

Н. Я. ГРИГОРЬЕВА, В. Ф. КУЧЕРОВ

ПОЛИФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В ЛИСТЬЯХ ТАБАКОВ С РАЗЛИЧНОЙ ФОТОПЕРИОДИЧЕСКОЙ РЕАКЦИЕЙ

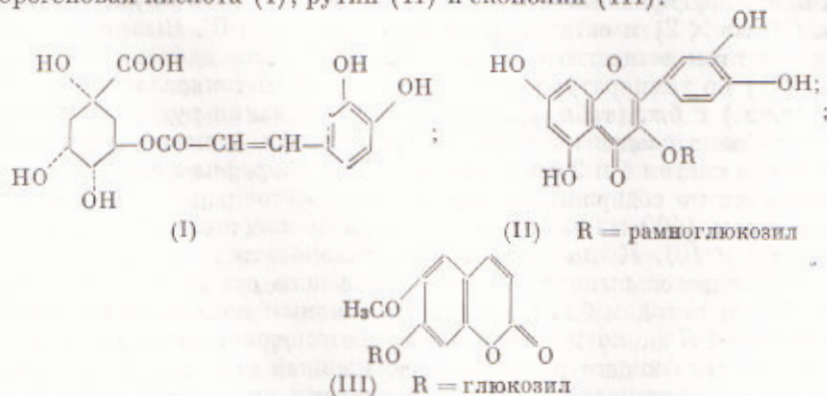
(Представлено академиком М. Х. Чайлаханом 20 VII 1970)

Нами было показано (^{1, 15}), что растение длинного дня *Nicotiana sylvestris* Spegaz et Comes и растение короткого дня *Nicotiana tabacum* L., обладающие противоположными типами фотопериодической реакции, обнаруживают резкие качественные и количественные различия в составе эндогенных гиббереллинов. В настоящей работе мы провели сравнительный анализ полифенольных компонентов, содержащихся в листьях этих табаков, выращенных как на благоприятном, так и на неблагоприятном световом режиме.

Анализ полифенолов растений в связи с проблемой фотопериодизма представлялся нам весьма интересным и целесообразным, так как исследование последних лет показали, что полифенолы играют регуляторную роль во многих процессах жизнедеятельности растений. Роль полифенолов в процессе цветения изучена мало. Наиболее четкие данные об их участии в биохимических реакциях, приводящих к зацветанию, были получены Цукером, Нитчем и Нитч (²), показавшими, что в процессе индукции цветения как у длиннодневного *N. sylvestris*, так и у короткодневного *N. tabacum*, наблюдается скачкообразное увеличение уровня хлорогеновой кислоты, а также ее изо- и неоиомеров.

Объектами нашего исследования явились четырехмесячные растения табаков, выращенные летом 1968 г. в открытом грунте в Москве на длинном дне (д.д.): свет — 16 час., темнота — 8 час. и коротком дне (к.д.): свет — 8 час., темнота — 16 час.

Предварительный анализ спиртовых экстрактов из листьев табаков методом двумерной хроматографии на бумаге (б.х.) с последовательным использованием систем бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5), система 1, и уксусная кислота — вода (15 : 85), система 2, показал, что главными полифенолами *Nicotiana*, как и следовало ожидать (³⁻⁵), являются хлорогеновая кислота (I), рутин (II) и скополин (III).



Качественный и количественный анализ этих полифенолов в четырех изученных объектах (*N. sylvestris*, д.д.; *N. sylvestris*, к.д.; *N. tabacum*, к.д.;

Таблица 1

Идентификация главных полифенольных компонентов листьев табака *

Полифенол	R _f при б. х. (бумага Filtrak FN1, производство ГДР)				R _f при т.с.х. на силикагеле КСК, насыпной слой (1 мм)			
	1	2	3	4	5	6	7	8
Рутин								
Из листьев	0,50	0,51	—	—	—	0,26	—	—
Контрольный	0,50	0,51	—	—	—	0,26	—	—
Хлорогеновая кислота								
Из листьев	0,52	0,71	—	—	0,12	—	0,22	—
Контрольная	0,52	0,71	—	—	0,12	—	0,22	—
Скополин								
Из листьев	0,52	0,80	—	0,33	0,55	—	—	—
Контрольный	0,52	0,80	—	0,33	0,55	—	—	—
Скополетин								
Из листьев	0,88	0,60	0,40	0,75	0,85	—	—	0,47
Контрольный	0,88	0,60	0,40	0,75	0,85	—	—	0,47

* Система 1: н-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5); система 2: 15% уксусная кислота; система 3: бензол — пиридин — вода (100 : 1 : 100); система 4: н-бутанол, насыщенный водой (бумага предварительно пропитана 0,1M раствором Na₂HPO₄); система 5: хлороформ — метанол (4 : 1); система 6: хлороформ — метанол (3 : 1); система 7: хлороформ — метанол (2 : 1); система 8: бензол — этилацетат (1 : 1).

Таблица 2

Содержание (среднее из двух определений) главных полифенольных компонентов в листьях табаков (мг/кг листьев)

Полифенол	N. sylvestris			N. tabacum		
	д. д.	к. д.	д. д./к. д.	д. д.	к. д.	д. д./к. д.
Рутин	384	2	>200	499	596	0,84
Хлорогеновая кислота	355	88	4	625	283	2,2
Скополин	48	14	3,5	106	74	1,4
Скополетин	0,57	0,2	2,8	0,32	0,24	1,3

N. tabacum д.д.) осуществлялся следующим образом. 4—5 кг свежих листьев табака фиксировали жидким азотом и экстрагировали спиртом (10 л × 2). Экстракт упаривали в вакууме при температуре ≤ 40°. Выпадающий при этом осадок, содержащий основную часть хлорофилла и липидов, отделяли центрифугированием, а водный концентрат (500 мл) промывали пентаном (50 мл × 2) и оставляли на трое суток при 0°. Выкристаллизовавшееся при этом вещество с т. пл. 192—194° было идентифицировано как рутин (II) по температуре плавления и данным тонкослойной хроматографии (т.с.х.) и б.х. (табл. 1). Данные о содержании рутина в листьях изученных табаков сведены в табл. 2. Методом б.х. с последовательным использованием систем 1 и 2 было показано, что хлорофил-липидная фракция практически не содержит рутина. Водный маточный раствор экстрагировали эфиром (400 мл × 10), а затем после подкисления — этилацетатом (300 мл × 10). Концентрирование этилацетатного экстракта в вакууме сопровождается выпадением желто-зеленого осадка с т. пл. 118—135°. Анализ его методом б.х. показал, что главным компонентом осадков является рутин (47%, по данным спектрофотометрического анализа ⁽⁴⁾ элюата пятна, отвечающего рутину), загрязненный веществами неизвестного строения, хлорогеновой кислотой и следами скополетина (табл. 2). Следует отметить, что ни водный концентрат после экстракции, ни орга-

нические экстракты не содержат рутина, по крайней мере в пределах чувствительности использованных хроматографических методов.

Анализ этилацетатного концентрата методами т.с.х. и б.х. показал, что в нем содержится другой главный полифенол табаков — хлорогеновая кислота (I) (табл. 1). Для ее выделения кислую часть этилацетатного экстракта хроматографировали на силикагеле КСК, импрегнированном фосфатным буфером с pH 6,2, в условиях, использованных нами для выделения гибберелловой кислоты (^{1, 15}). Хлорогеновая кислота элюируется при этом метанолом. Затем производилась повторная хроматография метанольных фракций на силикагеле, импрегнированном 0,5 N H₂SO₄, в условиях, рекомендованных (⁶).

Поскольку хроматографическими методами было специально показано, что загрязнения, содержащиеся в сыром препарате хлорогеновой кислоты, не поглощают свет с λ 330 мμ, содержание последней было количественно определено спектрофотометрически в этой области спектра (^{4, 6}) (табл. 2).

Третий главный полифенол растений табака — скополин (III) накапливается в водном концентрате, остающемся после экстракции этилацетатом. Он был идентифицирован методами т.с.х. и б.х. (табл. 1), а также путем сопоставления и.к. и у.-ф. спектров элюатов соответствующего пятна с двухмерной хроматограммы с заведомым образцом скополина. Ферментативный гидролиз сухого остатка из предварительно нейтрализованного до pH 7 водного концентрата с помощью эмульсина в ацетатном буфере с pH 5,4 (38°, 48 час.) приводит к его агликону, скополетину (III, R = H), идентифицированному методами т.с.х. и б.х. Для количественного анализа скополина аликвотную часть водорастворимых веществ из листьев табака гидролизовали разбавленной соляной кислотой (⁷). Гидролизат экстрагировали эфиром, а затем этилацетатом. Методами т.с.х. и б.х. было показано, что водный раствор после экстракции не содержит ни скополина, ни скополетина. Хроматографирование объединенных экстрактов методом т.с.х. на насыпном слое силикагеля КСК в системе метанол — хлороформ (1:4) привело к выделению сырого препарата скополетина. Очистка его с помощью двухмерной б.х. с последовательным использованием систем 1 и 2 дала хроматографически чистый препарат, количественный анализ которого (а следовательно, и скополина) был проведен спектрофотометрированием элюата пятна с двухмерной хроматограммы в области 345 мμ (^{5, 8}) (табл. 2).

Следует отметить, что в листьях изученных табаков содержится и свободный скополетин, который накапливается в наших условиях выделения в нейтральной части эфирного экстракта. Однако содержание его (табл. 2), определенное как описано выше, вопреки литературным данным (⁹), значительно ниже, чем содержание скополина.

Обсуждение результатов. Анализ данных, приведенных в табл. 2, показывает, что общий уровень полифенолов у обоих видов табаков, как отмечалось в (¹⁰), выше у растений, выращенных на д.д., чем у растений, выращенных на к.д.

Однако сопоставление содержания полифенолов у *N. sylvestris* и *N. tabacum* позволяет обнаружить, что метаболизм полифенолов у короткодневного *N. tabacum* слабо зависит от условий выращивания: различия в содержании рутина и скополина не превышают 40%, и только содержание хлорогеновой кислоты в листьях этого табака примерно вдвое выше на д.д., чем на к.д. В случае же длиннодневного *N. sylvestris* различия в содержании полифенолов в листьях растений, выращенных на благоприятном и неблагоприятном световом режиме, гораздо более значительны. При этом наиболее резкое различие наблюдается в уровне главного флавоноида табаков — рутина, содержание которого в листьях *N. sylvestris*, выращенного на к.д., ничтожно мало.

Падение содержания рутина в листьях *N. sylvestris*, выращенного на к.д., можно объяснить либо ускорением его метаболизации, либо ингиби-

рованием его биосинтеза в изученных условиях. Специальными опытами было показано, что исчезновение рутина в листьях не сопровождается накоплением ни его агликона-кверцетина, ни других гликозидов последнего. Кажется маловероятным объяснение падения уровня рутина усилением реакций лигнификации или реакций его глубокой деградации, так как эти процессы должны были бы в той же мере сказаться на уровне хлорогеновой кислоты и скополина. Более вероятное объяснение мы нашли при сопоставлении путей биосинтеза рассматриваемых фенолов. Как известно (¹¹, ¹²), их общим предшественником является шикимовая кислота. Однако характерная особенность биосинтеза рутина — необходимое участие в этом процессе ацетил-коэнзима А. Уровень последнего поддерживается в растениях расщеплением продукта фотосинтеза — фосфоенолпирувата, с одной стороны, и рядом темновых реакций, главной среди которых является β -окисление жирных кислот, — с другой стороны. Обнаруженное нами резкое снижение уровня рутина в листьях *N. sylvestris*, выращенного на к.д., и значительное более слабое влияние длины дня на уровень других полифенолов навели нас на мысль о том, что, возможно, характерной особенностью растений этого длиннодневного вида состоит в блокировании у них реакций β -окисления. Благодаря этому у растений, выращенных на к.д., когда значительно угнетен фотосинтез, биохимические реакции, требующие участия ацетил-коэнзима А (синтез рутина), подавлены в большей мере, чем реакции, в которых участвуют метаболиты, образующиеся только фотосинтетическим путем (синтез скополина, хлорогеновой кислоты).

Изложенные представления хорошо согласуются с обнаруженным нами ранее (¹⁵) снижением уровня эндогенных гиббереллинов у *N. sylvestris*, выращенного на к.д., а также с идеями Бортвика и Хендрикса (¹³, ¹⁴), считающих, что действие света на растение, воспринятое фитохромом, передается через общее звено в цепи метаболизма, а именно через ацетил-коэнзим А.

Авторы сердечно благодарят академика М. Х. Чайлахяна за плодотворное обсуждение этой работы.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР
Москва

Поступило
20 VII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. Я. Григорьева, В. Ф. Кучеров и др., Хим. природн. соед., № 4, 296 (1969).
- ² M. Zucker, C. Nitsch, J. P. Nitsch, Am. J. Bot., 52, 271 (1965).
- ³ A. C. Weaving, Tobacco, 146, 20 (1958).
- ⁴ S. J. Sheen, Phytochem., 8, 1839 (1969).
- ⁵ D. E. Koeppe, L. M. Rohrbaugh, S. H. Wender, Phytochem., 9, 889 (1970).
- ⁶ E. Sondheimer, Arch. Biochem. and Biophys., 74, 131 (1958).
- ⁷ C. G. Nordström, T. Swain, J. Chem. Soc., 1953, 2764.
- ⁸ J. R. Loewenberg, Phytochem., 9, 361 (1970).
- ⁹ C. Yang, Y. Nakagawa, S. H. Wender, Tobacco, 147, 20 (1958).
- ¹⁰ A. O. Tabor, Plant Physiol., 40, 273 (1965).
- ¹¹ A. C. Neish, In: Biochemistry of Phenolic Compounds, N. Y., 1964, p. 295.
- ¹² М. Н. Запрометов, Усп. совр. биол., 63, 380 (1967).
- ¹³ S. B. Hendriks, Science, 141, 21 (1963).
- ¹⁴ S. B. Hendricks, H. A. Bortwick, In: Environmental Control of Plant Growth, N. Y., 1963, p. 233.
- ¹⁵ N. Grigorieva, V. Kutscherov, Phytochem., in press.