

САЛВОН А. Г.✉, ЛИСТВАН К. В., ЛІТВІНОВ С. В., ПЧЕЛОВСЬКА С. А., ШИЛІНА Ю. В., ЖУК В. В., ТОНКАЛЬ Л. В.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,  
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

✉ [asya.salivon@gmail.com](mailto:asya.salivon@gmail.com)

## ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ РІЗНИХ ДОЗ ПЕРЕДПОСІВНОГО ОПРОМІНЕННЯ НАСІННЯ НА ВМІСТ ФЛАВОНОЇДІВ У ЛІКАРСЬКІЙ СИРОВИНІ ЗВІРОБОЮ ЗВИЧАЙНОГО

**Мета.** Метою роботи було визначення доз гамма- та рентгенівського опромінення насіння звіробою звичайного (*Hypericum perforatum* L.), які зумовлюють збільшення біомаси та накопичення флавоноїдів у лікарській сировині. **Методи.** Рентгенівське та  $\gamma$ -опромінення насіння, біометричні методи, екстракція флавоноїдів, кількісна оцінка вмісту флавоноїдів в екстрактах за допомогою спектрофотометрії (СФ), якісний і напівкількісний аналіз екстрактів із використанням вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), загальноприйняті статистичні методи обробки та аналізу даних. **Результати.** Доведено, що гостре рентгенівське передпосівне опромінення насіння звіробою звичайного у дозі 20 Гр призводить до збільшення врожаю лікарської сировини (ЛС) без втрати її фармацевтичної цінності. Також виявлено зростання концентрації кверцетину, рутину, гіперозиду у ЛС рослин, вирощених із насіння, що було хронічно опромінене  $\gamma$ -радіацією у сумарній дозі 1 Гр. ВЕРХ-аналіз екстрактів підтвердив, що якісний склад водно-спиртових екстрактів звіробою внаслідок дії опромінення на насіння не змінювався. **Висновки.** Отримані результати підтверджують можливість застосування передпосівного опромінення насіння звіробою звичайного в інтервалі доз 1–35 Гр з метою збільшення його продуктивності та підвищення фармацевтичної цінності лікарської сировини.

**Ключові слова:** звіробій звичайний (*Hypericum perforatum* L.), іонізуюче опромінення, продуктивність, флавоноїди.

Експериментально доведено, що за впливу стресових факторів, зокрема іонізуючого випромінювання, інтенсивність вторинного метаболізму у лікарських рослин зростає, і, відповідно, збільшується їх фармацевтична цінність [1, 2]. Зокрема, виявлено збільшення вмісту

шиконину на 400 % за опромінення в дозі 16 Гр рослин *Lithospermum erythrorhizon*. У *Datura stramonium* після опромінення спостерігали зростання вмісту скополоніну на 35 %; у *Rosmarinus officinalis* виявлено зростання антиоксидантної активності на 22 %, а вмісту фенолів – на 35 %. До стимуляції синтезу різноманітних цінних продуктів вторинного метаболізму призводило опромінення  $\gamma$ -радіацією насіння подорожника (*Plantago major*), маку (*Papaver somniferum*) та вітанії (*Withania somnifera*) [3, 4]. Нами також була продемонстрована можливість використання іонізуючої радіації для підвищення фармакологічної цінності сировини лікарських рослин [4–6].

Метою цієї роботи було вдосконалення радіаційної технології збільшення вмісту продуктів вторинного метаболізму у тканинах рослин як способу підвищення фармацевтичної цінності лікарської сировини. З практичного погляду перспективним і зручним є застосування передпосівного опромінення насіння. Об'єктом дослідження обрали насіння звіробою звичайного (*Hypericum perforatum* L.) – лікарської рослини, широко розповсюдженої в природних умовах лісостепової зони, придатної для культивування як у присадибних та фермерських господарствах, так і в промислових масштабах. У якості лікарської сировини використовують суцвіття звіробою, зібрані в період максимального розквітнення [7, 8]. У фармакопеї екстракт звіробою звичайного широко використовують як фітоантидепресант. Також відомі його антисептичні, протизапальні, в'яжучі та бактеріостатичні властивості [7]. Виділені із рослин поліфенольні комплекси та флавоноїди конкурують із багатьма синтетичними препаратами.

### Матеріали і методи

Насіння опромінювали в дозах 5, 10, 20, 35 та 50 Гр на рентгенівській установці РУМ-17

© САЛВОН А. Г., ЛИСТВАН К. В., ЛІТВІНОВ С. В., ПЧЕЛОВСЬКА С. А., ШИЛІНА Ю. В., ЖУК В. В., ТОНКАЛЬ Л. В.

(Національний інститут раку, Київ, Україна) за потужності дози 1,42 сГр/с. Також провели дослідження впливу хронічного опромінення насіння в сумарній поглинутій дозі 1 Гр від точкового джерела, що містить хлорид радіонукліду  $^{137}\text{Cs}$ .

У дослідах використовували насіння лікарських рослин ТМ «Флора Маркет», «Golden Garden», «Professional Seeds» та насіння, надане лабораторією медичної ботаніки Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАНУ. Опромінене й неопромінене насіння *H. perforatum* висівали безпосередньо в ґрунт на ділянках.

Для визначення впливу передпосівного опромінення на продуктивність рослин звіробою звичайного проводили збір квіток. Зібраний матеріал висушували до повітряно-сухого стану та проводили оцінку сухої маси ЛС. У ході вивчення впливу різних доз рентгенівського опромінення насіння звіробою звичайного оцінювали лабораторну і польову схожість насіння. Також вивчали часові характеристики початку бутонізації та цвітіння.

Вміст вторинних метаболітів в ЛС оцінювали за допомогою спектрофотометричного методу. Визначали оптичну густину комплексу флавоноїди – хлорид алюмінію. Екстракцію флавоноїдів та фенольних сполук із висушених квіток звіробою звичайного здійснювали шляхом інкубації наважки подрібненого матеріалу в 70 % етанолі у співвідношенні 1:100 за 24°C протягом 3-х діб. Визначення вмісту суми флавоноїдів проводили, вимірюючи оптичну густину комплексу флавоноїди-алюміній на спектрофотометрі СФ-46 за довжини хвилі 410 нм проти розчину порівняння. Визначали концентрацію суми флавоноїдів за калібрувальним графіком рутину та виражали в мг рутину на грам сухої маси. Вміст флавоноїдів у досліджуваних екстрактах обраховували за формулою:  $C_f = C \cdot k / m$ , де  $C_f$  – вміст флавоноїдів, мг рутинного еквівалента на грам сухої маси;  $C$  – вміст флавоноїдів за калібрувальною кривою, мг/мл;  $k$  – коефіцієнт розведення;  $m$  – маса наважки рослинного матеріалу.

Для визначення загальної антиоксидантної активності використовували реактив DPPH (2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил радикал) [9]. Вимірювали інтенсивність пурпурово-синього забарвлення спиртового розчину цього стабільного радикала до та після додавання досліджуваних екстрактів. У результаті реакції спиртово-

го розчину радикала і розчину з радикалпоглинаючою активністю радикал відновлюється, при цьому інтенсивність забарвлення суміші зменшується пропорційно до зменшення концентрації вільного радикала. Використовували розчин DPPH у 70 % етиловому спирті (концентрація радикала  $10^{-4}$  М). Реакцію проводили у 96-лункових мікропланшетах. У кожен лунку планшета додавали розчин радикала та відповідні розведення досліджуваних екстрактів. Об'єм екстрактів, що додавалися, становив 20, 10, 5, 2,5 мкл; кінцевий об'єм реакційної суміші в лунці – 100 мкл. Реакційну суміш витримували за кімнатної температури у темряві протягом 20 хв, після чого вимірювали оптичну густину за довжини хвилі 550 нм. Крім цього, вимірювали власну оптичну густину розчинів екстрактів відповідної концентрації у спирті без додавання DPPH. Як позитивний контроль використовували водний розчин аскорбінової кислоти (10 мг/мл). Кількісно поглинання вільного радикала виражали як відсоток інгібування і обчислювали за формулою:  $(A_k - A_e) \cdot 100 / A_k$ , де:  $A_k$  – оптична щільність контрольного розчину,  $A_e$  – оптична щільність розчину досліджуваного екстракту. На основі розрахованих відсотків інгібування було побудовано графік залежності величин інгібування забарвлення DPPH від об'єму екстракту. За графіком визначали об'єм екстракту, що спричиняв 50 %-е інгібування забарвлення вільного радикала (EC50).

Також здійснено аналіз отриманих екстрактів методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з метою порівняння виходу флавоноїдів в екстракти з контрольних рослин і рослин, які були вирощені із опроміненого в різних дозах насіння. Аналіз проводили на високоефективному рідинному хроматографі Shimadzu HPLC10Avr (Shimadzu, Японія) з колонкою Zorbax Eclipse (XDB-C18, 6x250 мм, 5мкм, Agilent, США), доповненою передколонукою Waters Symmetry C8 (Waters Corporation, США). Використані елюенти – ацетонітрил та деіонізована вода з додаванням 1 % мурашиної кислоти, градієнт ацетонітрилу – з 10 % до 60 % за 43 хвилини. Температура термостата 40 °C, швидкість потоку – 0,8 мл/хв, об'єм вколу – 10 мкл. Загальна тривалість аналізу – 48 хвилин. Довжина хвилі для аналізу отриманих піків – 318 нм.

Результати шести повторностей експерименту (польові дослідження, ЛС одного року) усереднювали та обробляли за допомогою стандарт-

них засобів програми Microsoft Excel 2010 (Microsoft, США).

### Результати та обговорення

На діаграмі на рис. 1 наведена дозова залежність схожості насіння звіробою звичайного у відсотках до контролю. Виявлено збільшення схожості насіння *H. perforatum* за передпосівного опромінення у дозах 15 і 20 Гр. Водночас дози 5 Гр, 10 Гр, 35 Гр, 50 Гр знижували схожість насіння звіробою (найбільшою мірою за опромінення у дозах 10 Гр та 35 Гр).

Встановлено стимуляцію приросту біомаси рослин звіробою звичайного в інтервалі доз 10–35 Гр. (рис. 2). Зокрема, спостерігалось значне збільшення повітряно-сухої маси рослин за передпосівного опромінення дозою 10 Гр. Деяке зростання середньої біомаси в розрахунку на одну рослину мало місце за опромінення в дозах 5 Гр, 20 Гр і 35 Гр. За дози 50 Гр, навпаки, помічалось зниження маси лікарської сировини в розрахунку на одну рослину, що свідчить про

зменшення темпів накопичення біомаси внаслідок інгібувальної дії іонізуючого опромінення.

На основі даних, представлених на рис.1 та рис. 2, було розраховано інтегральний ефект впливу передпосівного опромінення на кінцеву масу лікарської сировини звіробою звичайного за формулою  $IE = (E_c * E_m) / 100$  (1), де IE – інтегральний ефект у %,  $E_c$  – схожість насіння опроміненого варіанта у % до неопроміненого контролю,  $E_m$  – маса лікарської сировини в розрахунку на одну рослину варіанта у % до неопроміненого контролю.

Дозова залежність за результатами розрахунків за формулою (1) виразно демонструє наявність інтервалу стимулюючих доз 5–20 Гр з максимумом за 20 Гр, як і інтервалу інгібуючих доз 35–50 Гр (рис. 3). Із дозової залежності на рис. 3 можна зробити висновок, що в якості стимулюючих доз передпосівного опромінення *H. perforatum* можна застосовувати дози 10–20 Гр.

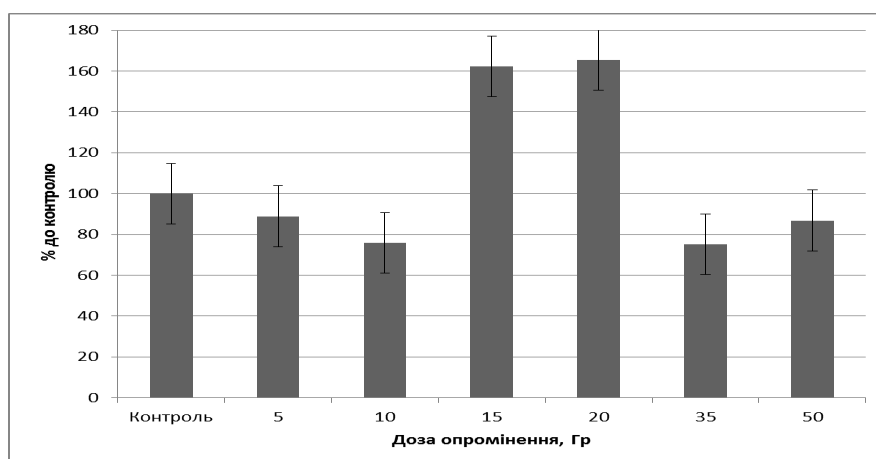


Рис. 1. Лабораторна схожість насіння *H. perforatum*, опроміненого різними дозами рентгенівських променів, % до контролю.

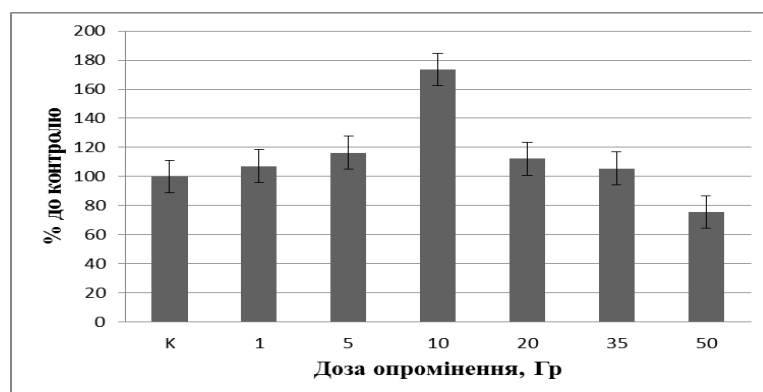


Рис. 2. Маса лікарської сировини *H. perforatum* у розрахунку на одну рослину.

Цікаво, що гостре опромінення насіння у дозах 5–35 Гр призводило до більш раннього цвітіння рослин опромінених варіантів, у той час як хронічне опромінення у дозі 1 Гр та гостре у дозі 50 Гр не індукували прискорення переходу рослин до фази цвітіння.

Нами було проведено вивчення антиоксидантної активності водно-етанольних екстрактів із варіантів сировини звіробою звичайного, вирощеного з насіння, яке опромінювали різними дозами радіації. На рис. 4 наведено діаграму залежності об'єму екстракту, що спричиняв 50 %-е інгібування забарвлення розчину DPPH, від дози передпосівного опромінення. Наведені результати свідчать про те, що антиоксидантна активність екстрактів суттєво зростала лише за

дозі гострого передпосівного опромінення 50 Гр (відзначимо, що за цієї дози значно зменшувалося накопичення рослинами біомаси надземної частини).

Дані, які представлені нижче (рис. 5, 6), показують, що антиоксидантна активність етанольних екстрактів із сировини суцвіть звіробою звичайного не корелювала із вмістом у них суми флавоноїдів, як і їх окремих найбільш представлених в екстрактах фракцій. Отже, зміна антиоксидантних властивостей *in vitro* екстрактів звіробою з сировини опромінених варіантів зумовлена не флавоноїдами, а речовинами іншої хімічної природи, розчинними у воді та/або етиловому спирті.

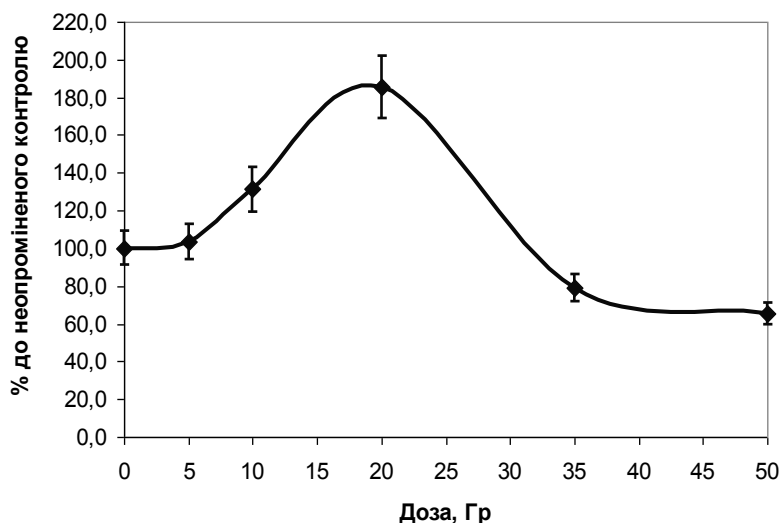


Рис. 3. Інтегральний ефект впливу рентгенівського передпосівного опромінення на вихід лікарської сировини звіробою звичайного залежно від дози опромінення. Точки відображають середні значення 6-и повторностей досліду та стандартні похибки.

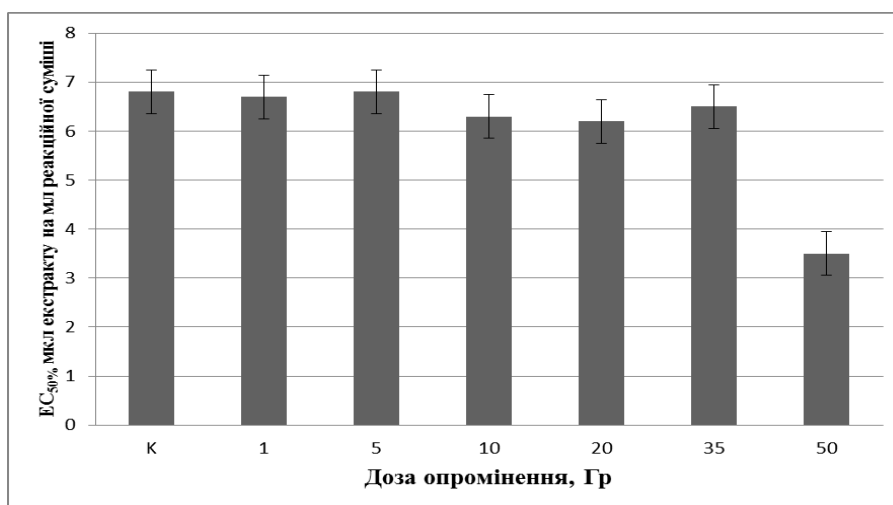


Рис. 4. Залежність об'єму екстракту, що спричиняв 50 %-ве інгібування забарвлення вільного радикала (EC<sub>50%</sub>), від дози опромінення насіння звіробою звичайного.

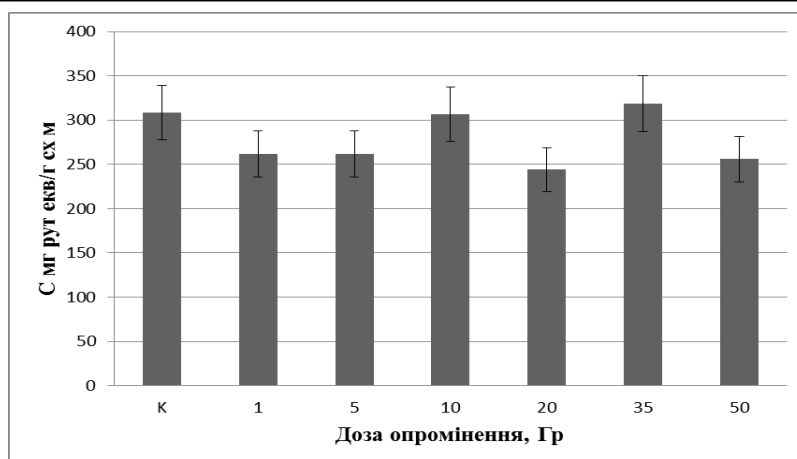


Рис. 5. Вміст суми флавоноїдів у водно-етанольних екстрактах із *H. perforatum* у перерахунку на рутин залежно від дози передпосівного опромінення насіння.

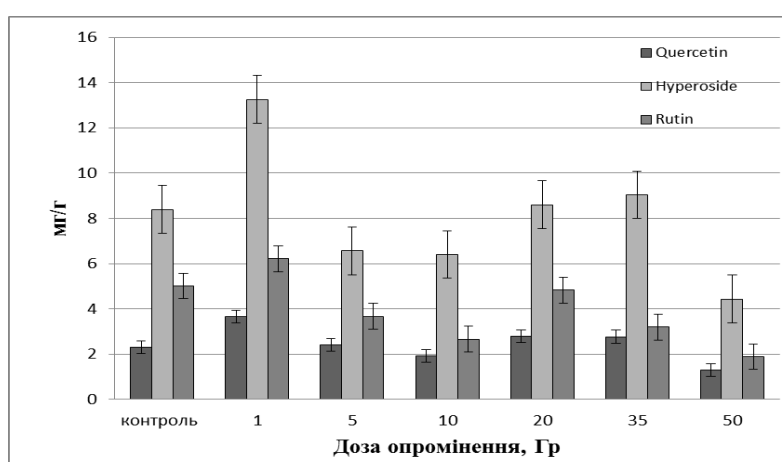


Рис. 6. Вміст кверцетину, гіперозиду та рутину, що входять до складу водно-етанольних екстрактів із ЛС *H. perforatum*, залежно від дози передпосівного опромінення.

Вміст суми флавоноїдів зменшувався за всіх доз передпосівного опромінення, за винятком варіантів 10 Гр і 35 Гр, які не відрізнялися від контролю (рис. 5). Отже, рідкоіонізуюче опромінення насіння звіробою звичайного в дозовому інтервалі 1–50 Гр не справляло стимулюючого впливу на вміст сукупності флавоноїдів лікарської сировини. Проте за рахунок збільшення виходу ЛС (рис. 3) загальний стимулювальний ефект все ж досягався за доз 10 Гр та 20 Гр.

Якісний аналіз екстрактів різних варіантів полягав у визначенні наявності/відсутності основних хроматографічних піків флавоноїдів у кожному експериментальному варіанті. Встановлена відсутність в екстрактах фракцій специфічних для лікарської сировини рослин з опроміненого насіння. Для порівняння кількісного вмісту речовин екстрактів різних варіантів оцінювали відносні площі піків для всіх речовин кожного екстракту. Дані по трьох основних

флавоноїдах ЛС звіробою звичайного наведено на рис. 6. Із діаграми видно, що суттєве підвищення вмісту кверцетину та його похідних гіперозиду й рутину характерне лише за хронічного опромінення в дозі 1 Гр. Зниження їх концентрації в екстрактах, а значить, і в ЛС, спостерігається за опромінення у дозах 5 Гр, 10 Гр та 50 Гр.

Цікаво, що за хронічного опромінення насіння звіробою дозою 1 Гр вміст кверцетину, гіперозиду та рутину у ЛС рослин збільшується на 25–60 %, в той час як виміряна спектрофотометрично концентрація сумарних флавоноїдів в екстрактах зменшується. Це можна розглядати як свідчення модифікації обміну речовин фенольної природи у клітинах рослин, вирощених з опроміненого насіння, в напрямку активації біосинтезу кверцетину та його похідних із субстратів, спільних для анаболізму флавоноїдів. Можливими тригерами цих змін є ферменти флавоноїдного шляху халкон-синтаза та халкон-

ізомераза. Це питання потребує подальших експериментальних досліджень.

### Висновки

За допомогою методу ВЕРХ було встановлено, що іонізуюче опромінення насіння звіробою звичайного не призводить до появи нових продуктів вторинного метаболізму в екстрактах з лікарської сировини, а лише змінює концентрацію сполук, властивих для неопромінених рослин. Отже, технологія передпосівного опромінення насіння лікарської рослини *H. perforatum* з метою підвищення біопродукти-

вності та фармакологічної цінності ЛС є безпечною для здоров'я людини.

Передпосівне опромінення насіння звіробою звичайного дозволяє підвищити вихід флавоноїдів із лікарської сировини як завдяки збільшенню її маси без стимуляції накопичення флавоноїдів (доза гострого передпосівного опромінення 20 Гр), так і завдяки зростанню вмісту в екстрактах фармацевтично цінних флавоноїдів кверцетину, рутину, гіперозиду без стимуляції накопичення біомаси (хронічне опромінення насіння у дозі 1 Гр).

### References

1. Moghaddam S.S., Jaafar H., Ibrahim R., Rahmat A., Aziz M.A., Philip E. Effects of acute gamma irradiation on physiological traits and flavonoid accumulation of *Centella asiatica*. *Molecules*. 2011. 16 (6). P. 4994–5007. doi: 10.3390/molecules16064994.
2. Grodzinskiy D.M. Adaptivnaia strategiia fiziologicheskikh protsessov rasteniy. Kiev: Naukova dumka, 2013. 300 s. [in Russian] / Гродзинский Д.М. Адаптивная стратегия физиологических процессов растений. К.: Наукова думка, 2013. 300 с.
3. Chunga B.Y., Lee Y.-B., Baeka M.-H., Kim J.-H., Wia S.G., Kim J.-S. Effects of low-dose gamma-irradiation on production of shikonin derivatives in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon* S. *Radiation Physics and Chemistry*. 2006. Vol. 75, Iss. 9. P. 1018–1023.
4. Pйrez M.B., Calderyn N.L., Croci C.A. Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Chemistry*. 2007. Vol. 104, Iss. 2. P. 585–592.
5. Grodzinsky D., Shylina Yu., Pchelovska S., Litvinon S., Sokolova D., Zhuk V., Tonkal L., Salivon A., Nesterenko O. The effect of acute X-ray irradiation of medicinal plant seeds on the secondary metabolite productivity. *Fourth International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, RAD 4: Book of Abstracts*. Ніль: University, Faculty of Electronic Engineering (Ніль, Serbia, May 23–27, 2016). Ніль, Serbia, 2016. P. 214.
6. Liozhyna L., Bulko O., Litvinov S., Pchelovska S., Sokolova D., Berestyanaya A., Tonkal L., Salivon A. X-ray exposure to the stress response from *Ri*-transformed regenerants *Digitalis purpurea* L. *in vitro*. *Radiation and Applications Journal*. Vol. 2, Iss. 1. P. 1–4. doi: 10.21175/RadJ.2017.01.001. URL: <http://www.rad-journal.org/index.php?id=4> (Last accessed: 1.04.2019).
7. Kovalev N.V., Kislichenko V.S., Zhuravel I.A. Farmakognoziia: Uchebnik dlia stud. Vyssh. Ucheb. Zaved. Kh.: Izd-vo NFaU, 2007. 272 s. [in Russian] / Ковалев Н.В., Кисличенко В.С., Журавель И.А. Фармакогнозия: Учебник для студ. Высш. Учеб. Завед. Х.: Изд-во НФаУ, 2007. 272 с.
8. Gosudarstvennaia farmakopeia SSSR XI izdanie 1 i 2 t. M.: Meditsina, 1990. 399 s. [in Russian] / Государственная фармакопея СССР XI издание 1 и 2 т. М.: Медицина, 1990. 399 с.
9. Blois M.S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. 1958. Vol. 181. P. 1199–1200.

**SALIVON A., LYSTVAN K., LITVINON S., PCHELOVSKA S., SHYLINA Yu., ZHUK V., TONKAL L.**

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 148, e-mail: asya.salivon@gmail.com*

### EVALUATION OF THE INFLUENCE OF DIFFERENT DOSES OF PRE-SOWING IRRADIATION OF SEEDS ON THE CONTENT OF FLAVONOIDS IN *HYPERICUM PERFORATUM* L. MEDICINAL RAW MATERIAL

**Aim.** The purpose of this work was to determine the dose of  $\gamma$ - and X-ray pre-sowing irradiation of seeds of *Hypericum perforatum* L., causing an increase in biomass and the accumulation of flavonoids in medicinal raw materials. **Methods.** X-ray and  $\gamma$ -irradiation of seeds, biometric methods, flavonoids extraction, quantification of flavonoid content in extracts using spectrophotometry, qualitative and semi-quantitative analysis of extracts using high-performance liquid chromatography (HPLC), common statistical methods for processing and analysis of data. **Results.** It was shown that acute X-ray pre-sowing irradiation of *H. perforatum* seeds at a dose of 20 Gy leads to an increase in the crop of medicinal raw material without losing its pharmaceutical value. Irradiation also increases concentration of quercetin, routine, hyperoside in herbal medicines, grown from seeds, that was chronically irradiated with  $\gamma$ -radiation in a total dose of 1 Gy. The HPLC analysis of extracts confirmed that the qualitative composition of ethanol extracts of *H. perforatum* did not change due to the effect of irradiation on the seeds. **Conclusions.** The obtained results confirm the possibility of application of pre-sowing irradiation of seeds of *H. perforatum* in the range of 1–35 Gy in order to increase its productivity and increase the pharmaceutical value of the medicinal raw material.

**Keywords:** *Hypericum perforatum* L., ionizing irradiation, productivity, flavonoids.