

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР «БИОРЕСУРСЫ»
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Отдел биохимии и биотехнологии растений

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ
АСПЕКТЫ БИОХИМИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ**

Сборник научных трудов
III Международной научной конференции
14–16 мая 2008 г., Минск

*К 50-летию Отдела биохимии
и биотехнологии растений*

Минск
«Издательский центр БГУ»
2008

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55
Т33

Научные рецензенты:

д-р биол. наук, проф., акад. НАН Беларуси *В. Н. Решетников*;
д-р биол. наук, проф. *В. М. Юрин*;
д-р биол. наук, проф. *В. Л. Калер*

Редакционная коллегия:

*В. Н. Решетников, О. П. Булко, И. И. Паромчик, Т. И. Фоменко,
Е. В. Спиридович, Т. В. Антипова*

Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений : сб. науч. тр. 3-й Междунар. науч. конф., 14–16 мая 2008 г., Минск : к 50-летию Отд. биохимии и биотехнологии растений / НАН Беларуси, Центр. ботан. сад [и др.] ; редкол. : В. Н. Решетников [и др.] . — Минск : Изд. центр БГУ, 2008. — 562 с.
ISBN 978-985-476-604-1.

В сборнике изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер и пластид высших растений, путей регулярного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгенеза. Представлены отдельные проблемы регуляции морфогенеза растительных клеток и микрклонального размножения некоторых культур, использования молекулярных маркеров в документировании ботанических коллекций. Рассмотрены биохимические основы практического использования растительных ресурсов.

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55

ISBN 978-985-476-604-1

© Центральный ботанический сад
НАН Беларуси, 2008

УДК: 582.918.3(476):581.13

СОДЕРЖАНИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ У *COLCHICUM AUTUMNALE* L. В УСЛОВИЯХ БЕЛАРУСИ

¹Грибок Н.А., ¹Спиридович Е.В., ¹Решетников В.Н., ¹Власова Т.М.,
²Сенькевич Г.Г., ²Курченко В.П.

¹Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь,
220072, ул. Сурганова 2в, e-mail: hbc@mserv.bas-net.by

²Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь, 220030,
пр. Независимости, 4, e-mail: kurchenko@tut.by

На основании данных ВЭЖХ показано, что растения *C. autumnale* L., выращенные в условиях Беларуси способны синтезировать и накапливать в своих органах колхицин и флавоны. Установлено, что их содержание изменяется в течение периода вегетации. Особенности сезонной динамики содержания колхицина и флавонов в органах *C. autumnale* L. указывает на связь вторичного метаболизма с физиологическими особенностями развития безвременников, а также позволяют определить источники и сроки заготовок лекарственного сырья в условиях Беларуси: для клубнелуковиц этого вида - в фазе формирования дочерних клубнелуковиц, а для надземных органов - в фазе бутонизации. Представители рода безвременник (*Colchicum* L.) традиционно использовались как лекарственные растения. В последнее время установлены противораковые, противовоспалительные, антигельминтные, антибактериальные и вирусостатические свойства, а также фунгицидная активность, связанные с наличием в их органах трополоновых алкалоидов. Наиболее известный алкалоид растений рода *Colchicum* L. - колхицин – способен связываться с тубулином микротрубочек веретена деления клеток и останавливать митоз в метафазе, что используется при получении полиплоидов растений.

Исследования содержания вторичных метаболитов представителей рода *Colchicum* L. последние десятилетия носили спорадический характер. Цель наших исследований - проследить особенности накопления колхицина и флавоновых соединений в клубнелуковицах, листьях, стеблях, бутонах и цветках безвременника осеннего (*C. autumnale* L.) в связи с физиологическими особенностями и сезонным циклом развития *C. autumnale* L. в условиях Беларуси; определить состав интермедиатов вторичного синтеза.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе коллекционного материала Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Растения для исследования отбирались в следующих фенофазах: начало отрастания, формирование дочерних клубнелуковиц, отмирание надземной части растения, бутонизация и цветение. Для анализа использовали листья, стебли, бутоны и цветки растений.

Аналитическую пробу сухого растительного сырья измельчали до размера частиц диаметром 1 мм и меньше. Точную навеску (0,2 г) средней пробы материала экстрагировали на водяной бане (60-70 °С) 70%-ным этанолом в колбе с обратным холодильником в течение 30 мин. Экстракцию повторяли 4 раза небольшими порциями спирта (до получения бесцветных вытяжек). Все вытяжки объединяли, отфильтровывали, перенесли в фарфоровую чашку и выпаривали досуха при температуре 50°С. Сухой остаток в чашке растворяли в 5 мл 70%-ного этанола и фильтровали на бумажном фильтре.

ВЭЖХ-анализ содержания колхицина, лютеолина и апигенина проводили с помощью хроматографа «Agilent 1100», оснащенный диодно-матричным детектором. Исследование проводилось на обращеннофазовой колонке С-18 фирмы «Диасфер» (250x4 мм). Хроматографию проводили в градиенте вода-ацетонитрил-метанол по методу Н.М. Merken [1]. Регистрацию разделяемых веществ осуществляли при длине волны 270 нм, в автоматическом режиме фиксировали время удержания соединений, а также прописывали его спектр и рассчитывали площадь пика. Идентификацию компонентов осуществляли спектрально. Для построения калибровочных прямых использованы соответствующие соединения производства фирмы Sigma.

Газохроматографический анализ вторичных метаболитов проводили на хроматографе «Agilent 6850» (США) с масс-селективным детектором «Agilent 5975». В качестве подвижной фазы использовали гелий. Для получения воспроизводимых результатов скорость потока газа поддерживалась на стационарном уровне и составляла 1мл/мин. Для разделения использовали капиллярную колонку длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм с неподвижной фазой HP-5MS (5% дифенил и 95% диметилполисилоксан), толщиной 0,25 мкм. Программирование изменения температуры: 50°С – 1 мин, подъем до 280°С со скоростью 5°С/мин. Объем пробы – 1 мкл, ввод пробы – без сброса, температура испарителя - 250°С. Идентификация соединений осуществлялась вручную, сравнением масс-спектров соединений с библиотечными (WileyC).

Результаты и их обсуждение. Анализ содержания нелетучих компонентов водноспиртовых экстрактов с помощью ВЭЖХ метода позволил идентифицировать и количественно оценить содержание колхицина в органах: клубнелуковицах, листьях, стеблях, бутонах и цветках *S. autumnale* L. на разных фазах сезонного развития в условиях Беларуси. Кроме пика соответствующего колхицину на всех полученных хроматограммах идентифицированы еще два пика. Им соответствуют флавоновые агликоны – лютеолин и апигенин (таблица).

Таблица

Содержание колхицина и флавоновых агликонов в органах *C. autumnale* L. на разных фазах вегетации в условиях Беларуси, % сухих веществ

Название соединения	Фенофазы				
	Начало отрастания	Формирование дочерних клубнелуковиц	Отмирание надземной части	Бутонизация	Цветение
Клубнелуковица					
Колхицин	0,031	0,118	0,090	0,060	0,046
Лютеолин	0,025	0,030	0,021	0,017	0,020
Апигенин	0,039	-	-	-	-
Лист					
Колхицин	0,612	0,157	н. о.		
Лютеолин	-	1,071	н. о.		
Апигенин	0,294	0,025	н. о.		
Генеративные органы					
Колхицин				0,802	0,511
Лютеолин				0,066	0,048
Апигенин				0,083	-

Примечание: н.о. – не определяли

Все части растений рода *Colchicum* L. содержат колхицин, но наибольшее содержание характерно для полностью созревших семян безвременников. В условиях Беларуси вызревание семян у этих растений не происходит. Следовательно, в условиях нашей республики при заготовках алкалоидоносного лекарственного сырья должны использоваться другие органы безвременников в качестве его источника.

Колхицин и флавоновые агликоны встречаются во всех органах *C. autumnale* L., но распределяются неравномерно. Из таблицы видно, что для листьев *C. autumnale* L., особенно молодых, характерно высокое содержание алкалоида колхицина. В клубнелуковицах данного вида отмечено стабильно невысокое содержание колхицина, несколько выше оно в дочерних клубнелуковицах. Наибольшее содержание колхицина характерно для бутонов и цветков изучаемого вида.

Содержание флавонов у *C. autumnale* L. выше в сформировавшихся листьях и бутонах, в клубнелуковицах – невысокое содержание флавонов с преобладанием лютеолина.

Метаболизм вторичных соединений тесно связан с физиологическими процессами, которые проявляются как смена фенологических фаз развития растений. Иллюстрацией может служить сезонная динамика содержания вторичных метаболитов у *C. autumnale* L. Сопоставляя содержание колхицина и флавоновых агликонов в органах *C. autumnale* L. с фенофаза-

ми, в которых были отобраны образцы, можно проследить сезонную динамику их содержания у изучаемых растений.

По результатам ВЭЖХ установлено, что наибольшее содержание колхицина в клубнелуковицах приходится на фазу формирования дочерних клубнелуковиц, затем происходит снижение содержания колхицина вплоть до окончания вегетации (см. таблицу). Наибольшее за сезон содержание колхицина в надземных органах изучаемых растений отмечено в фазе бутонизации, высокое оно и в фазе цветения. По-видимому, при формировании генеративных органов происходит активизация биосинтеза алкалоидов, что отражается в резком повышении содержания колхицина в надземных органах безвременников.

Содержание флавоновых агликонов в клубнелуковицах *C. autumnale* L. невысокое в течение всей вегетации (см. таблицу). Их содержание несколько повышается в фазе цветения. В надземных органах *C. autumnale* L. содержание флавонов повышается дважды за период вегетации. Первый раз оно происходит в фазе формирования дочерних клубнелуковиц. В фазе бутонизации отмечено повторное повышение содержания флавонов в надземных органах изучаемых растений, когда суммарное содержание лютеолина и апигенина достигает максимальных за сезон значений. По мере формирования репродуктивных органов содержание флавонов в надземных органах безвременников быстро снижается и в фазе цветения почти в два раза ниже.

На основании вышеизложенного можно отметить, что ни на одной из фенофаз не происходит одновременного повышения содержания всех трех вторичных соединений. Это указывает на взаимосвязь колхицинового и флавонового синтеза, наличие общих предшественников и возможность в зависимости от физиологического состояния растению переключаться на синтез предпочтительного продукта. В настоящее время известно, что предшественниками колхицина являются фенилаланин и тирозин [2]. Упрощенная схема основного пути биосинтеза колхицина представлена на рисунке.

На ранних стадиях биосинтеза колхицина L-фенилаланин превращается в коричную кислоту, которая в свою очередь восстанавливается до соответствующего альдегида, а на последующей стадии - до дигидрокоричного альдегида. Данное соединение после гидроксирования в 4-м положении и стереоселективного конденсирования с дофамином дает тригидроксилированный фенетилхинолин – первый алкалоидный предшественник колхицина. Дальнейшие модификации (несколько гидроксирований и метилирований) кольца С этого предшественника приводят к появлению аутумналину. (S)-аутумналин при действии высокоспецифичного цитохрома P-450 подвергается окислительному фенольному сопря-

жению с выходом изоандроцимбина. После метилирования под действием S-аденозилметионин-зависимой O-метилтрансферазы этот интермедиат превращается в O-метил-андроцимбин. Утрата атома С в 3-м положении и расширение кольца создают трополоновое кольцо демеколцина, который при потере N-метильной группы превращается в деацетилколхицин.

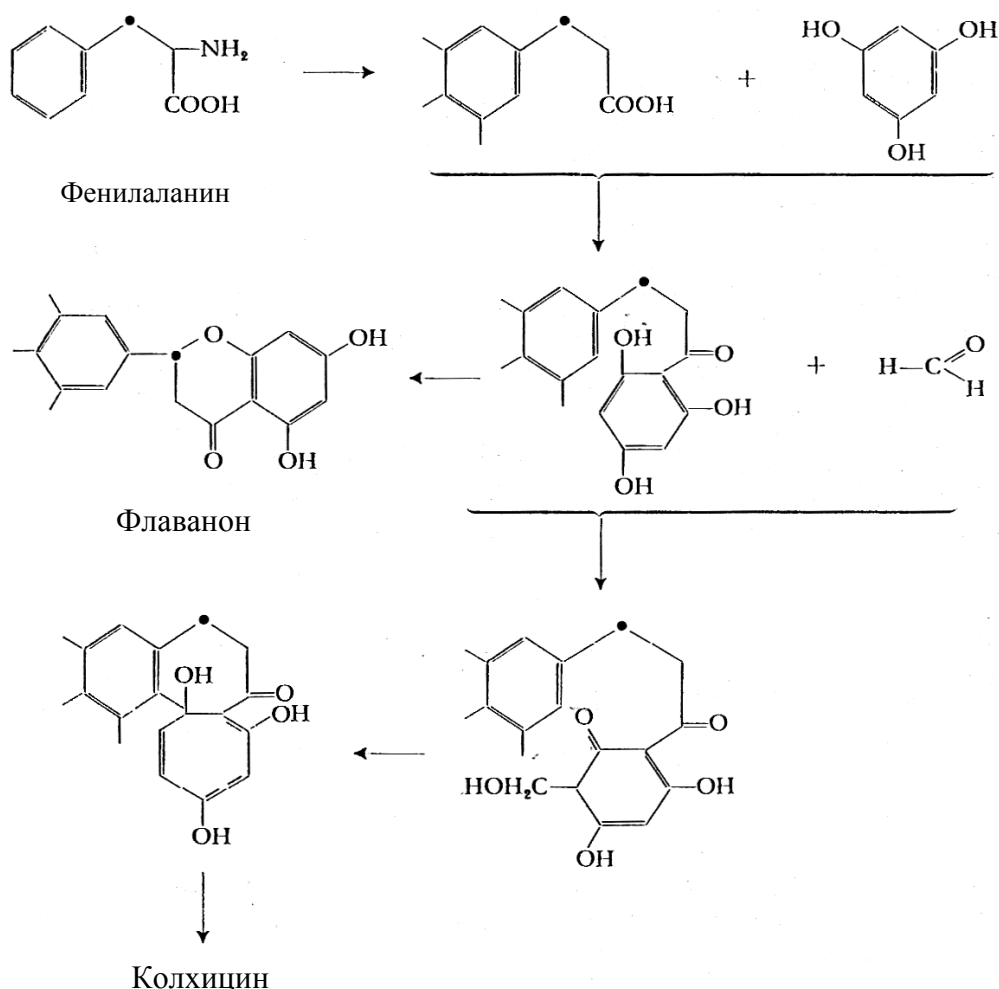


Рис. Схема биосинтеза колхицина [3]

Ацелирование молекулы деацетилколхицина приводит к образованию колхицина [2]. Из схемы четко видна связь алкалоидного и флавонового синтезов у безвременников.

Хроматогафический анализ компонентов водноспиртовых экстрактов клубнелуковиц, листьев, стеблей, бутонов и цветков *S. autumnale* L. с помощью метода ГХ-МС позволил идентифицировать 70 компонентов, относящихся к различным классам органических соединений: спиртам, альдегидам, органическим кислотам, фенольным соединениям и др., 27 из которых содержатся в следовых количествах. Установлено, что в иссле-

дованных образцах в преобладающих количествах содержатся глицерин, о-дигидроксibenзол, ацетин, м-дигидроксibenзол, лактон G, 2,1,3-бензотиодиазол, гексадекановая кислота, 9,12-октадекадиеновая кислота и 9,12,15-октадекатриен-1-ол.

Таким образом, на основании данных ВЭЖХ показано, что растения *C. autumnale* L., выращенные в условиях Беларуси, способны синтезировать и накапливать в своих органах колхицин и флавоны. Установлено, что алкалоиды и флавоны присутствуют во всех органах безвременников, но распределяются неравномерно. Кроме того, содержание этих вторичных соединений изменяется в течение периода вегетации. Особенности сезонной динамики содержания колхицина и флавоновых соединений у *C. autumnale* L. указывают на связь вторичного метаболизма с физиологическими особенностями развития безвременников, а также позволяет определить источники и сроки заготовок лекарственного сырья в условиях Беларуси: для клубнелуковиц этого вида - в фазе формирования дочерних клубнелуковиц, а для надземных органов - в фазе бутонизации.

Литература

1. Merken H.M., Beecher G.R. // J. of chromatography. 2000. Vol. A. № 897. P. 177.
2. Nasreen A. // Phytochemisry. – 1997. - Vol.46. №1. P. 107.
3. Hegnauer R. Chemotaxonomie der Pflanzen: Eine Übersicht über die Verbreitung und die Systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe: (Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften. Chemische Reihe): bd. 1-6. Stuttgart, 1962-1973. Bd. 2: Monocotyledoneae. 1963.

Summary

The secondary metabolites *Colchicum autumnale* L. grown in Central Botanical Garden of NAS of Belarus was studied. The patterns were selected at the different phases of *C. autumnale* L. seasonal development. The composition of secondary metabolites was investigated by means of the reversed-phase HPLC-analysis. The HPLC-analysis of alcohol extracts from the organs of *C. autumnale* L. has shown cochicine, luteoline and apigenine presence. The identification of components was based on spectra of standarts. The investigation shown the greatest content of cochicine and flavones was contained by daughter corms of *C. autumnale* L. at the beginning of vegetation and by the flower buds of these plants. These organs of *C. autumnale* L. may be recommend to store as the source of medical raw in the conditions of Belarus.