

УДК 615.451

DOI: 10.18413/2075-4728-2018-41-1-125-132

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ НАСТОЙКИ ВЕРЕСКА ОБЫКНОВЕННОГО ПОБЕГОВ

TECHNOLOGY DEVELOPMENT AND STANDARDIZATION OF HEATHER SHOOTS TINCTURE

О.А. Веремчук, Д.В. Моисеев
O.A. Veremchuk, D.V. Moiseev

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет
Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University
Republic of Belarus, 210023 Vitebsk, Frunze Av., 27

E-mail: veremchuk.oa@gmail.com; ussr80@ya.ru

Аннотация

Цель данной работы заключалась в экспериментальном выборе оптимальных условий получения настойки вереска обыкновенного побегов и разработке критериев качества готового продукта. Было изучено влияние концентрации экстрагента, соотношения сырья и экстрагента, кратности экстракции и режима настаивания с применением вспомогательных технологий (обработка ультразвуком) на выход биологически активных веществ из сырья. Установлено, что наиболее приемлемым способом получения настойки из вереска обыкновенного побегов является мацерация с применением ультразвука. Данный способ позволяет получать настойку с выходом по сумме флавоноидов $59.6 \pm 2.5\%$ с наименьшими временными затратами. Для стандартизации готовой настойки установлены показатели качества, которые включают содержание этанола от 55.0% до 65.0%; относительную плотность от 0.873 до 0.965 г/см³; сухой остаток не менее 1.0%; содержание суммы флавоноидов в пересчете на изокверцитрин не менее 0.80 мг/мл или не менее 0.08%. Также была изучена стабильность настойки вереска обыкновенного побегов в процессе хранения.

Abstract

The aim of the study was to optimize heather shoots tincture preparation as well as to develop quality parameters for finished product. The effects of extragent concentration, raw material-extragent ratio, number of extractions and extraction mode accompanied by supporting technologies (ultrasound treatment) on the yield of biologically active compounds of heather were investigated. Maceration accompanied by ultrasound treatment was established to be the most acceptable method of heather shoots tincture preparation. Using the above mode of extraction enables to get tinctures with $59.6 \pm 2.5\%$ of total flavonoids yield and spending minimum time. Specified quality parameters of finished product, including ethanol (55.0% to 65.0%), specific gravity (0.873 to 0.965 g/cm³), residue on evaporation (not less than 1.0%), total flavonoids taken on isoquercitrin (not less than 0.80 mg/ml or not less than 0.08%), were identified during this study. Finished heather shoots tincture was stable for 24 months under room temperature and $65 \pm 5\%$ relative humidity, protected from light.

Ключевые слова: *Calluna vulgaris*, настойка, мацерация, стандартизация.

Keywords: *Calluna vulgaris*, tincture, maceration, standardization.

Введение

Учитывая возрастающую потребность в лекарственных средствах природного происхождения, для фармацевтической промышленности интерес представляют виды растений, произрастающие или культивируемые на территории страны-производителя. Вереск обыкновенный (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.) имеет достаточную сырьевую базу, поскольку



произрастает на территории Российской Федерации и Республики Беларусь в достаточном количестве. Данное растение встречается в лесу, а также на открытых участках.

Культура вереска невероятно устойчива к болезням и практически не поражается вредителями. Некоторые декоративные сорта вереска обыкновенного были введены в культуру уже в середине XVIII века. В настоящее время самая большая коллекция, насчитывающая около 300 сортов, собрана в Германии. Ученые-селекционеры значительно продвинулись в разведении новых сортов вереска с использованием методов генетического конструирования и ДНК-штрихкодирования [Sannikov et al., 2014]. Так были выявлены ДНК-маркерные последовательности, которые позволяют идентифицировать декоративные растения с бутонным типом цветения (*but-flowering*) на ранних стадиях, что значительно ускоряет процесс селекции [Borchert, Hohe 2009].

Согласно экспериментальным данным спиртовые извлечения из побегов вереска обыкновенного проявляют противовоспалительную, мочегонную и антимикробную активность [Orhan et al., 2007; Веремчук, Моисеев, 2016; Vučić et al., 2014]. Содержащиеся в наземной и подземной частях растения фенольные соединения обеспечивают антиоксидантные свойства [Deligman-Orhan et al., 2009]. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* было показано, что спиртовые экстракты вереска обыкновенного побегов обладают противопаразитарной активностью [Moreno-Gonzalo et al., 2013 a, b]. Биологически активные вещества некоторых представителей семейства *Ericaceae* способны оказывать фотозащитное действие от ультрафиолетового излучения, в частности экстракты, полученные из *Calluna vulgaris* [Olteanu et al., 2012], *Empetrum nigrum* [Kim et al., 2013].

Химический состав вереска обыкновенного достаточно подробно описан в литературе [Monschein et al., 2010]. Ранее было установлено, что основным компонентом, отвечающим за противовоспалительные свойства настойки вереска обыкновенного, является флавоноид изокверцитрин [Веремчук, Моисеев, 2016].

В эксперименте *in vitro* показано, что изокверцитрин, выделенный из экстракта *Bidens bipinnata* L., в значительной степени ингибировал пролиферацию раковых клеток печени человека, ускорял их апоптоз и блокировал их развитие в фазе G1 [Huang et al., 2014]. Индивидуальный изокверцитрин, выделенный из *Craibiodendron yunnanense* W.W. Smith., положительно влиял на пролиферативную активность, остеогенную дифференцировку и минерализацию клеток линии MC3T3-E1. При этом в дозах от 1 ммоль/л изокверцитрин оказывал наиболее выраженный эффект. Эти данные подтверждают возможность использования *C. yunnanense* при переломах костей [Duan et al., 2014].

Изокверцитрин, как и рутин, способен укреплять стенки кровеносных сосудов и улучшать кровообращение. Благодаря этим свойствам изокверцитрин можно использовать для лечения варикозного расширения вен, геморроидальных состояний. Изокверцитрин также способен улучшать функции головного мозга, что может быть использовано при лечении прогрессирующей болезни Альцгеймера [De Rovira, 2008]. Это подтверждает способность экстракта из наземной части вереска обыкновенного ингибировать моноаминоксидазу [Ghedira, Goetz, 2013]. Также были изучены мочегонные свойства изокверцитрина [Gasparotto Junior et al., 2011]. Изокверцитрин в дозах 2-100 мг/кг обладает выраженным диуретическим действием у крыс линии SHR, при этом экскреция Na^+ и K^+ не нарушается.

Данные литературных источников указывают на использование вереска обыкновенного в народной медицине преимущественно в виде настоя или сиропа [Пустырский, Прохоров, 2000; Маркова, 2007]. На фармацевтическом рынке присутствуют растительные сборы и чай, в состав которых включен вереск обыкновенный. В частности, трава вереска входит в состав травяного чая «Leros Натур Детокс, очищающий чай» производства «Leros», Республика Чехия. Очевидно, что технология приготовления настоев не универсальна, что влечет за собой некорректное дозирование, а в некоторых случаях и отсутствие фармакологического эффекта. Нами было установлено, что содержание суммы флавоноидов в водном извлечении из побегов вереска обыкновенного на 10-15% ниже, чем в извлечении, полученном с использованием 60% спирта этилового. Таким образом, водные

извлечения из вереска обыкновенного побегов не удобны для применения, не позволяют получить лекарственную форму с известной концентрацией БАВ, а также нестабильны при хранении.

Настойки являются одной из самых распространенных лекарственных форм на основе растительного сырья. Они просты в изготовлении и имеют сравнительно невысокую стоимость [Минина, 2004].

Учитывая то, что БАВ вереска обыкновенного лучше всего извлекаются спиртом, и лекарственные формы, содержащие спирт, устойчивы к микроорганизмам, целью данного исследования было подобрать оптимальные условия получения настойки вереска обыкновенного побегов и разработать критерии качества готового продукта.

Объекты и методы исследования

Использовали вереска обыкновенного побеги, заготовленные в местах естественного произрастания в 2013, 2014 годах. Сырье подвергалось воздушно-теневого сушке и хранилось в сухом, проветриваемом помещении в бумажных пакетах.

Для подбора оптимального режима экстракции настойки получали методами мацерации, бисмацерации, ремацерации и мацерации с использованием ультразвука для ускорения процесса экстракции [Минина, 2004; Valachovic et al., 2001]. При проведении эксперимента варьировали следующие параметры: концентрация экстрагента, соотношение сырье-экстрагент, кратность экстракции. В качестве экстрагента использовали спирт этиловый в диапазоне концентраций от 30% до 90% (об/об). Коэффициент спиртопоглощения составил 2.83 мл/г.

Хроматографическое определение флавоноидов проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1100 («Agilent Technologies», США) с диодно-матричным детектором. Сбор данных, обработку хроматограмм и спектров поглощения осуществляли при помощи компьютерной программы Agilent ChemStation for LC 3D. В качестве неподвижной фазы использовали хроматографическую колонку Zorbax SB C-8 4.6×250 мм с размером частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смесь 0.01 М раствора калия дигидрофосфата (pH=3.0) и ацетонитрила в объемном соотношении 80:20. В качестве раствора сравнения использовали спиртовой раствор стандартного образца изокверцитрина (Sigma, Lot#BCBL9721V).

Результаты и их обсуждение

С целью подбора оптимальных условий для приготовления настойки из вереска обыкновенного побегов изучали влияние концентрации спирта, соотношения компонентов и режима экстракции на полноту извлечения флавоноидов.

В качестве экстрагента для приготовления настоек, как правило, используют спирт этиловый в концентрации от 30 до 90% [Минина, 2004]. Для уточнения концентрации экстрагента, позволяющего извлекать максимальное количество флавоноидов в режиме мацерации, готовили настойки вереска обыкновенного побегов 1:10 с использованием спирта различной концентрации (от 30% до 90%, об/об). Пробы для анализа отбирали из готовых настоек и рассчитывали степень извлечения суммы флавоноидов. Для расчета за 100% брали результат количественного определения суммы флавоноидов методом ВЭЖХ в исходном сырье вереска обыкновенного побегов. Максимальный выход флавоноидов наблюдался при использовании в качестве экстрагента 60% этанола (об/об) (рис. 1). Далее настаивание осуществляли только для образцов с использованием 60% этанола (об/об) в качестве экстрагента и отбирали пробы полученной настойки на 3-ий, 4-ый, 5-ый, 6-ой и 7-ой день. Было установлено, что концентрация флавоноидов в извлечении постепенно возрастает и достигает максимума к 6-ому дню (рис. 2).

Согласно определению Государственной фармакопеи Российской Федерации, настойки готовят в соотношении 1:5, а настойки из сырья, содержащего алкалоиды и сер-

дечные гликозиды, – 1:10 [ГФ РФ XIII]. Государственная фармакопея Республики Беларусь рекомендует для получения настоек использовать одну часть сырья и десять частей экстрагента или одну часть сырья и пять частей экстрагента [ГФ РБ II]. Нами экспериментально было установлено, что для приготовления настойки вереска обыкновенного побегов оптимальным является соотношение 1:10 (табл. 1).

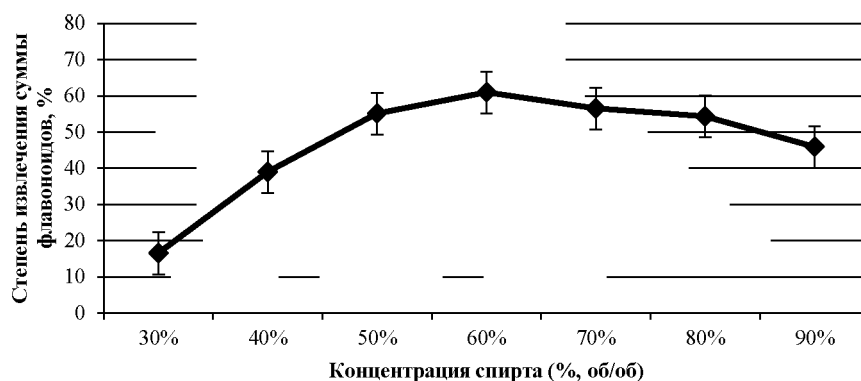


Рис. 1. Зависимость полноты экстракции флавоноидов от концентрации спирта (% об/об)
Fig. 1. Dependence of flavonoids extraction completeness on ethanol concentration (% v/v)

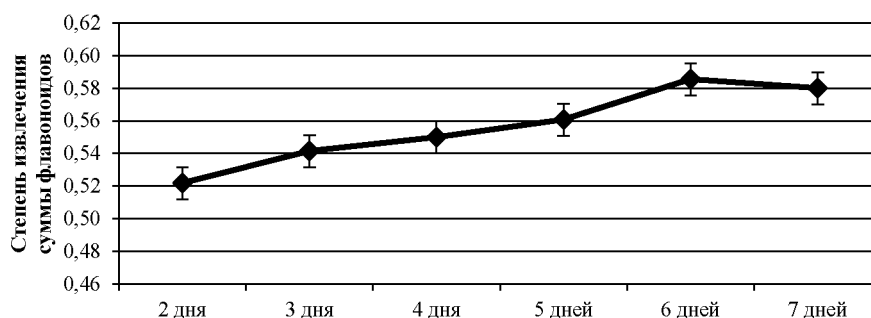


Рис. 2. Зависимость полноты экстракции флавоноидов от продолжительности настаивания
Fig. 2. Dependence of flavonoids extraction completeness on process duration

Таблица 1
Table 1

Зависимость полноты экстракции флавоноидов от соотношения сырья и экстрагента
Dependence of flavonoids extraction completeness on raw material-extragent ratio

Соотношение сырье экстрагент	Степень извлечения суммы флавоноидов, %
1:5	46.4-53.0
1:10	55.8-61.0
1:15	49.0-57.4

Мацерация является одним из самых простых способов получения настоек, однако имеет свои недостатки, в частности требует значительных временных затрат. С целью ускорения процесса экстракции в промышленности используют различные методы интенсификации процесса массообмена [Минина, 2004], среди которых мы выбрали метод ультразвуковой (УЗ) экстракции. Для полученных настоек были определены следующие показатели: описание, сухой остаток, содержание изокверцитрина и суммы флавоноидов (табл. 2).

Таблица 2
Table 2

Показатели качества настоек вереска обыкновенного побегов, полученных при разных режимах настаивания (n=3)
Quality parameters of heather shoots tinctures obtained in different extraction modes (n=3)

Режим настаивания	Описание	Сухой остаток, г/л	Содержание флавоноидов, мг/мл	Содержание изокверцитрина, мг/мл
Мацерация	Прозрачная жидкость, светло-коричневого цвета, с характерным ароматным запахом	19.80±0.03	2.08±0.03	1.09±0.09
Бисмацерация		17.20±0.02	2.03±0.04	1.38±0.01
Мацерация+УЗ		21.72±0.04	2.14±0.02	1.72±0.02
Бисмацерация+УЗ		22.70±0.02	2.06±0.03	1.66±0.01
Ремацерация+УЗ		17.75±0.03	1.98±0.02	1.59±0.02

Наиболее эффективным способом получения настойки из вереска обыкновенного побегов среди перечисленных оказался способ мацерации с использованием ультразвука. Одну часть сырья заливали десятью частями экстрагента с учетом коэффициента спиртопоглощения, проводили обработку ультразвуком в течение 40 минут. Вытяжку сливали, отжимали и отстаивали при 2-8°C в течение суток. Затем фильтровали через бумажный фильтр. Следует отметить, что при использовании ультразвука вытяжка получается мутной из-за большого количества взвешенных частиц сырья, однако она достаточно легко очищается в процессе фильтрации. Таким образом, настойку вереска обыкновенного побегов следует получать способом мацерации с применением ультразвука.

Стандартизацию готовой настойки проводили по следующим параметрам: описание, идентификация, сухой остаток, содержание этанола, относительная плотность, количественное определение. Готовая настойка вереска обыкновенного побегов представляет собой прозрачную жидкость светло-коричневого цвета, с характерным ароматным медовым запахом, горьковатую на вкус. При хранении допускается образование осадка. При идентификации сравнивали времена удерживания пиков на хроматограммах испытуемых образцов и хроматограммах стандартных образцов, в том числе изокверцитрина [Моисеев и др., 2011]. На хроматограмме испытуемого раствора были идентифицированы рутин, гиперозид, кемпферол-3-глюкозид, гербацетин-8-глюкозид, кверцетин, лютеолин (табл. 3, рис. 4). Идентификацию гидроксикоричных кислот проводили в условиях, приведенных в работе [Моисеев, 2014], а затем осуществляли их определение при более высоком содержании ацетонитрила в подвижной фазе.

Установили, что содержание этанола в готовой настойке должно быть в пределах от 55.0 до 65.0%. Относительная плотность должна быть в пределах от 0.873 до 0.965 г/см³. Сухой остаток должен быть не менее 1.0%.

Количественное определение суммы флавоноидов в настойке вереска обыкновенного побегов проводили при помощи метода жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием. Средний выход суммы флавоноидов при получении настойки вереска обыкновенного побегов способом мацерации составил 59.6±2.5%. Исходя из того, что рекомендуемый предел количественного содержания суммы флавоноидов в вереска обыкновенного побегах составляет не менее 1.5%, а также принимая во внимание результаты, полученные в ходе эксперимента, содержание суммы флавоноидов, соответствующих пикам 1, 2 и 3 (см. рис. 4), в настойке вереска обыкновенного побегов должно составлять не менее 0.80 мг/мл или не менее 0.08%.

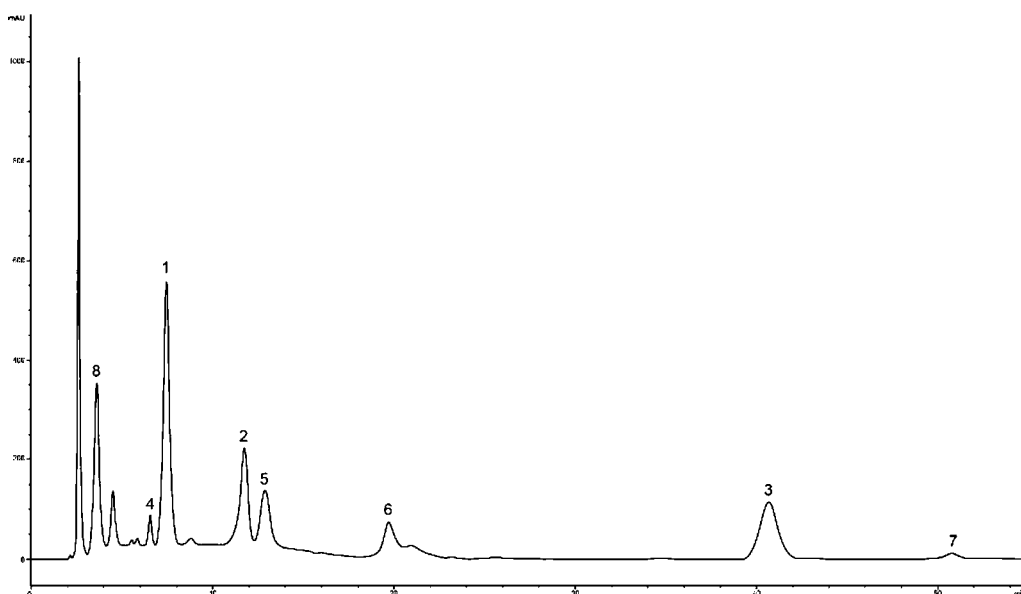
Далее проводили изучение стабильности настойки вереска обыкновенного побегов при хранении в условиях комнатной температуры ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) в течение 24 месяцев в защищенном от света месте. Для этого готовили три серии настоек.

Таблица 3
Table 3

Компоненты настойки вереска обыкновенного побегов
Heather shoots tincture components

Вещество	Относительное время удерживания ¹	Содержание, %
Хлорогеновая кислота	0.49	14.1
Рутин	0.89	3.1
Изокверцитрин	1.00	35.1
Гиперозид	1.57	13.6
Кемпферол-3-глюкозид	1.73	9.9
Гербацетин-8-глюкозид	2.81	5.8
Кверцетин	5.59	16.8
Лютеолин	7.07	1.5

Примечание: относительное время удерживания рассчитывали по отношению ко времени удерживания пика изокверцитрина. Содержание веществ рассчитывали по методу нормализации по отношению площади пика исследуемого вещества к сумме площадей пиков всех веществ.



1 - изокверцитрин, 2 - гиперозид, 3 - кверцетин, 4 - рутин, 5 - кемпферол-3-глюкозид, 6 - гербацетин-8-глюкозид, 7 – лютеолин, 8 - хлорогеновая кислота

Рис. 4. Хроматограмма настойки вереска обыкновенного побегов
Fig. 4. Heather shoots tincture chromatogram

В процессе хранения на хроматограммах исследуемых настоек не наблюдали отсутствия основных пиков или появления новых пиков по сравнению с исходной хроматограммой. Изменения в количественных показателях происходили в пределах допустимых значений (табл. 4).

Таким образом, можно заключить, что настойка вереска обыкновенного побегов является стабильной по показателям «описание» и «количественное определение» в течение 24 месяцев при хранении в условиях комнатной температуры ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) в защищенном от света месте.

Таблица 4
Table 4

Результаты анализа настойки вереска обыкновенного побегов в процессе хранения
Heather shoots tincture analysis results obtained during storage

Период контроля, мес.	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на изокверцитрин, мг/мл		
	Серия 1	Серия 2	Серия 3
Исходная настойка	1.87±0.06	1.55±0.05	2.06±0.06
3	1.89±0.04	1.54±0.04	2.05±0.04
6	1.85±0.05	1.56±0.05	2.06±0.05
9	1.86±0.04	1.56±0.03	2.04±0.05
12	1.85±0.05	1.53±0.04	2.04±0.04
18	1.77±0.03	1.52±0.04	2.02±0.06
24	1.74±0.04	1.53±0.06	1.95±0.04

Заключение

1. Экспериментальным путем подобраны оптимальные условия получения настойки вереска обыкновенного побегов, которые заключаются в настаивании 1 части измельченного сырья (750) в 10 частях 60% спирта этилового в течение 40 минут при воздействии ультразвука.

2. В готовой настойке методом жидкостной хроматографии идентифицированы хлорогеновая кислота, рутин, изокверцитрин, гиперозид, кемпферол-3-глюкозид, гебрацетин-8-глюкозид, кверцетин и лютеолин. Доминирующим компонентом является изокверцитрин, относительное содержание которого составило 35%.

3. Для осуществления контроля качества настойки вереска обыкновенного побегов рекомендуются следующие показатели качества: идентификация методом жидкостной хроматографии; содержание этанола (от 55.0% до 65.0%); относительная плотность (от 0.873 до 0.965 г/см³); сухой остаток (не менее 1.0%); содержание суммы флавоноидов в пересчете на изокверцитрин (не менее 0.80 мг/мл или не менее 0.08%).

4. В ходе испытаний стабильности было установлено, что настойка вереска обыкновенного побегов стабильна при хранении в течение 24 месяцев при комнатной температуре и относительной влажности 65±5% в защищенном от света месте. При хранении настойки в указанных условиях не происходило значимых отклонений в показателях «описание» и «количественное определение».

Список литературы References

1. Веремчук О.А., Моисеев Д.В. 2016. Противовоспалительная активность настойки побегов вереска обыкновенного и ее основного компонента. Вестник ВГУ, серия «Химия. Биология. Фармация», 2: 109-113.

Veremchuk O.A., Moiseev D.V. 2016. Protivovospalitel'naya aktivnost' nastojki pobegov vereska obyknovennogo i ee osnovnogo komponenta [Anti-inflammatory activity of heather shoots tincture and its main constituent]. Vestnik VGU, seriya «Himiya. Biologiya. Farmaciya», 2: 109-113. (in Russian)

2. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II). Т. 1. Общие методы контроля качества лекарственных средств, под. общ. ред. А.А. Шерякова. Молодечно, Тип. «Победа», 2012.

Gosudarstvennaya farmakopeya Respubliki Belarus' (GF RB II). T. 1. [State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus]. Obshhie metody kontrolya kachestva lekarstvennykh sredstv, pod. obshh. red. A.A. Sheryakova. Molodechno, Tip. «Pobeda», 2012. (in Russian)

3. Государственная фармакопея Российской Федерации (ГФРФ XIII, том II). URL: <http://www.femb.ru> (дата обращения: 02 мая 2017).



Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federatsii (GFRF XIII, tom II) [State Pharmacopoeia of Russian Federation]. Available at: <http://www.femb.ru> (accessed 02 May 2017). (in Russian)

4. Минина С.А., Каухова Е.И. 2004. Химия и технология фитопрепаратов. Уч. пособие для вузов. М., ГЭОТАР-МЕД, 560.

Minina S.A., Kaukhova E.I. 2004. Khimiya i tekhnologiya fitopreparatov [Chemistry and phytochemistry of plant formulations]. Uch. Posobie dlya vuzov. M., GEOTAR-MED, 560. (in Russian)

5. Моисеев Д.В. 2014. Определение фенольных кислот в растениях методом ВЭЖХ. Химия растительного сырья, 3: 171-174.

Moiseev D.V. 2014. Opredelenie fenol'nykh kislot v rasteniyakh metodom HPLC [Determination of phenolic acids in plants by HPLC]. Khimiya rastitel'nogo syr'ya, 3: 171-174. (in Russian)

6. Моисеев Д.В., Бузук Г.Н., Шелюто В.Л., 2011. Идентификация флавоноидов в растениях методом ВЭЖХ. Химико-фармацевтический журнал, 45 (1): 35-38.

Moiseev D.V., Buzuk G.N., Shelyuto V.L., 2011. Identifikatsiya flavonoidov v rasteniyakh metodom HPLC [HPLC identification of flavonoids in plants]. Himiko-farmaceuticheskiy zhurnal, 45 (1): 35-38 (in Russian).

7. Травник: золотые рецепты народной медицины. Сост. А. Маркова. М., Эксмо; Форум, 2007.

Travnik: zoloty retsepty narodnoj meditsiny [Travnik: golden recipes of folk medicine]. Sost. A. Markova. M., Ehksmo; Forum, 2007. (in Russian)

8. Универсальная энциклопедия лекарственных растений. Сост. И. Пустырский, В. Прохоров. Мн., Книжный дом; М., Махаон, 2000.

Universal'naya ehntsiklopediya lekarstvennykh rastenij [Universal encyclopedia of medicinal plants]. Sost. I. Pustyrskij, V. Prokhorov. Mn., Knizhnyjdom; M., Makhaon, 2000. (in Russian)

9. Borchert T., Hohe A. 2009. Identification of molecular markers for the flower type in the ornamental crop *Calluna vulgaris*. Euphytica, 170: 203-213.

10. De Rovira D.A. 2004. Dictionary of Flavors. Ames, Iowa, USA, John Wiley & Sons Ltd., 735.

11. Deliorman-Orhan D., Şenol S., Kartal M., Orhan, I. 2009. Assessment of antiradical potential of *Calluna vulgaris* (L.) Hull and its major flavonoids. Journal of the Science of Food and Agriculture, 89: 809-814.

12. Duan A.Z., Deng X.L., Li R.T. 2014. Effects of isoquercitrin from *Craibiodendron yunnanense* on osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells. China Journal of Chinese Materia Medica, 39 (9): 3836-3840.

13. Gasparotto Junior A., Gasparotto F.M., Boffo M.A., Lourenço E.L., Stefanello M.É., Salvador M.J., da Silva-Santos J.E., Marques M.C., Kassuya C.A. 2011. Diuretic and potassium-sparing effect of isoquercitrin an active flavonoid of *Tropaeolum majus* L. Journal of Ethnopharmacology, 134: 210-215.

14. Ghedira K., Goetz P. 2013. Bruyère commune: *Calluna vulgaris* (L.) Hull. Ou *Calluna vulgaris* Salisb. (Ericaceae). Phytothérapie, 11: 52-55.

15. Huang G., Tang B., Tang K., Dong X., Deng J., Liao L., Liao Z., Yang H., He S. 2014. Isoquercitrin inhibits the progression of liver cancer in vivo and in vitro via the MAPK signalling pathway. Oncology Reports, 5: 2377-2384.

16. Kim K.C., Kim D., Kim S.C., Jung E., Park D., Hyun J.W. 2013. Empetrum nigrum var. Japonicum extract suppresses ultraviolet B-induced cell damage via absorption of radiation and inhibition of oxidative stress. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013: 1-10.

17. Monschein M., Neira J.I., Kunert O., Bucar F. 2010. Phytochemistry of heather (*Calluna vulgaris* (L.) Hill.) and its altitudinal alteration. Phytochemistry Reviews, 9: 205-215.

18. Olteanu E.D., Filip A., Clichici S., Daicoviciu D., Achim M., Postescu I.D., Bolfa P., Bolojan L., Vlase L., Muresan A. 2012. Photochemoprotective effect of *Calluna vulgaris* extract on skin exposed to multiple doses of ultraviolet B in SKH-1 hairless mice. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology, 31 (3): 233-243.

19. Orhan I., Küpeli E., Terzioğlu S., Yesilada E. 2007. Bioassay-guided isolation of kaempferol-3-O-β-D-galactoside with anti-inflammatory and antinociceptive activity from the aerial part of *Calluna vulgaris* L. Journal of Ethnopharmacology, 114: 32-37.

20. Sannikov S.N., Petrova I.V., Dymshakova O.S., Cherepanova O.E. 2014. Genetic and Phenotypic Differentiation of *Calluna vulgaris* (L.) Hull. in Pritobolie and Europe. Russian Journal of Genetics, 50 (9): 925-933.

21. Valachovic P., Pechova A., Mason T.J. 2001. Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction. Ultrasonics Sonochemistry, 8 (2): 111-117.

22. Vučić D.M., Petković M.R., Rodić-Grabovac B.B., Stefanović O.D., Sasić S.M., Čomić L.R. 2014. In vitro activity of heather [*Calluna vulgaris* (L.) Hull] extracts on selected urinary tract pathogens. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 14 (4): 234-238.