующую активность экстрактов определяли методом биологических тестов [10], используя в качестве тест объектов, семена редиса сорт Рубин и кресс-салата. В чашки Петри вносили экстракт соответствующий 1 г сухого вещества. Контролем служила дистиллированная вода. Повторность опытов-трехкратная.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия Стьюдента, вероятными считали изменения, где $P < 0,05$ [8]. Основные статистические расчеты проводили с использованием программ *Microsoft Excel* и *Statistica*.

Результаты и обсуждение

Установлено, что в побегах и шишкоягодах можжевельника высокого присутствует четыре компонента фенольной природы (табл. 1).

По данным хроматографического анализа и качественных реакций, среди веществ фенольной природы в побегах можжевельника высокого выявлены две фенольные кислоты и два флавоноида. В шишкоягодах данного вида обнаружены те же фенольные кислоты, кумарин и флавоноид.

В составе фенольных соединений побегов мужских растений можжевельника колючего определено семь компонентов, в побегах женских – пять, в шишкоягодах – четыре (табл. 2).

В побегах мужских растений выявлены: флавоон, два флавонола, две фенольные кислоты, халкон и кумарин. В побегах женских растений и шишкоягодах присутствовали: флавоон, флавонол, фенольная кислота, кумарин. Халкон, присутствующий в побегах женских и мужских растений можжевельника колючего, в его шишкоягодах не обнаружен.

Определено процентное содержание флавоноидов в сухих экстрактах из побегов и шишкоягод изучаемых можжевельников. Установлено, что шишкоягоды можжевельника высокого содержат 0,7% флавоноидов в пересчете на сухой вес, побеги – 2,7%. Шишкоягоды можжевельника колючего – 1,8% веществ флавоноидной природы, побеги женских растений – 2,6%, мужских – 1,5%.

Таблица 1

Качественные реакции фенольных соединений можжевельника высокого

Компонент	R _f	Видимый свет	Уф-свет		ДСК*	Хлористый цирконил	Цианидиновая проба	Идентифицировано по окраске
			Без паров NH ₃	С парами NH ₃				
шишкоягоды								
A	0,68	Б/ц	Г	Г	О/к	Б/ц	—	фенольная кислота
B	0,63	Б/ц	Г	Ж	К	Б/ц	—	кумарин
C	0,46	Б/ц	Г	З	О	Б/ц	—	фенольная кислота
D	0,19	Б/ж	Ж	Ж	О/к	Ж/з	+	флавонол
побеги								
A'	0,68	Б/ц	Г	Г	О/к	Б/ц	—	фенольная кислота
C'	0,46	Б/ц	Г	З	О	Б/ц	—	фенольная кислота
D'	0,19	Б/ж	Ж	Ж	О/к	Ж/з	+	флавонол
E'	0,09	Б/ж	Ж	Ж	О/к	Ж/з	+	флавонол

Примечание: Б/ц – бесцветный, Ж – желтый, Б/ж – бледно-желтый, Ж/з – желто-зеленый, Г – голубой, З – зеленый, О – оранжевый, О/к – оранжево-красный, ДСК – диазотированная сульфониловая кислота.

Таблица 2

Качественные реакции фенольных соединений можжевельника колючего

Компонент	R _f	Видимый свет	Уф-свет		ДСК	Хлористый цирконил	Цианидиновая проба	Идентифицировано по окраске
			Без паров NH ₃	С парами NH ₃				
шишкоягоды								
A ₁	0,62	Б/ц	Г	Ж	К	Б/ц	—	кумарин
B ₁	0,58	Б/ц	Г	Г	О/к	Б/ц	—	фенольная кислота
E ₁	0,33	Б/ж	Кор	З	О/к	Ж	+	флавонол
H ₁	0,04	Б/ж	Ж	Ж	О/к	Ж/з	+	флавонол
побеги женских растений								
A ₁ '	0,62	Б/ц	Г	Ж	К	Б/ц	—	кумарин
B ₁ '	0,58	Б/ц	Г	Г	О/к	Б/ц	—	фенольная кислота
C ₁ '	0,53	Ж	Кор	К	Ж	Ж	+	халкон
D ₁ '	0,44	Б/ц	Г	З	О	Б/ц	—	фенольная кислота
H ₁ '	0,04	Б/ж	Ж	Ж	О/к	Ж/з	+	флавонол
побеги мужских растений								
A ₂	0,62	Б/ц	Г	Ж	К	Б/ц	—	кумарин
B ₂	0,58	Б/ц	Г	Г	О/к	Б/ц	—	фенольная кислота
C ₂	0,53	Ж	Кор	К	Ж	Ж	+	халкон
D ₂	0,44	Б/ц	Г	З	О	Б/ц	—	фенольная кислота
E ₂	0,33	Б/ж	Кор	З	О/к	Ж	+	флавонол
F ₂	0,20	Б/ж	Ж	Ж	О/к	Ж/з	+	флавонол
G ₂	0,10	Б/ж	Ж	Ж	О/к	Ж/з	+	флавонол

Примечание: Б/ц – бесцветный, Ж – желтый, Б/ж – бледно-желтый, Ж/з – желто-зеленый, Г – голубой, З – зеленый, О – оранжевый, О/к – оранжево-красный, Кор – коричневый, К – красный

Далее было изучено изменение концентрации суммарных фракций фенольных соединений в побегах и шишкочьягодах можжевельника высокого и можжевельника колючего в годичном цикле.

Изменение концентрации суммы фенольных соединений при созревании шишкочьягод можжевельника высокого и можжевельника колючего характеризовалось рядом особенностей. Опыление семяпочек женских шишек можжевельника высокого происходит в январе – марте. С момента опыления до полного созревания семян у этого вида проходит 19-21 месяц. Опыление у можжевельника колючего происходит в мае, а до полного созревания семян проходит 30 месяцев.

При анализе динамики накопления фенольных соединений в побегах и шишкочьягодах можжевельника высокого и можжевельника колючего в течение вегетации установлено, что шишкочьягоды можжевельника высокого накапливали фенольные соединения в более высоких концентрациях (рис. 1).



Рис. 1. Изменение концентрации суммарной фракции фенольных соединений в шишкочьягодах можжевельника высокого

Максимум накопления веществ фенольной природы приходится на 11-й месяц созревания – период формирования зародыша и семени и составляет 52 мг/г сухого вещества. Далее концентрация снижается до 32 мг/г и в полностью созревших шишкочьягодах она составляет 24 мг/г.

Наиболее высокое содержание веществ фенольной природы в шишкочьягодах можжевельника колючего отмечено на начальных этапах формирования семян – 3 месяц созревания (рис. 2).

В полностью созревших шишкочьягодах содержится 7 мг/г фенольных соединений. Максимальное содержание фенольных соединений в шишкочьягодах можжевельника высокого и можжевельника колючего приходится на период формирования семян и по мере их созревания концентрация фенолов снижается.

В побегах можжевельника высокого максимальной концентрации фенольные соединения достигают в период дифференциации мужских репродуктивных органов в июне-августе - 66 мг/г; минимальной – на начальных этапах формирования семян – 22 мг/г сухого вещества (рис. 3).

В отличие от можжевельника высокого, который является однодомным видом, можжевельник колючий – растение двудомное. Побеги мужских растений можжевельника колючего накапливают до 41 мг/г сухого вещества фенольных соединений – это период окончания роста вегетативных побегов – август-месяц. Побеги женских растений м. колючего – до 47 мг/г (формирование зародыша и семени – июль) (рис. 4).

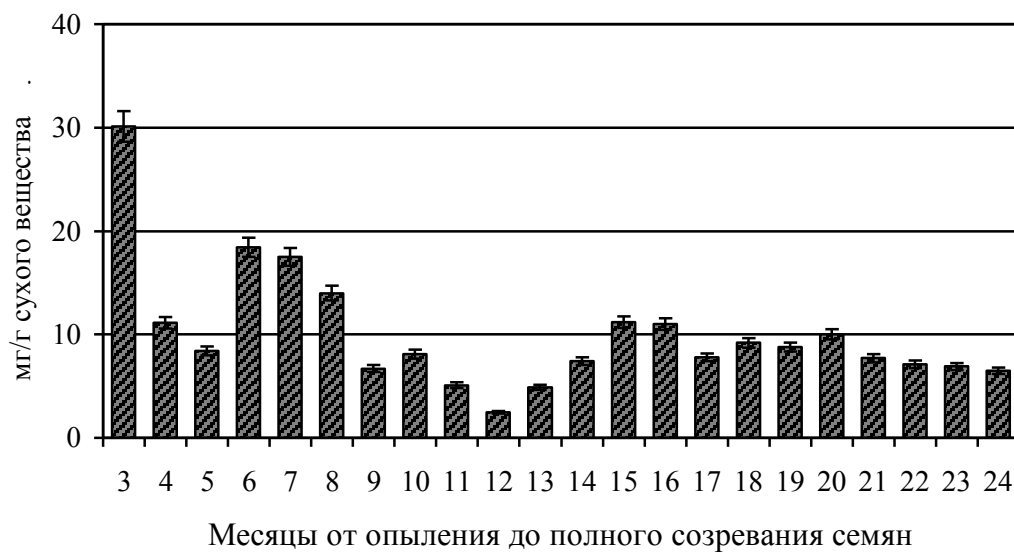


Рис. 2. Изменение концентрации суммарной фракции фенольных соединений в шишкоягодах можжевельника колючего

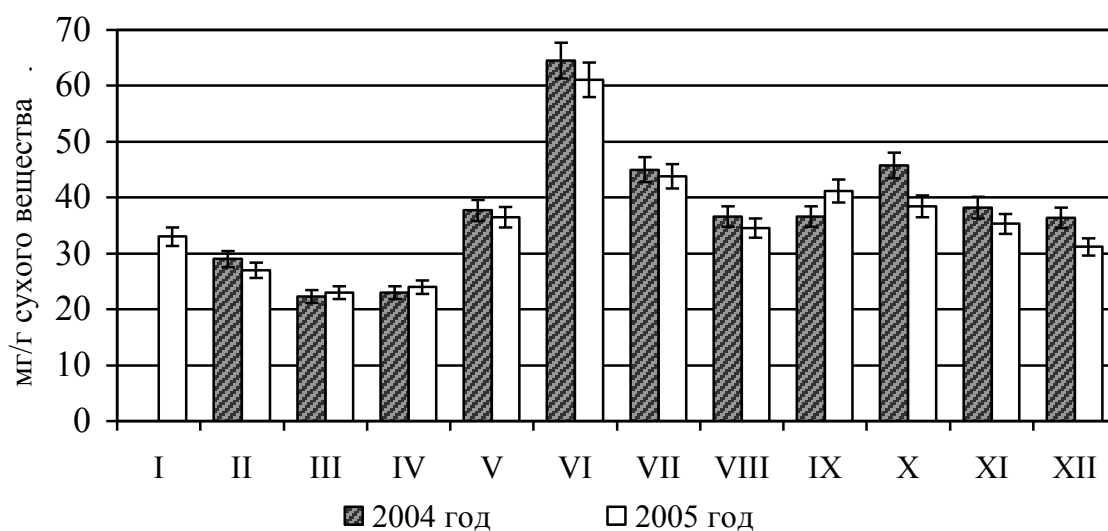


Рис. 3. Изменение концентрации суммарной фракции фенольных соединений в побегах можжевельника высокого в годичном цикле

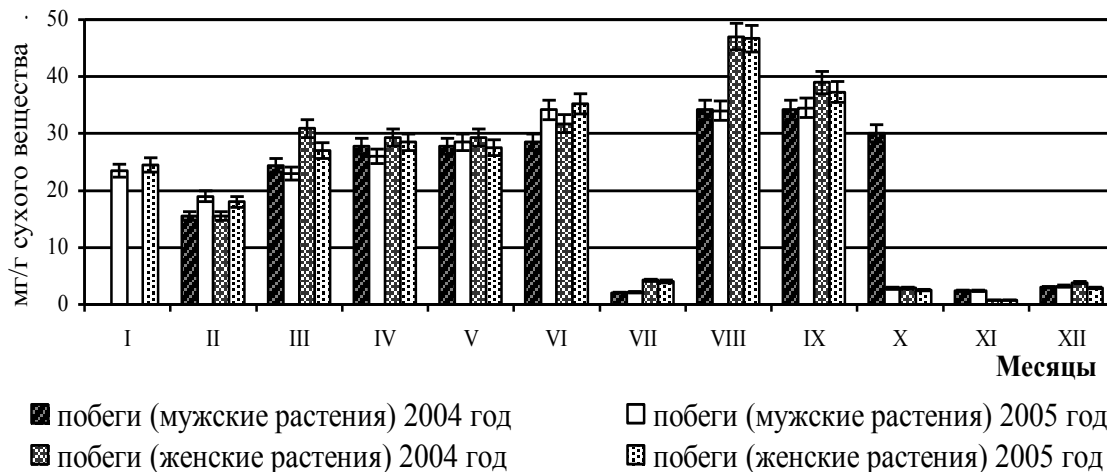


Рис. 4. Изменение концентрации суммарной фракции фенольных соединений в побегах можжевельника колючего в годичном цикле

Полученные результаты согласуются с литературными данными. По мнению большинства авторов, регулятором синтеза и накопления фенольных веществ являются солнечный свет и продолжительность светового дня. Физиологическая роль фенольных соединений состоит в изменении интенсивности ростовых процессов в зависимости от времени суток, сезона года, наступления засухи и т. п. [4, 11]. Очень часто, в зависимости от концентрации, одно и то же вещество фенольной природы может либо усиливать, либо тормозить рост растения. В роли ингибиторов ростовых процессов, как правило, выступают фенольные соединения с *орто*- и *пара*-расположением гидроксиллов (т. е. склонные к обратимому окислению в хиноны), тогда как *м*-фенолы, неспособные к такому превращению, стимулируют рост [1, 12]. Неодинаковое распределение данных веществ в побегах и шишкоягодах можжевельников, по-видимому, представляет приспособительную особенность изучаемых растений к осуществлению разными органами свойственных им функций.

В результате исследования действия экстрактов из побегов и шишкоягод можжевельников на прорастание семян тест-объектов установлено, что все исследуемые экстракты обладают ингибирующим действием на прорастание семян редиса и кресс-салата (табл. 3 и 4).

Таблица 3

Влияние экстрактов из плодов и побегов можжевельника высокого на прорастание семян редиса и кресс-салата

Орган растения	Исследуемый экстракт	Проросшие семена, % относительно контроля			
		редиса		кресс-салата	
		24 ч	48ч	24ч	48ч
шишкоягоды	этанольный	45,3	46,8	17,7	29,8
	эфирный	26,0	20,3	11,5	12,8
	этилацетатный	50,7	70,2	95,6	97,3
	бутанольный	56,6	69,9	6,8	5,5
побеги	этанольный	36,2	37,4	14,2	10,4
	эфирный	20,8	16,2	9,2	10,4
	этилацетатный	40,5	56,2	77,3	77,9
	бутанольный	45,3	56,0	6,9	5,4

Таблица 4

Влияние экстрактов из плодов и побегов можжевельника колючего на прорастание семян редиса и кресс-салата

Орган растения	Исследуемый экстракт	Проросшие семена, % относительно контроля			
		редиса		кресс-салата	
		24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
шишкоягоды	этанольный	38,5	39,4	19,2	27,8
	эфирный	19,0	15,2	22,5	15,7
	этилацетатный	58,3	64,5	98,4	96,3
	бутанольный	61,3	68,4	5,4	4,7
побеги	этанольный	30,8	31,5	15,4	22,4
	эфирный	15,2	12,1	18,3	12,6
	этилацетатный	46,6	51,6	78,7	87,3
	бутанольный	48,7	55,1	6,4	5,6

Низкой активностью обладали этилацетатные экстракты побегов и шишкоягод двух видов можжевельника – до 98% проросших семян кресс-салата относительно контроля и до 70% проросших семян редиса. Наибольшее подавление прорастания семян редиса вызывали эфирные экстракты.

Максимум отмечен для эфирного экстракта из побегов м. колючего- 12% проросших семян. Причем, в течение эксперимента процент по сравнению с контролем проросших семян уменьшался. Довольно высокая активность обнаружена также у этанольного экстракта. Экстракты из побегов можжевельника высокого и можжевельника колючего в среднем на 20% активнее подавляли всхожесть семян редиса, чем экстракты из шишкоягод.

Прорастание семян кресс-салата в большей степени угнетали бутанольные фракции как из побегов, так и из шишкоягод двух изучаемых видов; максимум выявлен для шишкоягод можжевельника колючего – 4,7% проросших семян.

Выводы

1. У двух изучаемых видов накопление фенольных соединений в побегах приходится на период активных митотических делений при формировании мужских и женских репродуктивных органов на побегах прироста текущего года, а в шишкоягодах – на период формирования зародыша.

2. Можжевельник колючий имеет более широкий компонентный состав фенольных соединений, чем можжевельник высокий. При изучении качественного состава фенольных соединений можжевельника высокого и можжевельника колючего выявлено, что в побегах и шишкоягодах можжевельника высокого присутствует четыре соединения фенольной природы (кумарин, фенольные кислоты и флавоноид). Мужские и женские растения можжевельника колючего отличались по составу фенольных соединений. В побегах и шишкоягодах женских растений можжевельника колючего обнаружено пять полифенолов (халкон, фенольные кислоты и флавоноидные гликозиды). В побегах мужских растений выявлены семь компонентов (кумарин и флавоноиды).

3. Экстракты из плодов и шишкоягод можжевельника высокого и можжевельника колючего, содержащие фенольные соединения, проявляют ростиингибирующее действие.

Список литературы

1. Барабой В.А. Биологическое действие растительных фенольных соединений. – К.: Наукова думка, 1976. – 162 с.
2. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. – Новосибирск: Наука, 1990. – 333 с.
3. Горяев М.И. Химия можжевельников. – Алма-Ата: Наука, 1969. – 256 с.
4. Запрометов М. Н. Фенольные соединения растений: Биосинтез, превращения и функции / Новые направления в физиологии растений. М.: Наука, 1985. – 288 с.
5. Кабиев О.К. Балмуханов С.Б. Природные фенолы – перспективный класс противоопухолевых и радиопотенцирующих соединений. – М.: Медицина, 1975. – 189 с.
6. Колесников П.А. Фенольные вещества в биологических окислительно-восстановительных системах / Фенольные соединения и их биологические функции. – М.: Наука, 1968. – С. 139 – 145.
7. Машковский М.Д. Основные лекарственные средства: В двух книгах. – Харьков: Фолио, 1999. – Кн. 1. – 560 с.
8. Менчер Э.М., Земшман А.Я. Основы планирования эксперимента с элементами математической статистики в исследованиях по виноградарству. – Кишинев: Штиинца, 1986. – 238 с.
9. Методичні вказівки з фармакогнозії / За ред. В.М. Ковальова і Н.М. Солодовніченко. – Харків: УкрФА, 1993. – 156 с.
10. Методы определения фитогормонов и фенолов в семенах. / Под ред. М.А. Николаевой. – Л.: Наука, 1979. – 78 с.

11. Минаева В. Г. Флавоноиды в онтогенезе растений и их практическое использование. – Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1978. – 256 с.
12. Рубин Б. А., Арциховская Е. В., Аксенова В. А. Биохимия и физиология иммунитета растений. – М.: Наука, 1975. – 320 с.
13. Чемесова И.И., Чубарова С.Л., Саканян Е.И., Котовский Б.К., Чижиков Д.В. Спектрофотометрический метод количественного определения содержания полифенолов в сухом экстракте из надземной части *Melilotus officinalis* (L.) Pall. и в его лекарственной форме // Растит. ресурсы. – 2000. – Т. 36, Вып. 1. – С. 86–91.
14. Чумбалов Т. К. Химия флавоноидов / Фенольные соединения и их биологические функции. – М.: Наука, 1968. – С. 27–36.
15. Cumarins and related compounds from *Juniperus sabina* / San Feliciano A., Miguel J.M., Gordaliza M., Castro M.A. // Fitopherapia. – 1991. – Vol. LXII, № 5. – P. 435-439.

Peculiarities of qualitative and quantitative composition of phenol compounds in *Juniperus excelsa* Bieb. and *J. oxycedrus* L. which grow on the South coast of Crimea

Paliy A.E., Kraynuk E.S.

The dynamics of transformation of the total fraction of phenol compounds in the shoots and cones of *Juniperus excelsa* Bieb. and *J. oxycedrus* L. were investigated. It was determined that *J. excelsa* has more wider component composition of phenol substances than *J. oxycedrus*. The concentration of flavonoids in the shoots and fruits of these species of *Juniperus* was studied.