

ОСНОВЫ БИОХИМИИ ВТОРИЧНОГО ОБМЕНА РАСТЕНИЙ

Учебно-методическое пособие



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
УРАЛЬСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ПЕРВОГО ПРЕЗИДЕНТА РОССИИ Б. Н. ЕЛЬЦИНА

ОСНОВЫ БИОХИМИИ ВТОРИЧНОГО ОБМЕНА РАСТЕНИЙ

Рекомендовано методическим советом УрФУ
в качестве учебно-методического пособия для студентов,
обучающихся по программам магистратуры
по направлению подготовки 020400 «Биология»

Екатеринбург
Издательство Уральского университета
2014

УДК 581.19(07)
О-753

Авторы:

Г. Г. Борисова, А. А. Ермошин, М. Г. Малева, Н. В. Чукина

Под общей редакцией

Г. Г. Борисовой

Рецензенты:

лаборатория биотехнологии растений

Филиала Института биоорганической химии РАН

(заведующий лабораторией

доктор биологических наук, профессор Я. И. Бурьянов);

Е. Н. Шарафутдинова, кандидат химических наук, доцент
(Уральский государственный экономический университет)

Основы биохимии вторичного обмена растений : [учеб.-
О-753 метод. пособие] / [Г. Г. Борисова, А. А. Ермошин, М. Г. Малева,
Н. В. Чукина ; под общ. ред. Г. Г. Борисовой] ; М-во образования
и науки Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. — Екатеринбург :
Изд-во Урал. ун-та, 2014. — 128 с.

ISBN 978-5-7996-1296-2

В учебно-методическом пособии показаны пути биосинтеза основных групп вторичных метаболитов растений. Отражены современные методические подходы к качественному и количественному определению вторичных метаболитов.

Пособие будет полезно студентам-магистрантам при выполнении блока лабораторно-практических занятий в рамках специальных курсов, а также аспирантам при проведении экспериментальных исследований.

УДК 581.19(07)

ISBN 978-5-7996-1296-2

© Уральский федеральный университет, 2014
© Борисова Г. Г., Ермошин А. А.,
Малева М. Г., Чукина Н. В., 2014

ПРЕДИСЛОВИЕ

Последние десятилетия характеризуются бурным развитием разделов физиологии и фармакологии, связанных с изучением вторичных метаболитов растений. Благодаря возникновению новых методов анализа и идентификации веществ уже идентифицировано около 100 тыс. индивидуальных соединений вторичного происхождения [см.: 1, с. 589].

Цель учебно-методического пособия — обеспечение эффективности и результативности самостоятельной работы студентов, обучающихся по магистерским программам «Физиология и биохимия растений», «Ботаника». Пособие составлено с учетом программы специального курса «Биохимия вторичного обмена».

Задачи пособия:

– активизация самостоятельной работы студентов, управление их познавательной деятельностью, обеспечение контроля за ходом самостоятельной работы;

– ознакомление студентов с современными научно-методическими подходами к качественному и количественному анализу вторичных соединений.

Самостоятельная работа студентов заключается в освоении теоретического материала, подготовке рефератов и презентаций по отдельным темам и самопроверке знаний с использованием контрольных вопросов и тестовых материалов.

В первом разделе пособия отражены общие представления о вторичном обмене растений. Во втором дана краткая характеристика основных групп вторичных метаболитов, рассмотрены основные пути их биосинтеза и представлен обзор современных физико-химических методов, которые используются при изучении вторичного обмена.

В задачу авторов пособия не входило подробное освещение теоретических вопросов, касающихся фитохимии и физиологии

вторичного метаболизма. Особое внимание ими уделено методическим аспектам: по каждому разделу приводятся контрольные вопросы и тестовые задания, которые рекомендуется использовать студентам для самоконтроля.

В третьем разделе пособия рассмотрены общие принципы биохимического анализа вторичных метаболитов растений, приведена краткая характеристика физико-химических методов исследования и отражены научно-методические принципы определения основных групп вторичных соединений. Этот материал служит основой для понимания современных подходов к изучению вторичного обмена растений и более успешного проведения лабораторного практикума, который является неотъемлемой частью образовательного процесса при освоении магистерских программ.

В конце пособия приводится список библиографических ссылок, а также список рекомендуемой литературы, с которым студенты могут ознакомиться при углубленном изучении отдельных разделов и подготовке рефератов.

Раздел 1

**ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ
О ВТОРИЧНОМ ОБМЕНЕ РАСТЕНИЙ**

**Тема 1. Характерные особенности
вторичных метаболитов**

Помимо первичных метаболитов — углеводов, аминокислот, жирных кислот, хлорофиллов, цитохромов, нуклеотидов, а также соединений, являющихся интермедиатами различных метаболических реакций, растения содержат огромное количество веществ, которые не участвуют в основном обмене. Их принято называть вторичными метаболитами, или веществами вторичного происхождения. В отличие от первичных метаболитов, присутствующих во всех растительных клетках, вторичные метаболиты могут быть специфичны для одного или нескольких видов растений [см.: 2, с. 322].

Термин «вещества вторичного происхождения» весьма условный, поскольку многие из этих веществ являются важнейшими физиологически активными соединениями, играющими первостепенную роль в процессах дыхания и фотосинтеза [см.: 3, с. 312].

К настоящему времени на предмет присутствия вторичных метаболитов исследовано около 20–30 тыс. видов растений — примерно 10–15 % от всей флоры Земли [см.: 1, с. 589].

Наиболее многочисленными группами вторичных метаболитов являются: изопреноиды, фенольные соединения и алкалоиды. Каждая из этих групп подразделяется на многочисленные подгруппы.

Кроме этих основных групп, выделяют минорные классы вторичных соединений растительного происхождения: цианогенные гликозиды, серосодержащие гликозиды (тиогликозиды), растительные амины, небелковые аминокислоты, полиацетилены,

беталаины, тиофены и др. Некоторые авторы к веществам вторичного метаболизма относят также органические кислоты алифатического ряда [см.: 4, с. 143], фитогормоны [см.: 5, с. 207].

В настоящее время известно более десятка групп (классов) вторичных метаболитов. При этом некоторые группы насчитывают по несколько тысяч индивидуальных соединений, некоторые — от единиц до нескольких сотен (минорные группы). Число идентифицированных веществ с каждым годом непрерывно пополняется новыми соединениями.

Вещества вторичного метаболизма разных групп в растительном мире распределены неравномерно. Например, фенольные соединения имеют всеобщее распространение в растениях, в то время как алкалоиды образуются лишь у 10–15 % сосудистых растений. Причем отдельные представители этого класса синтезируются у очень узкого круга растений. Беталаины обнаружены только у растений одного порядка, а серосодержащие и цианогенные гликозиды встречаются лишь в растениях нескольких семейств.

Существуют ли четкие критерии, позволяющие отнести то или иное вещество или группу веществ сходного строения к веществам первичного или вторичного метаболизма?

Принято выделять четыре основополагающих признака вторичных метаболитов [см.: 1, с. 590]:

- присутствие не во всех растениях;
- наличие биологической активности;
- относительно низкая молекулярная масса;
- небольшой набор исходных соединений для синтеза самых разнообразных вторичных метаболитов.

Каждый из этих признаков не является обязательным. Многие фенольные соединения и изопреноиды присутствуют у всех растений. Некоторые соединения вторичного обмена (например, каучук и гутта) имеют высокую молекулярную массу. Тем не менее совокупность этих критериев достаточно четко очерчивает круг вторичных метаболитов растений.

Установлено, что вторичные метаболиты образуются из очень небольшого числа предшественников: 5–6 аминокислот для

алкалоидов, фенилаланин или тирозин для фенольных соединений, мевалоновая кислота или 5-оксисилулоза для изопреноидов.

Вещества вторичного метаболизма не имеют собственных путей синтеза и для своего образования используют основные метаболические пути растений. Их биосинтез происходит на ответвлениях метаболических путей белков, углеводов, липидов, где функционирует широкий спектр ферментов, обуславливающих способность растений синтезировать разнообразные вещества.

Вторичные метаболиты могут находиться в различных частях клетки, ткани, органа растения. Фенольные соединения образуются в каждом растении и присутствуют в разных органах и тканях (корень, стебли, листья, цветы, плоды, семена) и в каждой растительной клетке [см.: 6, с. 107]. Алкалоиды чаще всего накапливаются не в тех тканях, в которых синтезируются. Например, никотин синтезируется в корнях табака, а затем переносится и запасается в листьях.

Соединения вторичного обмена, как правило, распределены в тканях неравномерно. Часто они накапливаются в идиобластах, млечниках, специальных каналах и ходах. Для внутриклеточной локализации вторичных метаболитов характерно их накопление в «метаболически неактивных» компартментах клетки — в вакуоли, периплазматическом пространстве, клеточной стенке. При этом обычно их синтез проходит в других компартментах — чаще всего в цитозоле, эндоплазматическом ретикулуме и хлоропластах. Вторичные метаболиты выделяются во внешнюю среду с помощью выделительных тканей (железистых клеток, железистых волосков — трихом).

Поскольку вторичные метаболиты, как правило, отличаются высокой биологической активностью, а следовательно, могут вызвать повреждения цитоплазмы, у растений должны существовать механизмы, обезвреживающие их. В растениях имеются два основных пути защиты от химически активных веществ: компартиментация в пространственно разделенных клеточных органеллах и химическая модификация до относительно безвредных соединений.

В процессе изучения вторичного метаболизма было выдвинуто несколько гипотез о функциональной значимости этих соединений [см.: 1, с. 614]. Первой появилась гипотеза об отсутствии этой роли. Она существовала со времен А. Косселя, который и определил вторичные метаболиты как «нечаянно» синтезируемые растительной клеткой. Исходя из этой гипотезы, вторичные метаболиты считались «отбросами» жизнедеятельности растений, «тупиками метаболизма». Вторая гипотеза утверждала запаасающую роль вторичных метаболитов. Третья гипотеза заключалась в предположении о том, что все вторичные метаболиты на самом деле являются первичными, просто в силу ограниченности наших знаний пока еще неизвестно, в каких важных процессах они участвуют. Исходной точкой для такой идеи было открытие шикиматного пути синтеза ароматических соединений. Наибольшее признание получила гипотеза о защитной роли вторичных соединений.

Многие вторичные метаболиты выполняют функции конститутивных, полуиндуцибельных или индуцибельных защитных соединений. Однако этими функциями их роль в жизни растения далеко не исчерпывается. Многообразие вторичных метаболитов обуславливает и многообразие выполняемых ими функций. Но обобщенно можно сказать, что вторичные метаболиты выполняют в растениях прежде всего экологические функции. Они защищают растения от различных вредителей и патогенов, участвуют в размножении растения (обуславливая окраску и запах цветков, плодов), обеспечивают взаимодействие растений между собой и другими организмами в экосистеме [см.: 2, с. 322]. Условия местообитаний для разных видов растений весьма разнообразны. Более того, каждый вид растения может «решать» сходные задачи по-своему. Этим и объясняется разнообразие соединений вторичного метаболизма растений и уникальность их набора для вида растения.

Таким образом, группа метаболитов под названием «вещества вторичного метаболизма» охватывает почти безграничный спектр самых разнообразных соединений, синтезируемых главным образом растениями. Эти вещества выполняют различные функции, причем далеко не все из этих функций к настоящему времени выяснены.

Очевидно, четкую границу между первичным и вторичным метаболизмом, а следовательно, между первичными и вторичными метаболитами во многих случаях провести невозможно. Отнести соединение к первичным или вторичным метаболитам можно только на основе выяснения его функциональной значимости. Наиболее аргументированной к настоящему времени является гипотеза, что, в отличие от первичных метаболитов, соединения вторичного метаболизма имеют функциональное значение не на уровне клетки, а на уровне целого организма. Вторичные метаболиты являются «средством общения и взаимоотношения между организмами» [7, с. 8].

С давних времен вещества вторичного обмена нашли широкое применение в медицине, фармакологии, ветеринарии и других областях.

Содержание вторичных метаболитов в тканях растений может служить таксономическим признаком в систематике.

Растения, отличающиеся существенным накоплением тех или иных вторичных метаболитов, являются ценным сырьем для многих отраслей промышленности.

Присутствие некоторых из вторичных метаболитов в растительном сырье в значительной степени определяет биологическую ценность, вкус и аромат получаемых пищевых продуктов.

Тема 2. Основные принципы классификации вторичных метаболитов

В настоящее время можно встретить элементы четырех вариантов классификации вторичных соединений [см.: 1, с. 591].

Эмпирическая (тривиальная) классификация

Это самый древний принцип классификации. Он основан на определенных свойствах вторичных метаболитов. Например, алкалоиды — соединения, имеющие щелочные свойства; сапонины — вещества, образующие при встряхивании пену (от *Saponaria* — мыльнянка); горечи — соединения с горьким вкусом; эфирные

масла — ароматные летучие вторичные метаболиты. Подобный принцип классификации имеет много недостатков, однако его элементы встречаются до сих пор в силу традиции и длительного употребления.

Химическая классификация

Данный вариант классификации основан на признаках химической структуры вторичных метаболитов и в настоящее время наиболее разработан и распространен. Однако и эта классификация не лишена недостатков. Например, алкалоиды по такой классификации — соединения, имеющие атом азота в гетероцикле. По этому признаку гликоалкалоиды картофеля или томатов — типичные алкалоиды. Однако по способу синтеза, структуре и ряду свойств эти соединения являются изопреноидами.

Биохимическая классификация

Данная классификация базируется на способах биосинтеза вторичных метаболитов. Например, согласно этой классификации, упомянутые выше гликоалкалоиды относятся к тритерпеновым псевдоалкалоидам, так как синтезируются, как и стероидные гликозиды, по изопреноидному пути. Очевидно, это наиболее обоснованный вариант классификации. Однако поскольку биохимия вторичного метаболизма еще недостаточно разработана, то такая классификация находится в периоде становления.

Функциональная классификация

Основана на функциях вторичных метаболитов в интактном растении. Этот вариант принципиально отличается от предыдущих и должен существовать параллельно с ними. Согласно данной классификации в одну группу соединений могут попадать химически разные структуры. Например, фитоалексины (вторичные метаболиты, имеющие защитные функции и синтезирующиеся в ответ на атаку патогена) представлены у разных видов растений фенольными соединениями, изопреноидами, полиацетиленами и др. Разработка функциональной классификации вторичных метаболитов

только начинается, но она имеет принципиальное значение для физиологии растений.

Отсутствие единой классификации вторичных метаболитов приводит к определенным сложностям. В частности, при использовании разных признаков, используемых при химической классификации, возможно «перекрытие» групп вторичных метаболитов. Например, в фармакогнозии в качестве действующих веществ многих лекарственных растений выделяют гликозиды (соединения, молекула которых состоит из агликона и углеводного фрагмента) в отдельную группу. В то же время по структуре агликона эти гликозиды могут быть отнесены к фенольным соединениям, изопреноидам или другим группам вторичных метаболитов. Возникают также проблемы, когда соединение содержит ряд признаков, характерных для разных групп вторичных метаболитов.

Тема 3. Закономерности строения вторичных метаболитов и их функции

Анализ химической структуры вторичных метаболитов дает возможность выделить в большинстве случаев определенную «базовую» структуру, на основе которой образуются многочисленные варианты. Наибольшее распространение получили следующие пути возникновения различных вариантов [см.: 1, с. 593]:

– модификации базовой структуры: присоединение либо замена функциональных групп, изменение степени окисленности молекулы. В качестве функциональных групп обычно используются гидроксильные, метильные либо метоксильные группы;

– образование конъюгатов — присоединение к базовой структуре «унифицированных блоков». В качестве последних чаще всего выступают различные сахара (моно- или олигосахариды), органические кислоты или некоторые группы вторичных метаболитов;

– конденсация нескольких одинаковых или различных базовых структур (например, образование пренилированных фенольных соединений).

Для разных групп вторичных метаболитов характерны разные типы изменения структуры. Например, для алкалоидов характерно метоксилирование, но не гликозилирование; для изопреноидов, наоборот, типично гликозилирование, но не метоксилирование; у фенольных соединений наблюдаются оба типа этих модификаций.

Многие модификации (в частности, гликозилирование) значительно изменяют биологическую активность молекулы. Очень часто гликозилирование является универсальным способом перевода активной (функциональной) формы вторичного метаболита в неактивную (запасную).

Контрольные вопросы и задания

Вопросы для самоконтроля

1. Каким ученым введено понятие «вторичный метаболизм»?
2. Какова доля видов растений, исследованных на наличие вторичных метаболитов?
3. Чем объясняется огромное разнообразие соединений, участвующих во вторичном обмене растений?
4. Можно ли отличить вторичные метаболиты от соединений, участвующих в первичном обмене, по химической структуре?
5. Какова средняя молекулярная масса вторичных метаболитов?
6. Как называются (в соответствии с эмпирической классификацией вторичных метаболитов) соединения, способные образовывать густую пену в чистом виде?
7. В качестве чего вторичные метаболиты рассматриваются современной физиологией растений?
8. Как называются специализированные клетки, служащие для накопления вторичных метаболитов?
9. Какая классификация, основанная на свойствах вторичных метаболитов, является наиболее обоснованной и удачной?
10. Назовите основные классы вторичных метаболитов. Почему нецелесообразно выделять гликозиды в отдельный класс?

Тестовые задания

1. Соотнесите места синтеза и депонирования вторичных метаболитов:

- | | |
|-------------------|-------------------------------------|
| 1) синтез; | а) цитозоль; |
| 2) депонирование. | б) клеточная стенка; |
| | в) хлоропласты; |
| | г) вакуоль; |
| | д) периплазматическое пространство; |
| | е) эндоплазматический ретикулум. |

2. Перечислите специальные структуры для накопления вторичных метаболитов у некоторых растений.

3. Назовите, в каких органах чаще всего накапливаются вторичные метаболиты:

- а) в надземных;
- б) в подземных;
- в) общей тенденции нет.

4. Определите, какой класс вторичных метаболитов является наиболее многочисленным на данный момент:

- а) фенольные соединения;
- б) минорные соединения;
- в) изопреноиды;
- г) алкалоиды.

5. Назовите 2 способа образования масляных ходов в растении:

- а) _____;
- б) _____.

6. Дайте определения следующим понятиям:

- а) идиобласты — ...
- б) млечники — ...
- в) трихомы — ...

7. Образование димерных индольных алкалоидов является результатом:

- а) модификации базовой структуры;
- б) конъюгации;
- в) конденсации.

8. В качестве «унифицированных блоков», присоединяющихся к «базовым структурам», чаще всего выступают:

- а) липиды;
- б) витамины;
- в) сахара;
- г) аминокислоты.

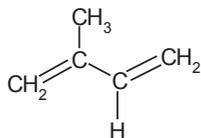
Раздел 2

ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Тема 1. Изопrenoиды (терпеноиды)

Изопреноидами (терпеноидами) называют самый многочисленный класс природных соединений, углеродный скелет которых построен из разветвленных C_5 -единиц, называемых изопреновыми единицами. Это обширная группа соединений, имеющих общую формулу $(C_5H_8)_n$.

Изопрен (1) — летучее соединение, которое легко переходит в газообразную форму. Он обычно содержится в растениях в очень малых количествах, но в определенных условиях количество изопрена, выделяемого растением, может резко возрастать. Это происходит при интенсивном освещении, высокой температуре и низкой концентрации диоксида углерода в воздухе [см.: 4, с. 184].



(1)

Изопреноиды повсеместно распространены среди живых организмов, как эукариот, так и прокариот. Они объединяются в один класс по биогенетическому признаку, поскольку ведут свое начало от единого предшественника — изопентенилпирофосфата (ИППФ), или изопентенилдифосфата (ИПДФ).

Биосинтез изопреноидов осуществляется путем объединения пятиуглеродных фрагментов. Следовательно, название этой группы веществ совпадает с их биохимической классификацией.

Второе название изопреноидов — терпеноиды — берет начало от немецкого слова *terpentin* (скипидар), так как скипидар представляет собой смесь легких изопреноидов [см.: 1, с. 597].

Классификация изопреноидов основана на количестве изопреновых единиц, входящих в состав молекулы. Соединения на основе только одной изопреновой единицы в растениях обнаружили сравнительно недавно. Поэтому исторически сложилось, что монотерпенами называли соединения, содержащие две изопреновые единицы, а следовательно, имеющие общую формулу $(C_5H_8)_2$, $C_{10}H_{16}$. Изопреноиды, содержащие три изопреновых единицы, называли сесквитерпенами, т. е. «полуторатерпенами» (общая формула $C_{15}H_{24}$). Соответственно дитерпены построены из четырех, тритерпены — из шести и тетратерпены — из восьми пятиуглеродных фрагментов. Когда же обнаружили соединения, состоящие из одной и пяти изопреновых единиц, то их пришлось назвать соответственно гемитерпенами и сестертерпенами. Политерпены — гутта и каучук — имеют в своем составе от 100 до 5000 единиц изопрена.

Обычно терпенами называют соединения, содержащие целое число C_5 единиц, независимо от присутствия в молекуле функциональных групп (гидроксильных, карбонильных и др.). Термин «терпеноиды» применяют для соединений с различным числом углеродных атомов, но биосинтез которых явно прошел из C_5 -единиц. Таким образом, первый термин базируется на химическом признаке, второй — на биохимическом.

Моно- и сесквитерпены являются, как правило, легкоиспаряющимися жидкостями, часто с разнообразным запахом. Известно более 3000 этих соединений.

Классификация моно- и сесквитерпенов основана на наличии или отсутствии кольцевой структуры в молекуле, типе кольца и наличии и количестве двойных связей в молекуле.

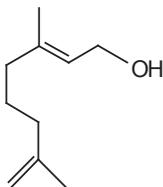
Моно- и сесквитерпены могут быть алифатическими (углеводород с незамкнутой цепочкой атомов), циклическими с различным количеством циклов (от одного до трех), а также содержать различные функциональные группы (гидрокси-, карбокси-,

кето-группы). Они являются основными компонентами эфирных масел. Моно- и сесквитерпены часто обладают бактерицидным действием.

Алифатические терпеноиды тесно связаны взаимными переходами с циклическими терпеноидами. В качестве типичного представителя алифатических монотерпенов можно назвать мирцен, содержащийся во многих эфирных маслах. Например, в эфирном масле хмеля содержится 30–50 % мирцена [см.: 3, с. 339].

Наиболее важные и распространенные представители кислородных производных алифатических монотерпенов — спирты гераниол, линалоол и цитронеллол.

Гераниол (2) встречается в ряде эфирных масел (розы, эвкалипта). При окислении гераниола образуется соответствующий альдегид, получивший название цитраль. Цитраль, взаимодействуя с ацетоном, может превращаться в циклическое соединение — ионон, которое входит в состав каротина, а также витамина А. Это превращение является примером образования циклических структур из соединений с открытой цепью.



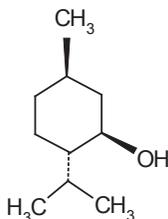
(2)

Линалоол содержится в цветках ландыша, апельсиновом и кориандровом масле. Цитронеллол обладает запахом розы и содержится в розовом, гераниевом и других маслах.

В растениях широко распространены циклические монотерпены (моно- и бициклические). Лимонен — исходное соединение, из которого образуются его кислородные производные. Он содержится в эфирном масле плодов цитрусовых, тмина, укропа, скипидаре и т. д.

К кислородсодержащим соединениям относятся ментол, борнеол, камфора.

Ментол (3) — вторичный спирт, содержащийся до 70 % в эфирном масле перечной мяты [см.: 5, с. 209]. Это основной компонент валидола.



(3)

Камфора (4) относится к бициклическим монотерпенам. В отличие от рассмотренных выше соединений, представляет собой не жидкость, а твердое вещество. Она содержится в большом количестве в древесине и листьях камфорного лавра, а также в одном из видов полыни. Камфора широко используется в медицине в качестве средства, нормализующего работу сердца.



(4)

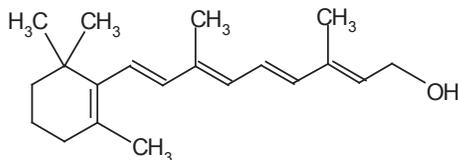
Сесквитерпены, как и монотерпены, могут быть алифатическими и циклическими. Среди сесквитерпенов известны хамазулен (основное действующее вещество эфирного масла ромашки), ледол (компонент эфирного масла багульника), неролидон (содержится в эфирном масле цветков апельсина и в перуанском бальзаме).

Особые группы моно- и сесквитерпенов образуют вещества, у которых в состав кольца (колец) входит один или несколько атомов кислорода (иридоиды, сесквитерпеновые лактоны). Эти

соединения (как правило, в виде гликозидов) часто обладают специфическим горьким вкусом и являются горечами — веществами, возбуждающими аппетит и улучшающими пищеварение. Некоторые из них обладают бактериостатическим (аукубин) и противоопухолевым (арглабин) действием. Кроме того, они могут влиять на работу сердечно-сосудистой системы.

Дитерпены также насчитывают несколько тысяч структур. Они являются главными компонентами смол у голосеменных (ель, сосна, пихта, кедр). Особенно широко распространены в смолах циклические кислоты (производные дитерпенов), имеющие формулу $C_{20}H_{30}O_2$: они составляют основную часть смолистых выделений хвойных растений [см.: 3, с. 342].

Фитол, входящий в состав хлорофилла, может рассматриваться как гидрированный дитерпеновый спирт. Моноциклическим дитерпеновым спиртом является витамин А (5), предшественником которого является β -каротин.



(5)

Часто дитерпены смол обладают бактерицидными свойствами. Дитерпен из коры тисса — таксол — в настоящее время является одним из лучших противоопухолевых средств. Дитерпеновые гликозиды из листьев стевии (стевииозиды) в 300 раз слаще сахарозы и являются ее заменителем для больных сахарным диабетом.

Тритерпены отличаются от предыдущих групп изопреноидов, во-первых, меньшим разнообразием структурных типов, во-вторых, более широким распространением в различных группах живых организмов. Некоторые тритерпены претерпевают деградацию углеродного скелета, иногда весьма существенную — от C_{30} до C_{18} . Эти деградированные тритерпеноиды составляют

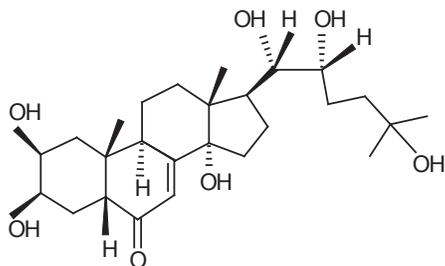
группу важнейших физиологически активных соединений, называемых стероидами. Прежде всего, это соединения первичного метаболизма — фитостерины.

Однако большинство тритерпенов являются типичными вторичными метаболитами. К ним относятся сердечные, стероидные, тритерпеновые гликозиды. Особый класс тритерпеновых соединений образуют экдистероиды, которые обнаружены у многих видов растений.

Сердечные гликозиды представляют собой стероиды с дополнительным кислородсодержащим пятичленным или шестичленным кольцом. Углеводная часть молекулы содержит от одного до пяти моносахаридов, соединенных между собой. Сердечные гликозиды увеличивают силу и уменьшают частоту сердечных сокращений, улучшают работу сердечной мышцы.

Стероидные гликозиды также представляют собой модифицированные стероидные структуры. Многие из данных соединений обладают поверхностной активностью и вызывают гемолиз эритроцитов. Поэтому часто эти гликозиды называют сапонинами (от латинского названия растения *Saponaria* — мыльнянка).

Экдистероиды (6) — гормоны линьки насекомых — обнаружены во многих растениях. Они представляют собой стероиды с большим количеством гидроксильных групп. Экдистероиды широко распространены в мире растений: они найдены у водорослей, мхов, папоротникообразных, голосеменных, покрытосеменных. Обнаружены они и у грибов. Помимо мощного инсектицидного действия, экдистероиды обладают психостимулирующей, адаптогенной и анаболической активностью. В последние годы изучением экдистероидов занимаются многие лаборатории мира. На современном этапе экдистероиды являются весьма распространенным объектом исследования как при решении фундаментальных проблем клеточной и молекулярной биологии, так и при решении прикладных задач в области биотехнологии, фармакологии, медицины, энтомологии и т. д.



(6)

Тетратерпены представлены в растениях, главным образом, каротиноидами — жирорастворимыми пигментами желтого или оранжевого цвета. Каротиноиды включают в себя две группы веществ: каротины (ненасыщенные каротиноиды, не содержащие кислорода в молекуле) и ксантофиллы (кислородсодержащие каротиноиды). В растениях широко распространены каротины, ликопин, зеаксантин, виолоксантин, флавоксантин и др. В значительных количествах каротиноиды накапливаются в корнеплодах моркови, плодах шиповника, рябины обыкновенной, смородины, облепихи, помидоров, тыквы, листьях шпината, салата, крапивы.

К политерпенам относятся каучук и гутта, в молекулах которых остатки изопрена образуют длинную цепочку. Полиизопреновая цепочка каучука содержит от 1000 до 6000 остатков изопрена, а цепочка гутты — около 100. Эти вещества имеют различия и в строении полиизопреновой цепочки: цепочка каучука имеет *цис*-конфигурацию, а цепочка гутты — *транс*-конфигурацию [см.: 3, с. 343].

Каучук и гутта различаются и по физическим свойствам. Каучук при обычной температуре эластичен и аморфен. Длинные его молекулы беспорядочно свернуты и постоянно меняют форму, что и обуславливает его эластичность. Он приобретает кристаллическую структуру при растяжении или при охлаждении. Гутта при обычной температуре пластична.

Каучук образуется и накапливается в различных тканях растений — млечных трубках, клетках основной паренхимы, ассимилирующих тканях листа и стебля. Он обнаружен у растений 300 родов [см.: 4, с. 193]. Но наиболее высоким содержанием каучука отличаются тропическое растение гевея и корни сложноцветных кок-сагыза и тау-сагыза. Гутта в растениях накапливается либо в млечном соке, как у *Palaguim gutta*, либо в замкнутых вместилищах, имеющих в разных тканях бересклета и эвкомии.

Изопреноидные вторичные метаболиты, в отличие от алкалоидов, обычно после синтеза выводятся из клетки. Помимо клеточной стенки, они могут накапливаться в вакуолях, но это происходит не часто.

Функции изопреноидов

Изопреноиды выполняют множество важнейших функций как в первичном, так и во вторичном обмене [см.: 2, с. 330; 8, с. 200]. В первичном метаболизме они:

- участвуют в фотосинтезе в качестве фотосинтетических пигментов (фитол, каротиноиды);
- являются гормонами и стимуляторами роста;
- принимают участие в переносе электронов в дыхательной и фотосинтетической электронтранспортных системах (пренильные боковые цепи убихинона и пластохинона);
- используются в качестве переносчиков гликозидов в реакциях гликозилирования (полипренилфосфаты);
- стабилизируют внутриклеточные мембраны (стерины у эукариот).

Таким образом, без участия изопреноидов невозможны такие процессы, как рост и развитие растений и животных, поскольку многие гормоны растений (гиббереллины, абсцизовая кислота, брассиностероиды) и животных (стероидные половые гормоны и гормоны коры надпочечников) относятся к этому классу соединений.

Однако большая часть известных к настоящему времени изопреноидов относится к веществам специализированного

(вторичного) обмена растений, которые участвуют в процессах сигнализации, защиты от фитопатогенов. Очевидно, основная роль изопреноидов, специфичных для определенных семейств, родов и видов растений (это главным образом моно-, сескви-, ди-, сестер- и тритерпеноиды), сводится к защите растений от различных неблагоприятных воздействий окружающей среды, в том числе от макро- и микровредителей. Например, смолистые вещества, каучук и гутта затягивают раны в коре и древесине растений, защищая их от вредителей. Смолы препятствуют поеданию растений животными. Эфирные масла способствуют также привлечению насекомых-опылителей. Многие компоненты эфирных масел и другие изопреноиды выполняют роль аллелопатических агентов. Следует отметить, что до сих пор остается загадкой причина образования у растений огромного количества разнообразных изопреноидов, функции многих из них остаются непонятными.

Биосинтез изопреноидов

Современные представления о биосинтезе терпеноидов сформировались на основе изучения биосинтеза стероидов. Л. Ружичка впервые установил, что изопрен является универсальной структурной единицей для синтеза большой группы природных соединений, включая стероиды [см.: 2, с. 332]. Он также предположил, что все терпеноиды синтезируются из предшественника — «активного изопрена». Это предположение подтвердил Ф. Линен, который обнаружил, что таким веществом является изопентенилпирофосфат (ИППФ). Таким образом, синтез огромного числа изопреноидов происходит из единственного предшественника — ИППФ.

В 1956 г. К. Фолкерсом была открыта мевалоновая кислота (МВК). С этого времени сформировалось общее представление, что у всех живых организмов изопреноиды образуются на ранних стадиях по единому мевалонатному пути (путь Блоха — Линена) [см.: 2, с. 332]. Позднее было установлено, что в клетках высших растений и некоторых видов водорослей ферменты, отвечающие за синтез изопреноидов, локализуются не только в цитозоле, но и в пластидах. Эти и некоторые другие данные, противоречащие

постулату о едином пути образования изопреноидов из МВК, получили объяснение в подробных исследованиях на нескольких видах эубактерий, проведенных под руководством Ромера [см.: 9, с. 273]. Пути образования ИППФ в этих компартментах различны.

Мевалонатный путь биосинтеза изопреноидов

При взаимодействии двух молекул ацетил-СоА образуется ацетоацетил-СоА, который, в свою очередь, реагирует с еще одной молекулой ацетил-СоА с образованием 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА. Это соединение с разветвленной цепью, состоящее из шести атомов углерода. Первые две стадии процесса — активация ацетата и образование ацетоацетил-СоА — являются общими для многих путей метаболизма ацетата. В то же время реакция образования 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА представляет собой первый этап процесса, свойственного почти исключительно метаболизму изопреноидов. В растительных клетках обе реакции идут при участии одного фермента — гидроксиметилглутарил-СоА-синтазы (КФ 4.1.3.5). Далее гидроксиметилглутарил-СоА-редуктаза (КФ 1.1.1.34) катализирует NADPH-зависимую реакцию превращения 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА в МВК (рис. 1). Этот фермент ключевой, лимитирующий на данном этапе биосинтез изопреноидов. Практически у всех высших растений существуют изоформы этого фермента, образующиеся как за счет множества кодирующих генов (семейство генов *hmg*), так и за счет альтернативного процессинга м-РНК и посттрансляционной модификации.

Мевалоновая кислота — первый продукт в цепи реакций, свойственных исключительно метаболизму изопреноидов. Стадии превращения мевалоновой кислоты в ИППФ представлены на рис. 2. Сначала происходит фосфорилирование МВК при участии мевалонаткиназы (КФ 2.7.1.36), при этом в качестве донора фосфата выступает АТФ. На второй стадии фосфомевалонат вновь фосфорилируется, при этом образуется пиродифосфомевалонат. Далее он принимает участие в реакции, которая является наиболее характерной реакцией метаболизма изопреноидов: карбоксильная группа пиродифосфомевалоната удаляется в виде CO_2 , происходит отщепление молекулы воды, так что между вторым

и третьим атомами углерода возникает двойная связь и образуется ИППФ. Эта реакция катализируется пиروفосфомевалонат-декарбоксилазой (КФ 4.1.1.33).

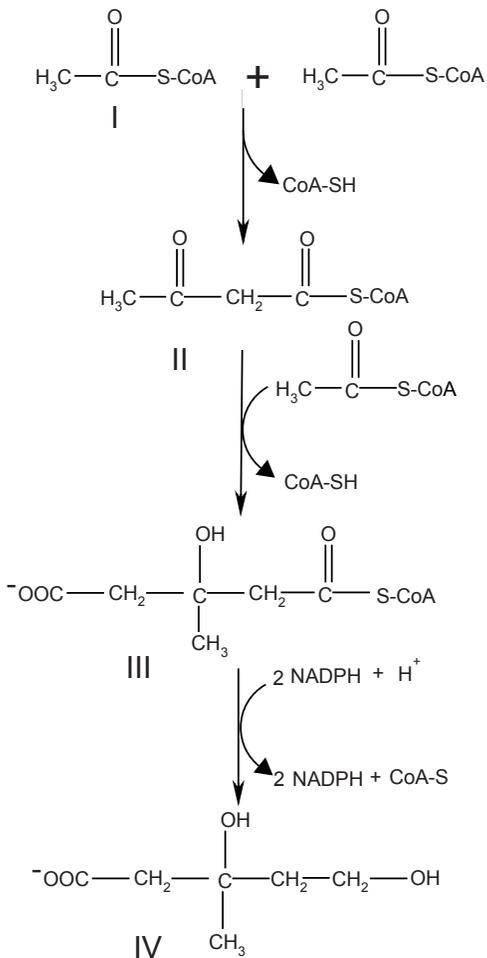


Рис. 1. Биосинтез мевалоновой кислоты [см.: 2, с. 333]:

I — ацетил-CoA; II — ацетоацетил-CoA;

III — 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA; IV — мевалоновая кислота

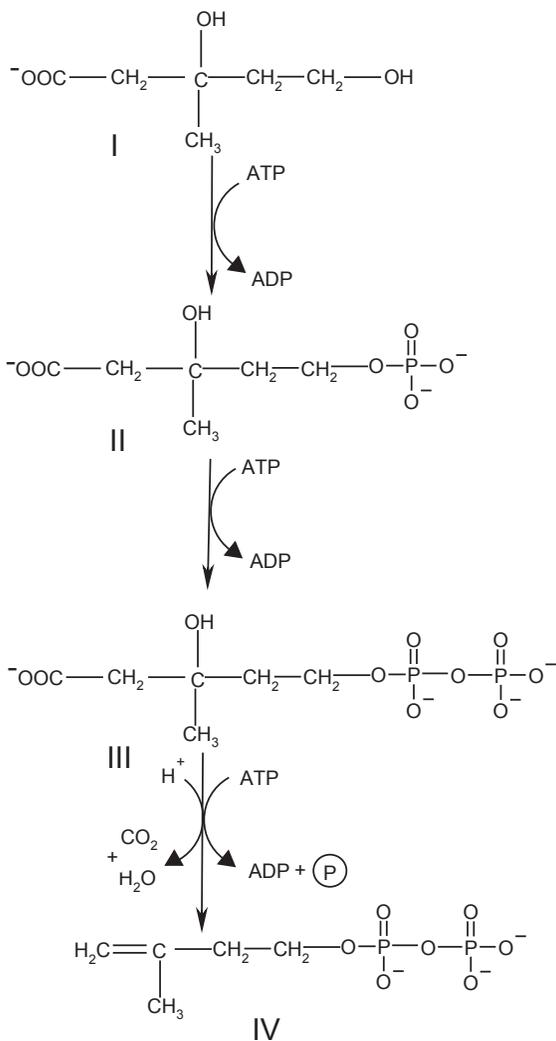


Рис. 2. Биосинтез изопентенилпирофосфата в цитозоле (мевалонатный путь) [см.: 2, с. 333]:

I — мевалоновая кислота; II — 5-фосфомевалонат;

III — 5-пирофосфомевалонат; IV — изопентенилпирофосфат

Две последовательные реакции фосфорилирования мевалоната, катализируемые двумя различными киназами, приводят к формированию пирофосфатного эфира. При участии третьей молекулы АТФ и через промежуточную стадию образования фосфатного эфира пирофосфатный эфир превращается в ИППФ за счет образования двойной углерод-углеродной связи и отщепления карбоксильной группы. По мевалонатному пути происходит синтез стероидов, некоторых сесквитерпенов и боковых цепей убихинонов.

Пластидный путь биосинтеза

В пластидах биосинтез ИППФ осуществляется по так называемому немевалонатному (или 1-дезоксид-*D*-ксилоулозо-5-фосфатному) пути. Предшественниками являются пируват и *D*-глицеральдегид-3-фосфат. Пируват декарбоксилируется при участии тиаминпирофосфата (ТРП) и конденсируется с *D*-глицеральдегид-3-фосфатом с последующим образованием 1-дезоксид-*D*-ксилоулозо-5-фосфата (ДОХР). В результате перегруппировки и последующих реакций восстановления, дегидратации и фосфорилирования из ДОХР образуется ИППФ (рис. 3).

У высших растений немевалонатный путь сохранился только в хлоропластах, где показано прямое образование изопреноидов из фотосинтетически усвоенного $^{14}\text{CO}_2$ [см.: 9, с. 271]. В то же время фитостерины в высших растениях образуются в цитоплазме по классическому мевалонатному пути, при этом их образование практически полностью подавляется ингибитором гидроксиметилглютарил-СоА-редуктазы — мевинолином [см.: 10, с. 50].

Следует учитывать, что альтернативный немевалонатный путь образования ИППФ требует значительно меньших энергетических затрат (в виде АТФ), чем мевалонатный путь.

Цитоплазматический мевалонатный и хлоропластный немевалонатный пути различаются на ранних стадиях, а затем, начиная с образования C_5 -единицы (ИППФ), различия в стадиях биосинтеза изопреноидов отсутствуют.

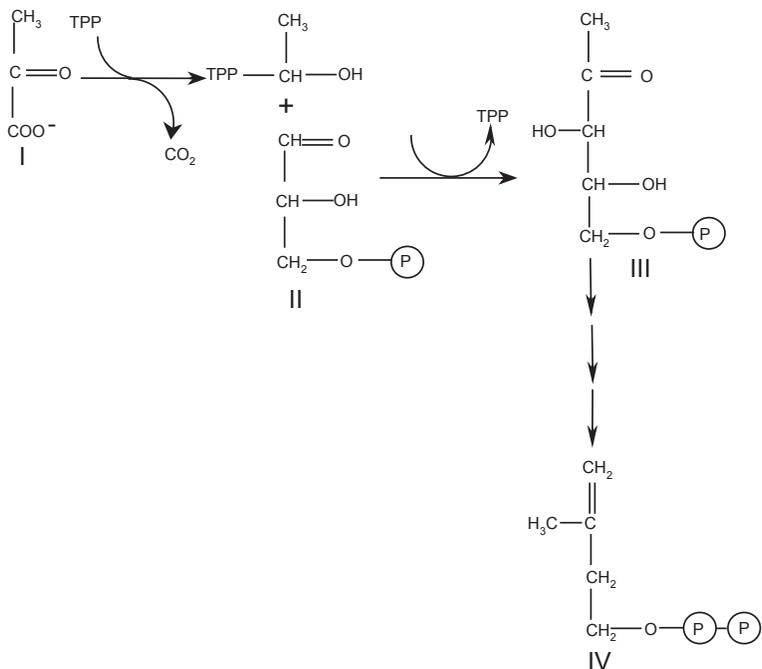


Рис. 3. Биосинтез изопентенилпирофосфата в пластидах (немевалонатный, или 1-дезоксид-*D*-ксилозу-5-фосфатный путь) [см.: 2, с. 334]:

I — пируват; II — *D*-глицеральдегид-3-фосфат;

III — 1-дезоксид-*D*-ксилозу-5-фосфат; IV — изопентенилпирофосфат

На рис. 4 представлена общая схема синтеза изопреноидов. Под действием фермента изопентенилдифосфат- Δ -изомеразы (КФ 5.3.3.2), сдвигающего двойную связь, ИПДФ превращается в диметилаллилпирофосфат (ДМАДФ). Далее ИПДФ присоединяется к ДМАДФ по двойной связи и образуется C_{10} -соединение — геранилпирофосфат. Он служит источником всех монотерпенов. Затем к геранилпирофосфату присоединяется еще один ИПДФ и образуется C_{15} -соединение фарнезилпирофосфат — исходное вещество для синтеза сесквитерпенов.

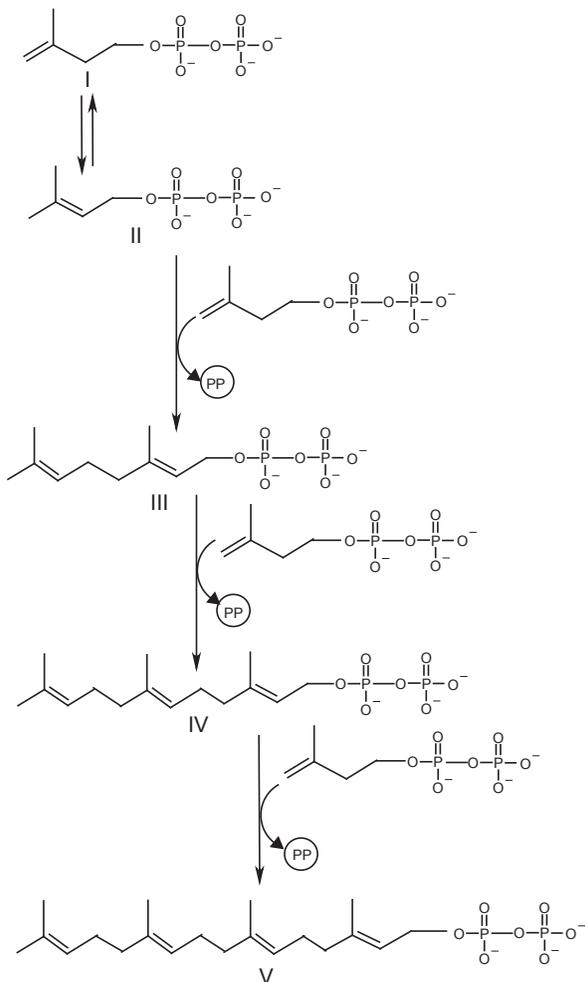


Рис. 4. Образование молекул изопrenoидов различной длины за счет последовательного присоединения изопренильных фрагментов [см.: 2, с. 335]:

- I — изопентенилпирофосфат (C_5); II — диметилаллилпирофосфат (C_3);
 III — геранилпирофосфат (C_{10}); IV — фарнезилпирофосфат (C_{15});
 V — геранилгеранилпирофосфат (C_{20})

Далее фарнезилпирофосфат может либо присоединить еще одну молекулу ИППФ с образованием геранилгеранилпирофосфата (C_{20} -соединение — источник дитерпенов), либо димеризоваться с образованием сквалена (C_{30} -соединение — исходное соединение для всех тритерпенов). Наконец, геранилгеранилпирофосфат может димеризоваться с образованием фитоина — C_{40} -соединения, источника тетратерпенов. Кроме того, к геранилгеранилпирофосфату может последовательно присоединиться большое количество ИППФ, формируя в конечном итоге полиизопrenoиды — каучук и гутту. В результате описанных реакций образуется полный гомологический ряд C_5 -соединений разной длины.

Далее эти алифатические молекулы могут «свернуться» в циклические структуры, причем количество циклов, их размер и типы сочленения могут быть самыми разными. Синтез базовых изопреноидных структур осуществляют два типа ферментов — пренилтрансферазы, которые «наращивают» длину изопреноидов, и циклазы, которые формируют циклический скелет молекулы. При этом каждый тип структуры формирует специфическая циклаза. Так как типов циклических структур изопреноидов довольно много, то и количество циклаз должно быть внушительным. К настоящему времени их известно более ста. После формирования базовой структуры (или одновременно с этим) происходит ее модификация и «оснащение» функциональными группами.

Таким образом, синтез изопреноидов происходит в двух компартментах — в пластидах и в цитозоле. При этом существуют два независимых пути синтеза изопреноидов — мевалонатный, который происходит в цитоплазме, и альтернативный — в пластидах. По первому пути (в цитозоле) синтезируются моно-, сескви- и тритерпены, тогда как ди- и тетратерпены — по второму (в пластидах).

Тема 2. Фенольные соединения

Фенольные соединения — вещества ароматической природы, содержащие одну или несколько гидроксильных групп. Таким образом, отличительной чертой фенольных соединений является

наличие ароматического кольца (колец) и одной или нескольких ОН-групп, связанных с атомами углерода этого кольца. Фенолами называют соединения с одним атомом гидроксила, полифенолами — с двумя и более. Фенольные соединения в растениях выполняют множество разнообразных функций. Многие из них участвуют в основном обмене: например, играют важную роль в процессах фотосинтеза и дыхания. Однако большинство фенольных соединений — типичные представители вторичного метаболизма.

Отличительной чертой фенольных соединений является формирование огромного числа соединений за счет модификаций молекулы и образования конъюгатов с разнообразными веществами.

Из модификаций для фенольных соединений характерно образование гликозидов, метилирование и метоксилирование. За счет гидроксильных и карбоксильных групп фенольные соединения могут связываться с сахарами, органическими кислотами, растительными аминами, алкалоидами.

Помимо этого, растительные фенолы могут соединяться с изопреноидами, образуя большую группу пренилированных фенолов. Такие свойства фенольных соединений обеспечивают огромное количество разнообразных структур, характерных для растительных фенолов.

Классифицируют фенольные соединения в зависимости от числа ароматических колец и количества присоединенных к ним атомов углерода. Обычно фенольные соединения разделяют на три большие подгруппы: с одним ароматическим кольцом, с двумя ароматическими кольцами и полимерные фенольные соединения. Иногда в особую группу выделяют димерные фенольные соединения.

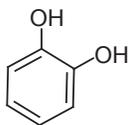
Фенольные соединения с одним ароматическим кольцом

В зависимости от дополнительных атомов углерода они разделяются:

– на соединения C_6 -ряда (без дополнительных атомов углерода);

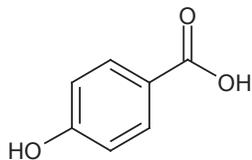
- соединения $C_6—C_1$ -ряда (один дополнительный атом углерода);
- соединения $C_6—C_2$ -ряда (два дополнительных атома углерода);
- соединения $C_6—C_3$ -ряда (три дополнительных атома углерода);
- соединения $C_6—C_4$ -ряда (четыре дополнительных атома углерода).

Соединения C_6 -ряда. К ним относятся простые фенолы. К этой группе веществ иногда относят и бензохиноны, хотя у них ароматическое кольцо почти всегда соединено с длинной изопреноидной цепочкой. Простые фенолы распространены не очень широко. Фенол в малых количествах обнаружен в хвое сосны, в составе эфирного масла смородины, табака и руты. Пирокатехин (7) найден в листьях тополя и эфедры, чешуе лука. Гваякол, монометиловый эфир пирокатехина, в значительных количествах содержится в смоле бука [см.: 6, с. 108].



(7)

Соединения $C_6—C_1$ -ряда. К ним относятся производные оксибензойной кислоты, которые часто называют фенольными кислотами, или фенолокислотами. Фенольные кислоты, особенно такие, как ванилиновая, *n*-гидроксibenзойная (8), протокатеховая, галловая, обнаружены практически у всех исследованных покрытосеменных растений. Чаще они находятся в тканях в связанном состоянии и освобождаются при выделении и гидролизе. Например, салициловая кислота, которая находится в корнях дуба, выделяется в окружающую среду в качестве аллелопатического вещества.

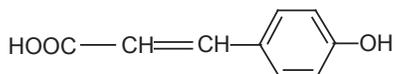


(8)

Соединения C₆—C₂-ряда. К этому ряду соединений относятся фенолоспирты, фенилуксусные кислоты, ацетофенон. В отличие от фенольных кислот, они встречаются в растениях не так часто. В коре ивы присутствует салициловый спирт. Но особенно известен ванилин (ванильный альдегид), который содержится в плодах и ветвях ванильного дерева в виде гликозида.

Соединения C₆—C₃-ряда. Эту наиболее многочисленную и важную группу веществ часто называют также фенилпропаноидами. Она включает в себя оксикоричные кислоты (по международной номенклатуре их рекомендуется называть гидроксикоричными кислотами), оксикоричные (гидроксикоричные) спирты, фенилпропены, а также кумарины, изокумарины и хромоны — соединения, у которых дополнительные атомы углерода замыкаются в конденсированное лактонное кольцо.

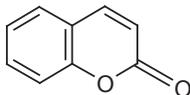
К гидроксикоричным кислотам относятся: *n*-гидроксикоричная, или *n*-кумаровая (9), кофейная, феруловая и синаповая. Как правило, в растениях они находятся в связанном состоянии (кроме кофейной). Для них характерна *цис-транс*-изомерия. Показано, что *цис*-изомеры гидроксикоричных кислот являются активаторами ростовых процессов [см.: 4, с. 157].



(9)

Помимо широко распространенной *n*-гидроксикоричной кислоты в некоторых растениях обнаружена *o*-гидроксикоричная

кислота. Ее *транс*-форма устойчива, но *цис*-форма (называемая кумариновой кислотой) в кислой среде циклизуется с образованием устойчивого лактона кумарина (10).



(10)

Кумарин — бесцветное кристаллическое вещество с приятным запахом, напоминающим запах сена [см.: 3, с. 319]. В растениях кумарин обычно содержится в виде гликозидов. При сенокосе растительные ткани повреждаются, и гликозиды из клеточного сока соприкасаются с ферментами цитоплазмы. После отщепления сахара кумаровая кислота после изомеризации замыкается в лактон — при этом вянущая трава приобретает запах сена.

Гидроксикоричные спирты являются производными соответствующих кислот. В ряде случаев фенилпропаноиды могут соединяться между собой и образовывать димеры, т. е. соединения типа $(C_6-C_3)_2$. Такие вещества называют лигнанами. Однако их обычно относят к группам димерных фенольных соединений.

Соединения C_6-C_4 -ряда. К этому ряду соединений относятся нафтохиноны. Нафтохиноном является витамин К (филлохинон).

Фенольные соединения с двумя ароматическими кольцами

Эти соединения делятся:

– на соединения $C_6-C_1-C_6$ -ряда (два ароматических кольца, соединенных мостиком из одного углеродного атома);

– соединения $C_6-C_2-C_6$ -ряда (два ароматических кольца, соединенных двумя атомами углерода);

– соединения $C_6-C_3-C_6$ -ряда (два ароматических кольца, соединенных тремя атомами углерода).

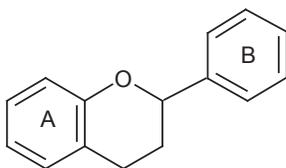
Соединения $C_6-C_1-C_6$ -ряда. К ним относятся бензофеноны и ксантоны. Бензофеноны представляют собой соединения, у которых два ароматических кольца соединены мостиком из одного

карбонильного углеродного атома. Бензофеноны встречаются в растениях достаточно редко. Характерной особенностью строения ксантонов является образование дополнительного конденсированного лактонного кольца. Ксантоны более разнообразны и чаще встречаются в растениях, чем бензофеноны. Они могут находиться в растениях как в свободном виде, так и в виде гликозидов.

Соединения $C_6—C_2—C_6$ -ряда. К этой группе относятся стильбены (два кольца соединяются цепочкой из двух атомов углерода) и антрахиноны (два ароматических кольца соединяются двумя атомами углерода с образованием центрального конденсированного третьего кольца).

Соединения $C_6—C_3—C_6$ -ряда (два ароматических кольца, соединенных тремя атомами углерода). Это наиболее многочисленная и важная группа фенольных соединений, поэтому целесообразно более подробно рассмотреть эту группу. Она представлена прежде всего флавоноидами, которые, в свою очередь, разделяют на целый ряд подгрупп. Кроме флавоноидов, к соединениям $C_6—C_3—C_6$ -ряда относятся изофлавоноиды и неофлавоноиды, которые также подразделяют на несколько подгрупп.

Молекула флавоноидов содержит два бензольных ядра (кольца А и В) и одно кислородное (пирановое) кольцо. Флавоноиды можно рассматривать как производные флавана (11).



(11)

Свое название флавоноиды получили от латинского *flavus* — желтый, так как первые выделенные из растений соединения имели желтую окраску. Однако позднее выяснилось, что большинство из них — бесцветные соединения.

Флавоноиды широко распространены, их содержат почти все высшие растения. Это самый обширный класс фенольных соединений. Особенно богаты флавоноидами семейства розоцветных, бобовых, гречишных, сложноцветных, яснотковых. Флавоноиды находятся в разных частях растений, но чаще в надземных: цветках, листьях, плодах. В меньшем количестве они содержатся в стеблях и подземных органах. Наиболее богаты ими молодые цветки и незрелые плоды. Содержание флавоноидов в растениях различно: в среднем 0,5–5 %, но может достигать 20 %.

Классифицируют флавоноиды в зависимости от степени окисления трехуглеродного фрагмента молекулы (пиранового гетероцикла). Различают следующие группы флавоноидов — в порядке увеличения степени окисленности пиранового кольца [см.: 11, с. 22]:

- незамещенные флаваны (отсутствие функциональных групп и двойных связей);
- катехины и флаван-4-олы (одна гидроксильная группа у C_3 или C_4 атомов соответственно);
- лейкоантоцианидины (две гидроксильные группы — у C_3 и C_4 атомов);
- дигидрохалконы (отсутствие пиранового кольца и карбонильная группа);
- халконы (отсутствие пиранового кольца, двойная связь и карбонильная группа);
- антоцианидины (гидроксильная группа у C_3 и две двойные связи);
- флаваноны (карбонильная группа у C_4);
- флаванонолы (карбонильная группа у C_4 и гидроксильная у C_3);
- флавоны (карбонильная группа у C_4 и двойная связь);
- флавонолы (карбонильная группа у C_4 , гидроксильная у C_3 и двойная связь);
- ауроны (пятичленное лактоновое кольцо, карбонильная группа и двойная связь).

Разнообразие флавоноидов обусловлено прежде всего различными заместителями в кольцах А и В. Практически каждый атом этих колец (за исключением C'_6) может иметь гидроксильную группу. Кроме того, практически каждый гидроксил может быть метилирован с образованием метоксильной группы. Флавоноиды могут присутствовать в растениях как в свободном, так и в связанном виде. Они образуют огромное число разнообразных гликозидов. Катехины, лейкоантоцианидины, дигидрохалконы, флаваноны и флаванолы не имеют окраски, тогда как остальные классы флавоноидов имеют желтый, красный, темно-красный или пурпурный цвет. Наиболее разнообразную окраску имеют антоцианы — проантоцианидины и их гликозиды.

Катехины получили свое название по видовому названию акации — *Acacia catechu* — из древесины которой были впервые выделены. Молекула катехинов содержит два асимметричных атома углерода в пирановом кольце (C_2 и C_3), следовательно, для каждой молекулы возможно 4 стереоизомера. Катехины широко распространены в растениях. Они обладают значительной Р-витаминной активностью.

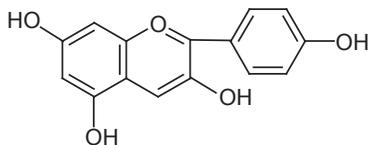
Лейкоантоцианидины («бесцветные антоцианидины») получили название из-за своей способности при нагревании с разбавленными минеральными кислотами превращаться в ярко окрашенные антоцианидины. В отличие от катехинов, лейкоантоцианидины имеют уже 3 асимметричных атома углерода в молекуле (C_2 , C_3 и C_4), таким образом, каждый из них может быть представлен 8 изомерами и 4 рацематами. Лейкоантоцианидины легко конденсируются, образуя ди-, олиго- и полимерные формы, которые входят в состав проантоцианидинов и танинов. Гликозилирование для них не свойственно. Лейкоантоцианидины, подобно катехинам, обладают Р-витаминной активностью.

Халконы и дигидрохалконы часто рассматривают как флавоноиды с раскрытым пирановым кольцом. На самом деле они представляют собой флавоноиды с еще не замкнутым пирановым кольцом, так как являются отправной точкой синтеза всех остальных флавоноидов. Халконы имеют желтую окраску

(хромофор — карбонильная группа с конъюгированной двойной связью). В растениях присутствуют преимущественно в виде гликозидов, при этом известно несколько десятков агликонов халконовой природы. Однако возможно присутствие в растениях и в свободном виде.

Антоцианидины представляют собой производные катиона флавилия, у которого кислород в пирановом кольце обладает свободной валентностью. В растениях они, как правило, присутствуют в виде гликозидов. Антоцианы — более широкий термин, включающий в себя как антоцианидины, так и их гликозиды. Антоцианы — основные водорастворимые пигменты растений, обуславливающие окраску цветков, плодов, листьев в разнообразные цвета — от розового до фиолетово-черного. Само название «антоцианы» происходит от греческого *anthos* — цветок и *kyanos* — синий. Антоцианы присутствуют практически во всех цветковых растениях.

Основных антоцианидинов всего 6: пеларгонидин (12), цианидин, дельфинидин, пеонидин, петунидин и мальвидин. Все они имеют гидроксилы в 5-м и 7-м положении кольца А и различаются только заместителями в положении 3' и 5' в кольце В.



(12)

Основное разнообразие антоцианов обусловлено их гликозидированием. Известны монозиды, биозиды, триозиды, а также дигликозиды и тригликозиды антоцианидинов. Окраска антоцианами цветков, плодов и других частей растений зависит от ряда факторов [см.: 3, с. 296; 4, с. 163]:

– от структуры агликона, причем, главным образом, числа и видов заместителей в кольце В. Увеличение степени гидрокси-

лирования сдвигает окраску в синюю область, степени метилирования — в красную;

- количества антоцианов в тканях;

- рН среды: в кислых растворах мальвидин имеет красную окраску, пеларгонидин — оранжево-красную, цианидин — синевато-красную, дельфинидин — синюю;

- копигментации антоцианов с другими флавоноидными гликозидами или таннинами;

- комплексообразования антоцианов с металлами. При этом взаимодействие антоцианов с магнием и кальцием придает цветкам, как правило, синюю окраску, а с калием — пурпурную. Кроме того, в комплексообразовании могут участвовать железо, алюминий, молибден.

Изофлавоноиды встречаются в растительном мире реже флавоноидов. Их образование характерно прежде всего для бобовых растений, где они выполняют роль фитоалексинов. Помимо семейства *Fabaceae*, изофлавоноиды обнаружены в семействах *Iridaceae*, *Rosaceae*, *Moraceae*, *Amaranthaceae*, *Podocarpaceae*.

Полимерные фенольные соединения принято разделять на 4 подгруппы [4, с. 167]:

- гидролизуемые дубильные вещества (сложные эфиры глюкозы и галловой кислоты);

- негидролизуемые (конденсированные) дубильные вещества (полимеры флавоноидов);

- лигнины (полимеры оксикоричных спиртов);

- меланины (темноокрашенные соединения).

Природные дубильные вещества (таннины) представляют собой сложную смесь близких по составу соединений с молекулярной массой 500–5000. Гидролизуемые дубильные вещества при нагревании с разбавленными кислотами распадаются на фенольные кислоты и сахара. Конденсированные дубильные вещества представляют собой линейные полимеры с большой молекулярной массой, мономерами которых являются катехины и другие восстановленные формы флавоноидов. При нагревании с разбавленными

кислотами они уплотняются с образованием аморфных, нерастворимых в воде полимерных соединений, имеющих коричнево-красную окраску. Конденсированные дубильные вещества содержатся в коре и древесине дуба, ивы, сосны, ели, лиственницы, эвкалипта, акации, каштана и др.

Лигнин — трехмерный полимер, мономерами которого являются гидроксикоричные спирты, соединенные связями С—С и С—О—С. В составе лигнина встречаются в основном кумаровый, кониферилловый и синаповый спирты. Их соотношение у различных растений различно. Лигнин входит в состав клеточных оболочек тканей древесины. Он откладывается между микрофибриллами целлюлозы, что придает клеточным оболочкам твердость и прочность. Однако при этом нарушается связь между клетками, что приводит к отмиранию живого содержимого, поэтому лигнификация является заключительным этапом онтогенеза клетки.

Растительные меланины представляют собой наименее изученную группу растительных полимерных фенольных соединений со сложной структурой. Меланины имеют черный или коричнево-черный цвет. Их образованием объясняется быстрое потемнение поверхности разрезанного яблока, клубня картофеля, некоторых грибов. Растительные и животные меланины отличаются по составу мономеров. Растительные меланины являются безазотистыми веществами: при гидролизе они образуют пирокатехин, в то время как животные — дигидроксииндол.

Фенольные соединения накапливаются как в вакуолях, так и в периплазматическом пространстве. При этом в вакуолях обычно содержатся гликозилированные фенольные соединения, тогда как в периплазматическом пространстве — метоксилированные соединения или агликконы.

Функции фенольных соединений

Будучи постоянными и универсальными компонентами растительных тканей, флавоноиды и другие фенольные соединения несут значительную функциональную нагрузку:

– участвуют в процессах дыхания;

- играют важную роль в окислительно-восстановительных и защитных реакциях;
- оказывают влияние на ростовые процессы растений, иногда активирующее, чаще ингибирующее;
- повышают устойчивость растений к заболеваниям;
- защищают растения от избыточной солнечной радиации;
- влияют на проницаемость мембран;
- являются аттрактантами или детеррентами для насекомых;
- могут выступать в качестве аллелопатических веществ (например, салициловая кислота у дуба).

Биосинтез фенольных соединений

К настоящему времени выявлены два основных пути образования фенольных соединений: шикиматный и ацетатно-малонатный.

Шикиматный путь

Исходными соединениями биосинтеза фенольных соединений по шикиматному пути служат фосфоенолпировиноградная кислота (ФЕП) и эритрозо-4-фосфат, образующиеся соответственно при гликолизе и в пентозофосфатном цикле (ПФЦ) при фотосинтезе. При их конденсации возникает семиуглеродное соединение — 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат (ДАГФ) [см.: 11, с. 92]. Реакцию катализирует фосфо-2-кето-3-дезоксигептонат-альдолаза (КФ 4.1.2.15). Этот фермент обнаружен во многих растениях и в культурах растительных клеток и тканей.

Следующим этапом шикиматного пути является образование из ДАГФ первого циклического продукта, а именно: 3-дегидрохинной кислоты (рис. 5). Эта реакция катализируется 3-дегидрохинат-синтазой (КФ 4.6.1.3). Для проявления активности фермента требуется присутствие NAD и Co^{2+} (а у некоторых видов растений — еще и Cu^{2+} [см.: 11, с. 12]). Далее 3-дегидрохинная кислота может превращаться либо в 3-дегидрошикимовую кислоту, либо в хинную кислоту.

Превращение 3-дегидрохинной кислоты в 3-дегидрошикимовую катализируется 3-дегидрохинат-дегидратазой (КФ 4.2.1.10). Установлено, что активность 3-дегидрохинат-дегидратазы

в подавляющем большинстве случаев не может быть отделена от активности следующего фермента шикиматного пути — шикиматдегидрогеназы (КФ 1.1.1.25). В связи с этим было высказано предположение, что активности этих двух ферментов принадлежат одному бифункциональному белку.

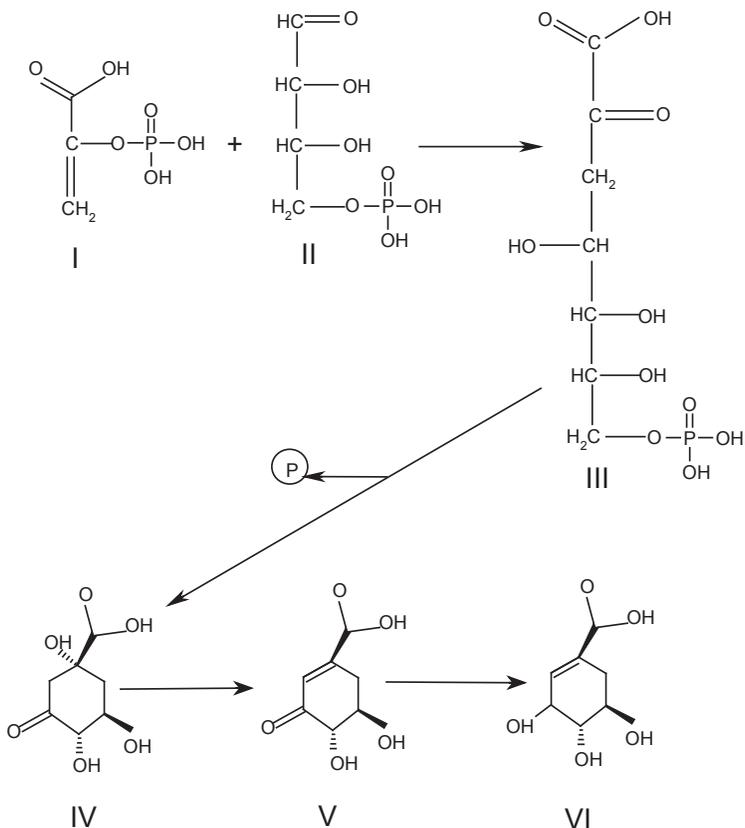


Рис. 5. Биосинтез шикимовой кислоты [см.: 11, с. 92]:

I — фосфоенолпировиноградная кислота; II — эритрозо-4-фосфат;
 III — 3-деокси-*D*-арабиногептулозонат-7-фосфат; IV — 3-дегидрохинная
 кислота; V — 3-дегидрошикимовая кислота; VI — шикимовая кислота

Обратимое превращение 3-дегидрохинной кислоты в хинную кислоту катализирует хинатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.24). У бактерий и грибов этот фермент обычно отсутствует, и поэтому они редко образуют хинную кислоту. У высших растений хинная кислота, напротив, распространена повсеместно и часто накапливается в значительных количествах как в свободном виде, так и в виде эфиров с фенолкарбоновыми кислотами.

Шикимовая кислота имеет шестичленное кольцо, одну двойную связь, и ее довольно легко перевести в соединения ароматического ряда. Из нее возможно образование простых фенольных соединений $C_6—C_1$ -ряда, например *n*-оксисбензойной, протокатеховой и галловой кислот, а в дальнейшем и дубильных веществ гидролизуемой группы.

Однако в растительной и микробной клетке превращение шикимовой кислоты в ароматические соединения идет значительно сложнее. Шикимовая кислота далее подвергается фосфорилированию при участии АТФ и шикиматкиназы (КФ 2.7.1.71) с образованием шикимат-3-фосфата (рис. 6).

На следующем этапе происходит конденсация шикимат-3-фосфата с ФЕП. При этом образуется 5-енол-пирувил-шикимат-3-фосфат (ЕПШФ). Реакция катализируется 5-енол-пирувил-шикимат-3-фосфат-синтазой (КФ 2.5.1.19). Далее ЕПШФ превращается в хоризмовую кислоту при участии хоризматсинтазы (КФ 4.6.1.4). Хоризмовая кислота находится в точке ветвления биосинтетических процессов. Она служит непосредственным предшественником как префеновой кислоты (используемой далее для образования *L*-фенилаланина и *L*-тирозина, а затем фенольных соединений), так и антраниловой кислоты (используемой далее для образования *L*-триптофана, а затем индольных производных) [см.: 11, с. 97].

При биосинтезе *L*-фенилаланина и *L*-тирозина хоризмовая кислота превращается в префеновую кислоту при участии хоризматмутазы (КФ 5.4.99.5). На стадии префеновой кислоты пути биосинтеза расходятся.

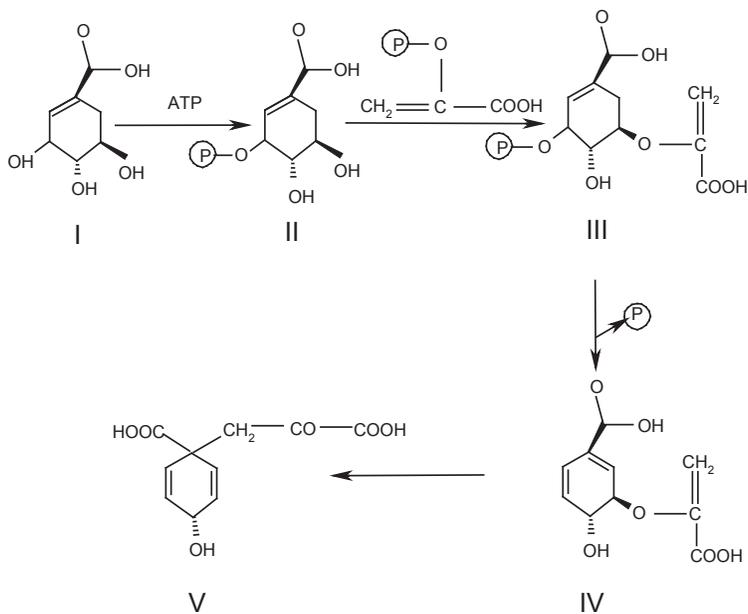


Рис. 6. Образование префеновой кислоты (шикиматный путь)

[см.: 3, с. 329]:

I — шикимовая кислота; II — шикимат-3-фосфат; III — 5-енол-пирувил-шикимат-3-фосфат; IV — хоризмовая кислота; V — префеновая кислота

По первому пути идет синтез фенилпировиноградной кислоты, а по другому — *n*-оксифенилпировиноградной кислоты (рис. 7). При аминировании двух последних веществ образуются соответственно *L*-фенилаланин и *L*-тирозин. Данные аминокислоты могут участвовать в биосинтезе молекул белков и некоторых групп алкалоидов.

При дезаминировании аминокислот в присутствии ферментов (соответствующих аммиак-лиаз) получают *транс*-коричная и *транс*-гидроксикоричная кислоты. Из коричных кислот с помощью гидроксилующих и метоксилирующих ферментов синтезируются соединения фенилпропанового ряда — оксикоричные кислоты (например, кофейная, феруловая, синаповая) и кумарины.

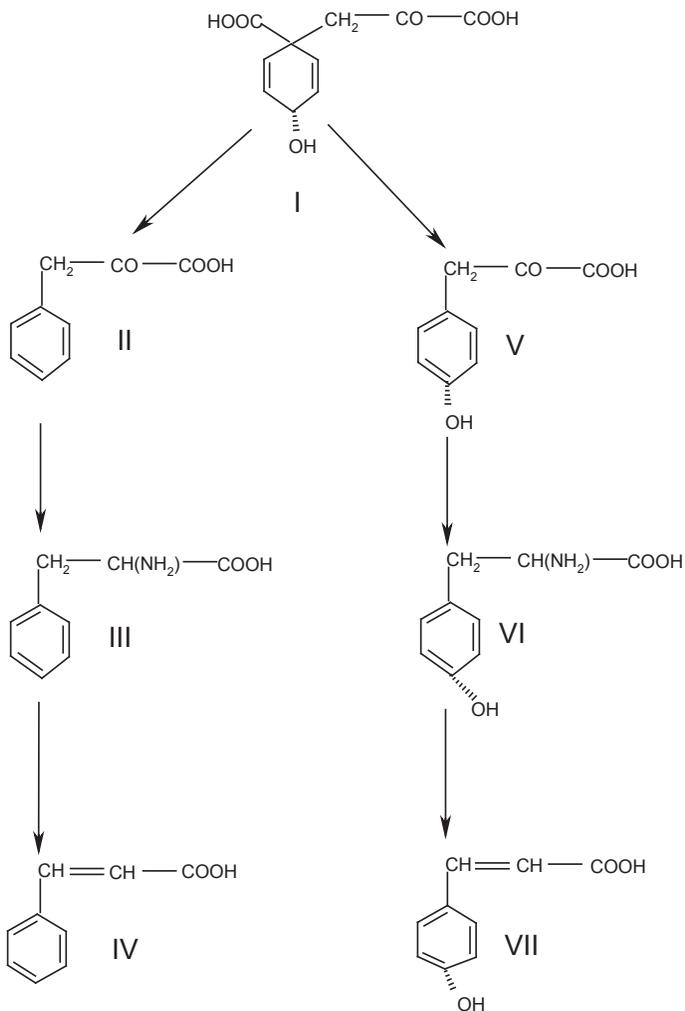


Рис. 7. Образование *транс*-коричной и *транс*-гидроксикоричной кислот
[см.: 3, с. 329]:

I — префеновая кислота; II — фенилпировиноградная кислота;
III — *L*-фенилаланин; IV — *транс*-коричная кислота; V — *n*-оксифенилпировиноградная кислота; VI — *L*-тирозин; VII — *транс*-гидроксикоричная кислота

Известен также путь к фенилаланину и тирозину через *L*-арогеновую кислоту. Она образуется в результате аминирования префеновой кислоты с использованием *L*-глутаминовой кислоты в качестве донора аминогруппы. Далее *L*-арогеновая кислота подвергается либо окислительному декарбоксилированию под действием арогенатдегидрогеназы, либо сопровождающейся декарбоксилированием дегидратации при участии арогенатдегидратазы. Дегидратация и декарбоксилирование арогената приводят к образованию фенилаланина, а окисление и декарбоксилирование — тирозина [см.: 11, с. 101].

Фенилаланин, тирозин и продукты их обмена дают начало множеству различных соединений, таких как: фенилпропаноиды, катехоламины, алкалоиды (изохинолиновые, тропановые, протоалкалоиды), лигнины, меланины.

Шикиматный путь осуществляется в клетках микроорганизмов, грибов, растений. У высших растений ключевые этапы проходят в пластидах, однако гены ферментов локализованы в ядре; при нормальных условиях роста около 20 % всего усваиваемого растением углерода протекает этим путем. Животные не имеют ферментной системы шикиматного пути, поскольку получают протеиногенные ароматические аминокислоты и прочие необходимые продукты шикиматного пути в достаточном количестве с пищей и потому эволюцией освобождены от необходимости их биосинтеза *de novo*. Животные способны преобразовывать готовые ароматические продукты шикиматного пути, в частности, превращать незаменимую аминокислоту фенилаланин в тирозин, являющийся заменимой аминокислотой при условии достаточного поступления фенилаланина с пищей.

Ранее полагали, что ферменты шикиматного пути локализованы исключительно в пластидах [см.: 2, с. 243]. Но сегодня доказано существование также и цитозольных форм ряда ферментов шикиматного пути: шикиматдегидрогеназы, хоризматмутазы и некоторых других. Однако цитозольная ветвь шикиматного пути не может восполнить дефекты в пластидной ветви, что говорит об их разной физиологической нагрузке.

Ацетатно-малонатный путь

Второй путь биосинтеза фенольных соединений (ацетатно-малонатный путь) связан с промежуточным синтезом поликетометиленовых предшественников. Исходный продукт — ацетил-СоА — образуется в результате гликолиза сахаров и содержит макроэргическую тиоэфирную связь. Ацетил-СоА при участии карбоксилазы и АТФ в присутствии ионов Mn^{2+} превращается в малонил-ацетил-СоА. Таким путем при постепенном наращивании углеродной цепи возникает поли-3-кетометиленовая цепочка, циклизация которой приводит к образованию различных фенольных соединений.

Ацетатно-малонатный путь биосинтеза фенольных соединений широко распространен у грибов, лишайников и микроорганизмов. У высших растений он является минорным и, как правило, реализуется в сочетании с шикиматным путем в биосинтезе флавоноидов и антрахинонов. Синтез флавоноидных соединений — характерная особенность высших растений. Опыты с мечеными по углероду ^{14}C продуктами показали, что фенилпропановый скелет (кольцо В и трехуглеродный фрагмент) происходит от *n*-кумаровой кислоты, которая получается шикиматным путем. С другой стороны, кольцо А синтезируется по ацетатно-малонатному пути из 3 молекул малонил-СоА.

В результате взаимодействия *n*-кумароил-СоА с 3 молекулами малонил-СоА образуется халкон, а затем флаванон (рис. 8).

Основная масса фенольных соединений происходит из гидроксикоричных кислот, которые образуются из фенилаланина и тирозина. Кроме того, источником фенолов являются промежуточные соединения, возникающие на пути образования фенилаланина и тирозина — хинная и шикимовая кислоты. Из этих кислот образуются фенольные кислоты и гидролизуемые танины.

Гидроксикоричные кислоты образуют кумарины, меланины, участвуют в образовании лигнина и В-кольца флавоноидов. А-кольцо флавоноидов синтезируется из ацетил-СоА (и малонил-СоА). Флавоноиды являются источником конденсированных танинов. В образовании ряда фенольных соединений (гидролизуемых танинов) участвуют сахара и продукты распада углеводов и липидов — ацетил-СоА (малонил-СоА).

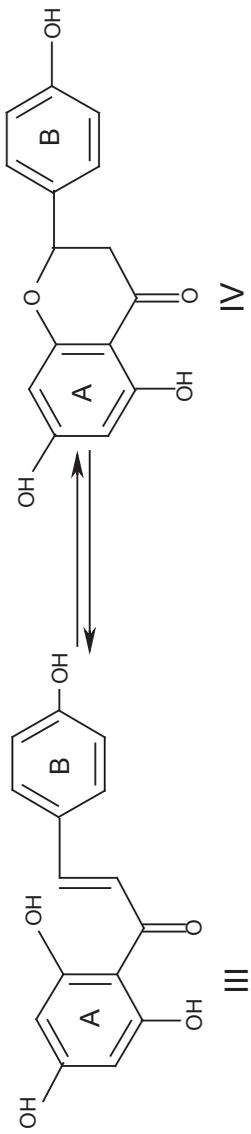
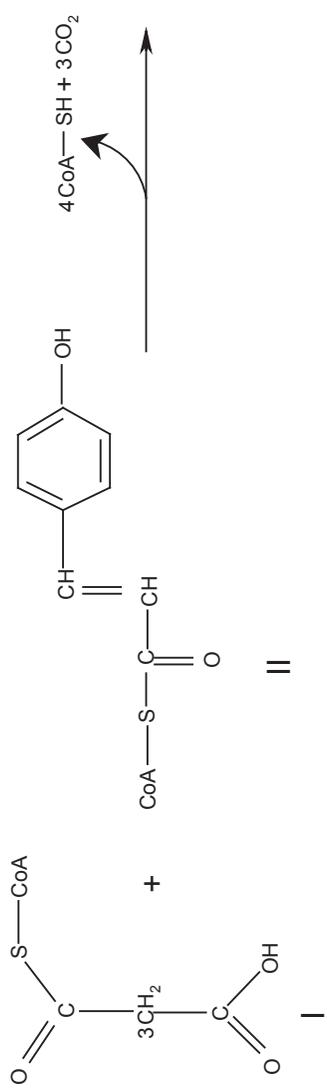


Рис. 8. Образование халкона и флаванона (ацетатно-малонатный путь) [см.: 2, с. 356]:
 I — малонил-CoA; II — *n*-кумарил-CoA; III — халкон; IV — флаванон

Биосинтез оксибензойных кислот

Оксибензойные кислоты могут образовываться двумя путями:
– из ранних продуктов шикиматного пути, т. е. из алициклических кислот типа 3-дегидрошикимовой кислоты;
– оксикоричных кислот при помощи механизма β -окисления.

Наиболее детально изучен биосинтез галловой кислоты. Как правило, в молодых листьях растений шикимовая кислота служит гораздо более эффективным предшественником галловой кислоты по сравнению с *L*-фенилаланином. Во взрослых листьях оба пути имеют примерно одинаковую эффективность.

Биосинтез кумаринов

Исходным предшественником в биосинтезе большинства кумаринов является *транс*-коричная кислота. Если в случае оксикоричных кислот *транс*-коричная кислота на первом этапе подвергается *пара*-гидроксилрованию, то для образования кумариновой структуры она должна быть прежде всего *орто*-гидроксилрована.

Стильбены ($C_6-C_2-C_6$ -ряд) образуются из *пара*-кумарил-КоА и 3 молекул малонил-КоА при участии фермента стильбенсинтазы, который присутствует у некоторых растений.

Биосинтез фенилпропаноидов

Фенилаланин–аммиак-лиаза (КФ 4.3.1.5) катализирует реакцию дезаминирования *L*-фенилаланина, что приводит к образованию *транс*-коричной кислоты. Эта реакция является ключевой в биосинтезе фенольных соединений, поскольку с нее начинается образование большинства полифенолов в тканях растений (рис. 9).

Вместе с тем она представляет собой связующее звено между первичным и вторичным метаболизмом, между метаболизмом ароматических аминокислот и метаболизмом фенольных соединений.

Фенилаланин–аммиак-лиаза обладает строгой субстратной специфичностью по отношению к *L*-фенилаланину. В ряде случаев обнаружено, что этот фермент способен дезаминировать не только *L*-фенилаланин, но и *L*-тирозин, эта способность у большинства изученных растений является низкой.

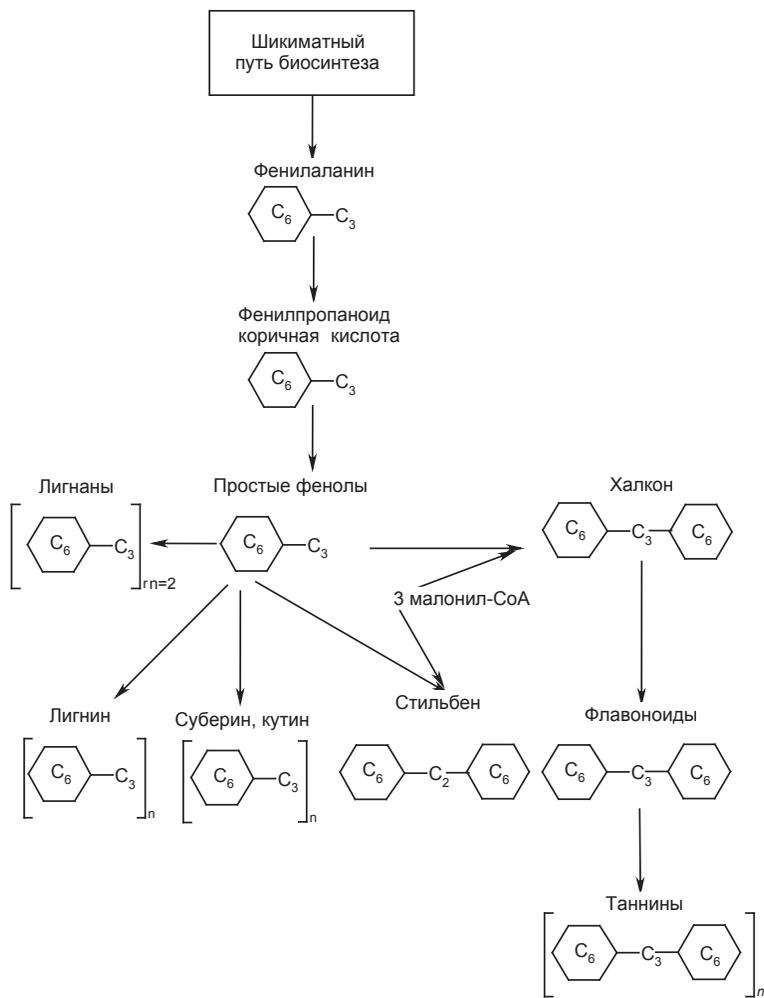


Рис. 9. Основные продукты метаболизма фенилпропанойдов [см.: 2, с. 348]

Хотя реакция дезаминирования *L*-фенилаланина теоретически обратима, в растениях ее равновесие практически полностью

сдвинуто в сторону образования *транс*-коричной кислоты. Образовавшаяся из *L*-фенилаланина *транс*-коричная кислота далее подвергается *пара*- или *орто*-гидроксилированию.

Пара-гидроксилирование является основным путем превращения *транс*-коричной кислоты и приводит к образованию *пара*-оксикоричной (*пара*-кумаровой кислоты). Эта реакция катализируется *пара*-гидроксилазой или 4-гидроксилазой *транс*-коричной кислоты (КФ 1.14.13.11).

4-гидроксилаза *транс*-коричной кислоты обладает высокой субстратной специфичностью. Активность этого фермента подавляется *цис*-коричной кислотой и продуктом реакции (*n*-кумаровой кислотой), оптимальное значение pH 7,5. В мембранах эндоплазматического ретикулама функционирование фермента обычно сопряжено с цитохромом P-450 [см.: 11, с. 105].

Активность 4-гидроксилазы *транс*-коричной кислоты индуцируется освещением при участии фитохромной системы, а также при механических повреждениях тканей, при воздействии этилена, ионов марганца, фенобарбитала, этанола [см.: 11, с. 105].

Следующим этапом в биогенезе фенилпропаноидов является гидроксилирование *n*-кумаровой кислоты, приводящее к образованию кофейной кислоты, которая затем превращается в феруловую.

Флавоноиды — наиболее многочисленная группа фенольных соединений $C_6—C_3—C_6$ -ряда, где присоединение второго ароматического кольца идет по 9-му атому фенилпропанового ядра (производного от оксикоричной кислоты). Предшественником синтеза флавоноидов является халкон, который синтезируется из *n*-кумарил-СоА и 3 молекул малонил-СоА под действием фермента халконсинтазы (см.: рис. 8).

Образование дубильных веществ

Конденсированные танины являются полимерами флавоноидов и образуются как продукты фенилпропаноидного метаболизма. Образование конденсированных дубильных веществ является следствием окислительных реакций, катализируемых ферментами фенолоксидазного или пероксидазного типа.

Гидролизуемые танины состоят из остатков галловой кислоты, которые в основном связаны с молекулами гексоз. Галловые кислоты у растений образуются преимущественно по шикиматному пути.

Образование лигнина

Лигнин образуется при полимеризации 3 монолигнолов: *n*-кумарового, синапового и кониферилового спиртов.

Пероксидазное окисление оксикоричных спиртов (называемых также монолигнолами) происходит с промежуточным образованием свободных феноксильных (ароксильных) радикалов.

Конденсация таких радикалов приводит к образованию димеров (дилигнолов), которые опять подвергаются атаке пероксидазой, образуя димерные свободные радикалы. Последние, в свою очередь, вовлекаются в конденсацию с моно-, ди- или более высоко олигомерными лигнолами, и процесс завершается формированием неупорядоченного трехмерного полимера, названного лигнином.

Лигнификация происходит во вторичной клеточной стенке, куда должны поступать либо сами оксикоричные спирты, либо соответствующие гликозиды. Последние подвергаются гидролизу под действием специфичной β -гликозидазы, содержащейся в клеточных стенках.

В модельных опытах было показано, что для нормального протекания процесса лигнификации важное значение имеет присутствие в клеточных стенках целлюлозных и гемицеллюлозных волокон, которые служат как бы матрицами в ходе формирования нативного лигнина [см.: 11, с. 164].

Регуляция процессов образования фенольных соединений осуществляется с использованием множественных способов. Предпринята попытка основные способы регуляции биосинтеза фенольных соединений представить в виде следующей классификации [см.: Там же, с. 178]:

- существование изоферментов с аллостерическим контролем их активности;
- существование изоферментов с различной субстратной специфичностью;

- различная внутриклеточная компарментация ферментов и изоферментов;
- существование специфических эндогенных ингибиторов ферментов;
- образование полиферментных комплексов;
- обратимое фосфорилирование — дефосфорилирование, сопровождающееся активацией — дезактивацией.

Кроме этих внутренних факторов осуществляется и регуляция под влиянием внешних воздействий: света, температуры, условий минерального питания, атаки патогенов.

Таким образом, синтез фенольных соединений происходит как в цитозоле, так и в хлоропластах, где существуют два независимых пути синтеза ароматических соединений. Для синтеза фенольных соединений растение использует основные метаболические пути, связанные с образованием углеводов, аминокислот, липидов.

К настоящему времени полностью доказано функционирование всех звеньев шикиматного пути у высших растений. Однако организация и регуляция шикиматного пути у растений имеет свою специфику. В отличие от грибов, а также некоторых бактерий и водорослей у высших растений не удалось обнаружить существования прочно связанных мультиферментных комплексов. Для растений характерна различная внутриклеточная компарментация изозимов. Для большей надежности изозимы, кроме их пространственного разделения, различным образом регулируются конечными продуктами шикиматного пути и ионами металлов [см.: Там же, с. 101].

Тема 3. Алкалоиды

Алкалоиды представляют собой гетерогенную группу азотсодержащих гетероциклических соединений основного характера, обладающих ярко выраженной физиологической активностью. Название этой группы веществ происходит от арабского *alkali* — щелочь и греческого *eidos* — подобный [см.: 7, с. 223; 12, с. 311].

Как правило, алкалоиды содержатся в растениях в виде солей яблочной, винной, лимонной и других кислот. В свободном виде они нерастворимы в воде, но растворяются в органических растворителях. По химической структуре алкалоиды обычно разделяют на две подгруппы: протоалкалоиды, которые содержат азот не в гетероцикле, и истинные алкалоиды, содержащие азот в гетероцикле. Гликоалкалоиды, а также ряд других алкалоидов (например, алкалоиды аконита) по типу синтеза и по структуре фактически являются изопреноидами. Поэтому эти алкалоиды было решено выделить в особую группу — изопреноидных псевдоалкалоидов [см.: 1, с. 594].

Таким образом, по «модифицированной» химической классификации сейчас принято разделять алкалоиды на три подгруппы:

- истинные алкалоиды (азот в составе гетероцикла);
- протоалкалоиды (азот не в гетероцикле);
- псевдоалкалоиды (синтез не из аминокислот).

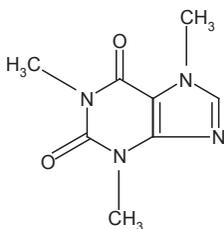
Каждая подгруппа разделяется в свою очередь на 3–10 классов.

Параллельно с химической классификацией существует и биохимическая классификация. По ней алкалоиды подразделяются на подгруппы согласно исходной для их синтеза аминокислоте. Различают [см.: Там же, с. 595; 7, с. 254] следующие алкалоиды:

- синтезирующиеся из *L*-орнитина (простые пирролидиновые алкалоиды, тропановые алкалоиды, пирролизидиновые алкалоиды);
- из *L*-лизина (пиперидиновые алкалоиды, хинолизидиновые алкалоиды);
- *L*-триптофана (сложные индольные алкалоиды, β -карболиновые алкалоиды);
- *L*-фенилаланина (сложные изохинолиновые алкалоиды);
- антралиновой кислоты (протоалкалоиды, хинолиновые алкалоиды, хиназолиновые алкалоиды);
- *L*-тирозина (сложные изохинолиновые алкалоиды);
- гистидина (пуриновые алкалоиды).

Пуриновые алкалоиды, хотя и представлены небольшим количеством соединений, широко распространены. Они имеют

достаточно простую структуру. Одним из представителей этой группы является кофеин (13). Он оказывает возбуждающее действие на центральную нервную систему, усиливает сердечную деятельность, расширяет сосуды сердца и мускулатуру бронхов.



(13)

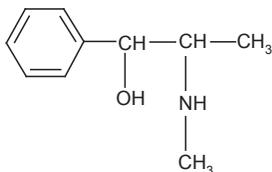
Самая многочисленная подгруппа истинных алкалоидов — индольные алкалоиды; она насчитывает более тысячи структур. В молекулах этих алкалоидов индольное ядро часто сохраняет свою ароматическую структуру, но иногда оно может быть гидрировано, ацилировано по атому азота или окислировано по пятичленному циклу. Часто в молекулу входят в качестве составляющих пиридиновые и пиперидиновые фрагменты [см.: 7, с. 236].

Индольные алкалоиды синтезируются преимущественно растениями тропиков и субтропиков. Как правило, они очень токсичны. Стрихнин — сильный яд, но в малых дозах применяется в качестве тонизирующего и возбуждающего центральную нервную систему средства. Аймалин обладает антиаритмическим действием. Помимо них, в медицине используются и такие индольные алкалоиды, как физостигмин, эргоалкалоиды (алкалоиды спорыньи), алкалоиды кураре, раувольфии и др.

Протоалкалоиды представляют собой относительно немногочисленную группу растительных алкалоидов, но ее представители достаточно известны благодаря своим свойствам. Они встречаются довольно часто в растениях разных семейств, но, как правило, в них не накапливаются в значительных количествах. Фактически эти алкалоиды являются третичными растительными аминами.

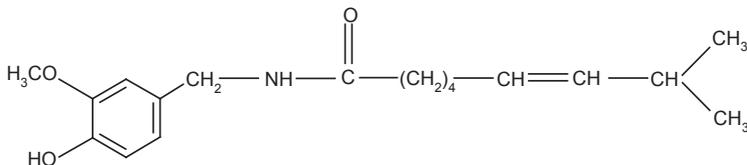
Наиболее известными протоалкалоидами являются: эфедрин, капсаицин, колхамин, колхицин, мускарин.

Эфедрин (14) выделен из некоторых видов эфедры. По химической структуре и физиологическому действию он сходен с адреналином. Расширяет бронхи, возбуждает дыхательный центр. Широко используется для лечения аллергических заболеваний.



(14)

Капсаицин (15) содержится в плодах и семенах стручкового перца и определяет их жгучий вкус. Используется в медицине в виде настойки стручкового перца и в виде перцового пластыря (в качестве местного возбуждающего средства).



(15)

Псевдоалкалоиды отличаются от истинных алкалоидов по типу синтеза: они имеют «базовую структуру» молекулы, происходящую не из аминокислот, как у истинных алкалоидов, а из изопреноидов. Изопреновые структуры, участвующие в построении псевдоалкалоидов, могут относиться к моно-, сескви-, ди- и три-терпеноидам. Самую большую группу изопреноидных псевдоалкалоидов составляют C_{27} -стероидные алкалоиды.

Стероидные псевдоалкалоиды в значительных количествах находятся в семенах и зеленых органах картофеля, в семенах

помидоров. Именно они обуславливают токсичность этих частей растения и послужили в свое время причиной «картофельных бунтов» в России.

Стероидные алкалоиды, как правило, находятся в растениях в виде гликозидов, что послужило причиной их второго названия — гликоалкалоиды. Разнообразие строения гликоалкалоидов обусловлено прежде всего вариациями углеводной части соединения. Однако в ряде случаев эти алкалоиды могут присутствовать и в свободном (негликозилированном) виде.

Наиболее широко алкалоиды распространены у покрытосеменных растений, причем в более значительных количествах они синтезируются и накапливаются у двудольных [см.: 7, с. 223]. Во мхах, в папоротниках, голосеменных алкалоиды встречаются относительно редко.

В растениях алкалоиды находятся в виде солей в активно растущих тканях, эпидермальных (покровных) клетках, обкладках сосудистых пучков, в составе латекса (млечного сока) растений. Алкалоиды накапливаются в листьях, плодах, семенах, коре, подземных органах.

Различные части растения могут содержать разные алкалоиды. Обычно концентрация алкалоидов в растении невелика и составляет десятые и сотые доли процента. При содержании алкалоидов в пределах 1–3 % растение считается богатым алкалоидами (алкалоидоносным). Только немногие растения, например культивируемые формы хинного дерева, могут накапливать до 15–20 % алкалоидов.

Функции алкалоидов

Поскольку алкалоиды представляют собой разнородную группу соединений, то и функции их в растении существенно различаются. Однако можно выделить ряд общих функций, которые могут быть отнесены к большинству представителей этой группы соединений [см.: 4, с. 209; 13, с. 133]:

– выполняют роль резерва азота, накапливаясь при усиленном азотном питании;

- могут служить транспортной формой азота;
- синтез алкалоидов в корнях — один из механизмов снижения уровня токсичных аминокислот и аминов и обезвреживания аммиака;
- связывая органические кислоты, осуществляют регуляцию рН клеточного сока;
- участвуют в поддержании ионного баланса в растении (благодаря способности к хелатообразованию);
- могут принимать участие в регуляции активности некоторых ферментов, а следовательно, оказывать воздействие на скорость метаболических процессов;
- повышают устойчивость растений к патогенным грибам;
- оказывают воздействие на процессы дифференцировки и органогенеза.

Биосинтез алкалоидов

Биосинтез алкалоидов изучен в значительно меньшей степени, чем биосинтез других соединений. Это связано с тем, что данная группа сборная. В отличие от изопреноидов, биосинтез которых идет от одного общего предшественника, при изучении биосинтеза алкалоидов приходится сталкиваться с большим разнообразием исходных соединений. К тому же алкалоиды далее всех других классов природных соединений отстоят от начальных биосинтетических путей (реакции фотосинтеза) [см.: 7, с. 253].

Проблема биосинтеза алкалоидов начала успешно разрабатываться только с появлением изотопной техники. К настоящему времени определены первичные предшественники большого числа алкалоидов и расшифрованы основные ключевые этапы образования наиболее распространенных структурных типов этих соединений.

Несмотря на исключительное многообразие алкалоидов, образование их происходит за счет одних и тех же первичных предшественников через сходные промежуточные реакции. Основу их строения составляет относительно небольшое число структурных элементов. Исследование путей их образования является основополагающей задачей, решение которой необходимо для

глубокого понимания процессов биосинтеза этого класса вторичных метаболитов.

Биогенетическими предшественниками большинства алкалоидов являются аминокислоты: орнитин, лизин, фенилаланин, тирозин, триптофан, гистидин, аспарагиновая кислота и антралиловая кислота. Все эти аминокислоты, кроме антралиловой кислоты, являются протеиногенными. Никотиновая кислота может быть синтезирована из триптофана или аспарагиновой кислоты.

Основными реакциями при биосинтезе подавляющего числа алкалоидов являются декарбоксилирование и окислительное дезаминирование или переаминирование аминокислот и диаминов, первичное метилирование, трансметилирование, а также циклизация алифатических соединений-предшественников до гетеро- и карбоциклических структур.

Особую роль в образовании алкалоидов играют реакции метилирования. Оно часто происходит на стадии ациклического соединения и предшествует циклизации, направляя ее. Метильные группы, введенные в молекулу алкалоида, стабилизируют ее. Кроме того, метилированные аналоги менее токсичны, чем алкалоиды, не имеющие метильных групп [см.: 4, с. 209]. В молекулах алкалоидов метилироваться могут кислород и азот, образуя группы $—OCH_3$ и $=N—CH_3$. Метильные группы переносятся с помощью ферментов метилтрансфераз.

Реакции циклизации, имеющие при образовании алкалоидов универсальное значение, очень разнообразны и могут совершаться через азометин с образованием основания Шиффа, по типу конденсации Манниха, путем альдольной конденсации, через форму лактамной связи и т. д. [см.: 13, с. 82].

Ниже представлены наиболее характерные реакции, участвующие в биосинтезе различных классов алкалоидов.

Основания Шиффа могут быть получены в результате реакции аминов с кетонами или альдегидами. Данная реакция является распространенным способом формирования $C=N$ связи. При биосинтезе алкалоидов реакция образования основания может проходить также внутримолекулярно: например, при синтезе пиперидиновых алкалоидов (рис. 10).

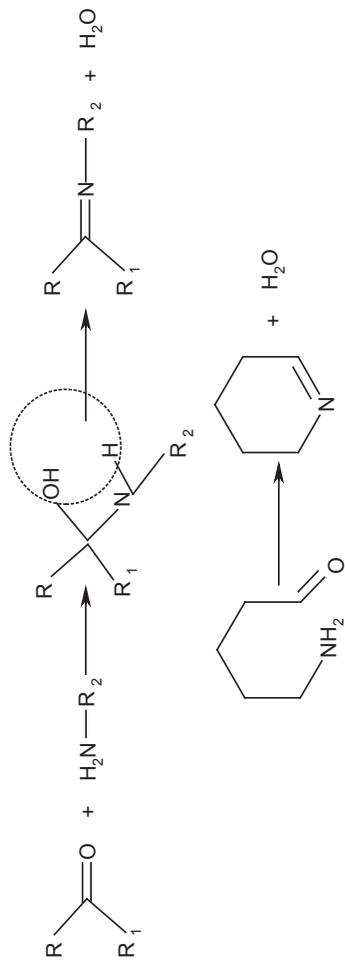


Рис. 10. Образование оснований Шиффа [см.: 7, с. 254]

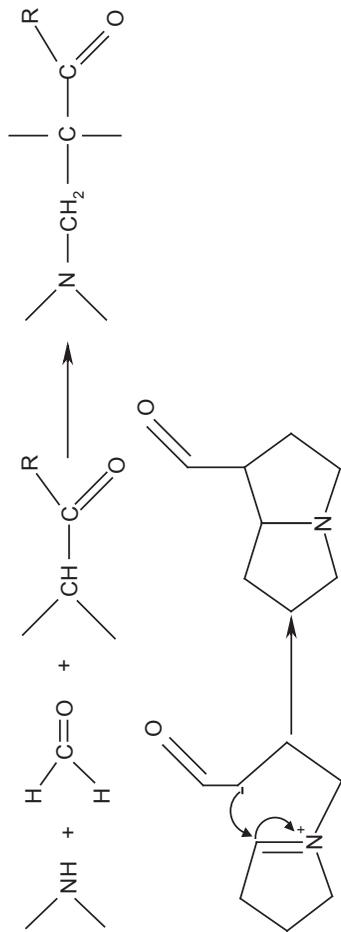


Рис. 11. Реакция Манниха [см.: 7, с. 254]

В реакции Манниха (рис. 11), помимо амина и карбонильного соединения, участвует также карбанион, играющий роль нуклеофила в процессе присоединения к иону, образованному взаимодействием амина и карбонильного соединения.

Реакция Манниха также может осуществляться как межмолекулярно, так и внутримолекулярно (см. рис. 11). Примером внутримолекулярной реакции Манниха служит синтез пирролизидинового ядра.

Разновидностью внутримолекулярной реакции Манниха является реакция Пикте — Шпенглера — циклизация шиффовых оснований, образованных из β -фенилэтиламина с образованием системы тетрагидроизохинолина.

Процессы циклизации, ведущие к замыканию алифатических соединений-предшественников в гетероциклы на первых этапах биосинтеза алкалоидов, на последующих этапах в подавляющем большинстве случаев дополняются процессами конденсации, в ходе которых отдельные кольца, соединяясь друг с другом, образуют более сложные фигуры [см.: 13, с. 83].

При биосинтезе алкалоидов постоянно происходит образование активных центров, которые способны присоединять к себе как отдельные фрагменты алифатических молекул, так и замкнутые гетероциклы. Возникновение этих центров может быть связано не только с декарбоксилированием, но также с отщеплением других функциональных групп.

В ряде случаев образование алкалоидов сопряжено с расщеплением (размыканием) циклических структур, наступающим в результате разрыва C—C, C—N или C—O связей. Широко известна, например, реакция окислительного расщепления ароматических колец по соседству с фенольной группировкой, которая имеет место при биосинтезе индольных алкалоидов.

Помимо циклизации и конденсации, усложнение углеродного скелета алкалоидов достигается также в ходе внутримолекулярных перегруппировок, при которых происходит не только разрыв, но и образование новых C—C и C—N-связей. Ограниченное число вариантов циклизации и внутримолекулярных перегруппировок

при биосинтезе алкалоидов, как правило, сочетается с различными вариантами локализации функциональных групп в составе их молекул, что, в свою очередь, также обуславливает многообразие структурных типов этих соединений.

Таким образом, на первых этапах биосинтеза алкалоидов, когда предшественник имеет ациклическое строение, осуществляются реакции, характерные для обмена аминокислот: дезаминирование, переаминирование, декарбоксилирование. Далее происходит циклизация, а затем конденсация.

Первичными предшественниками алкалоидов являются аминокислоты или родственные им диамины. Вместе с тем единые на первых этапах пути биосинтеза различных азотистых соединений расходятся на заключительных этапах. У растений имеется значительно больший, по сравнению с животными тканями, набор ферментов, функционирующих на заключительных стадиях биогенеза. Именно это в конечном счете и является причиной исключительного многообразия органических форм азота (в том числе и алкалоидной природы), которое отличает растительный мир от животного.

На примере алкалоидов впервые расшифрован биосинтез пиридинового кольца и показано, что его образование у растений происходит иначе, чем у человека, животных и большинства микроорганизмов. Поскольку пиридиновое кольцо в качестве основной структурной единицы, помимо алкалоидов, входит в состав важнейших коферментов, связанных с основными звеньями обмена растительной клетки, решение этого вопроса представляет значительный общепромышленный интерес [см.: 13, с. 86].

Алкалоиды накапливаются, как правило, в вакуолях. В периплазматическое пространство алкалоиды практически не поступают. Возможно, это является следствием «бережного отношения» растения к азотсодержащим соединениям. Транспорт алкалоидов в вакуоли проходит, видимо, с участием специфических переносчиков. Во всяком случае, в ряде экспериментов показано, что в изолированные вакуоли эффективно поступают только «собственные» алкалоиды, т. е. характерные для данного растения. В вакуолях

алкалоиды обычно находятся в виде солей. Синтез алкалоидов проходит в пластидах либо в цитозоле или эндоплазматическом ретикулуме.

Тема 4. Минорные группы вторичных метаболитов

Гликозиды

Гликозиды — широко распространенные в природе вещества, в молекулах которых остатки сахара связаны с молекулой вещества неуглеводной природы — агликоном. В зависимости от химической природы связи сахара с агликоном различают О-, S-, N- и С-гликозиды [см.: 4, с. 175].

Агликонами могут быть самые различные соединения (спирты, кислоты, фенольные соединения, амины и др.), поэтому гликозиды, как правило, не рассматриваются в качестве отдельного класса вторичных метаболитов. Так, например, гликозиды, содержащиеся в качестве агликона фенольные соединения (антоцианы, халконы), принято относить к фенолам. Гликозиды, содержащиеся в качестве агликонов соединения стероидной природы (сердечные гликозиды и сапонины), относят к изопреноидам (тритерпеноидам). В виде гликозидов, как правило, в растениях находятся стероидные алкалоиды, что послужило причиной их второго названия (гликоалкалоиды).

Цианогенные гликозиды

Цианогенные гликозиды являются β-гликозидами 2-гидроксинитрилов (цианогидринов). Они образуются из аминокислот и содержат в своем составе синильную кислоту. Первым цианогенным гликозидом, который удалось выделить, был амигдалин, получивший свое наименование от латинского названия миндаля. Он встречается только в семействе розоцветных (*Rosaceae*). К настоящему времени у высших растений обнаружено несколько десятков подобных соединений. Основные структурные вариации обусловлены природой радикалов [см.: 1, с. 603].

В качестве углеводного фрагмента у цианогенных гликозидов, как правило, выступает *D*-глюкоза. Но есть и исключения из этого правила. Например, углеводной частью амигдалина является дисахарид гентиобиоза.

Обычно цианогенные гликозиды классифицируют исходя из структуры агликона.

Цианогенные гликозиды присутствуют, как правило, в вакуолях клетки, а β -гликозидаза, отщепляющая углеводный фрагмент молекулы, — в цитозоле. Следует отметить, что для β -гликозидаз характерна избирательность по отношению к различным цианогенным гликозидам. В частности, гликозидазы, достаточно активно расщепляющие ароматические цианогенные гликозиды, гораздо менее активны по отношению к гликозидам с алифатическими агликонами (линамарин, лотаустралин).

Тиольные гликозиды (S-гликозиды, глюкозинолаты)

Тиольные гликозиды содержат в своем составе тиоцианатные, изотиоцианатные, сульфо- и неорганические агликаны [см.: 6, с. 125]. При гидролизном распаде образуют соответствующие сахара и меркаптаны. Тиольные гликозиды широко представлены в растениях семейства крестоцветных, реже — в семействах луковых и настурциевых. Они находятся в виде солей с щелочными металлами, чаще всего с калием. Обладают сильным антимикробным действием и обуславливают острый или жгучий вкус горчицы, хрена, редьки.

В растении тиольные гликозиды, как и цианогенные гликозиды, пространственно отделены от гидролизующих их ферментов. При повреждении растительных тканей происходит ферментативное расщепление гликозидов с образованием летучих токсичных веществ с горчичным запахом — изотиоцианатов и нитрилов [см.: 14, с. 314].

Растительные амины

Амины можно рассматривать как производные аммония. Различают четыре основные группы аминов: первичные, вторичные, третичные и четвертичные.

Следует отметить, что достаточно сложно четко отделить растительные амины от других классов вторичных соединений, прежде всего алкалоидов. Многие амины считаются типичными алкалоидами, например, мескалин. Четких критериев отличия биогенных аминов от протоалкалоидов нет. Часто к алкалоидам относят сложные соединения с относительно большой молекулярной массой. Некоторые авторы предлагают считать биогенными аминами только первичные или первичные и вторичные амины, оставив для протоалкалоидов соответственно соединения с третичными или вторичными и третичными атомами азота. В группу биогенных аминов обычно не включают соединения с карбоксильными группами, а также пурины и пиримидины.

В высших растениях присутствует большое количество аминов. Многие из аминов структурно представляют собой декарбоксилированные аминокислоты, причем как протеиногенные, так и непротеиногенные. Растительные амины обычно разделяют на моноамины (с одной аминогруппой), диамины (с двумя аминогруппами) и полиамины (более двух аминогрупп).

Амины — ядовитые вещества, которые могут вызывать отравления как животных, так и растений. Они в малых количествах обнаружены в грибах (рожки спорыньи, мухоморы, дрожжи) и в растениях (дурман, белена, омела, соя). Содержание аминов может возрастать при неблагоприятных условиях выращивания [см. 4, с. 106].

Амины могут образовываться из аминокислот путем их декарбоксилирования (при участии декарбоксилаз, коферментом которых является пиридоксальфосфат — производное витамина В₆). При декарбоксилировании лизина образуется кадаверин, триптофана — триптамин, гистидина — гистамин, орнитина — путресцин. Путресцин и кадаверин обнаружены в рожках спорыньи, боровиках, мухоморах, белене, белладонне и дурмане; в этиолированных проростках сои найден кадаверин, в спорынье и побегах омелы — тирамин, в томатах и шпинате — гистамин. Во многих цветах содержится изоамиламин, образующийся при

декарбоксилировании лейцина, и изобутиламин, получающийся при декарбоксилировании валина [см.: 3, с. 428].

Амины, образующиеся при декарбоксилировании аминокислот, обычно в растениях не накапливаются, а претерпевают различные превращения и вовлекаются в обмен веществ.

Из диаминов в растениях синтезируются различные гетероциклы, а из них — гетероциклические соединения, например, алкалоиды. Из путресцина образуется гетероцикл пирролидин, а из него пирролидиновые алкалоиды; из кадаверина — гетероцикл пиперидин и пиперидиновые алкалоиды.

Непротеиногенные аминокислоты

Под термином «непротеиногенные» (небелковые) аминокислоты подразумевают природные аминокислоты, их амиды, иминокислоты, которые, как правило, не входят в состав белков.

Большинство непротеиногенных аминокислот в высших растениях находятся в свободном состоянии или в конденсированном виде с другими низкомолекулярными соединениями (глутаминовой, щавелевой, уксусной кислотами). Некоторые из непротеиногенных аминокислот, например, гидроксипролин или гомосерин, встречаются в составе растительных белков. Однако подобные случаи достаточно редки, при этом белки с такими аминокислотами выполняют, как правило, специфические функции (например гидроксипролин-обогащенные белки в клеточных стенках). К тому же образование непротеиногенных аминокислот в подобных белках происходит чаще всего путем посттрансляционной модификации протеиногенных аминокислот (например, гидроксипролин образуется путем гидроксирования пролина).

К настоящему времени известно более 400 непротеиногенных аминокислот [см.: 1, с. 603]. Многие из них можно рассматривать как модифицированные белковые аминокислоты. При этом наиболее обычными вариациями являются:

- удлинение или сокращение углеродной цепи (добавление или удаление CH_2 - или CH_3 -фрагментов);
- гидрирование и дегидрирование;

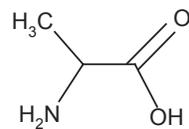
- гидроксирование;
- аминирование.

Фитохимическую классификацию непротеиногенных аминокислот обычно связывают со структурой «исходных» протеиногенных аминокислот. При этом различают:

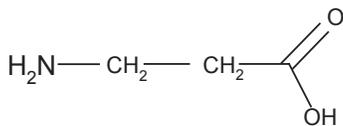
- нейтральные алифатические аминокислоты;
- серосодержащие аминокислоты;
- ароматические аминокислоты;
- гетероциклические аминокислоты;
- дикарбоновые аминокислоты и амиды;
- щелочные (основные) аминокислоты;
- иминокислоты.

Другая классификация непротеиногенных аминокислот основана на характере сходства с протеиногенными. Выделяют три основные группы [см.: 4, с. 81].

Сходство по изомерии. Некоторые непротеиногенные аминокислоты являются изомерами протеиногенных. Например, α -аланин (16) — протеиногенная аминокислота, а ее изомер, β -аланин (17), не входит в состав белка, а содержится в пуле свободных аминокислот. Он входит в состав пантотеновой кислоты, а следовательно, коэнзима А.

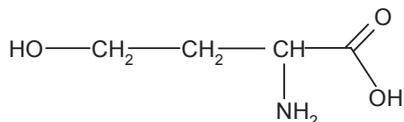


(16)

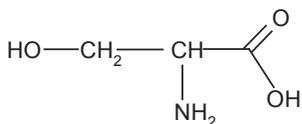


(17)

Сходство по гомологии. Ряд непотеиногенных аминокислот гомологичен протеиногенным. Например, гомосерин (18) содержит в углеродной цепочке на один углеродный атом больше, чем соответствующая протеиногенная аминокислота — серин (19).

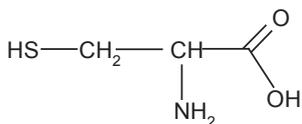


(18)

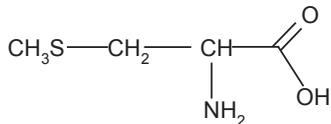


(19)

Сходство по аналогии. В некоторых случаях в молекуле протеиногенной аминокислоты один атом водорода замещен какой-нибудь группой, в результате чего получается непотеиногенная аминокислота. Например, цистеин (20) и S-метилцистеин (21). S-метилцистеин распространен в растениях и может выступать донором метильных групп в реакциях метилирования.

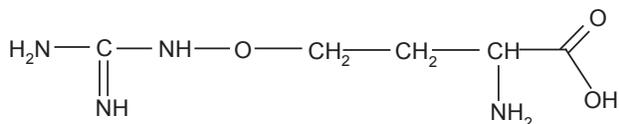


(20)

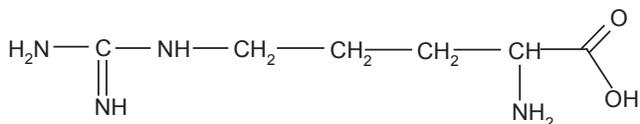


(21)

Аналогия может проявляться и по сходству в строении молекулы. Например, канаванин (22) имеет сходное строение с аргинином (23). Вместе с тем некоторые непротеиногенные аминокислоты не являются близкими аналогами белковых аминокислот.



(22)



(23)

Как правило, непротеиногенные аминокислоты очень токсичны. Их токсичность обусловлена тем, что они включаются в состав белков вместо «нормальных» белковых аминокислот и нарушают функционирование таких протеинов. Например, токсичность канаванина связана с тем, что у животных аминоацил-тРНК-синтазы, осуществляющие перенос аргинина на т-РНК, не могут отличить эту аминокислоту от аргинина и включают ее в состав белка [см.: 3, с. 328]. При этом собственная белок-синтезирующая система растения, как правило, отличает протеиногенные аминокислоты от непротеиногенных.

Непротеиногенные аминокислоты выполняют в растениях ряд важных функций:

- некоторые из них участвуют в образовании протеиногенных. Например, из гомосерина образуются треонин и метионин, а из непротеиногенной диаминопимелиновой кислоты — лизин;

- непротеиногенные аминокислоты могут служить запасной формой азота и серы. Например, орнитин, цитруллин, гомоаргинин накапливаются в семенах в качестве резерва азота,

а при прорастании используются для образования необходимых проростку аминокислот. В качестве источника запасной серы в семенах откладываются производные цистеина, например, S-метилцистеин;

– некоторые непротеиногенные аминокислоты (например, производные аспарагиновой и глутаминовой кислот и их амидов) являются транспортной формой азота. Они не накапливаются в семенах, а встречаются в проводящих тканях растений;

– непротеиногенные аминокислоты могут выполнять разнообразные защитные функции. Орнитин и цитруллин участвуют в обезвреживании аммиака в орнотиновом цикле. При наступлении неблагоприятных условий образуется ряд непротеиногенных аминокислот, которые связывают аммиак, накапливающийся при распаде белков (диаминомасляная кислота). В неблагоприятных условиях накапливается «стрессовый» фитогормон этилен. Его источником служит метионин, а промежуточным продуктом биосинтеза является непротеиногенная аминокислота аминокислота пропионилкарбоновая. Она же служит транспортной формой этилена.

Беталаины

Беталаины являются еще одной группой (помимо антоцианов) водорастворимых пигментов высших растений. По своей химической структуре они представляют собой алкалоиды. Это единственная группа алкалоидов, имеющих яркую окраску. Предшественниками беталаинов при биосинтезе в растениях являются тирозин и пролин. В царстве высших растений беталаины до сих пор обнаруживали только в семействах порядка гвоздичные *Caryophyllales* (*Centrospermae*).

Помимо высших растений, беталаины известны как пигменты некоторых высших грибов, в частности, мухоморов.

Беталаины встречаются в виде гликозидов, находятся в вакуолях и разделяются на бетацианины и бетаксантины.

Бетацианины являются красно-фиолетовыми водорастворимыми пигментами растений порядка *Caryophyllales*. Их присутствие придает различным частям растения соответствующий

оттенок (например, красно-фиолетовую окраску черешков листьев столовой свеклы). К настоящему времени известно более 50 бетацианинов. Все они являются гликозидами всего двух агликонов: бетанидина и изобетанидина. Эти агликоны состоят из двух гетероциклических систем — дигидроиндольной и дигидропиридиновой, связанных между собой двухуглеродным мостиком [см.: 15, с. 250]. Бетанидин и изобетанидин являются стереоизомерами и отличаются только пространственным расположением карбоксильной группы у C_{15} -атома. При этом *S*-конфигурация соответствует бетанидину, а *R*-конфигурация — изобетанидину. Бетацианины могут быть монозидами или биозидами. Углеводный компонент чаще всего представлен глюкозой или глюкуроновой кислотой. Широко распространено ацилирование углеводного фрагмента.

Бетаксантины являются желтыми водорастворимыми пигментами растений порядка *Caryophyllales*. У бетаксантинов сохраняется дигидропиридиновое кольцо и связующий двухуглеродный мостик, но дигидроиндольное кольцо замещено аминокислотой или аминогруппой [см.: Там же, с. 251]. К настоящему времени известно всего около десятка индивидуальных бетаксантинов.

Подобно повсеместно распространенным антоцианам, беталаины находятся в вакуолях клеток цветков, плодов и листьев. В столовой свекле они в больших количествах накапливаются и в подземных частях растения, однако это является результатом длительной селекционной работы.

До сих пор не найдены растения, где эти две группы пигментов — антоцианы и беталаины — встречаются одновременно [см.: Там же, с. 250].

Очевидно, беталаины играют в жизни растений ту же роль, что и антоцианы — они могут служить для привлечения насекомых и птиц в целях опыления и распространения семян. Беталаины играют важную роль в защите растения от патогенов. Показано, что проростки свеклы, содержащие бетанидин, более устойчивы к фитопатогенному грибу *Phythium debarium*. Выявлена также антимикробная и антивирусная активность ряда беталаинов.

Необычные липиды

Многие липиды растительного происхождения имеют признаки вторичных метаболитов: они являются низкомолекулярными соединениями, встречаются лишь в определенных таксономических группах растений, многие из них обладают биологической активностью.

Жирные кислоты

Необычные жирные кислоты являются типичными вторичными метаболитами: они встречаются лишь в растениях определенных таксономических групп и не являются компонентами мембран клеток.

Необычные жирные кислоты отличаются от «обычных» длинной углеродной цепи, необычным расположением и количеством двойных связей, наличием дополнительных функциональных групп и циклов. В углеродных алифатических цепях могут находиться заместители различной химической природы, такие как метильные, гидроксильные, карбонильные группы, оксо- и эпоксигруппы, циклопропановые или циклопентановые группировки. В эту же группу включены жирные кислоты с тройными связями, конъюгированными двойными связями, с разветвленной углеродной цепочкой, с двойными связями в *транс*-форме. Чаще всего необычные жирные кислоты обнаруживаются в масле семян.

Примером «коротких» насыщенных жирных кислот может служить каприевая кислота, имеющая 12 углеродных атомов и обнаруженная в представителях семейств *Ulmaceae*, *Lauraceae*, *Lythraceae*. Длинноцепочечная насыщенная жирная кислота с 24 атомами углерода — лигноцериновая — найдена в растениях семейств *Leguminosae* и *Sapindaceae*.

Из дополнительных функциональных групп в жирных кислотах чаще всего присутствуют гидроксилы. В масле семян ряда растений гидроксिलированные жирные кислоты могут составлять до 90 % от общего содержания жирных кислот. Кроме того, гидроксилированные жирные кислоты входят в состав кутина и суберина. В качестве примера свободной гидроксилированной кислоты

можно привести мононенасыщенную рициноловую кислоту, обнаруженную в клещевине *Ricinus communis*.

Отдельной группой ненасыщенных жирных кислот являются соединения с конъюгированными двойными связями. Обычно такие кислоты содержат три или более конъюгированных двойных связей, причем, как минимум, одна из них находится в *транс*-конфигурации. Примером подобных кислот может служить паринаровая кислота, найденная в растениях семейств розоцветных *Rosaceae* и бальзаминовых *Balsaminaceae*.

Масло из плодов тунгового дерева содержит до 80 % олеостеариновой кислоты, которая является изомером линоленовой, но имеет своеобразную конфигурацию: две ее двойные связи находятся в *транс*-, а одна двойная связь — в *цис*-положении. Причем двойные связи не разделены метиленовыми группами. Благодаря такому строению олеостеариновая кислота придает тунговому маслу специфические свойства — способность к полимеризации и затвердеванию при температуре выше 282 °С, что делает его ценным сырьем для лакокрасочной промышленности [см.: 4, с. 121].

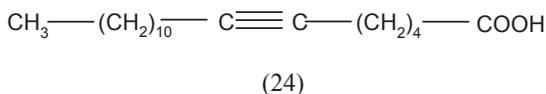
Необычные жирные кислоты характерны для той или иной небольшой группы растений. Однако в данной группе они могут содержаться в больших количествах. Например, масла семян растений из семейства крестоцветных (рапс, горчица) содержат от 42 до 55 % эруковой кислоты [см.: Там же, с. 120]. Эруковая кислота — ненасыщенная жирная кислота, имеющая 22 углеродных атома и одну двойную связь. С помощью клеточной селекции были получены варианты растений (например, рапса *Brassica napus* или *Brassica campestris*), полностью свободные от эруковой кислоты.

В масле некоторых тропических деревьев и кустарников из семейства *Flacourtiaceae* содержатся циклические жирные кислоты, с присутствием которых связывают лечебные свойства масла указанных растений.

Особое место среди необычных жирных кислот занимают кислоты с тройной связью, которые можно отнести к ацетиленовым производным, поэтому они рассмотрены ниже.

Производные ацетилена

У многих видов высших растений при изучении липидного спектра были обнаружены соединения с одной или несколькими тройными связями. Такие соединения получили название ацетиленовых производных. Первый природный ацетилен — тарариновая кислота (24) — был выделен из масла семян *Picramnia* [см.: 12, с. 396]. Она содержит одну тройную связь. Изановая кислота, имеющая две тройные и одну двойную связь, найдена в представителях семейства *Olacaceae*.



Ацетиленовые производные распространены очень широко: они обнаружены у растений, животных и микроорганизмов. Их можно разделить на длинноцепочечные моноацетилены и полиацетилены [см.: 7, с. 328]. Полиацетиленовые производные более разнообразны в структурном плане, поэтому получили более широкое распространение.

В отличие от необычных жирных кислот, которые, как правило, присутствуют только в масле семян и восках, ацетиленовые производные могут находиться во всех органах и частях растения.

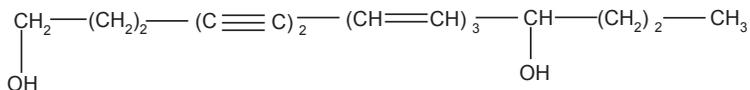
Известно несколько типов природных ацетиленов и полиацетиленов. Некоторые из них представляют собой алифатические соединения, другие имеют ароматический характер; одни из них представляют собой углеводороды, другие же обладают теми или иными функциональными группами. Длина цепей, а также степень ненасыщенности сильно варьируют даже в пределах одного типа.

Ненасыщенные фрагменты ацетиленов могут быть и сопряженными и разделенными метиленовыми группами. Отдельные вещества содержат наряду с ацетиленовыми также этиленовые группы. Соединения с двойной связью встречаются в виде *цис*- или *транс*-изомеров. В структуре этих соединений часто присутствуют другие функциональные группы: спиртовые, карбонильные,

карбокисильные, эфирные и др. Некоторые вещества имеют тиофеновые или фурановые группировки [см.: 12, с. 397]. Ацетиленовые производные тиофена представляют собой одну из самых крупных групп природных ацетиленов.

Многие полиацетилены являются физиологически активными веществами. В частности, некоторые из них обладают антибиотической активностью. Для многих природных полиацетиленов характерна высокая цитотоксическая активность по отношению к опухолевым клеткам. Из растения *Artemisia capillaris*, известного в китайской медицине своей противовоспалительной и диуретической активностью, было выделено более десяти фенилацетиленов под общим названием «капилларидины» [см.: 7, с. 330].

Отдельные представители ацетиленовых являются токсичными. Например, из растения *Cicuta virosa* был выделен цикутотоксин (25), производное ацетилена. Как известно, при его попадании в организм начинаются судороги и наступает смерть [см.: 12, с. 399].



(25)

Соединения ацетилена синтезируются у многих представителей сложноцветных и зонтичных. Полиацетилены обнаруживаются у них преимущественно в составе эфирных масел. Из растений семейства сложноцветных было выделено несколько ацетиленовых спиртов. Среди грибов способностью к образованию полиацетиленов обладают только высшие грибы, относящиеся к классу базидиомицетов.

За счет наличия тройных связей ацетиленовые производные химически активны и являются предшественниками целого ряда других вторичных метаболитов.

Воска

Эпидермис различных органов высших растений, как правило, покрыт кутикулой, на которой обычно имеется восковой налет различной толщины. Этот восковой слой носит название кутикулярного воска. Растительные воска имеют сложный состав. Кутикулярный воск представляет собой многокомпонентную смесь, которая состоит из относительно простых углеводов (прежде всего, алканов), восковых эфиров, а также жирных кислот, спиртов и кетонов.

Обязательными компонентами кутикулярного воска являются углеводороды, причем у многих высших растений они выступают главной его частью. Обычно углеводороды воска представлены алканами с длиной углеводородной цепочки около 30 атомов — C_{29} — C_{31} . Алканы обычно содержат нечетное количество атомов углерода ($n = 27, 29, 31$), что обусловлено их образованием из соответствующих карбоновых кислот.

Во многих восках найдены ненасыщенные углеводороды — алкены со структурами, похожими на структуру соответствующих алканов.

Алканы и алкены кутикулярных восков синтезируются в эпидермальном слое клеток и затем выводятся на поверхность кутикулы.

Восковые эфиры являются специфичными компонентами кутикулярного воска. Они представляют собой сложные эфиры длинноцепочечных насыщенных жирных кислот и спиртов жирного ряда. Обычно длина углеродной цепочки как спиртов, так и кислот составляет 24, 26 или 28 атомов. В ряде случаев обнаружены внутримолекулярные эфиры, в результате чего образуются кольцевые структуры.

В кутикулярных восках одновременно с углеводородами присутствуют гомологичные им спирты, кетоны и жирные кислоты, имеющие, как правило, длинные углеводородные цепочки.

Особенностью кутикулярных вторичных спиртов и кетонов является то, что гидроксильная или карбонильная группа обычно расположена около середины молекулы.

К необычным липидам относятся также цианолипиды, которые при гидролизе образуют свободную синильную кислоту.

Биосинтез минорных групп вторичных метаболитов

Пути биосинтеза минорных классов вторичных метаболитов к настоящему времени изучены достаточно полно [см.: 1, с. 610].

Непротеиногенные аминокислоты могут образовываться по-разному. Установлено, что пути их образования включают:

- модификацию протеиногенных аминокислот;
- модификацию путей биосинтеза протеиногенных аминокислот;
- уникальные пути биосинтеза. Например, латирин у *Latirus* образуется из лизина через гомоаргинин и гидроксигомоаргинин [см.: 6, с. 39].

Конденсация пирувата с 2-оксоглутаратом и другими низкомолекулярными промежуточными продуктами обмена представляет собой начальный путь, ведущий к образованию кетоаналогов 2-аминоадипиновой, 4-оксиглутаминовой и 4-метилглютаминной кислот. Так, например, ацетил-СоА и 2-оксоглутарат в реакциях, близких к реакциям цикла трикарбоновых кислот, образуют сначала гомолимонную кислоту, которая, в свою очередь, может превращаться в 2-оксоадипиновую через ряд циклических гомологов. Пировиноградная кислота подвергается медленной химической димеризации с образованием 4-окси-4-метил-2-оксоглутарата, а сходная ферментативная конденсация двух молекул пирувата или других близких к нему по строению C_3 -метаболитов может служить основным этапом в биосинтезе C_6 -кислот с разветвленной цепью [см.: 12, с. 222].

Реакции циклизации, ведущие к образованию пролина, могут служить типичной моделью биосинтеза других аминокислот.

Для многих азотсодержащих соединений исходными веществами являются аминокислоты. Например, образование моно- и диаминов осуществляется путем декарбоксилирования аминокислот. Синтез цианогенных гликозидов также начинается с декарбоксилирования соответствующей аминокислоты. Синтез беталаинов

начинается от тирозина, который гидроксيليруется и образуется диоксифенилаланин [см.: 14, с. 255]. Он служит предшественником для двух фрагментов молекулы бетацианинов — беталамовой кислоты и циклодиоксифенилаланина. Объединение этих двух соединений приводит к образованию бетацианинов. При синтезе бетаксантинов беталамовая кислота конденсируется с пролином. Серосодержащие вторичные метаболиты обычно синтезируются из серосодержащих аминокислот [см.: 1, с. 610].

Биосинтез компонентов воска у высших растений происходит только в эпидермальном слое клеток. Эфиры воска — главные компоненты воска кутикулы — могут образовываться путем переноса на спирт жирного ряда ацильного остатка как с фосфолипидом, так и от CoA-производного жирной кислоты. CoA-производные жирных кислот дают начало самым разнообразным компонентам воска. Свободные жирные кислоты образуются в результате гидролитического действия тиоэстераз CoA-производных жирных кислот. Альдегиды жирного ряда возникают в результате действия NAD-зависимой редуктазы CoA-производных жирных кислот. Спирты жирного ряда образуются из альдегидов жирного ряда.

Углеводородные компоненты воска — *n*-алканы — с нечетным числом углеродных атомов возникают при декарбоксилировании свободных жирных кислот с четным числом углеродных атомов. Окисление углеводов приводит к образованию вторичных спиртов с гидроксильной группой у углеродного атома, расположенного вблизи центра молекулы [см.: 6, с. 67].

Очевидно, для синтеза ацетиленовых производных используются традиционные метаболические пути (шикиматный, поликетидный, мевалонатный), ведущие к образованию соответствующих углеродных скелетов. Далее, на одной из стадий последующих метаболических процессов происходят реакции, приводящие к возникновению ацетиленовой связи путем дегидрирования олефиновых фрагментов [см.: 7, с. 332].

Контрольные вопросы и задания

Вопросы для самоконтроля

1. Почему к монотерпенам относят соединения, состоящие из двух изопреновых группировок?
2. На основании какого общего признака изопреноиды объединили в один класс?
3. Встречаются ли изопреноиды у животных организмов?
4. Какие вещества относят к гемитерпенам?
5. Какие растительные гормоны можно отнести к группе изопреноидов?
6. Какую роль играют изопреноиды в первичном метаболизме растительных организмов?
7. На чем основана биохимическая классификация изопреноидов?
8. Какие ферменты участвуют на разных стадиях биосинтеза изопреноидов?
9. Каковы причины дублирования путей биосинтеза изопреноидов?
10. Дайте общую характеристику фенольных соединений.
11. На чем основана классификация фенольных соединений?
12. Что собой представляют фенольные кислоты?
13. В чем особенности строения гидроксикоричных кислот?
14. Что собой представляют антоцианы и от каких факторов зависит их цвет?
15. Каковы основные пути образования фенольных соединений?
16. Ферменты каких классов принимают участие в шикиматном пути синтеза фенольных соединений?
17. На чем основана классификация алкалоидов? На какие группы их делят?
18. Что собой представляют истинные алкалоиды? На чем основана их классификация?
19. Что собой представляют протоалкалоиды? Приведите названия наиболее известных представителей этой группы.

20. Каково значение алкалоидов в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве?

21. Укажите название группы алкалоидов, в основе строения которых лежит стероидный скелет, к которому добавлена дополнительная гетероциклическая система. Приведите примеры (назовите представителей).

22. Какие группы вторичных метаболитов относят к минорным? Почему их так называют?

23. Охарактеризуйте группу аминов. Как их принято классифицировать?

24. Как образуются моноамины и диамины? Какие ферменты катализируют эти реакции?

25. На чем базируется фитохимическая классификация непротеиногенных аминокислот?

26. Назовите основные пути образования непротеиногенных аминокислот.

27. Укажите наиболее важные функции непротеиногенных аминокислот и проиллюстрируйте это конкретными примерами.

28. Какие два типа соединений объединяют беталаины?

29. На основании каких признаков некоторые липиды относят к веществам вторичного обмена растений? На какие группы их можно разделить?

30. Назовите характерные особенности жирных кислот, которые относят к вторичным метаболитам растений. Какие функции они выполняют?

31. Какую роль в жизнедеятельности растений играют гидроксильированные жирные кислоты?

32. Какие функции могут выполнять ацетиленовые производные? Как они образуются?

Тестовые задания

Изопреноиды

1. Установите соответствие между числом изопреновых единиц (1–8) и названием группы изопреноидов (а–з):

Число изопrenoвых единиц:	Группа изопrenoидов:
1) одна;	а) политерпены;
2) две;	б) тетратерпены;
3) три;	в) дитерпены;
4) четыре;	г) сесквитерпены;
5) пять;	д) гемитерпены;
6) шесть;	е) монотерпены;
7) восемь;	ж) тритерпены;
8) большое количество.	з) сестертерпены.

2. Терпены — группа изопrenoидов, которые состоят из _____ числа изопrenoвых единиц.

3. Монотерпены содержат в основе _____ атомов углерода;
 сесквитерпены — _____ атомов углерода;
 тритерпены — _____ атомов углерода;
 тетратерпены — _____ атомов углерода.

4. Выберите верное утверждение. Ксантофиллы — это:

- а) изопrenoиды, состоящие из нескольких сотен остатков изопрена;
- б) каротиноиды, не имеющие в своем составе кислорода;
- в) каротиноиды, содержащие гидроксильную или эпокси-группу;
- г) желтые и оранжевые красящие вещества фенольной природы.

5. Основными компонентами эфирных масел, как правило, являются:

- а) монотерпены;
- б) сесквитерпены;
- в) дитерпены;
- г) тетратерпены.

6. Эфирные масла получают следующими способами:

- 1) _____;
- 2) _____;
- 3) _____;
- 4) _____.

7. Представителями политерпенов являются:

- а) лигнин;
- б) суберин;
- в) каучук;
- г) кутин;
- д) фитол;
- е) гутта.

8. Во многих растениях обнаружены стероиды с большим количеством гидроксильных групп, которые, помимо мощного инсектицидного действия, обладают психостимулирующей, адаптогенной и анаболической активностью. Называются они

9. Основными компонентами смол, как правило, являются:

- а) монотерпены;
- б) сесквитерпены;
- в) дитерпены;
- г) тетратерпены.

10. Выберите из предложенного перечня три представителя тритерпеноидов:

- а) ментол;
- б) фитол;
- в) сапонины;
- г) сердечные гликозиды;
- д) абсцизовая кислота;
- е) гиббереллин;
- ж) экдистероиды.

11. Укажите название группы изопреноидов, к которой относятся: лютеин; виолоксантин; зеаксантин; неоксантин.

12. Установите соответствие между отдельными представителями изопреноидов (1–6) и названием группы, к которой они относятся (а–е):

Представители:	Группа изопреноидов:
1) неоксантин;	а) монотерпены;
2) каучук;	б) сесквитерпены;
3) неролидол;	в) дитерпены;
4) фитол;	г) тритерпены;
5) лимонен;	д) тетратерпены;
6) сапогенины.	е) политерпены.

13. Из перечисленных ниже индивидуальных соединений изопреноидом является:

- а) пеларгонидин;
- б) гераниол;
- в) кодеин;
- г) таннин.

14. «Активный изопрен» — это _____.

15. Синтез изопреноидов по мевалонатному пути идет в _____, а по альтернативному пути — в _____.

16. Исходным метаболитом для синтеза «активного изопрена» в пластидах является:

- а) мевалоновая кислота;
- б) дезоксиксилулозо-5-фосфат;
- в) ацетилкоэнзим А.

17. Расположите в правильной последовательности названия промежуточных метаболитов синтеза «активного изопрена» (мевалонатный путь):

- а) гидроксиметилглутарилкоэнзим А;
- б) фосфомевалонат;
- в) мевалоновая кислота;
- г) изопентенилпирофосфат;
- д) ацетоацетилкоэнзим А;
- е) ацетилкоэнзим А;
- ж) пирофосфомевалонат.

18. Расположите в правильной последовательности названия промежуточных метаболитов синтеза «активного изопрена» (немевалонатный путь):

- а) 1-дезоксид-*D*-ксилоулозо-5-фосфат;
- б) изопентенилпирофосфат;
- в) *D*-глицеральдегид-3-фосфат;
- г) пируват.

19. Выберите из перечисленных ниже ферментов наименования тех, которые участвуют в мевалонатном пути синтеза активного изопрена:

- а) изопентенилдифосфат-Δ-изомераза;
- б) гидроксиметилглутарил-СоА-редуктаза;
- в) пирофосфомевалонат-декарбоксилаза;
- г) гидроксиметилглутарил-СоА-синтаза;
- д) пренилтрансфераза;
- е) мевалонаткиназа;
- ж) DOXP-синтаза.

20. По мевалонатному пути у растений синтезируются:

- а) стероиды;
- б) фитол;
- в) каротиноиды;
- г) боковая цепь убихинона;
- д) боковая цепь пластохинона.

21. По немевалонатному (альтернативному) пути у растений синтезируются:

- а) стероиды;
- б) фитол;
- в) каротиноиды;
- г) боковая цепь убихинона;
- д) боковая цепь пластохинона.

22. Расположите в правильной последовательности названия промежуточных метаболитов синтеза изопреноидов, которые

образуются за счет последовательного присоединения изопренильных фрагментов:

- а) геранилгеранилпирофосфат;
- б) диметилаллилпирофосфат;
- в) геранилпирофосфат;
- г) фарнезилпирофосфат.

23. Длину изопреноидной цепи наращивает фермент _____, а циклические структуры на концах изопреноидных цепей формирует фермент _____.

Фенольные соединения

1. Установите соответствие между представителями фенольных соединений (1–6) и типом их химической структуры (а–е):

Представители:

- 1) стильбены;
- 2) фенилпропаноиды;
- 3) флавоноиды;
- 4) фенолоксилоты;
- 5) простые фенолы;
- 6) фенолоспирты.

Тип химической структуры:

- а) C_6 -ряд;
- б) C_6-C_1 -ряд;
- в) C_6-C_3 -ряд;
- г) C_6-C_2 -ряд;
- д) $C_6-C_3-C_6$ -ряд;
- е) $C_6-C_2-C_6$ -ряд.

2. Наиболее восстановленной группой фенольных соединений являются:

- а) кумарины;
- б) флавононы;
- в) антоцианы;
- г) катехины.

3. Выберите из предложенных выражений верные:

- а) хиноны часто обнаруживаются в растениях в чистом виде;
- б) ароматические аминокислоты не синтезируются у животных, так как у них отсутствует шикиматный путь;
- в) образование лигнина из коричных спиртов сопровождается свободнорадикальными реакциями;
- г) биосинтез флавоноидов характерен только для высших растений;
- д) меланины животных и растений являются азотсодержащими соединениями.

4. Пигментация растений, обусловленная антоцианами, не зависит:

- а) от строения антоцианидина;
- б) комплексообразования с тяжелыми металлами;
- в) содержания беталаинов;
- г) рН-среды.

5. К фенольным соединениям относятся:

- а) антоцианы;
- б) сесквитерпены;
- в) флавоноиды;
- г) кумарины;
- д) стероиды;
- е) дубильные вещества.

6. К полимерным фенольным соединениям относятся:

- а) полифенолы;
- б) танины;
- в) лигнин;
- г) пирокатехин;
- д) меланин;
- е) резорцин.

7. Ацетатно-малонатный путь биосинтеза фенольных соединений реализуется:

- а) только у плесневых грибов;
- б) только у высших растений;
- в) как у высших растений, так и у плесневых грибов;
- г) только у водорослей.

8. С затратой АТФ связан следующий этап шикиматного пути:

- а) образование хоризмовой кислоты;
- б) образование тирозина;
- в) образование 5-енол-пирувилшикимат-3-фосфата;
- г) образование 3-фосфошикимовой кислоты.

9. Расположите в правильной последовательности названия промежуточных метаболитов синтеза лигнина:

- а) *L*-фенилаланин;

- б) хоризмовая кислота;
- в) простые фенолы;
- г) гидроксикоричные спирты;
- д) шикимовая кислота;
- е) гидроксикоричные кислоты;
- ж) хинная кислота.

10. Расположите в правильной последовательности названия промежуточных метаболитов синтеза флавоноидов (шикиматный путь):

- а) *L*-фенилаланин;
- б) хинная кислота;
- в) оксикоричная кислота;
- г) шикимовая кислота.

11. В результате реакции аминирования префеновой кислоты при участии глутамата образуется:

- а) *L*-фенилаланин;
- б) хинная кислота;
- в) оксикоричная кислота;
- г) хоризмовая кислота;
- д) *L*-арогеновая кислота;
- е) шикимовая кислота.

12. Выберите из предложенных утверждений верные:

- а) ацетатно-малонатный путь приводит к образованию стильбенов и халконов;
- б) одно кольцо флавоноидов образуется с использованием шикиматного, а другое — ацетатно-малонатного пути;
- в) феруловая кислота образуется путем метилирования кофейной кислоты;
- г) шикиматный путь биосинтеза фенольных соединений осуществляется только в пластидах;
- д) предшественником кофейной, феруловой и синаповой кислот является *n*-оксикоричная кислота.

13. Расположите в правильной последовательности названия промежуточных метаболитов синтеза кумаринов:

- а) кумариновая кислота;
- б) *транс*-коричная кислота;
- в) *о*-кумаровая кислота;
- г) *L*-фенилаланин;
- д) префеновая кислота;
- е) хоризмовая кислота.

14. Конденсированные дубильные вещества (таннины) синтезируются при участии:

- а) только шикиматного пути;
- б) только ацетатно-малонатного пути;
- в) шикиматного и ацетатно-малонатного пути.

15. Гены, кодирующие ферменты шикиматного пути, локализованы:

- а) в хлоропластах;
- б) ядре;
- в) как в хлоропластах, так и в ядре.

16. Выберите из перечисленных ниже ферментов наименование тех, которые участвуют в шикиматном пути синтеза фенольных соединений:

- а) фосфо-2-кето-3-дезоксигептонат-альдолаза;
- б) халкон-синтаза;
- в) хоризмат-синтаза;
- г) ацетил-СоА-карбоксилаза;
- д) фенилаланин-аммиак-лиаза;
- е) стильбен-синтаза.

17. Выберите из перечисленных ниже ферментов наименование тех, которые участвуют в ацетатно-малонатном пути синтеза фенольных соединений:

- а) фосфо-2-кето-3-дезоксигептонат-альдолаза;
- б) халкон-синтаза;
- в) хоризмат-синтаза;
- г) ацетил-СоА-карбоксилаза;

- д) фенилаланин–аммиак-лиаза;
- е) стильбен-синтаза.

Алкалоиды

1. Алкалоиды — это:

- а) группа азотсодержащих органических соединений природного происхождения (чаще всего растительного), большинство которых обладает свойствами слабой кислоты;
- б) группа серосодержащих органических соединений природного происхождения (чаще всего растительного), большинство которых обладает свойствами слабого основания;
- в) группа азотсодержащих органических соединений природного происхождения (чаще всего растительного), большинство которых обладает свойствами слабого основания.

2. Установите соответствие между группами алкалоидов (1–3) и их особенностями (а–в):

Группа алкалоидов:	Особенности:
1) истинные алкалоиды;	а) образуются без участия аминокислот;
2) протоалкалоиды;	б) алкалоиды с гетероциклическими кольцами;
3) псевдоалкалоиды.	в) алкалоиды без гетероциклических колец.

3. Назовите аминокислоту, из которой синтезируются индольные алкалоиды:

- а) тирозин;
- б) фенилаланин;
- в) триптофан;
- г) треонин.

4. Алкалоиды растворяются:

- а) в свободной форме — в органических растворителях и воде;

- б) в свободной форме — в воде, а в виде солей — в органических растворителях;
 - в) в свободной форме — только в воде;
 - г) в свободной форме — в органических растворителях, а в виде солей — в воде.
5. Выберите из предложенных утверждений верные:
- а) алкалоиды в больших количествах обнаруживаются в меристемах и омертвевших тканях;
 - б) большинство алкалоидов действует на нервную систему;
 - в) наиболее широко алкалоиды распространены среди мхов, папоротников и голосеменных;
 - г) алкалоиды могут играть роль резерва азота, накапливаясь при усиленном азотном питании.
6. Назовите в правильной последовательности основные стадии образования алкалоидов из нециклических предшественников:
- а) конденсация;
 - б) декарбоксилирование и дезаминирование;
 - в) метилирование;
 - г) циклизация.
7. Выберите из предложенного перечня названия вторичных метаболитов, которые не относятся к алкалоидам:
- а) кверцетин;
 - б) серотонин;
 - в) кумарин;
 - г) соласонин;
 - д) таннин;
 - е) кофеин.
8. Предшественником псевдоалкалоидов является:
- а) аспарагиновая кислота;
 - б) антралиловая кислота;
 - в) мевалоновая кислота;
 - г) *L*-орнитин.

9. Установите соответствие между названием алкалоида (1–4) и его действием (а–г):

Название алкалоида:	Наиболее характерное действие на организмы:
1) морфин;	а) сильнодействующий яд;
2) атропин;	б) блокирует процессы митоза;
3) колхицин;	в) успокаивающее и обезболивающее средство;
4) кониин.	г) расширяет зрачок.

10. Установите соответствие между названием алкалоида (1–5) и видом растения, в котором он встречается (а–д):

Название алкалоида:	Растение:
1) атропин;	а) болиголов пятнистый;
2) кониин;	б) раувольфия змеиная;
3) резерпин;	в) безвременник;
4) колхицин;	г) жгучий перец;
5) капсаицин.	д) белладонна.

11. Основным местом накопления алкалоидов, как правило, является:

- а) цитозоль;
- б) пластиды;
- в) вакуоль;
- г) клеточная стенка.

12. Установите соответствие между названием химической реакции (1–3) и характеристикой реакции (а–в):

Название реакции:	Характеристика реакции:
1) окислительное сочетание фенолов;	а) реакция соединения с первичной аминогруппой и карбонильной группой;
2) реакция Манниха;	б) свободнорадикальная реакция;
3) образование шиффовых оснований.	в) реакция сочетания карбаниона, альдегида и амина.

13. Предшественником пиридиновых алкалоидов является:

- а) *L*-орнитин;
- б) *L*-лизин;
- в) *L*-аспарат + C_3 -единица;
- г) *L*-тирозин.

14. Установите соответствие между алкалоидами (1–4) и аминокислотами (а–г), из которых они образуются:

Алкалоиды:

- 1) кокаин;
- 2) морфин;
- 3) конин;
- 4) хинин.

Аминокислоты:

- а) триптофан;
- б) тирозин;
- в) лизин;
- г) орнитин.

15. Углеводная часть молекулы гликоалкалоидов присоединяется через:

- а) метильную группу у C_3 -атома;
- б) гидроксильную группу у C_3 -атома;
- в) карбонильную группу у C_3 -атома;
- г) гидроксильную группу у C_{22} -атома.

Минорные группы вторичных соединений

1. Выберите из предложенного перечня названия вторичных метаболитов, которые относятся к минорным группам:

- а) антоцианы;
- б) беталаины;
- в) стильбены;
- г) цианогенные гликозиды;
- д) катехины;
- е) таннины;
- ж) лигнины.

2. Установите соответствие между аминами (1–6) и аминокислотами (а–е), из которых они образуются:

- 1) этаноламин;
- 2) кадаверин;
- 3) изобутиламин;
- а) орнитин;
- б) триптофан;
- в) лейцин;

- | | |
|-----------------|-----------|
| 4) триптамин; | г) валин; |
| 5) изоамиламин; | д) серин; |
| 6) путресцин. | е) лизин. |

3. Выберите из предложенного перечня четыре основных процесса модификации протеиногенных аминокислот, в результате которых образуются непротеиногенные аминокислоты:

- а) конденсация;
- б) гидроксилирование;
- в) циклизация;
- г) аминирование;
- д) удлинение цепи;
- е) конъюгация;
- ж) метилирование;
- з) сокращение цепи.

4. Укажите типы сходства протеиногенных и непротеиногенных аминокислот в следующих парах:

- а) цистеин — метилцистеин;
- б) цистеин — гомоцистеин;
- в) аргинин — гомоаргинин;
- г) α -аланин — β -аланин;
- д) фенилаланин — карбокси-фенилаланин;
- е) аргинин — канаванин.

5. Выберите из предложенного перечня верные утверждения:

- а) беталаины — это нерастворимые в воде пигменты, которые обнаружены в растениях из порядка гвоздичные;
- б) бетацианины и бетаксантины являются растительными пигментами, которые относятся к группе антоцианов;
- в) бетацианины обуславливают желтую окраску, а бетаксантины — красно-фиолетовую;
- г) беталаины могут играть важную роль в защите растения от патогенов;
- д) беталаины — это водорастворимые пигменты, которые обнаружены не только у высших растений.

6. К необычным жирным кислотам относятся:

- а) олеиновая;
- б) олеостеариновая;
- в) линоленовая;
- г) эруковая;
- д) арахидоновая;
- е) рициноловая.

7. Основным местом накопления необычных жирных кислот в растении является:

- а) корневая система;
- б) листья;
- в) соцветия;
- г) семена.

8. Горький вкус рапсовому маслу придает:

- а) олеиновая кислота;
- б) линоленовая кислота;
- в) эруковая кислота;
- г) рициноловая кислота.

9. Выберите из предложенного перечня верные утверждения:

- а) необычные жирные кислоты могут иметь не только двойные, но и тройные связи;
- б) цианогенные гликозиды накапливаются, как правило, в пластидах, а фермент β -гликозидаза, отщепляющий углеводный фрагмент, в цитозоле;
- в) в отличие от необычных жирных кислот, ацетиленовые производные могут находиться во всех органах и частях растения;
- г) кутикулярный воск представляет собой многокомпонентную смесь, которая состоит из относительно простых углеводов, восковых эфиров, а также жирных кислот, спиртов и кетонов;
- д) восковые эфиры состоят из насыщенных жирных кислот с короткой цепочкой и спиртов.

10. Горький вкус горчичному маслу придают:

- а) фенилпропаноиды;
- б) серосодержащие гликозиды;
- в) тиофены;
- г) растительные амины.

11. Аллицин лука и чеснока относят:

- а) к алкалоидам;
- б) фенилпропаноидам;
- в) серосодержащим гликозидам;
- г) растительным аминам.

12. Амигдалин, дуррин и линамарин относятся к группе _____

Раздел 3

НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ ВТОРИЧНОГО ОБМЕНА РАСТЕНИЙ

Тема 1. Общие представления о качественном и количественном анализе

При изучении вторичных метаболитов в растительном материале используют как качественный, так и количественный анализ.

Качественный анализ

Качественный анализ позволяет установить присутствие того или иного компонента или группы компонентов в исследуемом материале. Такой анализ всегда предшествует количественному определению, и его результаты являются ориентировочными. В качественном анализе могут применяться как групповые реакции, так и реакции на индивидуальные соединения. Первые позволяют обнаружить группу химически близких веществ, например, алкалоиды в целом, вторые — конкретное искомое вещество. Групповых реагентов известно значительно больше, чем индивидуальных. Реакции с применением групповых реагентов могут давать ложноположительные результаты. Групповые реагенты имеют разную степень чувствительности к исследуемым веществам. Поэтому при качественном анализе растительного сырья необходимо применять несколько групповых реагентов, чтобы уменьшить вероятность ложноположительных и избежать ложноотрицательных результатов.

Качественный анализ может быть применен в качестве экспресс-теста для приблизительной оценки содержания искомого вещества, что бывает необходимо в токсикологии или селекции растений, например, при выведении сортов люпина с пониженным

содержанием алкалоидов [см.: 16, с. 115]. Кроме того, качественные реакции применяются для гистохимического определения локализации искомых веществ в клетках и тканях растений [см.: 17, с. 3].

Качественный анализ не требует сложного и дорогостоящего оборудования, проводится на часовых стеклах в капле раствора или с применением специальных индикаторных бумаг [см.: 16, с. 115]. В основе качественного анализа лежат реакции образования окрашенных соединений или осаждения.

В экспресс-методах качественного анализа широко применяют тесты с использованием меченых антител (иммунологические методы анализа), например, методы иммунохроматографии (применяются для определения наркотических веществ) или методы иммуногистохимии [см.: 18, с. 84].

Количественный анализ

Количественный анализ — это совокупность физических, химических и физико-химических методов исследования, позволяющих с требуемой точностью определять в анализируемом образце содержание отдельных компонентов.

При использовании физических методов анализа содержание вещества определяют по присущим ему физическим свойствам (например, определение сахарозы рефрактометрическим методом или определение глюкозы поляриметрическим методом).

При использовании химических методов анализа количество вещества определяют после его химического превращения. Детекция результата производится визуально (например, объемные методы анализа).

Физико-химические методы направлены на определение содержания веществ после их химической модификации с помощью соответствующего оборудования (например, спектрофотометрия или газовая хроматография).

Количественный анализ основан на точном измерении массы и объема определяемых веществ, продуктов их химических превращений или расходуемых реактивов, вступающих в реакции с определяемыми веществами. Методы количественного

анализа позволяют определить точное содержание искомого вещества в растительном материале, а не только установить факт его присутствия.

В количественном анализе химического состава растительного материала применяют те же методы, что и в аналитической химии. Условно их можно разделить на две группы — классические методы химического анализа и современные физико-химические методы.

К первой группе можно отнести титриметрические (объемные), гравиметрические и колориметрические методы анализа.

Ко второй группе относятся газовая хроматография (ГХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), масс-спектрометрия (МС) и их комбинации (ВЭЖХ — МС, ГЖХ — МС), метод ядерного, протонного магнитного резонанса (ЯМР и ПМР) и электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

Классические методы анализа являются более дешевыми, но, как правило, обладают меньшей чувствительностью, чем современные физико-химические методы. Поэтому в последние годы все более широкое применение находят физические и физико-химические методы, обладающие многими преимуществами по сравнению с химическими методами. Возникновение новых методов анализа и идентификации веществ позволило выявить тысячи различных метаболитов вторичного происхождения и установить их химическую структуру.

Тема 2. Характеристика избранных методов, используемых при изучении вторичных метаболитов растений

Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Метод основан на способности веществ с разной силой связываться с сорбентом. При этом разделение происходит в очень тонком слое сорбента, нанесенного на нейтральный носитель. В качестве сорбента чаще всего используют силикагель, оксид

алюминия или микрокристаллическую целлюлозу, в качестве подложки — стекло, алюминиевую фольгу или полимерную пленку [см.: 19, с. 50].

Достоинствами данного метода являются: относительная дешевизна, простота в исполнении, быстрота разделения. При проведении ТСХ не требуется такого сложного и дорогостоящего оборудования, как для некоторых других видов хроматографии.

Метод служит не только для качественного определения состава исследуемых смесей, но и для количественного определения веществ. Содержание компонентов в пробе может быть определено как по площади пятна, так и после элюирования веществ из области пятна.

Идентификация индивидуального вещества проводится по значению R_f (коэффициент распределения), специфичной флуоресценции или после специфичного окрашивания.

Коэффициент распределения — это величина, характеризующая степень связывания компонентов разделяемой смеси с носителем. Экспериментально ее вычисляют как отношение расстояния от линии старта до середины пятна исследуемого вещества к расстоянию, пройденному фронтом растворителя. Этот коэффициент индивидуален для каждого вещества в определенной системе растворителей и для конкретного сорбента. Он может зависеть от температуры и влажности воздуха, поэтому ориентироваться только на R_f при идентификации веществ нельзя. Обязательным является использование вещества (так называемого свидетеля) и сравнение R_f , полученного для свидетеля опытным путем, с табличным. При необходимости для веществ, определяемых на хроматограмме, вносят поправки.

При применении пластин, обработанных флуоресцентным красителем, вещества, которые не флуоресцируют в ультрафиолетовом (УФ) свете, могут быть обнаружены в виде темных пятен на светящемся фоне.

Важным усовершенствованием, повышающим эффективность анализа хроматограмм, является применение денситометров — сканеров ТСХ-пластин, позволяющих превратить изображение

хроматограммы в кривую на графике, что позволяет более точно проводить количественную оценку исследуемых компонентов.

Газовая хроматография

Газовая хроматография (ГХ) — метод разделения летучих, термостабильных соединений. Подвижной фазой служит инертный газ (газ-носитель), протекающий через неподвижную фазу, имеющую большую поверхность [см.: 20, с. 20]. В качестве подвижной фазы можно использовать водород, гелий, азот, аргон и углекислый газ. Наиболее часто используют азот как более доступный и дешевый. Газ-носитель обеспечивает перенос разделяемых компонентов по хроматографической колонке и не взаимодействует ни с разделяемыми веществами, ни с неподвижной фазой.

Различают два варианта метода: газо-адсорбционную, когда неподвижной фазой служит твердый носитель, и газо-жидкостную хроматографию, когда неподвижной фазой является вязкая, нелетучая жидкость, нанесенная на инертный носитель. В качестве детектора чаще всего используют пламенно-фотометрический детектор (ПФД) или масс-спектрометрический детектор (МС).

Можно отметить достоинства газовой хроматографии:

- широкие границы применимости;
- возможность определения анализируемых соединений с высокой точностью;
- быстрота анализа;
- широкий выбор сорбентов и неподвижных фаз;
- возможности для варьирования условий разделения.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Жидкостная хроматография (ЖХ) — метод, в котором в качестве подвижной фазы для разделения веществ используется жидкость [см.: 21, с. 35; 22, с. 64].

В результате комбинации ограниченного числа сорбентов и неограниченного числа различных по составу подвижных фаз возможно решение чрезвычайно большого количества возникающих на практике задач. Метод ЖХ применим для разделения

значительно более широкого круга веществ, чем газовая хроматография, поскольку многие вещества не обладают летучестью или неустойчивы при высоких температурах. Таким образом, с помощью ЖХ можно разделять и те вещества, которые делят с помощью ГХ, и другие, для которых ГХ не подходит. В ЖХ разделение обычно происходит при комнатной температуре, однако при работе с белками хроматографию проводят при низких положительных температурах.

Система для ВЭЖХ состоит из нескольких блоков: насоса, дозатора, колонки, детектора и регистрирующего устройства. Наиболее распространенным детектором в адсорбционной ВЭЖХ является спектрофотометрический. В процессе элюирования веществ в микрокювете измеряется оптическая плотность элюата при заранее выбранной длине волны, соответствующей максимуму поглощения определяемых веществ. Такие детекторы измеряют поглощение света в ультрафиолетовой или видимой областях спектра.

Кроме спектрофотометрического детектора, широкое распространение получило применение флуориметрического детектора. Принцип его действия заключается в измерении флуоресцентного излучения, испускаемого веществом после поглощения возбуждающего света. Флуориметрические детекторы обладают очень высокой чувствительностью и селективностью. Многие соединения способны флуоресцировать при облучении ультрафиолетовым светом, например, флавоноиды. Однако наиболее важной областью применения флуориметрического детектора является идентификация ароматических полициклических углеводов.

Масс-спектрометрия

Масс-спектрометрия является исключительно важным аналитическим методом для идентификации молекул. Он основан на том, что для ионизации молекул используют ионный удар (химическую ионизацию). При ионизации молекулы в вакууме образуются группа характеристических ионов, число которых пропорционально количеству поступающего вещества. Одновременно

с записью хроматограммы в любой ее точке, обычно на вершине хроматографического пика, может быть зарегистрирован масс-спектр (зависимость интенсивности ионного тока от массы иона). Масс-спектрометр, в отличие от других спектроскопических детекторов, регистрирует не излучение или поглощение энергии молекулами или атомами вещества, а позволяет определить отношение массы молекул к заряду.

Схема устройства масс-спектрометра включает в себя инжектор (дозатор) проб, ионизатор, анализатор масс и детектор ионов. Сначала проба впрыскивается в ионизатор, где молекулы образца ионизируются. Затем ионы образца анализируются и регистрируются. Чтобы предотвратить столкновение с молекулами газа, ионизатор, анализатор масс и детектор ионов обычно работают в вакууме [см.: 23, с. 53].

Масс-спектрометрия в настоящее время редко используется как самостоятельный метод анализа. Чаще этот метод используется для идентификации результатов жидкостной или газовой хроматографии. Сочетание ГХ или ВЭЖХ и масс-спектрометрии — один из наиболее эффективных методов анализа сложных смесей в объектах окружающей среды.

Для ионизации лабильных органических соединений (в том числе биологически активных) разработаны специальные методы ионизации: ионизация в электроспрее (ESI) и ее подвид — химическая ионизация при атмосферном давлении (MALDI).

Развитию хромато-масс-спектрометрии способствовало создание «быстрых» квадрупольных масс-анализаторов. Их действие основано на том, что пучок ионов с помощью электрического поля разгоняется до высокой скорости и проходит сквозь квадрупольный анализатор масс, состоящий из четырех металлических стержней. К этим стержням прилагается напряжение постоянного или переменного тока таким образом, что в каждый момент времени сквозь анализатор пролетают ионы с одинаковым отношением массы к заряду [см.: 23, с. 55].

Тема 3. Методические подходы к определению основных групп вторичных соединений

Определение монотерпенов, дитерпенов и сесквитерпенов

Выделение

Монотерпены и дитерпены являются душистой основой эфирных масел. Для выделения эфирных масел из растительного сырья применяют перегонку с водяным паром или экстракцию в этанол с последующей отгонкой этанола.

Качественный анализ

Состав эфирных масел определяют органолептически (по специфическому аромату). Кроме того, эфирные масла можно отличить от жирных масел, нанеся каплю исследуемого соединения на фильтровальную бумагу. Эфирные масла высыхают, не оставляя следов. С помощью данной пробы устанавливают примесь липидов в эфирных маслах.

Качество эфирного масла можно оценить растворением его пробы в избытке 70 % этанола. Чистое эфирное масло полностью в нем растворимо. Примесь углеводов в нем проявляется в виде плавающих на поверхности капель, а примесь жирных масел — в виде нерастворимой фазы на дне пробирки [см.: 24, с. 194; 25, с. 17].

Количественный анализ

Количество эфирных масел в растительном материале определяют гравиметрическим методом после их перегонки с водяным паром и осушения безводным хлоридом кальция. Недостатком данного метода является его длительность и потребность в большом количестве растительного материала (примерно 1 кг сырья) [см.: 24, с. 191; 25, с. 20].

Химический состав монотерпенов и дитерпенов, входящих в состав эфирных масел, определяют с применением методов

газовой хроматографии или в сочетании газовой хроматографии с масс-спектрометрией [см.: 25, с. 24].

Определение каротиноидов

Пробоподготовка. Выделение каротиноидов

Каротиноиды являются липофильными соединениями, поэтому их экстракцию проводят в метанол, этанол, ацетон, хлороформ, гексан, петролейный эфир. Однако вместе с каротиноидами в экстракт переходят липиды и хлорофиллы, мешающие определению каротиноидов. Для устранения мешающих соединений необходимо провести омыление хлорофиллов и липидов добавлением в этанольный экстракт спиртового раствора КОН. Омыление проводят при нагревании на водяной бане. При таких условиях омыления может произойти частичное окисление каротиноидов, поэтому реакцию проводят в атмосфере азота, добавляя аскорбиновую кислоту для предотвращения их окисления.

Определение содержания каротиноидов спектрофотометрическим способом

Суммарное содержание каротиноидов в экстракте легко определить спектрофотометрическим методом по поглощению в синей области спектра. При этом невозможно определить качественный состав извлеченных веществ.

Спектрофотометрические методики являются достаточно простыми и быстрыми. Одно из главных их достоинств состоит в том, что присутствие хлорофиллов не мешает определению каротиноидов.

Качественный состав компонентов можно оценить, снимая спектры поглощения экстракта и идентифицируя компоненты по максимуму поглощения.

Тонкослойная хроматография каротиноидов

Тонкослойная хроматография (ТСХ) — наиболее быстрый и дешевый способ определения индивидуальных компонентов в смеси каротиноидов и полуколичественной оценки их соотношения.

Хроматографию проводят на пластинках с силикагелем в разных системах растворителей. Если проводится ТСХ суммарной фракции пигментов без предварительного омыления, то хроматографию проводят в двух направлениях. В первой системе растворителей отделяют каротиноиды от хлорофиллов. Часто в этом случае в качестве растворителя используют бензин, бензол или петролейный эфир. После первого разделения проводят второе, в перпендикулярном направлении. В этом случае используют другую систему растворителей — смесь гексана с диэтиловым эфиром или ацетоном, что приводит к хорошему разделению каротиноидов.

Качественный состав каротиноидов и их количество определяют после элюции пятен с пластин и их спектрофотометрии. При этом по максимумам поглощения определяют принадлежность пятна к конкретному соединению, а по поглощению света с длиной волны 440 нм — относительное или абсолютное (после пересчета по формулам) содержание компонента. Второй способ определения количества каротиноидов при ТСХ — денситометрия. При этом концентрацию вычисляют по площади пика на графике (отражает размер пятна и его яркость), а состав каротиноидов определяют по их R_f и оттенку пятна [см.: 26, с. 320].

ВЭЖХ каротиноидов

Данный метод позволяет надежно определять качественный и количественный состав каротиноидов. Однако при его использовании необходимо тщательно освободить экстракт от хлорофиллов, так как они вызывают загрязнение и порчу хроматографических колонок. Желательно перед ВЭЖХ каротиноидов провести очистку препарата на предколонке с обращенной фазой.

Для повышения точности определения каротиноидов можно использовать в качестве детектора МС. В этом случае препарат необходимо также тщательно очистить от ионов металла, которые остаются после омыления пигментов.

Определение стеринов

Выделение

Стерины входят в состав неомыляемого компонента липидной фракции, а также могут встречаться в гликозилированной форме. Для выделения стеринов используют следующий алгоритм: общую липидную фракцию экстрагируют смесью хлороформ : метанол (3 : 1), после чего к экстракту добавляют дистиллированную воду, что приводит к разделению экстракта на хлороформную и водно-спиртовую фракцию. В водно-спиртовой фракции находятся гликозиды стеринов. Для выделения агликонов необходимо провести их экстракцию из водной фракции в водонасыщенный *n*-бутанол. Далее бутанол выпаривают, а остаток растворяют в 1 Н растворе соляной кислоты в 80 % этаноле. Раствор гидролизуют при температуре не выше 40 °С без доступа воздуха. После окончания гидролиза кислоту нейтрализуют, разводят смесь водой и экстрагируют агликоны стеринов в диэтиловый эфир [см.: 27, с. 95].

Для выделения свободных стеринов из липидной фракции используют хлороформную фазу, которую высушивают, после чего растворяют в 10 % растворе КОН в 70 % этаноле, добавляют аскорбат и омыляют на водяной бане. После окончания омыления экстракт разводят водой, нейтрализуют щелочь разбавленной соляной кислотой и экстрагируют стерины в диэтиловый эфир.

Эфирную фракцию высушивают и хранят без доступа воздуха в эксикаторе на холоду. Перед анализом ее растворяют в хлороформе [см.: 28, с. 87].

Спектрофотометрическое определение суммы стеринов

Для спектрофотометрического определения суммы стеринов используют несколько реакций:

а) реакция с реактивом Либермана — Бурхарда. Хлороформный раствор неомыляемой фракции липидов смешивают с равным объемом реактива, состоящего из уксусного ангидрида с добавлением концентрированной серной кислоты. При этом развигивается окрашивание от зеленого до голубого, в зависимости от

типа стерина. Концентрацию стеринов определяют спектрофотометрическим или колориметрическим методом [см.: 28, с. 87].

Недостатком данного метода является то, что в экстракте могут находиться мешающие компоненты, которые дают ложноположительную реакцию. Для избавления от данных артефактов рекомендуется перед проведением реакции провести разделение компонентов с помощью ТСХ и элюировать зону, соответствующую стандарту стеринов. Обычно каротиноиды перемещаются с фронтом растворителя, нестероидные компоненты, реагирующие с реактивом, остаются на старте, а стерины находятся в средней части хроматограммы;

б) реакция стеринов с формальдегидом и серной кислотой. В данной реакции развивается окрашивание вишневого цвета. Концентрацию стеринов определяют спектрофотометрически [см.: 25, с. 168];

в) определение концентрации стеринов по поглощению в УФ-спектре [см.: 28, с. 87]. Данный метод дает ненадежные результаты, так как имеется множество соединений, которые также поглощают свет в УФ-области и мешают анализу.

Газо-жидкостная хроматография стеринов

Метод является наиболее точным и распространенным при анализе стеринов. Однако стерины обладают низкой летучестью, поэтому для эффективной газо-жидкостной хроматографии этих липидов необходимо провести их модификацию путем метилирования диазометаном или борирования.

Определение простых фенолов

Экстракция

Фенолы обладают достаточно высокой растворимостью в воде, однако для полного их извлечения необходимо использовать водно-спиртовые растворы. Сначала проводят экстракцию 70 % этанолом или метанолом. После этого экстракт упаривают в атмосфере азота до водной фракции. Водную фракцию подкисляют 1 М соляной

или фосфорной кислотой до рН 3. Далее прибавляют диэтиловый эфир. В кислой среде фенолы переходят в протонированную форму и в таком виде лучше растворяются в эфире, чем в воде. Вместе с фенолами в эфирную фракцию переходят пигменты и липиды. Отбирают эфирную фракцию и добавляют к ней 5 % раствор гидрокарбоната натрия. Фенолы переходят в натриевые соли — феноляты, которые не растворимы в эфире, но растворимы в воде. В эфирной фракции остаются мешающие компоненты (пигменты и липиды). Эту фракцию отбрасывают. Далее раствор гидрокарбоната натрия подкисляют до прекращения выделения пузырьков углекислого газа. В кислой среде феноляты вновь протонируются до свободных фенолов. Затем к раствору добавляют новую порцию эфира. В эфир переходят свободные фенолы, а в растворе остаются примеси, включая ионы натрия. Эфирную фракцию отбирают и высушивают. Сухой остаток растворяют в этаноле или в воде и используют в дальнейшей работе [см.: 17, с. 97].

Спектрофотометрическое определение фенолов

К спиртовому или водному раствору добавляют последовательно реактив Фолина — Чокальтеу и 20 % раствор карбоната натрия. Через час развивается синяя окраска. Оптическую плотность раствора определяют спектрофотометрически при 725 нм. В некоторых случаях происходит помутнение раствора. Тогда необходимо провести центрифугирование образца, а потом — спектрофотометрию [см.: 17, с. 111].

Хроматография фенольных соединений на бумаге

Хроматография на бумаге является одним из распространенных способов хроматографического разделения веществ, в том числе фенолов.

Для определения индивидуальных фенолов на хроматограмме ее высушивают, просматривают в УФ-свете. При этом фенолы флуоресцируют пятнами различного цвета, чаще всего синего и голубого. Далее хроматограмму выдерживают над 25 % раствором аммиака. При этом может наблюдаться изменение цвета

флуоресценции и появление новых пятен. На заключительном этапе хроматограмму обрабатывают спиртовым раствором хлорида алюминия или хлорида железа (III). Фенолы проявляются в виде серо-зеленых пятен на белом фоне или синих и красных пятен на желтом фоне. Идентификацию проводят по значениям R_f , флуоресценции и цвету пятна после обработки реактивом. Пятна, соответствующие отдельным фенолам, можно элюировать с хроматограммы и провести количественное определение с реактивом Фолина — Чокальтеу.

Определение кумаринов

Экстракцию кумаринов проводят так же, как при выделении простых фенолов [см.: 17, с. 97].

Качественной реакцией на кумарины является реакция взаимодействия с гидроксидом натрия. К исследуемой пробе добавляют раствор гидроксида натрия, нагревают, оценивают развитие окраски в пробе. В присутствии кумаринов развивается желтая окраска.

Количественное определение кумаринов основано на спектрофотометрическом анализе окрашенного продукта взаимодействия кумаринов с *n*-нитроанилином, диазотированным сульфаниловой кислотой. В данной реакции образуется продукт вишнево-красного цвета.

Определение флавоноидов

Экстракция

Сухой растительный материал обрабатывают четыреххлористым углеродом или низкокипящим петролевым эфиром. Данная операция приводит к удалению восков и смол, что облегчает экстрагирование флавоноидов. Далее проводят экстракцию этиловым или метиловым спиртом.

Некоторые авторы для более полной экстракции рекомендуют добавлять в растворитель детергенты [см.: 29, с. 134].

Для получения чистых препаратов флавоноидов к экстракту добавляют раствор основного или среднего ацетата свинца. При этом выпадает осадок от ярко-желтого до красного цвета. Осадок центрифугируют, промывают, ресуспендируют в этаноле. Свинец в пробе осаждают пропусканием экстракта через раствор сероводорода. При этом образуется чистый препарат флавоноидов, которые можно перекристаллизовать.

Спектрофотометрическое определение суммы флавоноидов

Метод основан на батохромном сдвиге: в результате реакции растворы приобретают более яркую желтую или зеленоватую окраску. Наиболее часто для спектрофотометрического определения флавоноидов используют спиртовой раствор хлорида алюминия или борно-лимонный реактив. Особое внимание следует обратить на то, что растворы флавоноидов окрашены сами по себе и могут менять интенсивность окраски в зависимости от рН. Поэтому при спектрофотометрировании в качестве раствора сравнения надо использовать исходный раствор образца при том же значении рН, что и исследуемый образец после реакции [см.: 29, с. 135; 30, с. 129].

Наличие бледно-желтой окраски дает возможность определения содержания флавоноидов по поглощению в ультрафиолетовой области спектра. Кроме того, возможно определение их качественного состава путем сравнения спектров поглощения в УФ-области.

Хроматографическое разделение флавоноидов и идентификация функциональных групп

Для разделения смеси флавоноидов и их идентификации может быть применима как хроматография на бумаге, так и ТСХ на силикагеле. Рекомендуется использовать систему растворителей *n*-бутанол : уксусная кислота : вода (в соотношении 4 : 1 : 5). Пятна флавоноидов обнаруживаются в ультрафиолетовом свете.

Известен ряд реактивов для обработки хроматограмм и определения состава флавоноидов:

– реактив Вильсона (раствор борной и безводной лимонной кислоты в безводном метаноле). После обработки реактивом хроматограмму просушивают при 110 °С. Зелено-желтая флуоресценция в УФ-свете показывает наличие 5-оксифлавонов, 5-окси- и 5-метоксифлавонолов. Желтая флуоресценция говорит о присутствии 5-окси- и 5-метоксихалконов;

– реактив Мартини — Беттолло (раствор пятихлористой сурьмы в четыреххлористом углероде). Желтая и оранжевая окраска указывает на наличие флавонов, изофлавонов, флавонолов, флавононов. Красная и фиолетовая окраска говорит о присутствии халконов [см.: 24, с. 576].

Определение антоцианов

Экстракция

Антоцианы легко экстрагируются 70–80 % этанолом или метанолом. При этом экстрагируются как свободные антоцианы, так и их гликозиды. В том случае, когда нет необходимости в изучении гликозидированных форм, экстракцию проводят в спирт, содержащий 0,1 М соляную кислоту. Некоторые авторы советуют экстрагировать антоцианы подкисленным спиртом при нагревании на водяной бане для полного гидролиза гликозидов. После этой процедуры необходимо развести раствор водой и провести переэкстракцию антоцианов в изоамиловый спирт. При этом достигается не только более высокая чистота препарата, но и происходит концентрирование антоцианов.

Спектрофотометрическое определение антоцианов

Концентрацию антоцианов определяют по поглощению в видимом свете. Иногда бывает достаточно произвести экстракцию водным раствором соляной кислоты [см.: 31, с. 28]. Если концентрация антоцианов низкая, то их можно сконцентрировать переэкстракцией с использованием изоамилового спирта.

Спектрофотометрия в кислой среде является обязательным условием, так как при этом большинство антоцианов имеет близкие максимумы поглощения.

Качественный состав антоцианов может быть определен путем сравнения максимумов поглощения отдельных компонентов экстракта после хроматографического разделения.

Тонкослойная хроматография

Хроматографию антоцианов проводят в тех же условиях, что и хроматографию других флавоноидов. При этом антоцианы обнаруживают по собственному окрашиванию.

Самым эффективным и точным методом определения антоцианов в настоящее время является ВЭЖХ — МС [см.: 30, с. 107].

Определение дубильных веществ

Для определения дубильных веществ используют качественные реакции:

- реакция Стиасни — с 40 % раствором формальдегида и концентрированной HCl. Конденсированные дубильные вещества образуют осадок кирпично-красного цвета;

- реакция с бромной водой. К 2–3 мл испытуемого раствора прибавляют по каплям бромную воду до появления в растворе запаха брома. В присутствии конденсированных дубильных веществ образуется оранжевый или желтый осадок;

- при окрашивании солями трехвалентного железа или железозаммонийными квасцами дубильные вещества гидролизуемой группы, являющиеся производными пирогаллола, дают черносиний цвет, а дубильные вещества конденсированной группы, являющиеся производными пирокатехина, — черно-зеленый цвет;

- с раствором желатина дубильные вещества дают осадок, растворимый в избытке желатина;

- катехины дают красное окрашивание с ванилином (в присутствии концентрированной HCl или 70 % H₂SO₄);

– свободная эллаговая кислота дает красно-фиолетовую окраску при добавлении нескольких кристаллов нитрита натрия и трех-четырёх капель уксусной кислоты;

– реакция с 10 % раствором среднего ацетата свинца (одновременно добавляют 10 % раствор уксусной кислоты) — образуется белый осадок. Осадок, не растворимый в уксусной кислоте, дают дубильные вещества гидролизуемой группы, а растворимый в уксусной кислоте — дубильные вещества конденсированной группы [см.: 24, с. 607].

Количественное определение дубильных веществ

Для количественного определения дубильных веществ используют гравиметрический, титриметрический и спектрофотометрический методы.

Гравиметрический метод основан на способности желатина осаждать дубильные вещества из раствора. Существенным недостатком данного метода является возможность растворения осадка при избытке желатина. Этот эффект используется в другом методе определения дубильных веществ — титриметрическом (желатиновом).

Титриметрический желатиновый метод (метод Якимова и Курницыкой) основан на способности дубильных веществ образовывать нерастворимые комплексы с белками. Водные извлечения из сырья титруют 1 % раствором желатина. В точке эквивалентности комплексы (желатино-таннаты) растворяются в избытке реактива [см.: 24, с. 607]. Этот метод наиболее точный, так как позволяет определить количество истинных дубильных веществ. Недостатки метода: длительность определения и трудность установления точки эквивалентности.

Перманганатометрический метод (метод Левенталья в модификации Курсанова). Это фармакопейный метод, основанный на легкой окисляемости дубильных веществ перманганатом калия в кислой среде в присутствии индикатора и катализатора индиго-сульфокислоты, которая в точке эквивалентности раствора меняет окраску от синей до золотисто-желтой [см.: 25, с. 120].

Метод экономичный, быстрый, прост в исполнении, но недостаточно точен, так как перманганат калия частично окисляет и низкомолекулярные фенольные соединения.

Спектрофотометрический метод определения количества дубильных веществ основан на измерении оптической плотности окрашенных продуктов взаимодействия катехинов с железотартратным реактивом в присутствии 0,1 М фосфатного буфера с рН 8,2. Он считается наиболее точным и эффективным, не требующим больших затрат времени [см.: 32, с. 179].

Определение алкалоидов

Экстракция

Поскольку алкалоиды представляют в большей мере разнообразную по химической природе группу, то нет универсальной методики их экстракции из растительного сырья и очистки. Чаще всего при экстракции алкалоидов используют их основные (базофильные) свойства. На первом этапе растительное сырье замачивают и растирают в растворе уксусной, лимонной или соляной кислот. При этом алкалоиды переходят в растворимые в воде соли. В раствор также переходят углеводы и минеральные вещества. После фильтрования раствор нейтрализуют аммиаком (сильные основания использовать не рекомендуется, так как это приводит к образованию фенолятов, мешающих дальнейшей очистке алкалоидов). В слабощелочной среде алкалоиды переходят из солей в свободную форму. Из раствора их экстрагируют диэтиловым эфиром, хлороформом или бензолом. Органический экстракт упаривают, сухой остаток используют для дальнейших определений [см.: 25, с. 132].

Качественные реакции на алкалоиды

Как уже было отмечено, алкалоиды — это сборная группа вторичных веществ, включающая соединения с разными функциональными группами. Поэтому не существует общих методов качественного и количественного анализа алкалоидов. В качественном

анализе применяют от 5 до 10 общих реакций на алкалоиды. В количественном анализе применяют те же реагенты, что и в качественном. Алкалоиды определяют в виде их нерастворимых соединений гравиметрическим методом либо в форме окрашенных производных [см.: 24, с. 287; 25, с. 136].

Йод-калий йодид (реактив Вагнера) образует с алкалоидами осадки от светло-коричневого до темно-бурого цвета.

Висмут-йодид с йодидом калия (реактив Драгендорфа) с алкалоидами в солянокислой или серноокислой среде дает аморфные осадки оранжево-красного цвета (теобромин образует кристаллический осадок).

Фосфорно-молибденовая кислота (реактив Зонншейна) вызывает образование осадка уже в очень разбавленных (нейтральных или кислых) растворах солей алкалоидов и является одним из самых чувствительных реагентов. Осадки окрашены в светло-желтый или буро-желтый цвет и часто изменяют окраску на синюю или зеленую в результате восстановления молибденовой кислоты. Некоторые из осадков растворяются в растворе аммиака, иногда с характерной синей окраской, например, в присутствии берберина и кониина, и зеленой — в присутствии бруцина и кодеина.

Калий-йод-меркурат (реактив Майера) дает с большинством солей алкалоидов в нейтральной или слабокислой среде беловатые или желто-белые осадки; не осаждает колхицин, кофеин и соланин.

10 % раствор таннина (свежеприготовленный) с большинством солей алкалоидов образует в нейтральной и в слабокислой среде желтоватые осадки, растворимые в спирте, уксусной кислоте и растворах аммонийных солей.

1 % водный раствор пикриновой кислоты осаждает большинство солей алкалоидов в виде пикратов желтого цвета в аморфном или кристаллическом состоянии. Большинство алкалоидов осаждается из разведенных серноокислых растворов. Аконитин, атропин, кокаин и гиосциамин частично осаждаются только из более концентрированных серноокислых растворов [см.: 25, с. 136].

Контрольные вопросы и задания

Вопросы для самоконтроля

1. Какие этапы выделяют при идентификации вторичных метаболитов?
2. Какие соединения мешают определению стероидов с использованием газового хроматографа?
3. Какой метод хроматографии близок по разрешающей способности к ВЭЖХ, но проще его по инструментальному обеспечению и дешевле?
4. Каким свойством должно обладать вещество, чтобы его можно было определить методом ГХ?
5. На каком принципе основана газовая хроматография? Какие типы газовой хроматографии Вам известны?
6. Охарактеризуйте планарную, газовую и жидкостную хроматографию. Какие достоинства и недостатки данных методов Вам известны?
7. Какие варианты планарной хроматографии Вам известны?
8. Назовите групповые реагенты на алкалоиды.
9. В чем сущность иммунохроматографии, где она применяется?

Тестовые задания

1. Вставьте в предложение пропущенные слова: для выделения эфирных масел из растительного материала применяют _____ водяным паром или _____ с последующей отгонкой _____.
2. Для экстракции каротиноидов используют:
 - а) полярный растворитель;
 - б) неполярный растворитель;
 - в) смесь полярного и неполярного растворителей.
3. С помощью водно-спиртовых растворов из растительного материала извлекают:
 - а) тетрагерпеноиды;
 - б) эфирные масла;
 - в) алкалоиды;
 - г) простые фенолы.

4. При хроматографическом разделении флавоноидов для обработки хроматограмм и определения состава флавоноидов используют:

- а) реактив Мартини — Беттоло;
- б) реактив Вагнера;
- в) реактив Вильсона;
- г) реактив Фолина — Чокальтеу.

5. Установите правильную последовательность операций, которые осуществляют при выделении алкалоидов:

- а) фильтрование;
- б) выпаривание органического экстракта;
- в) гомогенизация растительного материала в растворе уксусной, лимонной или соляной кислот;
- г) экстракция диэтиловым эфиром, хлороформом или бензолом;
- д) нейтрализация раствора аммиаком.

6. С помощью реактива Либермана — Бурхарда определяют:

- а) фенолы;
- б) алкалоиды;
- в) стерины;
- г) антоцианы.

7. На каком свойстве алкалоидов основано их выделение из растительного материала?

- а) наличие карбоксильной группы;
- б) наличие спиртовой группы;
- в) гидрофобность молекулы;
- г) нерастворимость в органических растворителях.

8. По поглощению в видимой части спектра определяют:

- а) алкалоиды;
- б) стероиды;
- в) гликозиды;
- г) антоцианы.

9. По поглощению в ультрафиолетовой части спектра определяют:

- а) алкалоиды;
- б) стероиды;
- в) гликозиды;
- г) антоцианы.

10. Соотнесите индивидуальное соединение (1–9) с группой, к которой оно принадлежит (а–в):

- | | |
|----------------|--------------------------|
| 1) папаверин; | а) алкалоиды; |
| 2) цианидин; | б) фенольные соединения; |
| 3) соланин; | в) изопреноиды. |
| 4) кверцитин; | |
| 5) ситостерин; | |
| 6) лейкопен; | |
| 7) морфин; | |
| 8) лимонен; | |
| 9) гваякол. | |

11. Установите соответствие между вторичными метаболитами (1–5) и названиями реактивов (а–д), с которыми они реагируют:

- | | |
|----------------|---------------------------------|
| 1) колхицин; | а) реактив Либермана —Бурхарда; |
| 2) рутин; | б) реактив Вагнера; |
| 3) ситостерин; | в) борно-лимонный реактив; |
| 4) резорцин; | г) реактив Стиасни; |
| 5) таннин. | д) реактив Фолина —Чокальтеу. |

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Физиология растений : учебник для студентов вузов / под ред. И. П. Ермакова. М. : Изд. центр «Академия», 2005. 640 с.
2. Хелдт Г. -В. Биохимия растений : пер. с англ. М. : БИНОМ ; Лаборатория знаний, 2011. 471 с.
3. Кретович В. Л. Биохимия растений. М. : Высш. шк., 1986. 497 с.
4. Красильникова Л. А., Авксентьева О. А., Жмурко В. В., Садовниченко Ю. А. Биохимия растений / под ред. Л. А. Красильниковой. Ростов н/Д : Феникс ; Харьков : Торсинг, 2004. 224 с.
5. Жеребцов Н. А., Попова Т. Н., Артюхов В. Г. Биохимия : учебник. Воронеж : Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2002. 696 с.
6. Филиппова Г. Г., Смолич И. И. Основы биохимии растений : курс лекций. Минск : Белорус. гос. ун-т, 2004. 136 с.
7. Племенков В. В. Введение в химию природных соединений. Казань : Б. и., 2001. 370 с.
8. Пасешичченко В. А. Терпеноиды и стероиды в жизни растений // Успехи биологической химии. 1991. Т. 32. С. 197–221.
9. Lichtenthaler H., Schwender J., Disch A., Rohmer M. Biosynthesis of isoprenoids in higher plants chloroplasts proceeds via a mevalonate independent pathway // FEBS Lett. 1997. Vol. 400. P. 271–274.
10. Bach T., Lichtenthaler H. K. Inhibition by mevlinolin of plant growth, sterol formation and pigment accumulation // Physiol. Plant. 1983. Vol. 59. P. 50–60.
11. Запаметов М. Н. Фенольные соединения. М. : Наука, 1993. 272 с.
12. Биохимия растений / под ред. В. Л. Кретовича. М. : Мир, 1968. 624 с.
13. Ловкова М. Я. Биосинтез и метаболизм алкалоидов в растениях. М. : Наука, 1981. 169 с.
14. Медведев С. С. Физиология растений : учебник. СПб. : Изд-во Санкт-Петербург. ун-та, 2004. 336 с.
15. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. М. : Мир, 1986. 422 с.
16. Практикум по селекции и семеноводству полевых культур / под ред. А. П. Горина. М. : Колос, 1968. 439 с.
17. Паламарчук И. А., Веселова Т. Д. Изучение растительной клетки. М. : Просвещение, 1969. 143 с.

18. Новые методы иммуноанализа / под ред. У. П. Коллинза. М. : Мир, 1991. 280 с.
19. *Евгеньева И. И.* Планарная хроматография и анализ органических веществ // Сорос. образоват. журн. 1999. № 11. С. 50–55.
20. *Зеленин К. Н.* Газовая хроматография в медицине // Сорос. образоват. журн. 1996. № 11. С. 20–25.
21. *Карцова А. А.* Жидкостная хроматография в медицине // Сорос. образоват. журн. 2000. Т. 6, № 11. С. 35–40.
22. *Яшин Я. И., Яшин А. Я.* Высокоэффективная жидкостная хроматография. Состояние и перспективы // Рос. хим. журн. 2003. Т. 47, № 1. С. 64–79.
23. *Нолтинг Б.* Новейшие методы исследования биосистем. М. : Техносфера, 2005. 256 с.
24. *Муравьева Д. А.* Фармакогнозия. М. : Медицина, 1981. 657 с.
25. Химический анализ лекарственных соединений / под ред. Н. И. Гринкевич, Л. Н. Сафронич. М. : Высш. шк., 1983. 89 с.
26. *Чечета О. В., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И.* Методика определения каротиноидов методом хроматографии в тонком слое сорбента // Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. Т. 8, № 2. С. 320–326.
27. *Тютчев С. Л., Кудрявцева В. П., Тарлаковский С. А., Ксёндзова Э. Н., Гусева Т. А.* Применение методов биохимии в исследованиях по защите растений. Л. : ВИЗР, 1976. 134 с.
28. *Кандюк Р. П.* Методы определения стеридов в морских объектах // Экология моря. 2002. Вып. 5. С. 87–90.
29. *Рогожин В. В.* Практикум по биологической химии : учеб.-метод. пособие. СПб. : Изд-во «Лань», 2006. 256 с.
30. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. М. : Федер. центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 240 с.
31. *Муравьева Д. А., Бубенчикова В. Н., Беликов В. В.* Спектрофотометрическое определение суммы антоцианов в цветках василька синего // Фармакология. 1987. Т. 36. С. 28–29.
32. *Данилова Н. А., Попов Д. М.* Количественное определение дубильных веществ в корнях шавеля конского методом спектрофотометрии в сравнении с методом перманганатометрии // Вестн. Воронеж. гос. ун-та. 2004. № 2. С. 79–182. (Сер. Химия. Биология. Фармация.)

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева В. Ю.* Разработка методики количественного определения флавоноидов в манжетке обыкновенной *Alchemilla vulgaris* / В. Ю. Андреева, Г. И. Калинкина // Химия растительного сырья. 2000. № 1. С. 85–88.
- Антипова Е. А.* Определение биологически активных веществ в *Alocasia macrorrhiza* / Е. А. Антипова, С. М. Юдина, Л. Е. Тимофеева, Е. А. Лейтес // Химия растительного сырья. 2004. № 3. С. 103–107.
- Барам Г. И.* ВЭЖХ для всех : курс лекций / Г. И. Барам. Новосибирск : ЗАО институт хроматографии «ЭкоНова», 2007. 117 с.
- Бекетов Е. В.* Идентификация и количественная оценка флавоноидов в плодах черемухи обыкновенной / Е. В. Бекетов, А. А. Абрамов, О. В. Нестерова, С. В. Кондрашев // Вестн. Моск. гос. ун-та. 2005. Т. 46, № 4. С. 259–262. (Сер. 2. Химия.)
- Бурлакова Е. Б.* Биоантиоксиданты : вчера, сегодня, завтра / Е. Б. Бурлакова // Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты. М. : Химия, 2005. Т. 2. С. 10–45.
- Вольнец А. П.* Определение фенольных соединений в растительном материале / А. П. Вольнец, С. Н. Маштаков // Методы определения фитогормонов, ингибиторов роста, дефолиантов и гербицидов. М. : Наука, 1973. С. 29–40.
- Гудвин Т.* Введение в биохимию растений : в 2 т. / Т. Гудвин, Э. Мерсер. М. : Мир, 1986. Т. 2. 312 с.
- XI Государственная фармакопея СССР. Вып. 2 : Общие методы анализа растительного сырья. М. : Медицина, 1990. 400 с.
- Заикин В. Г.* Основы масс-спектрометрии органических соединений / В. Г. Заикин, А. В. Варламов, А. И. Микая, Н. С. Простаков. М. : Наука, 2001. 286 с.
- Запретов М. Н.* Фенольные соединения / М. Н. Запретов. М. : Наука, 1993. 272 с.

- Запрометов М. Н.* Специализированные функции фенольных соединений в растениях / М. Н. Запрометов // Физиология растений. 1993. Т. 40, № 6. С. 921–931.
- Зеленин К. Н.* Газовая хроматография в медицине / К. Н. Зеленин // Сорос. образоват. журн. 1996. № 11. С. 20–25.
- Зенков Н. К.* Фенольные антиоксиданты / Н. К. Зенков, Н. В. Кандалинцева, В. Э. Ланкин, Е. Б. Меньшикова, А. Е. Просенко. Новосибирск : Сиб. отд-ние РАМН, 2003. 328 с.
- Евгеньева И. И.* Планарная хроматография и анализ органических веществ / И. И. Евгеньева // Сорос. образоват. журн. 1999. № 11. С. 50–55.
- Карнаухов В. Н.* Биологические функции каротиноидов / В. Н. Карнаухов. М. : Наука, 1988. 239 с.
- Карцова А. А.* Жидкостная хроматография в медицине / А. А. Карцова // Сорос. образоват. журн. 2000. Т. 6, № 11. С. 35–40.
- Ковтун Г. А.* Реакционная способность взаимодействия фенольных антиоксидантов с пероксильными радикалами / Г. А. Ковтун // Катализ и нефтехимия. 2000. № 4. С. 1–9.
- Коновалова А. М.* Выделение и первичная характеристика каротиноидов розовоокрашенных мелилтроффов / А. М. Коновалова, С. О. Шилин, П. В. Рокитко // Украин. биохим. журн. 2006. Т. 78, № 4. С. 146–150.
- Кузнецова Г. А.* Природные кумарины и фукокумарины / Г. А. Кузнецова. Л. : Наука, 1967. 268 с.
- Куркин В. А.* Фенилпропаноиды — перспективные природные биологически активные соединения / В. А. Куркин. Самара : СамГМУ, 1996. 80 с.
- Куркин В. А.* Фармакогнозия / В. А. Куркин. Самара : СамГМУ, 2007. 1239 с.
- Латыпова Г. М.* Исследование качественного и количественного состава флавоноидных соединений густого экстракта первоцвета лекарственного / Г. М. Латыпова, З. Р. Романова, В. Н. Бубенчикова, Г. В. Аюпова // Химия растительного сырья. 2009. № 4. С. 113–116.
- Литвиненко В. И.* Природные флавоноиды / В. И. Литвиненко. Харьков : ГНЦЛС, 1995. 56 с.
- Лобанова А. А.* Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья / А. А. Лобанова, В. В. Будаева, Г. В. Сакович // Химия растительного сырья. 2004. № 1. С. 47–52.

- Ловкова М. Я.* Биосинтез и метаболизм алкалоидов в растениях / М. Я. Ловкова. М. : Наука, 1981. 169 с.
- Лукнер М.* Вторичный метаболизм у микроорганизмов, растений и животных / М. Лукнер. М. : Мир, 1979. 548 с.
- Мальцева А. А.* Количественное определение флавоноидов в траве горца почечуйного / А. А. Мальцева, А. С. Чистякова, А. А. Сорокина, А. И. Сливкин, С. А. Логунова // Вестн. Воронеж. гос. ун-та. 2013. № 2. С. 199–202. (Сер. Химия. Биология. Фармация.)
- Марчук Н. Ю.* Влияние антропогенного загрязнения среды на содержание и состав эфирного масла *Cupressus sempervirens* L. / Н. Ю. Марчук, В. Н. Ежов // Учен. зап. Тавр. нац. ун-та. 2011. Т. 24 (63), № 4. С. 151–155. (Сер. Биология, химия.)
- Минаева В. Г.* Флавоноиды в онтогенезе растений и их практическое использование / В. Г. Минаева. Новосибирск : Наука, Сиб. отд-ние, 1978. 170 с.
- Муравьева Д. А.* Фармакогнозия / Д. А. Муравьева. М. : Медицина, 1981. 657 с.
- Нарчуганов А. Н.* Количественное определение двух групп терпеновых соединений методом хромато-масс-спектрометрии / А. Н. Нарчуганов, А. А. Ефремов // Химия растительного сырья. 2013. № 1. С. 125–128.
- Нго Зиэп Т. Т.* Разработка методики количественного определения суммарного содержания флавоноидов в траве пустырника спектрофотометрическим методом / Т. Т. Нго Зиэп, Е. В. Жохова // Химия растительного сырья. 2007. № 4. С. 73–77.
- Нолтинг Б.* Новейшие методы исследования биосистем / Б. Нолтинг. М. : Техносфера, 2005. 256 с.
- Пасешниченко В. А.* Новый альтернативный путь биосинтеза изопреноидов у бактерий и растений / В. А. Пасешниченко // Биохимия. 1998. Т. 63, № 2. С. 171–182.
- Писарев Д. И.* Разработка экспресс-методов определения каротиноидов в сырье растительного происхождения / Д. И. Писарев, О. О. Новиков, Т. А. Романова // Науч. вед. Белгород. гос. ун-та. 2010. № 22 (93), С. 119–122. (Сер. Медицина. Фармация; Вып. 12/2.)
- Племенков В. В.* Введение в химию природных соединений / В. В. Племенков. Казань : Б. и., 2001. 370 с.

- Племенков В. В. Химия изопреноидов : учеб. пособие / В. В. Племенков. Барнаул : Изд-во Алтайск. ун-та, 2007. 322 с.
- Рогинский В. А. Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность / В. А. Рогинский. М. : Наука, 1988. 247 с.
- Ромашко С. Н. Разработка способов выделения алкалоидов индольного ряда из листьев *Cartaranthus roseus* / С. Н. Ромашко, О. В. Молчан, В. М. Юрин // Тр. Белгород. гос. ун-та. 2009. Т. 4, ч. 2. С. 189–197.
- Саенко А. Ю. Использование физико-химических методов для определения содержания флавоноидов в траве овса посевного / А. Ю. Саенко, М. Ф. Маршалкин, М. В. Гаврилин, И. Я. Куль // Современные наукоемкие технологии. 2004. № 1. С. 29–30.
- Саламатова Т. С. Физиология выделения веществ растениями / Т. С. Саламатова, О. А. Зауралов. Л. : Изд-во Ленингр. гос. ун-та, 1991. 149 с.
- Смоликова Г. Н. Роль хлорофиллов и каротиноидов в устойчивости семян к абиотическим стрессорам / Г. Н. Смоликова, Н. А. Ламан, О. В. Борискевич // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 6. С. 817–825.
- Сысоев А. А. Времяпролетные масс-спектрометры : учеб. пособие / А. А. Сысоев, В. Б. Артаев. М. : МИФИ, 1990. 82 с.
- Тамбиев А. Х. Реакционная способность экзометаболитов растений / А. Х. Тамбиев. М. : Изд-во Моск. гос. ун-та, 1984. 73 с.
- Тараховский Ю. С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю. С. Тараховский, Ю. А. Ким, Б. С. Абдрасилов, Е. Н. Музафаров. Пушино : Synchrobook, 2013. 310 с.
- Ткачев А. В. Исследование летучих веществ растений / А. В. Ткачев. Новосибирск : Офсет, 2008. 969 с.
- Упадышев М. Т. Роль фенольных соединений в процессах жизнедеятельности садовых растений / М. Т. Упадышев. М. : Изд. дом МСП, 2008. 320 с.
- Федосеева Л. М. Изучение дубильных веществ подземных и надземных вегетативных органов бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* (L.) fitch.), произрастающего на Алтае / Л. М. Федосеева // Химия растительного сырья. 2005. № 3. С. 45–50.
- Фенольные соединения : фундаментальные и прикладные аспекты / отв. ред. Н. В. Загоскина, Е. Б. Бурлакова ; Ин-т физиологии растений РАН. М. : Науч. мир, 2010. 400 с.

- Хабриев Р. У.* Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев. М. : Медицина, 2005. 832 с.
- Хрипач В. А.* Брассиностероиды / В. А. Хрипач, В. А. Лахвич, В. Н. Жабинский. Минск : Навука І тэхніка, 1993. 287 с.
- Чечета О. В.* Методика определения каротиноидов методом хроматографии в тонком слое сорбента / О. В. Чечета, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин // Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. Т. 8, № 2. С. 320–326.
- Шаповалова Е. Н.* Хроматографические методы анализа : метод. пособие для спец. курса / Е. Н. Шаповалова, А. В. Пирогов. М. : Изд-во Моск. гос. ун-та, 2007. 109 с.
- Шаршунова М.* Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии : в 2 ч. / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец. М. : Мир, 1980. Ч. 1. 607 с.
- Хеншен А.* Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии / А. Хеншен, К.-П. Хупе, Ф. Лотшпайх, В. Вельгер. М. : Мир, 1988. 688 с.
- Юрин В. М.* Регуляторное действие полисахаридных носителей на синтез вторичных метаболитов в иммобилизованных растительных клетках / В. М. Юрин, О. В. Молчан, С. Н. Ромашко, Т. И. Дитченко // Тр. Белгород. гос. ун-та. 2009. Т. 4, ч. 1. С. 212–218.
- Яшин Я. И.* Высокоэффективная жидкостная хроматография. Состояние и перспективы / Я. И. Яшин, А. Я. Яшин // Рос. хим. журн. 2003. Т. 47, № 1. С. 64–79.
- Bach T.* Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, a key enzyme in phytosterol synthesis / T. Bach // *Lipids*. 1986. Vol. 21. P. 82–88.
- Bhawani S. A.* Thin-Layer Chromatographic Analysis of Steroids : A Review / S. A. Bhawani, O. Sulaiman, R. Hashim // *Tropical J. of Pharmaceutical Research*. 2010. Vol. 9 (3). P. 301–313.
- Boerjan W.* Lignin biosynthesis / W. Boerjan, J. Ralph, M. Baucher // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2003. Vol. 54. P. 519–546.
- De Luca V.* The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis / V. De Luca, B. St. Pierre // *Trends Plant Sci.* 2000. Vol. 5. P. 168–173.
- Dixon R. A.* Stress-induced phenylpropanoid metabolism / R. A. Dixon, N. L. Paiva // *Plant Cell*. 1995. Vol. 7. P. 1085–1097.

- Halkier B. A.* The biosynthesis of glucosinolates / B. A. Halkier, L. Du // Trends Plant Sci. 1997. Vol. 2. P. 425–431.
- Holton T. A.* Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis / T. A. Holton, E. C. Cornish // Plant Cell. 1995. Vol. 7. P. 1071–1083.
- Giuliano G.* Metabolic engineering of plant carotenoids / G. Giuliano, R. Aquilani, S. Dharmapuri // Trends Plant Sci. 2000. Vol. 5. P. 406–409.
- Rohmer M.* Glyceraldehyde-3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis / M. Rohmer, M. Seemann, S. Horbach, S. Bringer-Meyer, H. Salm // J. Amer. Chem. Soc. 1996. Vol. 118. P. 2564–2568.
- Touchstone J. C.* Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation / J. C. Touchstone // J. of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 1995. Vol. 671. P. 169–195.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Раздел 1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ВТОРИЧНОМ ОБМЕНЕ РАСТЕНИЙ	5
Тема 1. Характерные особенности вторичных метаболитов	5
Тема 2. Основные принципы классификации вторичных метаболитов	9
Тема 3. Закономерности строения вторичных метаболитов и их функции ...	11
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	12
Раздел 2. ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ	15
Тема 1. Изопреноиды (терпеноиды)	15
Тема 2. Фенольные соединения	30
Тема 3. Алкалоиды	53
Тема 4. Минорные группы вторичных метаболитов	63
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	79
Раздел 3. НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ ВТОРИЧНОГО ОБМЕНА РАСТЕНИЙ	96
Тема 1. Общие представления о качественном и количественном анализе	96
Тема 2. Характеристика избранных методов, используемых при изучении вторичных метаболитов растений	98
Тема 3. Методические подходы к определению основных групп вторичных соединений	103
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	116
Библиографические ссылки	119
Список рекомендуемой литературы	121

Учебное издание

Борисова Галина Григорьевна
Ермошин Александр Анатольевич
Малева Мария Георгиевна
Чукина Надежда Владимировна

ОСНОВЫ БИОХИМИИ ВТОРИЧНОГО ОБМЕНА РАСТЕНИЙ

Учебно-методическое пособие

Зав. редакцией *М. А. Овечкина*
Редактор *В. И. Попова*
Корректор *В. И. Попова*
Компьютерная верстка *Н. Ю. Михайлов*

План выпуска 2014 г. Подписано в печать 06.10.2014.
Формат 60 × 84 ¹/₁₆. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Уч.-изд. л. 6,5. Усл. печ. л. 7,44. Тираж 40 экз. Заказ № 1054.

Издательство Уральского университета
620000, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4

Отпечатано в Издательско-полиграфическом центре УрФУ.

620000, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4.

Тел.: +7 (343) 350-56-64, 350-90-13.

Факс: +7 (343) 358-93-06.

E-mail: press-urfu@mail.ru

