

ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК 577.3 : 544.02

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СОСТАВ ЛИПИДОВ ЦВЕТКОВ КАЛЕНДУЛЫ И ПЛОДОВ ОБЛЕПИХИ

© 2021 г. А. Н. Смирнова¹, В. О. Швыдкий^{1*}, Л. Н. Шишкина¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: slavuta58@gmail.com

Поступила в редакцию 31.08.2020;
после доработки 22.10.2020;
принята в печать 20.11.2020

Методом тонкослойной хроматографии определен количественный состав липидов, выделенных из цветков календулы лекарственной и плодов облепихи крушиновидной. Выявлены существенные различия как долей фосфолипидов (ФЛ) и стерина в составе общих липидов, так и отдельных фракций в составе ФЛ. Показано, что липиды исследованных растительных объектов по способности к окислению достоверно не различаются. Обнаружено, что упаковка ФЛ в мембранах цветков календулы является менее жесткой, чем в мембранах плодов облепихи. Математический анализ УФ-спектров с использованием метода Гаусса позволил выявить присутствие различных каротиноидов и флавоноидов в хлороформном растворе липидов, в то время как более гидрофильные биологически активные вещества в процессе выделения липидов остаются в смеси полярных растворителей.

Ключевые слова: растительные объекты, стерин, фосфолипиды, УФ-спектрометрия, каротиноиды, флавоноиды.

DOI: 10.31857/S0207401X21070104

ВВЕДЕНИЕ

В мембранах клеток всех биологических объектов структурной основой являются фосфолипиды (ФЛ), которые активно участвуют в регуляции клеточного метаболизма и обуславливают разнообразие функций клеточной мембраны в целом [1]. Однако роль ФЛ в функционировании растительных клеток и детальное определение состава их ФЛ начали активно исследоваться только в последние годы [2–4]. Как и в животных клетках, количественный состав ФЛ клеточных мембран растений реагирует на изменения в окружающей среде, что приводит к своим изменениям физико-химических свойств мембран. Более того, выявлены сигнальные функции у целого ряда ФЛ, таких как фосфатидная кислота, лизоформы фосфолипидов, фосфатидилсерин [5–7]. Однако перечисленные исследования проведены преимущественно на растениях вида *Arabidopsis thaliana* L.

Помимо ФЛ в растениях содержатся различные биологически активные вещества (БАВ), среди которых наиболее распространены флавоноиды и каротиноиды, обладающие наряду с их биологической эффективностью и антиоксидантными свойствами [8, 9]. Считается, что фармакологическое действие лекарственных растений обусловлено преимущественно флавоноидами.

Однако при использовании экстрактов этих растений в качестве лекарственных средств необходимо учитывать, что флавоноиды способны образовывать комплексы с ФЛ [10, 11], что оказывает существенное влияние на их ингибирующую эффективность [11, 12]. Поскольку антиоксидантные свойства биологических объектов зависят от природы ФЛ и структуры БАВ [13–15], то это обуславливает необходимость детального изучения качественного и количественного состава ФЛ растительных объектов. Одними из наиболее широко применяемых в фармакологии растениями являются цветки календулы и плоды облепихи.

Цели данной работы – изучение количественного состава и свойств липидов, соотношения фракций фосфолипидов в цветках календулы лекарственной и плодах облепихи крушиновидной, а также выявление биологически активных веществ, экстрагирующихся вместе с липидами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Объектами исследования были липиды, выделенные из свежесобранных цветков календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) и замороженных плодов облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.). Липиды из растительных объектов извлекали по методу Фолча в модифи-

Таблица 1. Количественное содержание фракций в составе фосфолипидов (% Р) цветков календулы и плодов облепихи

Фракция ФЛ, % Р	Цветки календулы (n = 5)	Плоды облепихи (n = 4)
Лизоформы фосфолипидов	5.5 ± 1.2	6.3 ± 1.1
Сфинголипиды (СЛ)	9.1 ± 0.7	4.0 ± 1.0
Фосфатидилхолин	26.8 ± 2.3	30.4 ± 1.4
Фосфатидилинозит + Фосфатидилсерин	12.1 ± 0.6	12.0 ± 1.8
Фосфатидилэтаноламин	28.8 ± 3.1	16.9 ± 0.8
Кардиолипин	9.7 ± 1.0	15.2 ± 2.2
Фосфатидная кислота	8.1 ± 0.7	15.2 ± 0.9

Примечание: n – количество хроматографических дорожек.

кации Кейтса [16]. Предварительно взвешенные цветки календулы и плоды облепихи растирали в дистиллированной воде в соотношении 1 : 1.95 г сырой массы/мл дистиллированной воды. В процессе экстракции липиды и гидрофобные БАВ концентрируются в хлороформе, а все гидрофильные соединения остаются в водно-метанольном растворе. Полученные хлороформные растворы хранили в морозильной камере при –18°С. Верхние слои водно-метанольных растворов хранили в холодильнике. Хлороформный раствор экстрагированных липидов использовали для анализа их количественного состава, а для УФ-спектрометрии использовали и водно-метанольные, и хлороформные растворы.

Качественный и количественный состав ФЛ определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), используя силикагель марки Н производства компании Sigma-Aldrich (USA), стеклянные пластинки размером 90 × 120 мм и смесь хлороформ – метанол – ледяная уксусная кислота – дистиллированная вода в объемном соотношении 12.5 : 7.5 : 2 : 1 в качестве мобильной фазы [17]. Проявление хроматограмм проводили в парах йода. Количественный анализ состава ФЛ после удаления пятен с пластинки и сжигания их до неорганического фосфата (Р) хлорной кислотой проводили на спектрофотометре ПЭ-5400ВИ (группа компаний “ЭКРОС”, Россия) при длине волны 815 нм по образованию фосфорномолибденового комплекса в присутствии аскорбиновой кислоты. Для калибровки использовали однозамещенный фосфорнокислый калий марки “ОСЧ”. Для каждой пробы анализировали не менее 4–5 хроматографических дорожек. Содержание стерина определяли по их взаимодействию с уксусным ангидридом в кислой среде [18]. Оптическую плотность растворов регистрировали на спектрофотометре при длине волны 625 нм.

Помимо количественного содержания отдельных фракций, оценивали также обобщенные показатели состава липидов: доля ФЛ (%) и стерина (%) в составе общих липидов; отношение фрак-

ций фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина (ФХ/ФЭ), отражающее структурное состояние мембранной системы ткани [19] и соотношение сумм долей (в %) более легкоокисляемых и более трудноокисляемых фракций ФЛ (ΣЛОФЛ/ΣТОФЛ), характеризующее способность липидов к окислению [19]. Последнее соотношение вычисляли по следующей формуле: $\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ} = (\text{ФИ} + \text{ФС} + \text{ФЭ} + \text{КЛ} + \text{ФК})/(\text{ЛФХ} + \text{СЛ} + \text{ФХ})$, где ФИ – фосфатидилинозит, ФС – фосфатидилсерин, КЛ – кардиолипин, ФК – фосфатидная кислота, ЛФХ – лизоформы фосфолипидов, СЛ – сфинголипиды.

Раствор липидов в хлороформе и оставшийся после экстракции липидов водно-метанольный раствор использовали для УФ-спектрометрии. Дифференциальные УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре “ShimadzuUV-1700 PharmaSpec” компании Shimadzu (Япония) в диапазоне длин волн от 200 до 500 нм при разбавлении исходных растворов либо хлороформом, либо водно-метанольной смесью растворителей в соответствующем соотношении. Полученные УФ-спектры были аппроксимированы функциями Гаусса в программе Excel solver путем минимизации суммы квадратов разности между экспериментальным и расчетным спектрами. При решении этих задач сумма квадратов разности составляла не более $1 \cdot 10^{-4}$. Количество функций Гаусса при аппроксимации зависело от вида спектра.

Экспериментальные данные обрабатывали стандартными статистическими методами, используя программный продукт MS Excel и пакет компьютерных программ KINS [20]. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента [21]. В табл. 1, 2 данные представлены в виде средних арифметических значений с указанием их средних квадратичных ошибок ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе выделения липидов гидрофобные вещества, в том числе каротиноиды и флавонои-

Таблица 2. Содержание фосфолипидов и стерина в составе общих липидов цветков календулы и плодов облепихи

Показатель	Цветки календулы	Плоды облепихи
Доля фосфолипидов в составе общих липидов, %	24.6 ± 2.4 , $n = 8$	13.5 ± 2.9 , $n = 7$
Доля стерина в составе общих липидов, %	31.1 ± 1.7 , $n = 2$	0.83 ± 0.14 , $n = 2$

Примечание: n – число измерений.

ды, должны экстрагироваться с липидами и находиться в нижнем хлороформном слое, а более гидрофильные соединения должны оставаться в верхнем водно-метанольном слое. Действительно, полученные водно-метанольные растворы были бесцветными, а хлороформные растворы липидов имели интенсивную окраску. Экстракт липидов цветков календулы был окрашен в желтый цвет, экстракт липидов плодов облепихи – в оранжевый.

Количественное соотношение фракций ФЛ в изученных объектах представлено в табл. 1. Как видно, в ФЛ цветков календулы преобладают ФХ и ФЭ, относительные содержания которых практически равны. Среди минорных фракций более высокая доля приходится на суммарное содержание ФИ + ФС, а лизоформы в ФЛ цветков календулы содержатся в наименьших количествах (табл. 1). В составе ФЛ плодов облепихи также преобладает ФХ, а более легкоокисляемые фракции (ФЭ, КЛ и ФК) содержатся в практически равных долях, в то время как наиболее низкое относительное содержание обнаружено для лизоформ ФЛ и СЛ (табл. 1).

Обобщенные показатели состава липидов цветков календулы и плодов облепихи приведены в табл. 2. Из этих данных следует, что доля ФЛ в составе общих липидов в цветках календулы в 1.8 раза ($p < 0.01$) превышает аналогичный показатель в плодах облепихи (табл. 2). Липиды цветков календулы также содержат и несколько более высокую долю стерина в составе общих липидов по сравнению с липидами плодов облепихи (табл. 2).

Существенные различия в количественном составе ФЛ цветков календулы и плодов облепихи обуславливают и достоверные различия ($p < 0.001$) отношения ФХ/ФЭ, которые равны 0.948 ± 0.062 и 1.802 ± 0.053 для ФЛ цветков календулы и плодов облепихи соответственно. Однако суммарное содержание более легкоокисляемых фракций ФЛ в обоих случаях достигает около 60%, а суммарное содержание более трудноокисляемых фракций ФЛ чуть больше 40%. При этом молярное отношение [Стерин]/[ФЛ] для цветков календулы несколько выше (0.230 ± 0.058), чем в липидах плодов облепихи (0.116 ± 0.015).

УФ-спектры хлороформных растворов липидов исследуемого растительного сырья представлены

на рис. 1 и 2. Как известно, при использовании хлороформа в качестве растворителя для УФ-спектрометрии границы его применимости находятся в области длин волн $\lambda \geq 245$ нм. Поэтому анализ спектров хлороформных растворов липидов цветков календулы и плодов облепихи, приведенных на рис. 1 и 2, позволяет выявить наличие в этих растворах гидрофобных БАВ, характеризующихся более высокими длинами волн максимумов полос поглощения. Из представленных данных видно, что в обоих случаях выявлены максимумы в диапазоне $\lambda = 246\text{--}380$ нм и в области $\lambda > 400$ нм. В соответствии с литературными данными полосы поглощения в диапазоне $\lambda = 246\text{--}380$ нм могут быть обусловлены присутствием флавоноидов, а в области $\lambda > 400$ нм максимумы поглощения характерны для каротиноидов [22, 23]. Наличие каротиноидов также подтверждается желтой и оранжевой окраской хлороформных растворов липидов.

Для проверки возможного наличия гидрофильных БАВ в полярном водно-метанольном слое после экстракции липидов были сняты их УФ-спектры, приведенные на рис. 3 и 4. Видно, что в этих спектрах имеются только полосы поглощения с максимумами в диапазоне длин волн от 206–217 до 350–370 нм. Анализ данных литературы позволяет предположить, что эти полосы поглощения могут быть обусловлены присутствием в этом слое раствора свободных жирных кислот и гидрофильных БАВ, в том числе и некоторых гликозидов флавоноидов.

Анализ имеющихся в литературе данных о составе ФЛ ряда растений свидетельствует о том, что он существенно зависит не только от вида и возраста растения, но и от исследованной части растения [24–26]. Анализ полученных нами данных соответствует этому заключению. Так, в ФЛ цветков календулы относительное содержание ФЭ в 1.7 раз ($p < 0.05$) выше, чем в ФЛ плодов облепихи. При этом в ФЛ плодов облепихи доля КЛ в 1.6 раза ($p < 0.10$), а доля ФК почти в 1.9 раза ($p < 0.001$) выше, чем в ФЛ цветков календулы. Выявленное более низкое значение соотношения фракций ФХ/ФЭ свидетельствует о менее жесткой упаковке ФЛ в мембранах цветков календулы по сравнению с аналогичным параметром в плодах облепихи. Возможно, это обусловлено и достоверно повы-

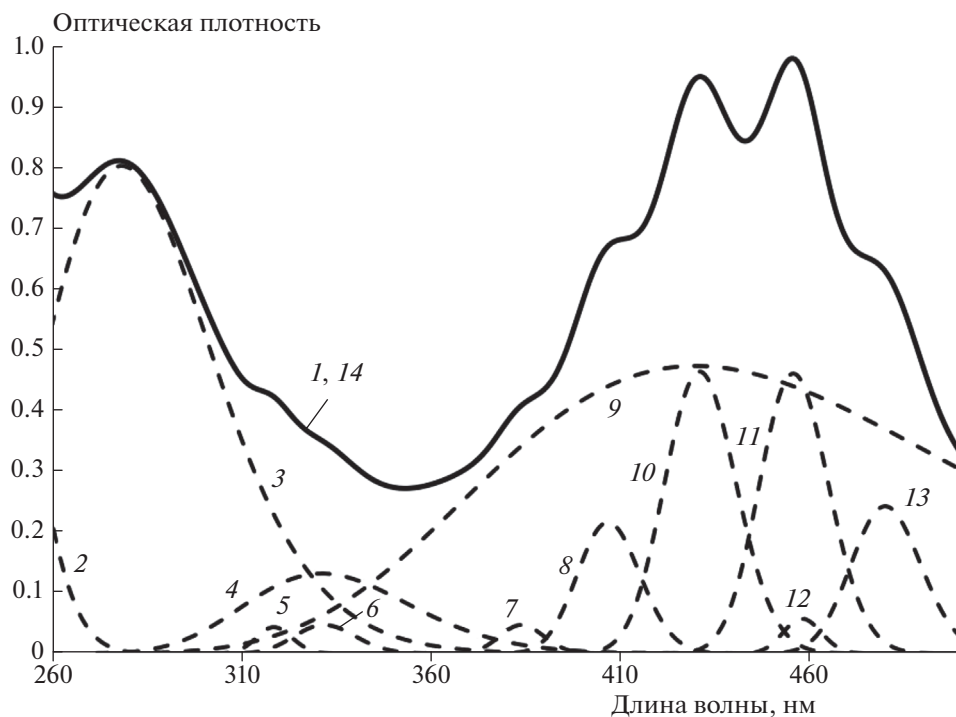


Рис. 1. УФ-спектр хлороформного раствора липидов цветков календулы и его гауссианы при $[LH] = 2.5 \cdot 10^{-5}$ моль/л: кривые 1 и 14 – исходный и расчетный спектры. Максимумы гауссиан: 2 – 246.0 нм, 3 – 278.3 нм, 4 – 318.6 нм, 5 – 331.2 нм, 6 – 331.8 нм, 7 – 384.0 нм, 8 – 406.9 нм, 9 – 430.0 нм, 10 – 431.1 нм, 11 – 455.9 нм, 12 – 458.2 нм, 13 – 480.2 нм.

шенным относительным содержанием сфинголипидов ($p < 0.01$) в составе ФЛ (табл. 1), и более высокой долей стерина в составе общих липидов (табл. 2) цветков календулы по сравнению с аналогичными величинами для плодов облепихи. Как показано в работах [2, 4], именно сфинголипиды и стерин образуют в мембранах рафты, которые

оказывают влияние на структуру и функционирование мембран в растительных клетках.

Максимумы поглощения, выявленные после математической обработки по методу Гаусса УФ-спектров полученных растворов, позволяют идентифицировать некоторые каротиноиды и флавоноиды на основании опубликованных в литературе данных [23, 27]. Состав каротиноидов в цветках календулы и плодах облепихи неоднократно исследовался с помощью разных методов, и было показано, что как в цветках календулы, так и в плодах облепихи содержится смесь каротиноидов [28, 29]. Однако сведения о максимумах полос поглощения ряда каротиноидов в хлороформе, обнаруженные нами в хлороформных растворах липидов цветков календулы и плодов облепихи, в литературе отсутствуют. Возможно, это обусловлено тем, что ранее выявление в УФ-спектрах максимума полосы поглощения БАВ проводили, не используя метод Гаусса, который позволяет более точно оценить величину λ . Определенные различия величин максимумов полос поглощения общих УФ-спектров и после разложения их по Гауссу были выявлены для водно-пропиленгликолевых экстрактов ряда лекарственных растений в работе [30].

Количество индивидуальных максимумов полос поглощения, выявленных при обработке УФ-спектров по методу Гаусса, позволяет сделать предположение, что состав каротиноидов в хлороформ-

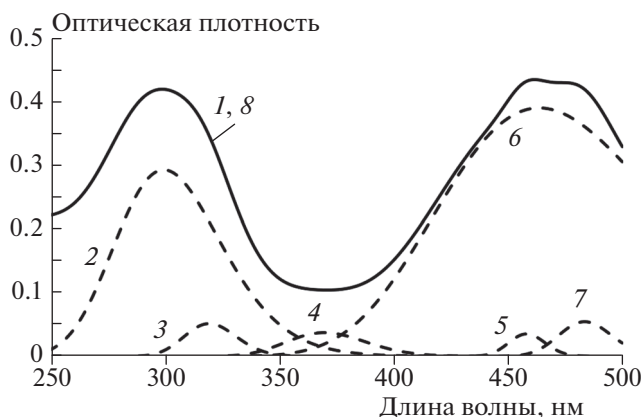


Рис. 2. УФ-спектр хлороформного раствора липидов плодов облепихи и его гауссианы при $[LH] = 2.5 \cdot 10^{-5}$ моль/л: кривые 1 и 8 – исходный и расчетный спектры. Максимумы гауссиан: 2 – 299.6 нм, 3 – 319.5 нм, 4 – 369.8 нм, 5 – 458.2 нм, 6 – 463.7 нм, 7 – 483.5 нм.

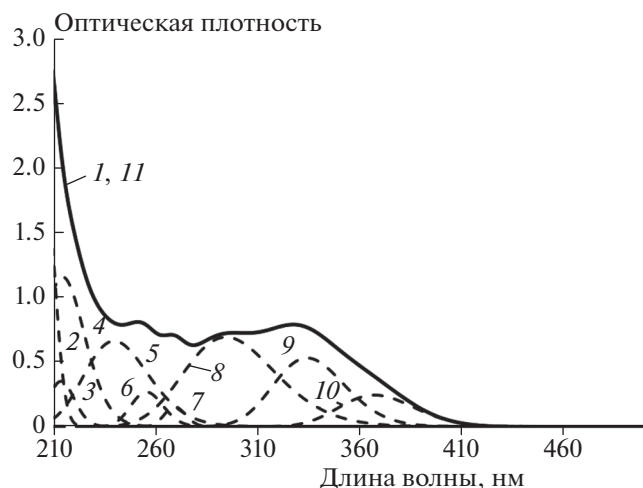


Рис. 3. УФ-спектр верхнего водно-метанольного раствора после экстракции липидов из цветков календулы и его гауссианы (разбавление в 20 раз): кривые 1 и 11 — исходный и расчетный спектры. Максимумы гауссиан: 2 — 206.3 нм, 3 — 213.6 нм, 4 — 214.4 нм, 5 — 239.7 нм, 6 — 255.5 нм, 7 — 269.4 нм, 8 — 294.6 нм, 9 — 334.4 нм, 10 — 367.6 нм.

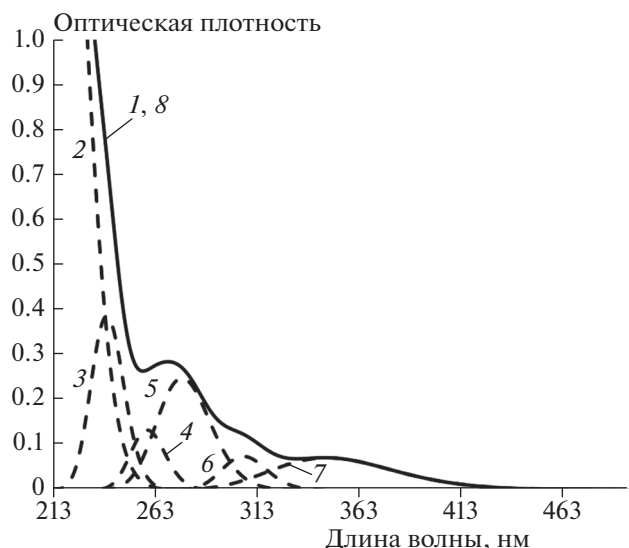


Рис. 4. УФ-спектр водно-метанольного раствора после экстракции липидов из плодов облепихи и его гауссианы (разбавление в 20 раз): кривые 1 и 8 — исходный и расчетный спектры. Максимумы гауссиан: 2 — 217.8 нм, 3 — 239.5 нм, 4 — 259.3 нм, 5 — 276.4 нм, 6 — 306.5 нм, 7 — 347.5 нм.

ном растворе липидов цветков календулы (рис. 1) более разнообразен, чем в хлороформном растворе липидов плодов облепихи (рис. 2). В хлороформном растворе липидов цветков календулы максимумы полос поглощения дают основание предполагать наличие хризантемаксантина, флавоксантина и α -каротина. Максимумы полос поглощения в хлороформном растворе липидов плодов облепихи позволяют идентифицировать только ликопин.

Для предварительной идентификации индивидуальных флавоноидов мы использовали литературные данные о максимумах полос поглощения различных флавоноидов в полярной среде (этиловый спирт) [22]. В спектре водно-метанольного раствора цветков календулы (рис. 3) обнаружены полосы поглощения, относящиеся, вероятно, к 3-О-рутинозиду изорамнетина (нарциссину), который, как полагают, является одним из наиболее распространенных флавоноидов цветков календулы [31]. Обнаруженные в спектре водно-метанольного раствора плодов облепихи (рис. 4) величины максимумов полос поглощения также не полностью соответствуют значениям максимумов полос поглощения, указанным в литературе для тех флавоноидов, которые ранее были обнаружены в этом растительном сырье разных сортов. Значения выявленных максимумов полос поглощения наиболее близки величинам для лютеолина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, методом ТСХ в работе определен количественный состав ФЛ и содержание ФЛ

и стерина в составе общих липидов, выделенных из цветков календулы лекарственной и плодов облепихи крушиновидной. Показано, что доля ФЛ и стерина выше в липидах цветков календулы по сравнению с аналогичными величинами в плодах облепихи. Основной фракцией в составе ФЛ обоих растительных объектов является ФХ. В составе ФЛ цветков календулы доли ФЭ и сфинголипидов достоверно выше, чем в ФЛ плодов облепихи, в то время как в составе ФЛ плодов облепихи обнаружено более высокое относительное содержание КЛ и ФК. Липиды исследованных растительных объектов по способности к окислению достоверно не различаются. В то же время обнаружено достоверно более высокое отношение фракций ФХ/ФЭ в ФЛ плодов облепихи, что свидетельствует о менее жесткой упаковке ФЛ в мембранах цветков календулы, обусловленное, возможно, повышенной способностью их ФЛ к образованию рафтов. Математический анализ УФ-спектров с использованием метода Гаусса позволил выявить присутствие различных каротиноидов и флавоноидов в хлороформном растворе липидов, в то время как более гидрофильные БАВ, в том числе и некоторые гликозиды флавоноидов, в процессе выделения липидов остаются в смеси полярных растворителей.

Работа выполнена в рамках госзадания Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (тема № 44.4, регистрационный номер 0084-2019-0014).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции. М.: Мир, 1997.
2. *Cacas J.-L., Furt F., Le Guédard M. et al.* // Prog. Lipid Res. 2012. V. 51. P. 272.
3. *Yuki Nakamura* // Trends Plant Sci. 2017. V. 22. № 12. P. 1027.
4. *Cassim A.M., Gouguet P., Gronnier J. et al.* // Prog. Lipid Res. 2019. V. 73. P. 1.
5. *Liu X., Ma D., Zhang Zh. et al.* // Environ. Exp. Botany. 2019. V. 165. P. 174.
6. *Okazaki Yo., Saito K.* // The Plant J. 2014. V. 79. P. 584.
7. *Colin L.A., Jaillais Y.* // Curr. Opin. Plant Biol. 2020. V. 53. P. 1.
8. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдралилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушкино: Synchrobook, 2013.
9. Семенов А.А., Карцев В.Г. Биологическая активность природных соединений. М.: Международный благотворительный фонд “Научное Партнерство”, 2012.
10. *Xu K., Liu B., Ma Yu. et al.* // Molecules. 2009. V. 14. P. 3486.
11. Мазалецкая Л.И., Шелудченко Н.И., Шишкина Л.Н. // Прикл. биохимия и микробиол. 2010. Т. 46. № 2. С. 148.
12. *Mazaletskaya L., Sheludchenko N., Shishkina L.* // Chem. Chem. Technol. 2012. V. 6. № 1. P. 35.
13. *Siyamak Shahab, Masoome Sheikh* // Russ. J. Phys. Chem. B. 2020. V. 14. № 1. P. 15.
14. Васильев Р.Ф., Кънчева В.Д., Наумов В.В. и др. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 6. С. 36.
15. Шишкина Л.Н., Козлов М.В., Мазалецкая Л.И. и др. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 6. С. 52.
16. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975.
17. Биологические мембраны: методы / Под ред. Финдлея Дж.Б., Эванза У.Г. М.: Мир, 1990.
18. *Sperry W.M., Webb M.* // J. Biol. Chem. 1950. V. 187. P. 97.
19. Шишкина Л.Н., Кушнирева Е.В., Смотряева М.А. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2004. Т. 44. № 3. С. 289.
20. Брин Э.Ф., Травин С.О. // Хим. физика. 1991. Т. 10. № 6. С. 830.
21. Лакин Г.Ф. Биометрия. 3-е изд. М: Высш. шк., 1990.
22. Курегян А.Г. // Фундаментальные исследования. 2015. № 2. № 23. С. 5166.
23. *Demandre Ch., Tremolieres A., Justin A.-M., Mazliak P.* // Phytochem. 1985. V. 24. № 3. P. 481.
24. *Moreau R.A., Asmann P.T., Norman H.A.* // Ibid. 1990. V. 29. № 8. P. 2461.
25. *Cacas J.-L., Buré C., Grosjean K. et al.* // Plant Physiol. 2016. V. 170. P. 367.
26. *Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H.* Carotenoids. Handbook. Basel AG.: Springer, 2004.
27. Дейнека В.И., Гостищев И.А., Третьяков М.Ю., Индина И.В. // Региональные геосистемы. 2011. Т. 15/2. № 9(104). С. 277.
28. Дейнека В.И., Подкопайло Р.В., Дейнека Л.А., Сорокопудов В.Н., Гостищев И.А. // Региональные геосистемы. 2011. Т. 15/1. № 9(104). С. 374.
29. Георгиевский В.П., Рыбаченко А.И., Казаков А.Л. Физико-химические и аналитические характеристики флавоноидных соединений. Ростов н/Д: Ростовский ГУ, 1988.
30. Швыдкий В.О., Смирнова А.Н., Волков В.А., Шишкина Л.Н. // Химия растительного сырья. 2020. № 1. С. 67.
31. Шарова О.В., Куркин В.А. // Химия растительного сырья. 2007. № 1. С. 65.