

УДК 615.322:582. 579.2:581.192

## ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ СЫРЬЕ *IRIS SIBIRICA* L. И РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИХ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

© Л.В. Щербакова<sup>1</sup>\*, Л.И. Тихомирова<sup>1</sup>, Д.А. Карпицкий<sup>1</sup>, Ю.Ц. Мартиросян<sup>2</sup>, Б.К. Ескалиева<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Алтайский государственный университет, пр. Ленина, 61, Барнаул, 656049 (Россия), e-mail: l.v.sch.1970@mail.ru

<sup>2</sup> ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, ул. Тимирязевская, 42, Москва, 127422 (Россия)

<sup>3</sup> Казахский национальный университет им. аль-Фараби, пр. аль-Фараби, 71, Алматы, 050040 (Республика Казахстан), e-mail: balakyz@mail.ru

Выявление научных закономерностей накопления физиологически активных соединений относится к актуальным вопросам биологии растений, поскольку может создать условия для бурного развития биотехнологических подходов и решения ряда экологических и экономических проблем, связанных с использованием растительного сырья. Целью данной работы являлось изучение особенностей накопления флавоноидов и разработка методики дифференциальной спектрофотометрии, позволяющей проводить оценку качества биотехнологического сырья *Iris sibirica* L. (Ириса сибирского) по содержанию суммы флавоноидов.

К наиболее значимым регуляторам синтеза вторичных соединений в тканевых культурах растений относятся такие компоненты питательных сред, как гормоны. В результате наших исследований отмечено, что для *I. sibirica* наблюдается зависимость между накоплением биомассы и содержанием кверцетина и рутина. На среде с 5.0 мкМ БАП, дополненной ауксинами, при нарастании общей высоты побегов содержание кверцетина и рутина в фитомассе резко уменьшалось. Для поддержания баланса между накоплением биомассы и содержанием флавоноидов для *I. sibirica* мы рекомендуем использовать среды с 2.5 мкМ БАП, дополненные ауксинами.

Разработанная методика позволяет определить содержание суммы флавоноидов в сырье *Iris sibirica* в присутствии других соединений, проста в исполнении и не требует дорогостоящей аппаратуры. А проведенная валидационная оценка методики свидетельствует о ее пригодности для контроля качества биотехнологического сырья *I. sibirica*.

**Ключевые слова:** *I. sibirica* L., лекарственные растения, культура ткани, вторичные метаболиты, растения-регенеранты, аэропонные технологии.

### Введение

---

Щербакова Людмила Владимировна – кандидат химических наук, доцент кафедры техносферной безопасности и аналитической химии, e-mail: l.v.sch.1970@mail.ru

Тихомирова Людмила Ивановна – кандидат биологических наук, заведующая отделом биотехнологии растений ЮСБС АлтГУ, e-mail: l-tichomirova@yandex.ru

Карпицкий Дмитрий Алексеевич – студент, e-mail: karpickiy\_dim@mail.ru

Мартиросян Юрий Цатурович – кандидат биологических наук, руководитель группы аэропонных установок, e-mail: yumart@yandex.ru

Ескалиева Балакыз Кымызгалиевна – кандидат химических наук, доцент кафедры химии и технологии органических веществ, природных соединений и полимеров, e-mail: balakyz@mail.ru

Флавоноиды широко распространены в природе, их содержат почти все высшие растения. Это самый обширный класс фенольных соединений вторичных метаболитов, которые аккумулируются в разных частях растений, но чаще в надземных: цветках, листьях, плодах. В меньшем количестве они содержатся в стеблях и подземных органах. Флавоноиды могут присутствовать в растениях, как в свободном, так и в связанном виде. Наиболее часто из представителей рассматриваемого класса в растительном сырье встречаются флавонолы. Молекулы флавонолов представлены как агликонами, так и разнообразными формами гликозидов, в которых гликозидная

---

\* Автор, с которым следует вести переписку.

часть прикреплена к атому кислорода, преимущественно в положениях 3, 7, 3', 4'. Флавонолы образуют огромное число разнообразных гликозидов. Кверцетин и его гликозид рутин являются одними из наиболее известных и хорошо изученных флавонолов [1–9].

В клетках животных и человека флавоноиды не синтезируются, и присутствие флавоноидов в тканях полностью зависит от потребления в пищу растительных продуктов. В связи с перспективами использования этих веществ в медицине в настоящее время наблюдается значительный рост интереса к исследованию действия флавоноидов на организм человека. Описание флавоноидов присутствует в большинстве работ, в которых проводится анализ химического состава растений традиционной медицины. Именно присутствием определенных флавоноидов часто объясняют лечебные свойства некоторых растений. Широка терапевтического действия, присущая как индивидуальным веществам флавоноидной структуры, так и их смесям, позволила создать большое количество лекарственных препаратов на их основе. Известно, что флавоноиды оказывают антиоксидантное и капилляроукрепляющее действие, а также входят в группу витамина P [11–15].

Род *Iris* L. представлен лекарственными и декоративными многолетними растениями, синтезирующими широкий спектр биологически активных веществ. В настоящее время описаны клеточные культуры *I. ensata* и *I. germanica*, биосинтезирующие полифенольные метаболиты. Группой немецких ученых была получена клеточная культура *I. pseudacorus*, являющаяся источником вторичных метаболитов класса терпеноидов. Флавоны в видах рода *Iris* преимущественно находятся в форме 6-С-гликозидов. Так, изоориентин и изовитексин обнаружены в растениях подрода *Limniris* (*Iris rossii*, *Iris ensata*) и *Iris* (*I. pseudopumila*, *I. albicans*) [16–21].

Биотехнологическое растительное сырье – альтернативный источник получения биологически активных и «экологически чистых» веществ, поскольку в нем синтезируются биологически активные вещества (БАВ), присущие intactными растениям. Содержание их может отличаться, что является хорошей предпосылкой для разработки технологий направленного биосинтеза ценных биологически активных соединений [22–30].

Цель данной работы – изучение особенностей накопления флавоноидов и разработка методики дифференциальной спектрофотометрии для оценки качества биотехнологического сырья *Iris sibirica* L. (Ириса сибирского) по содержанию суммы флавоноидов.

### Экспериментальная часть

*Растительный материал.* В качестве объектов исследования использовали растительное сырье *I. sibirica* сорт Стерх. Растения, размноженные микроклонально (растения-регенеранты), далее выращивали в условиях аэропоники в отделе биотехнологии растений Алтайского государственного университета («Ириса сибирского трава аэропонная» и «Ириса сибирского корневища и корни аэропонные») [31]. Intactные 6-летние растения заготавливали в окрестностях г. Новоалтайска Алтайского края в 2015 г.

Цветки ириса брали в фазе бутонизации. Части трубки околоцветника и цветоножки делили на фрагменты размером не более 3×3 мм и помещали на питательные среды. Питательные среды готовили по прописи MS (Мурасиге и Скуга), содержащей 30 г/л сахарозы. В них вводили фитогормоны: 3 мкМ НУК ( $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты) в сочетании с 8 мкМ БАП (6-бензиламинопурин). pH среды доводили до 5.8–5.9 и добавляли 0.6% агара. Среды разливали в пластиковые контейнеры (по 30 мл) или в культуральные флаконы (по 10 мл). Автоклавировали приготовленные питательные среды в течение 20 мин при 120 С. Экспланты культивировали в условиях фотопериода 16/8 часов свет/темнота при 24–26 С.

*Получение биотехнологического сырья представителей рода Iris L.* осуществляли в два этапа.

*1 этап (получение растений-регенерантов).* При микроразмножении *Iris sibirica* L. использовали питательные среды, содержащие 2.5; 5.0; 7.5; 10.0 мкМ БАП, а также среды, содержащие такое же количество цитокинина, дополненные ауксинами 1.0 мкМ НУК и 0.1 мкМ ИМК (индолил-3-масляная кислота). Культивировали микропобеги по следующей схеме: пассажи с чередованием сред с высокой концентрацией цитокинина и низкой (1 мкМ БАП). В среды с низкой концентрацией БАП добавляли 100 мг/л L-глутамина и аденин сульфата. В качестве контроля использована питательная среда, содержащая 1 мкМ БАП.

Определяли число образовавшихся микропобегов и высоту растения. Умножая эти показатели, получали общую высоту растения (табл. 1).

Укоренение проводили на питательной среде MS, дополненной 3 мкМ НУК. Способность к укоренению на данной среде составляла 100%.

Таблица 1. Влияние гормонального состава питательных сред на геммогенез у *Iris sibirica* сорт Стерх

Содержание БАП, мкМ	Длина побега		Коэффициент размножения		Общая длина побега, мм
	Среднее арифметическое, шт.	Стандартное отклонение	Среднее арифметическое, шт.	Стандартное отклонение	
1.0 (контроль)	84±12	44	2.2±0.3	0.36	184.8
2.5	81±8	35	2.4±0.5	0.70	196.3
2.5+A	59±8	31	3.0±0.6	0.82	176.1
5.0	45±5	21	4±1	1.4	165.4
5.0+A	82±13	33	3.0±0.6	0.71	246.9*
7.5	60±8	42	3.3±0.7	0.90	192.3
7.5+A	81±6	39	3.0±0.7	0.86	243.6*
10.0	89±7	46	2.8±0.7	0.84	250.5*
10.0+A	83±8	45	3.3±0.9	1.1	272.9*

Примечание: А (ауксины) – 1.0 мкМ НУК+0.1 мкМ ИМК; \* – различия с контролем достоверны при  $P \leq 0.05$ .

2 этап (получение аэропонного сырья). Выращивали сырье в условиях аэропоники. В работе была использована трехъярусная универсальная аэропонная установка, разработанная в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (Ю.Ц. Мартиросян). Установка построена по принципу модульности и может быть использована для научно-исследовательских работ по селекции картофеля, а также для размножения и выращивания других сельскохозяйственных и лекарственных растений [32].

*Методы исследования.* Воздушно-сухую аналитическую пробу растительного сырья измельчали до размеров частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 1 мм. Около 1 г (точная навеска) сырья помещали в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, приливали 30 мл 70% этилового спирта, нагревали до кипения и кипятили в течение 30 мин. Затем полученный экстракт фильтровали через беззольный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Отфильтрованное сырье подвергали повторной экстракции: первый раз – с нагреванием, второй раз – без нагревания. Объединенное извлечение разбавляли до метки 70% этиловым спиртом.

Аликвоту полученного раствора переносили в мерную пробирку, прибавляли 1 мл 70% этилового спирта, 0.1 мл 10% водного раствора хлорида алюминия, 0.1 мл ацетатной буферной смеси с pH 5.8 и разбавляли дистиллированной водой до отметки 5 мл. Смесь инкубировали в течение 30 мин, затем измеряли оптическую плотность относительно 10% водного раствора хлорида алюминия при длине волны 400 нм на фотоколориметре КФК-2.

В качестве стандарта использовали раствор кверцетина (степень чистоты «хч») в 70% этиловом спирте.

Для построения градуировочного графика серию алиquot с установленным шагом помещали в мерные пробирки, прибавляли в каждую 1 мл этилового спирта 70%, 0.1 мл 10% раствора хлорида алюминия, 0.1 мл ацетатной буферной смеси с pH 5.8, разбавляли дистиллированную воду до отметки 5 мл. Смеси инкубировали в течение 30 мин, затем измеряли оптическую плотность относительно 10% водного раствора хлорида алюминия при длине волны 400 нм.

Расчет содержания производили путем пересчета оптической плотности отдельных алиquot экстракта на концентрацию согласно градуировочному графику для раствора кверцетина по следующей формуле:

$$\omega = \frac{C_{\text{кверц.}} \cdot 1000}{m_{\text{нав}} \cdot V_a},$$

где  $\omega$  – содержание по массе в воздушно-сухом сырье, %;  $C_{\text{кверц.}}$  – содержание флавоноидов в пересчете на кверцетин, мг/5 мл;  $m_{\text{нав}}$  – масса навески для анализа, мг;  $V_a$  – объем алиquotы экстракта, мл.

Определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин проводили в соответствии с рекомендациями Д.А. Коновалова и Д.С. Коноваловой [31].

*Статистическая обработка.* Все измерения проведены не менее чем в трехкратной повторности. Количественные результаты исследований были подвергнуты статистической обработке. Статистическую значимость различий в сравниваемых выборках оценивали при помощи t-критерия Стьюдента, статистически достоверными считали различия при  $p \leq 0.05$ . Накопление базы данных и ее информационно-аналитическую переработку, вычислительные операции и графическое изображение результатов исследований осуществляли на компьютере с использованием электронных таблиц Microsoft Excel 2010 для Windows 7.

### Результаты и обсуждение

Сотрудники отдела биотехнологии растений Алтайского государственного университета совместно с ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии (Ю.Ц. Мартиросян) впервые получили биотехнологическое сырье: «Ириса сибирского трава аэропонная» и «Ириса сибирского корневища и корни аэропонные». В биохимическом плане данное сырье не изучено.

За 6 месяцев выращивания достигнуты следующие показатели:

длина вегетативной части 1 растения –  $98 \pm 4$  см;

длина корней 1 растения –  $29 \pm 3$  см;

сырая биомасса (листья) 1 растения –  $40 \pm 7$  г;

сырая масса корней 1 растения –  $8.1 \pm 0.2$  г;

содержание сух. веществ в листьях – 18.5% на а.с.в.;

содержание сух. веществ в корнях – 14.3% на а.с.в.;

прирост массы на  $1 \text{ м}^2$  сухого сырья – 0.576 кг.

В результате последовательной экстракции сырья «Ириса сибирского трава аэропонная» в установке типа «Сокслет» растворителями разной полярности установлено, что доминирующей является фракция, извлекаемая 70% этанолом (табл. 2). Спиртом извлекаются полифенольные соединения, в том числе флавоноиды. По нашим данным, 71.9% экстрактивных веществ, извлекаемых 70% этиловым спиртом из сырья «Ириса сибирского трава аэропонная», являются флавоноидами.

Разработка методики количественного определения флавоноидов в траве *I. sibirica* и ее валидация. Одной из задач работы являлась разработка дифференциальной спектрофотометрической методики, позволяющей проводить оценку качества сырья по содержанию флавоноидов. В основе методики количественного определения суммы флавоноидов лежит свойство последних образовывать окрашенный комплекс со спиртовым раствором алюминия хлорида. При этом наблюдается bathochromный сдвиг длинноволновой полосы поглощения в сторону больших длин волн (400 нм). Выбор аналитической длины волны проводили экспериментально. Полоса поглощения характеризуется значением  $\lambda_{\text{max}}$ , т.е. длиной волны, отвечающей максимальной оптической плотности (или максимальному значению  $\epsilon_m$ ).

Градуировочный график для определения суммы флавоноидов фотометрическим методом строили на основании зависимости оптической плотности от концентрации кверцетина в 5 мл раствора (табл. 3). Для построения зависимости использовали растворы в интервале содержания кверцетина 0.01–0.1 мг. Произвели аппроксимацию данных линейной функцией, которая имеет следующий вид:

$$A = 94.5734 \cdot C - 0.023 \quad (R^2 = 0.9992),$$

где  $A$  – оптическая плотность;  $C$  – содержание кверцетина, мг/5мл. По этим данным строили градуировочный график (рис. 1).

Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве *Iris sibirica*, полученного методами биотехнологии.

Проведена валидация методики по показателям: правильность, прецизионность (сходимость и воспроизводимость), линейность.

Определение прецизионности методики проводили на одном образце сырья шести спиртовых экстракций лекарственного сырья (табл. 4).

Относительное стандартное отклонение равно 2.85%, это свидетельствует о том, что методика позволяет получить удовлетворительные по сходимости результаты [33].

Таблица 2. Последовательная экстракция биотехнологического сырья «Ириса сибирского трава аэропонная» в установке типа «Сокслет» растворителями разной полярности

Растворитель	Индекс полярности	Экстрактивные вещества, % на а.с.в.	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин, % на а.с.в.
Гексан	0.10	$3.70 \pm 0.02$	не обнаружено
Хлороформ	4.10	$2.8 \pm 0.1$	не обнаружено
70% этанол	6.07	$6.1 \pm 0.4$	$4.4 \pm 0.2$
H <sub>2</sub> O	10.20	$5.3 \pm 0.2$	$0.52 \pm 0.05$
Сумма		17.9	4.91

Для разработки оптимальных условий методики была установлена область линейной зависимости оптической плотности от концентрации анализируемого вещества (суммы флавоноидов). Определение линейности проводили на 6 уровнях концентраций анализируемого извлечения (рис. 2). Растворы готовили путем разбавления аликвоты и увеличения аликвоты для измерения количественного содержания суммы флавоноидов в сырье.

На рисунке 2 видно, что почти все экспериментальные точки (за исключением пятой), лежат на линии тренда. Следовательно, область линейной зависимости наблюдается при концентрациях 0.0010–0.0070 г/мл. Величина коэффициента корреляции составила 0.99, что считается удовлетворительной корреляцией [33].

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин в растворах, полученных путем добавления точно известного количества кверцетина к анализируемому экстракту (табл. 5).

Критерий приемлемости – средний процент открываемости, скорректированный на 100%, и его средняя величина должна находиться в пределах 97–103% (согласно рекомендациям американской ассоциацией аналитической химии (АОАС) при содержании анализируемого вещества больше 1%) [34]. В разработанной методике средний процент открываемости составил 98.56%, а относительное стандартное отклонение не превышает 2.2%, что соответствует величине RSD, оптимальной для данного метода анализа [33, 34].

Таблица 4. Результаты установления прецизионности на уровне повторяемости (сходимости) валидируемой методики

№	$m_{\text{навески}}, \text{ г}$	$\omega, \%$ (пересчет на сухую массу)	$\bar{\omega}, \%$	$d$ (отклонение от среднего)	$\delta$ (квадратичное отклонение от среднего)	Метрологические характеристики  Среднеквадратичная ошибка среднего $S_x = 0.05$ Стандартное отклонение $\Delta X = 0.14$ $\varepsilon = 2.85\%$
1	1.0001	5.14 4.59 5.09	4.94	-0.17	0.029	
2	1.0007	5.14 4.67 4.56	4.79	-0.01	0.00010	
3	0.9999	5.04 4.75 4.76	4.85	-0.08	0.00064	
4	0.9998	4.64 4.51 4.76	4.64	0.14	0.0196	
5	1.0000	4.44 4.51 5.43	4.79	-0.02	0.00040	
6	1.0006	4.64 4.51 4.76	4.64	0.14	0.0196	
Среднее:			4.78			

Таблица 3. Экспериментальные данные для построения зависимости оптической плотности от содержания кверцетина

Содержание кверцетина, мг/5 мл	Оптическая плотность, отн. ед.
0.010	0.04
0.020	0.095
0.040	0.185
0.060	0.280
0.080	0.385
0.100	0.465

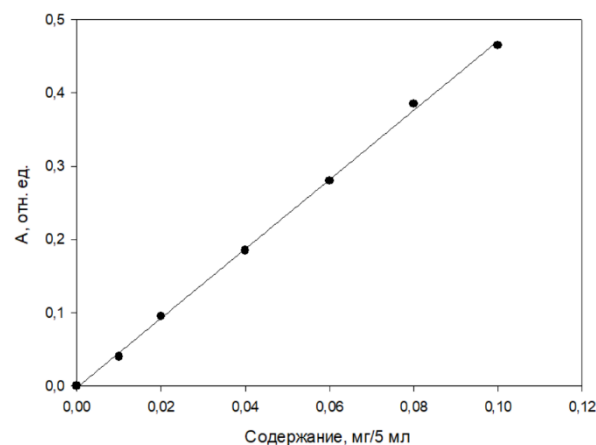


Рис. 1. Зависимость оптической плотности от содержания кверцетина

( $C_{\text{кверцетина(исх.)}} = 0.497 \text{ мг/мл}$ )

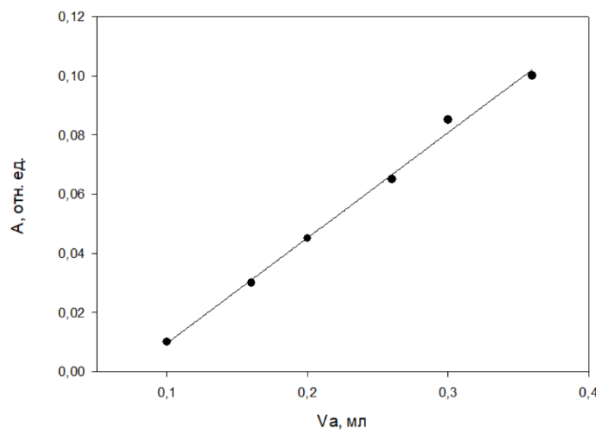


Рис. 2. Зависимость оптической плотности от концентрации флавоноидов в извлечении из травы *I. sibirica*

Таблица 5. Определение правильности методики (результаты опытов с добавками)

Введено, мг	A, отн. ед.	Найдено, мг	R, %	Sr 10 <sup>-2</sup>
0.20	0.0345	0.190	95.0	4.97
0.40	0.0447	0.394	98.5	1.46
0.60	0.0553	0.606	101.0	1.04
0.80	0.0647	0.794	99.3	0.71
1.00	0.0760	1.020	99.0	2.8
			$\bar{R}=98.56\%$	Среднее значение: 2.19

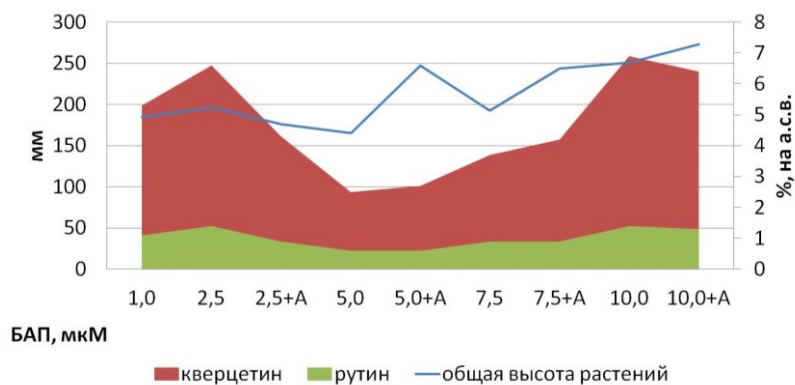
*Особенности накопления флавоноидов в биотехнологическом сырье I. sibirica.* При производстве лекарственного растительного сырья преследуют две цели: получение максимального количества биомассы и накопление биологически активных веществ. При культивировании *I. sibirica* определяли число образовавшихся микропобегов и высоту растения. Умножая эти показатели, получали общую высоту растения. В результате изменения гормонального состава агаровых питательных сред при микроклональном размножении нами отмечено изменение коэффициента размножения и длины побегов и, как следствие, общей длины побегов. Различия с контролем достоверны для питательных сред, содержащих 10.0 мкМ БАП, а также 5.0–10.0 мкМ БАП с ауксинами (табл. 1, рис. 3).

Наши исследования показали, что максимальное накопление биомассы (общей длины побега в мм) определяется при содержании 5.0 мкМ БАП, дополненной ауксинами. На данной питательной среде происходило резкое увеличение показателя за счет коэффициента размножения, который напрямую зависит от концентрации введенного БАП, а также увеличение средней длины побега, стимулятором роста которых является ауксин. Подобранная среда является оптимальной для выращивания *I. sibirica* в течение нескольких лет. Учитывая высокую стоимость фитогормонов, мы рекомендуем для наращивания биомассы *I. sibirica* использовать среду с 5.0 мкМ БАП, дополненную ауксинами.

Уровень эндогенного содержания флавоноидов зависит от генетических характеристик растений, условий выращивания, а также действия экзогенных соединений [25]. Нами было изучено накопление флавоноида кверцетина и его гликозида рутина в биомассе *I. sibirica*. Необходимо отметить резкое снижение синтеза данных флавоноидов на среде с 5.0 мкМ БАП, дополненной ауксинами. По всей видимости, чем активнее растения накапливают биомассу, тем меньше кверцетина и рутина синтезируется.

Как известно из литературы, наибольшее количество флавоноидов накапливается у многих растений в надземной части в фазе бутонизации и цветения [4]. В данный период онтогенеза растение достигло максимальных значений прироста фитомассы и переходит в следующую стадию развития – плодоношения. Растения-регенеранты в культуре ткани постоянно находятся в стадии активного роста под влиянием фитогормонов. Поэтому исследователь стремится подобрать гормональный состав питательной среды таким образом, чтобы обеспечить высокий коэффициент размножения при оптимальной длине побегов. На этом основано микроклональное размножение. Но как видно из представленной диаграммы (рис. 3), при нарастании общей высоты побегов на 5.0+A содержание кверцетина и рутина в фитомассе резко уменьшается. В связи с этим для поддержания баланса между накоплением биомассы и содержанием флавоноидов необходимо для *I. sibirica* использовать среды с 2.5 либо 10.0 мкМ БАП, дополненные ауксинами. Экономичнее использовать 2.5 мкМ БАП.

Рис. 3. Влияние гормонального состава питательных сред на накопление биомассы и суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин и рутин в сырье растений-регенерантов *I. sibirica* сорт Стерх



В траве ранее изученного Ириса сибирского (гибрид *I. sibirica* из селекционного фонда З.В. Долгановой, НИИСС) установлено присутствие флавоноидов: рутина, кверцетина и монозида мирицетина. Определено содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин  $1.9 \pm 0.2\%$  [35]. В наших исследованиях проводилось сравнение содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин и на кверцетин в сырье *I. sibirica* сорт Стерх – в растениях-регенерантах, в аэропонном сырье и интактных растениях. Из полученных данных можно сделать вывод о том, что на накопление суммы флавоноидов влияют не только условия выращивания, но и генотип. По всей видимости, содержание флавоноидов генотип определяет в большей степени (табл. 6).

Таблица 6. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин и на рутин в сырье *I. sibirica*, % на а.с.в.

Вид сырья	Биотехнологическое сырье, сорт Стерх				Традиционное сырье		
	растения-регенеранты		аэропонное сырье		сорт Стерх		[35]
	кверцетин	рутин	кверцетин	рутин	кверцетин	рутин	рутин
Трава	$6.5 \pm 0.2$	$1.30 \pm 0.02$	$4.40 \pm 0.02$	$1.20 \pm 0.07$	$4.43 \pm 0.05$	$1.03 \pm 0.05$	$1.9 \pm 0.2$
Корневища с корнями	–	–	не определяется	$0.3 \pm 0.1$	$0.02 \pm 0.01$	$0.40 \pm 0.02$	–

Примечание. – нет данных.

### Заключение

К наиболее значимым регуляторам синтеза вторичных соединений в тканевых культурах растений относятся такие компоненты питательных сред, как гормоны. В результате наших исследований отмечено для *I. sibirica* характерная зависимость между накоплением биомассы и содержанием кверцетина и рутина. На среде с 5.0 мкМ БАП, дополненной ауксинами, при нарастании общей высоты побегов содержание кверцетина и рутина в фитомассе резко уменьшалось. Для поддержания баланса между накоплением биомассы и содержанием флавоноидов для *I. sibirica* мы рекомендуем использовать среды с 2.5 мкМ БАП, дополненные ауксинами.

Разработанная методика позволяет определить содержание суммы флавоноидов в сырье *I. sibirica* в присутствии других соединений, проста в исполнении и не требует дорогостоящей аппаратуры. А проведенная валидационная оценка методики свидетельствует об ее пригодности для контроля качества биотехнологического сырья *I. sibirica*.

### Список литературы

1. Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. The effect of plant flavonoides on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer // *Pharmacol. Rev.* 2000. Vol. 52. N4. Pp. 673–701.
2. Parr A.J., Bolwell G.P. Phenols in the plant and man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile // *J. Sci. Food Agr.* 2000. Vol. 80. Pp. 985–1012. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<985::AID-JSFA572>3.0.CO;2-7
3. Левицкий А.П. Биофлавоноиды как модуляторы эстрогенной и остеогенной активности // *Вісн. фармакології та фармації.* 2004. №2. С. 2–4.
4. Коренская И.М., Ивановская Н.П., Измалкова И.Е. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащие флавоноиды. Воронеж, 2007. 81 с.
5. Смірнов О., Косик О. Флавоноїди рутин і кверцетин. Біосинтез, будова, функції // *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. Біологія.* 2011. Т. 56. С. 3–11.

6. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино: Synchrobook, 2013. 310 с.
7. Борисова Г.Г., Ермошин А.А., Малева М.А., Чукина Н.В. Основы биохимии вторичного обмена растений. Екатеринбург, 2014. 128 с.
8. Каримов А.М., Попков А.С., Остроушко Ю.В., Туртаева Р.И., Ботиров Э.Х. Исследование флавоноидов корней *Scutellaria Intermedia* Porov // Химия растительного сырья. 2018. №4. С. 89–94. DOI: 10.14258/jcprm.2018043728.
9. Сагарадзе В.А., Бабаева Е.Ю., Уфимов Р.А., Загурская Ю.В., Трусов Н.А., Коротких И.Н., Маркин В.И., Пещанская Е.В., Можаяева Г.Ф., Каленикова Е.И. Содержание флавоноидов в цветках с листьями боярышников (*Crataegus L.*) флоры РФ // Химия растительного сырья. 2018. №4. С. 95–104. DOI: 10.14258/jcprm.2018044039.
10. Korkina L.G., Afanas'ev I.B. Antioxidant and chelating properties of flavonoids // Adv. Pharmacol. 1997. Vol. 38. Pp. 151–163. DOI: 10.1016/s1054-3589(08)60983-7.
11. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. Минск: БГУ, 2004. 174 с.
12. Andersen O.M., Markham K.R. Flavonoids: chemistry, biochemistry and application. New York: CRC Press, 2005. Pp. 397–441.
13. Es-Safi N.E., Ghidouche S., Ducrot P.H. Flavonoids: hemisynthesis, reactivity, characterization and free radical scavenging activity // Molecules. 2007. Vol. 12. Pp. 2228–2258.
14. Hooper L., Kroon P.A., Rimm E.B., Cohn J.S., Harvey I., Le Cornu K.A., Ryder J.J., Hall W.L., Cassidy A. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials // Am. J. Clin. Nutr. 2008. Vol. 88. Pp. 38–50.
15. Kuhad A., Chopra K. Highlights from the 3rd Intern. Conf. on Polyphenols and Health. Current trends in polyphenol research: from Mother Nature to Molecular mechanisms // Drugs of the Future. 2008. Vol. 33 (3). Pp. 249–287.
16. Асланияц Л.К., Маршавина З.В., Казарян А.Г. Продуктивность культуры клеток *Iris sibirica L.*, выращенных на упрощенной питательной среде // Растительные ресурсы. 1988. Т. 24. С. 107–110.
17. Багдасарова З.М., Асланияц Л.К., Узунян Л.В. Биоконверсия терпеноидов культурой клеток ириса (*Iris sibirica*) // Прикладная биохимия и микробиология. 1988. Т. 24. С. 774–778.
18. Kaššák P. Screening of the chemical content of several Limniris group Irises // Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2014. №3. Pp. 11–14.
19. Седельникова Л.Л., Кукушкина Т.А. Содержание запасных и биологически активных веществ в вегетативных органах *Iris sibirica L.* (Iridaceae) // Ученые записки ЗабГУ. 2016. Т. 11. №1. С. 123–128.
20. Тарбеева Д.В. Полифенольные метаболиты *Iris pseudacorus L.* и его клеточной культуры: дис. ... канд. хим. наук. Владивосток, 2016. 126 с.
21. Zaprometov M. The formation of phenolic compounds in plant cell and tissue cultures and the possibility of its regulation // Advances in Cell. Culture. 1989. Vol. 7. Pp. 201–260.
22. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М., 1999. 152 с.
23. Загоскина Н.В., Дубравина Г.А., Запрометов М.Н. Особенности формирования хлоропластов и накопление фенольных соединений в фотомиксотрофных каллусных культурах чайного растения // Физиология растений. 2000. Т. 47. №4. С. 537–543.
24. Tadhani M., Patel V., Subhash R. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus // J. Food Compos. Analysis. 2007. Vol. 20. N3–4. Pp. 323–329. DOI: 10.1016/j.jfca.2006.08.004.
25. Matkowski A. Plant cell in vitro culture for production of antioxidants // Biotechnology Advances. 2008. Vol. 26. Pp. 548–560. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.001.
26. Nosov A.M. Application of cell technologies for production of plant derived // Applied Biochemistry and Microbiology. 2012. Vol. 48. Pp. 609–624. DOI: 10.1134/S000368381107009X.
27. Marchev A., Haas C., Schulz S., Georgiev V., Steingroewer J., Bley T., Pavlov A. Sage in vitro cultures: a promising tool for the production of bioactive terpenes and phenolic substances // Biotechnol Lett. 2014. Vol. 36. Pp. 211–221. DOI: 10.1007/s10529-013-1350-z.
28. Тихомирова Л.И., Ильичёва Т.Н., Базарнова Н.Г., Сысоева А.В. Способ получения лекарственного растительного сырья лапчатки белой (*Potentilla alba L.*) в условиях гидропоники // Химия растительного сырья. 2016. №3. С. 59–66. DOI: 10.14258/jcprm.2016031228.
29. Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Сысоева А.В. Фитохимический анализ биотехнологического сырья представителей рода *Potentilla L.* // Химия растительного сырья. 2018. №1. С. 145–154. DOI: 10.14258/jcprm.2018012734.
30. Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Ильичева Т.Н., Мартиросян Ю.Ц. Получение растительного сырья ириса сибирского (*Iris sibirica L.*) методами биотехнологии // Химия растительного сырья. 2018. №4. С. 235–245. DOI: 10.14258/jcprm.2018043887.
31. Коновалов Д.А., Коновалова Д.С. Разработка методики количественного определения флавоноидов в траве пиретрума девичьего и ее валидация // Научные ведомости. Медицина. Фармация. 2012. №16 (135). С. 165–159.
32. ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов эксперимента. URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0013-15-statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-eksperimenta/>.
33. AOAC Peer Verified methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, VA, 1993. Nov. Development Pharmaceutics and Process Validation: Directive 75/318/EEC – 1998.



34. Антипова Е.А., Кудрикова Л.Е. Идентификация и количественное определение флавоноидов в траве ириса сибирского // Фармацевтические науки: от теории к практике. 2016. С. 110–112. DOI: 10.14258/jcrpm.2019024291.

Поступила в редакцию 28 июня 2019 г.

После переработки 2 декабря 2019 г.

Принята к публикации 4 декабря 2019 г.

**Для цитирования:** Щербаклова Л.В., Тихомирова Л.И., Карпицкий Д.А., Мартиросян Ю.Ц., Ескалиева Б.К. Особенности накопления флавоноидов в биотехнологическом сырье *Iris sibirica* L. и разработка методики их количественного определения // Химия растительного сырья. 2019. №4. С. 327–336. DOI: 10.14258/jcrpm.2019046095.

*Shcherbakova L.V.*<sup>1\*</sup>, *Tikhomirova L.I.*<sup>1</sup>, *Karpitsky D.A.*<sup>1</sup>, *Martirosian Yu.Ts.*<sup>2</sup>, *Eskalieva B.K.*<sup>3</sup> THE FEATURES OF THE ACCUMULATION OF FLAVONOIDS IN BIOTECHNOLOGICAL RAW MATERIAL OF *IRIS SIBIRICA* L. THE DEVELOPMENT OF METHODS OF QUANTIFICATION

<sup>1</sup>Altai State University, pr. Lenina, 61, Barnaul, 656049 (Russia), e-mail: l.v.sch.1970@mail.ru

<sup>2</sup>All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, ul. Timiryazevskaya, 42, Moscow, 127422 (Russia)

<sup>3</sup>Kazakh National University Al-Farabi, Al-Farabi Ave., 71, Almaty, 050040 (Republic of Kazakhstan), e-mail: balakyz@mail.ru

Identification of scientific regularities of accumulation of physiologically active compounds is relevant to the issues of plant biology, as it can create conditions for the rapid development of biotechnological approaches and the solution of a number of environmental and economic problems associated with the use of plant raw materials. The aim of this work was to identify the features of the accumulation of flavonoids and the development of methods of differential spectrophotometry allows to assess the quality of biotechnological raw materials *Iris sibirica* L. (Siberian iris) on the content of flavonoids.

The most important regulators of the synthesis of secondary compounds in plant tissue cultures include such components of nutrient media as hormones. As a result of our experiments it was noted for *I. sibirica* characteristic relationship between the accumulation of biomass and the content of quercetin and rutin. On the medium with 5.0 µm BAP, supplemented by auxins with an increase in the total height of the shoots, the quercetin content and rutin in the phytomass decreased dramatically. To maintain a balance between biomass accumulation and flavonoid content for *I. sibirica*, we recommend using media with 2.5 µm BAP supplemented with auxins.

The developed method allows to determine the content of the total of flavonoids in *Iris sibirica* raw materials in the presence of other compounds, is simple in execution and does not require expensive equipment. A validation evaluation of the technique indicates its suitability for quality control of biotechnological raw materials *Iris sibirica*.

**Keywords:** *I. sibirica* L., medicinal plants, tissue culture, secondary metabolites, plant-regenerants have aeroponic technology.

## References

1. Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. *Pharmacol. Rev.*, 2000, vol. 52, no. 4, pp. 673–701.
2. Parr A.J., Bolwell G.P. *J. Sci. Food Agr.*, 2000, vol. 80, pp. 985–1012. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<985::AID-JSFA572>3.0.CO;2-7
3. Levitskiy A.P. *Visnyk farmakolohiyi ta farmatsiyi*, 2004, no. 2, pp. 2–4. (in Russ.).
4. Korenskaya I.M., Ivanovskaya N.P., Izmalkova I.Ye. *Lekarstvennyye rasteniya i lekarstvennoye rastitel'noye syr'ye, sodержashchiye flavonoidy*. [Medicinal plants and medicinal plant materials containing flavonoids]. Voronezh, 2007, 81 p. (in Russ.).

\* Corresponding author.

5. Smirnov O., Kosyk O. *Visn. L'viv. un-tu. Ser. Biolohiya*, 2011, vol. 56, pp. 3–11. (in Ukr.).
6. Tarakhovskiy Yu.S., Kim Yu.A., Abdrasilov B.S., Muzafarov Ye.N. *Flavonoidy: biokhimiya, biofizika, meditsina*. [Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine]. Pushchino: Sunchrobook, 2013, 310 p. (in Russ.).
7. Borisova G.G., Yermoshin A.A., Maleva M.A., Chukina N.V. *Osnovy biokhimi vtorichnogo obmena rasteniy*. [Fundamentals of biochemistry of secondary metabolism of plants]. Yekaterinburg, 2014, 128 p. (in Russ.).
8. Karimov A.M., Popkov A.S., Ostroushko Yu.V., Turtayeva R.I., Botirov E.Kh. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 4, pp. 89–94. DOI: 10.14258/jcprm.2018043728. (in Russ.).
9. Sagaradze V.A., Babayeva Ye.Yu., Ufimov R.A., Zagurskaya Yu.V., Trusov N.A., Korotkikh I.N., Markin V.I., Peshchanskaya Ye.V., Mozhayeva G.F., Kalenikova Ye.I. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 4, pp. 95–104. DOI: 10.14258/jcprm.2018044039. (in Russ.).
10. Korkina L.G., Afanas'ev I.B. *Adv. Pharmacol.*, 1997, vol. 38, pp. 151–163. DOI: 10.1016/s1054-3589(08)60983-7.
11. Kostyuk V.A., Potapovich A.I. *Bioradikaly i bioantioxidanty*. [Bioradicals and bioantioxidants]. Minsk, 2004, 174 p. (in Russ.).
12. Andersen O.M., Markham K.R. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and application*, New York: CRC Press, 2005, pp. 397–441.
13. Es-Safi N.E., Ghidouche S., Ducrot P.H. *Molecules*, 2007, vol. 12, pp. 2228–2258.
14. Hooper L., Kroon P.A., Rimm E.B., Cohn J.S., Harvey I., Le Cornu K.A., Ryder J.J., Hall W.L., Cassidy A. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008, vol. 88, pp. 38–50.
15. Kuhad A., Chopra K. *Drugs of the Future*, 2008, vol. 33 (3), pp. 249–287.
16. Aslanyants L.K., Marshavina Z.V., Kazaryan A.G. *Rastitel'nyye resursy*, 1988, vol. 24, pp. 107–110. (in Russ.).
17. Bagdasarova Z.M., Aslanyants L.K., Uzunyan L.V. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 1988, vol. 24, pp. 774–778. (in Russ.).
18. Kaššák P. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2014, no. 3, pp. 11–14.
19. Sedel'nikova L.L., Kukushkina T.A. *Uchonyye zapiski ZabGU*, 2016, vol. 11, no. 1, pp. 123–128. (in Russ.).
20. Tarbeyeva D.V. *Polifenol'nyye metabolity Iris pseudacorus L. i yego kletochnoy kul'tury: dis. ... kand. khim. nauk*. [Polyphenolic metabolites of *Iris pseudacorus L.* and its cell culture: dis. ... cand. Chem. sciences]. Vladivostok, 2016, 126 p. (in Russ.).
21. Zaprometov M. *Advances in Cell. Culture*, 1989, vol. 7, pp. 201–260.
22. Butenko R.G. *Biologiya kletok vysshikh rasteniy in vitro i biotekhnologiya na ikh osnove*. [Biology of cells of higher plants in vitro and biotechnology based on them]. Moscow, 1999, 152 p. (in Russ.).
23. Zagoskina N.V., Dubravina G.A., Zaprometov M.N. *Fiziologiya rasteniy*, 2000, vol. 47, no. 4, pp. 537–543. (in Russ.).
24. Tadhani M., Patel V., Subhash R. *J. Food Compos. Analysis*, 2007, vol. 20, no. 3–4, pp. 323–329. DOI: 10.1016/j.jfca.2006.08.004.
25. Matkowski A. *Biotechnology Advances*, 2008, vol. 26, pp. 548–560.
26. Nosov A.M. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2012, vol. 48, pp. 609–624. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.001.
27. Marchev A., Haas C., Schulz S., Georgiev V., Steingroewer J., Bley T., Pavlov A. *Biotechnol Lett.*, 2014, vol. 36, pp. 211–221. DOI: 10.1007/s10529-013-1350-z.
28. Tikhomirova L.I., Il'ichova T.N., Bazarnova N.G., Sysoyeva A.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2016, no. 3, pp. 59–66. DOI: 10.14258/jcprm.2016031228. (in Russ.).
29. Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Sysoyeva A.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 1, pp. 145–154. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2018012734.
30. Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Il'icheva T.N., Martirosyan Yu.Ts. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 4, pp. 235–245. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2018043887.
31. Konovalov D.A., Konovalova D.S. *Nauchnyye vedomosti. Meditsina. Farmatsiya*, 2012, no. 16 (135), pp. 165–159. (in Russ.).
32. *OFS.1.1.0013.15. Statisticheskaya obrabotka rezul'tatov eksperimenta*. [OFS.1.1.0013.15. Statistical processing of experimental results]. URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0013-15-statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-eksperimenta/> (in Russ.).
33. *AOAC Peer Verified methods Program, Manual on policies and procedures*, Arlington, VA, 1993, Nov. Development Pharmaceutics and Process Validation: Directive 75/318/EEC – 1998.
34. Antipova Ye.A., Kudrikova L.Ye. *Farmatsevticheskiye nauki: ot teorii k praktike*, 2016, pp. 110–112. DOI: 10.14258/jcprm.2019024291. (in Russ.).

Received June 28, 2019

Revised December 2, 2019

Accepted December 4, 2019

**For citing:** Shcherbakova L.V., Tikhomirova L.I., Karpitsky D.A., Martirosian Yu.Ts., Eskalieva B.K. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2019, no. 4, pp. 327–336. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2019046095.