

С. М. Щипарёв, К. В. Сазанова, С. В. Григорьев

ГИДРОКСИЦИТРАТ — ДОМИНИРУЮЩАЯ КИСЛОТА В ЛИСТЬЯХ КЕНАФА (*HIBISCUS CANNABINUS* L.)

В растениях, наряду с лимонной и изолимонной кислотами, встречается и гидроксиллимонная кислота ($C_6H_8O_8$). Впервые она была обнаружена Липпманом [1] в соке сахарной свеклы. Позже Грибель [2] выделил ее из цветочных чашечек гибискуса (*Hibiscus sabdariffa*) и назвал ее (+) алло-гидроксиллимонной кислотой (рис. 1, а). Льюис

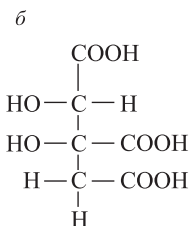
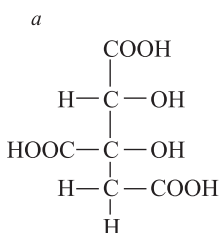


Рис. 1. Гидроксиллимонная кислота:

а — (+) алло-гидроксиллимонная кислота из кенафа и гибискуса; б — (-) гидроксиллимонная кислота из гарцинии.

и Никалантан [3] обнаружили другой изомер гидроксиллимонной кислоты в плодах гарцинии (*Garcinia cambogia*) и в плодах других представителей этого рода. Идентифицировали его как (-) гидроксиллимонную кислоту (рис. 1, б).

Авторами [3] также была найдена (+) алло-оксиллимонная кислота в растениях кенафа (*Hibiscus cannabinus*). До недавнего времени гидроксиллимонная кислота не привлекала к себе внимания исследователей, пока не обнаружилась ее

способность снижать избыточный вес у людей. Многочисленные исследования фармакологов и биохимиков показали, что гидроксиллимонная кислота из плодов гарцинии может быть мощным регулятором углеводного и липидного обмена у животных [4]. Вместе с тем мало что известно о происхождении и роли гидроксиллимонной кислоты в растениях.

Задачей нашей работы было изучение динамики и состава органических кислот в листьях и проростках кенафа, где гидроксиллимонная кислота была обнаружена ранее [3]. Сведений о содержании других кислот в листьях этого растения в литературе не имеется.

Методы исследования

Объектами исследования послужили 3-суточные этиолированные проростки и зеленые листья кенафа (*Hibiscus cannabinus* L.) сорта «Кубанский 333». Семена были получены в отделе генетических ресурсов масличных и прядильных культур ГНЦ ВИР им. Н. И. Вавилова. Этиолированные проростки выращивали в чашках Петри на дистиллированной воде при 28 °С. Листья брали с растений, выращенных в теплице

Щипарёв Сергей Михайлович — канд. биол. наук, доцент, Санкт-Петербургский государственный университет; e-mail: ship.ira@mail.ru

Сазанова Катерина Владимировна — аспирант, Санкт-Петербургский государственный университет; e-mail: barinova-kv@mail.ru

Григорьев Сергей Владимирович — канд. сель.-хоз. наук, ведущий научный сотрудник отдела генетических ресурсов прядильных и масличных культур ГНЦ ВИР им. Н. И. Вавилова.

© С. М. Щипарёв, К. В. Сазанова, С. В. Григорьев, 2013

Ботанического сада СПбГУ. Для анализов использовали зеленые семядольные листья (три недели после всходов), 5–6-й цельные сердцевидные, а также пальчато-рассеченные листья в фазу цветения и формирования плодов.

Высечки из листьев (1 г) фиксировали кипящим 96%-ным этанолом с последующей 3-кратной экстракцией 85%-ным этанолом в пробирках с обратным холодильником при температуре 75–78 °С в течение 30 мин. Объединенный экстракт упаривали досуха. Далее сухой остаток растворяли в воде и пропускали через колонку с катионитом КУ-2 в H^+ -форме для получения свободных кислот.

Анализ органических кислот проводили методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) на приборе Agilent с масс-селективным детектором MSD5975. Колонка HP-5MS, 30 м × 0,25 мм. Толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мм. Газ-носитель — гелий, скорость потока 1,3 мл/мин, при сбросе 1:20. Хроматографирование велось в режиме постоянного потока воздуха через колонку. Температура испарителя составляла 320 °С. Анализ проводился при линейном программировании температуры от 70 до 320 °С со скоростью 4 °С/мин. Кислоты анализировали в виде TMS-производных. Сбор данных осуществлялся с помощью программного обеспечения Agilent ChemStation. Обработка и интерпретация масс-спектрометрической информации проводилась с использованием программы AMDIS (URL: <http://www.amdis.net/index.html>) и стандартной библиотеки NIST2005. Количественная интерпретация хроматограмм выполнялась методом внутренней стандартизации по углеводороду C_{18} с помощью программы UniChrom (URL: <http://www.unichrom.com/unichrome.shtml>).

Количественный анализ проводили для янтарной, фумаровой, яблочной, глюконовой и гидроксилимонной кислот. Предварительно из искусственных смесей, состоящих из анализируемых кислот и углеводорода C_{18} , были определены коэффициенты чувствительности для каждой кислоты, используемые для расчета количества кислот в пробе. Для смесей стандартов кислот использовались янтарная, фумаровая, яблочная и глюконовая кислоты фирмы «Реахим». Гидроксилимонную кислоту получали из сухого порошка листьев кенафа, путем экстракции горячей водой. Затем экстракт пропускали через катионит КУ-2 в H^+ -форме. Раствор, содержащий свободные кислоты, нейтрализовали гидроксидом кальция. Са-соль органических кислот последовательно осаждали 60 и 80%-ным этанолом. В 80%-ном спиртовом осадке содержалась только Са-соль гидроксилимонной кислоты, откуда она была выделена в свободном состоянии. Чистоту препарата проверяли с помощью хроматографии на бумаге в системе растворителей: бутанол-этанол-муравьиная кислота (5:4:1). В качестве стандарта использовали препарат цитримакс (Citrimax, Concord, CA, VSA), содержащий гидроксилимонную кислоту из плодов гарцинии.

Результаты исследования и их обсуждение

Полученные с помощью ГХ-МС данные (рис. 2) позволили выявить в проростках и листьях кенафа органические кислоты, которые не были обнаружены там ранее [3].

В этиолированных проростках доминировала фумаровая кислота. В значительно меньших количествах были обнаружены яблочная, янтарная и глюконовая кислоты. Подтвердилось отсутствие в проростках гидроксилимонной кислоты. С переходом растений на автотрофный тип питания, гидроксилимонная кислота становится доминирующей в листьях (таблица).

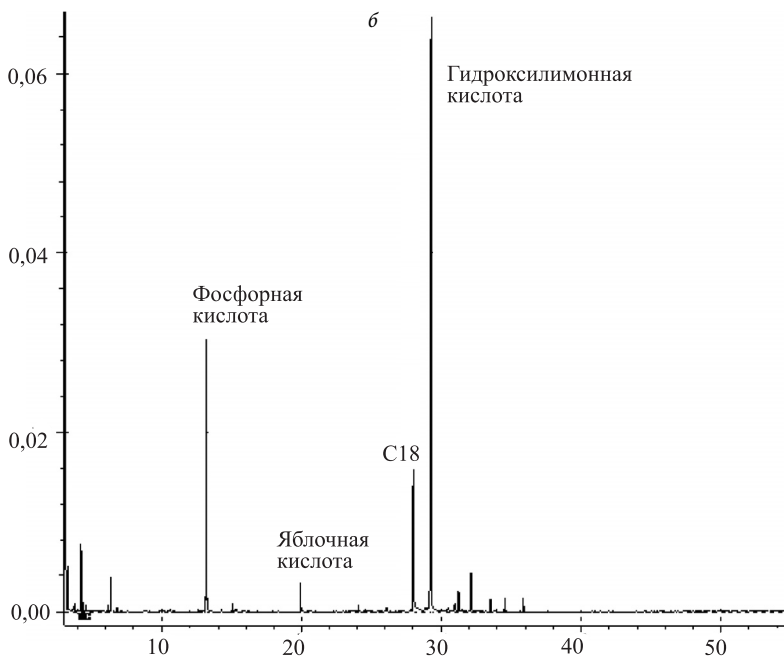
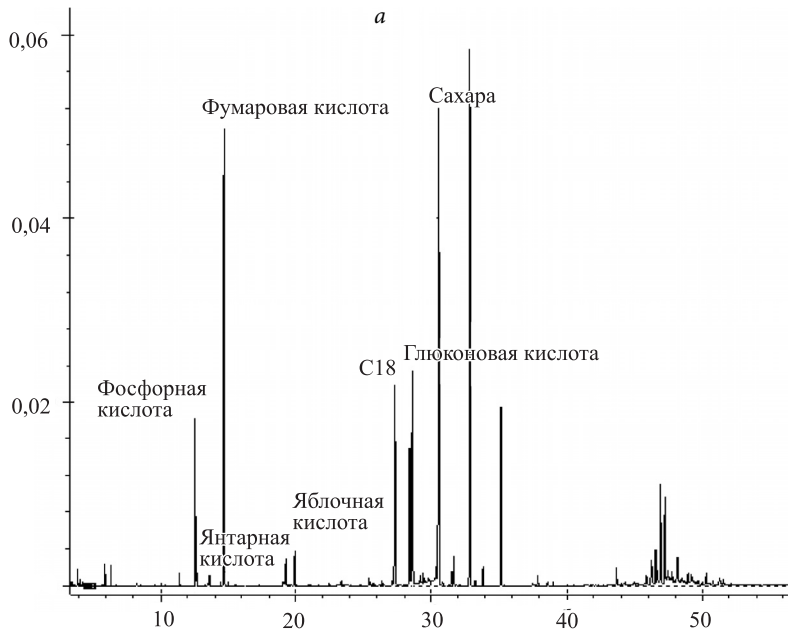


Рис. 2

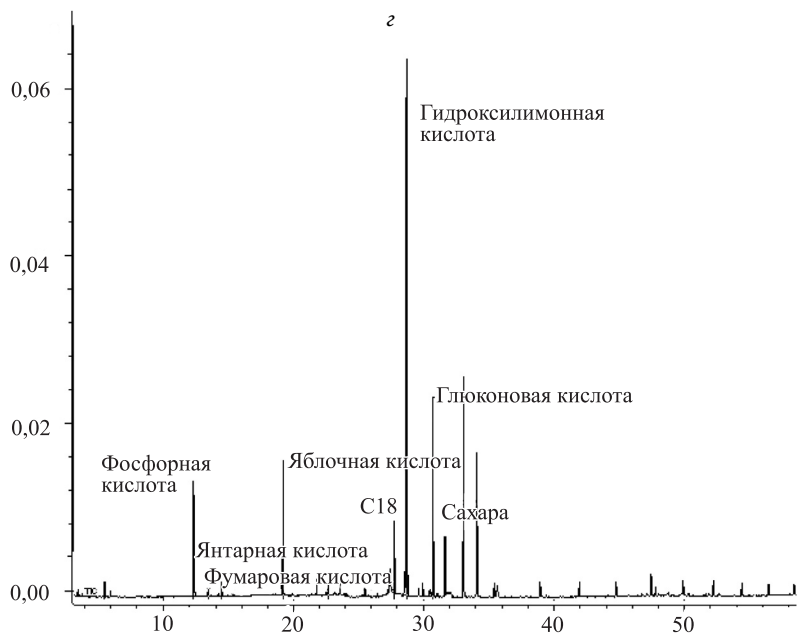
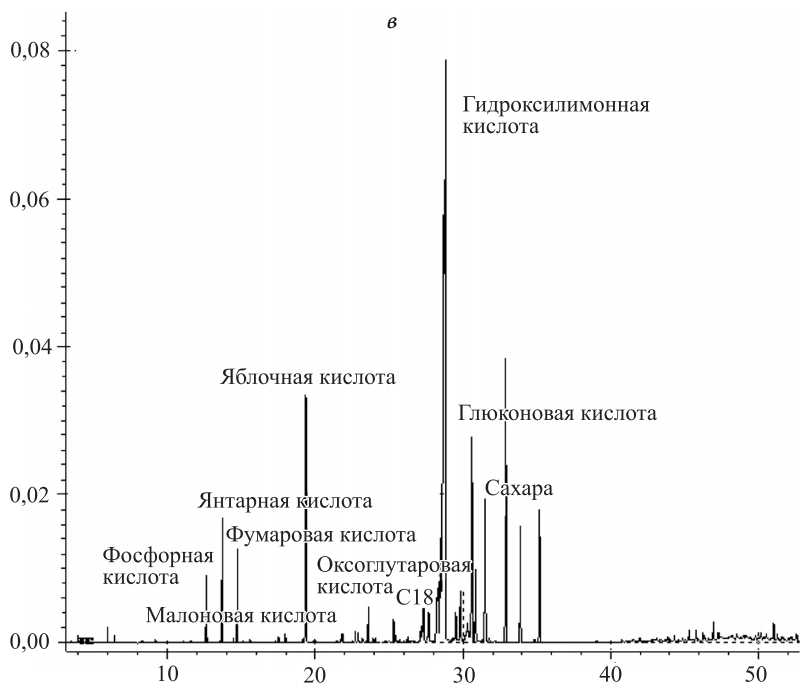


Рис. 2. Хроматограммы органических кислот кенафа:

a — этилированные проростки; *б* — семядольные листья; *в* — цельные сердцевидные листья (5–6-й лист); *г* — пальчато-рассеченные листья.

Содержание органических кислот в листьях и проростках кенафа (мкг/г сырой массы)

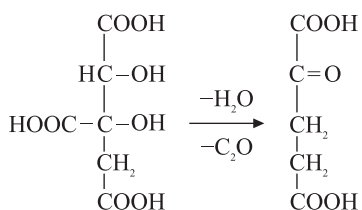
Кислоты	Этиолированные проростки	Семядольные листья	Цельные сердцевидные листья (5–6-й лист)	Пальчато-рассеченные листья
янтарная	13 ± 2	–	44 ± 3	294 ± 46
фумаровая	345 ± 64	–	70 ± 5	235 ± 42
яблочная	36 ± 5	47 ± 5	752 ± 50	1090 ± 144
глюконовая	42 ± 3	–	129 ± 29	36 ± 4
гидроксилимонная	–	760 ± 66	2635 ± 174	854 ± 77
оксоглутаровая	–	–	+	–
малоновая	–	–	+	–

Примечание. «±» — ошибка среднего (4 независимые пробы); «–» — кислота не обнаружена, «+» — кислота присутствует, но ее количество не определялось.

В семядольных и цельных сердцевидных листьях ее содержание становится на порядок больше других кислот, в том числе интермедиатов цикла ДТК — яблочной, фумаровой, янтарной, впервые обнаруженных нами в растениях кенафа. Интересно отметить, что в сердцевидных листьях на фоне очень высокого содержания в них гидроксилимонной кислоты обнаружена также оксоглутаровая кислота, как правило, не накапливающаяся в растениях.

Значительные перепады содержания гидроксилимонной кислоты в листьях различного возраста в ходе вегетации свидетельствуют, по нашему мнению, о ее высокой метаболической активности. Резкое снижение содержания гидроксилимонной кислоты в пальчато-рассеченных листьях в период формирования семян, возможно, является адаптивной реакцией, позволяющей накапливаться в семенах значительному количеству (30% на сухую массу) масел.

Происхождение гидроксилимонной кислоты в растениях до сих пор неизвестно. Установлено, что оно не связано напрямую с реакциями фотосинтеза и берет свое начало от сахаров при их окислительном распаде в темноте [5]. Накопление гидроксилимонной кислоты в листьях кенафа в концентрациях сравнимых с содержанием яблочной кислоты у некоторых суккулентов, безусловно, имеет какой-то смысл. В 1941 г. Мартиус выдвинул гипотезу, что гидроксилимонная кислота может быть источником оксоглутаровой кислоты [6]. Позже из зеленых семядольных листьев был выделен фермент оксидитратдегидрогеназа (декарбоксилирующая), катализирующая превращение гидроксилимонной кислоты в оксоглутарат [7]:

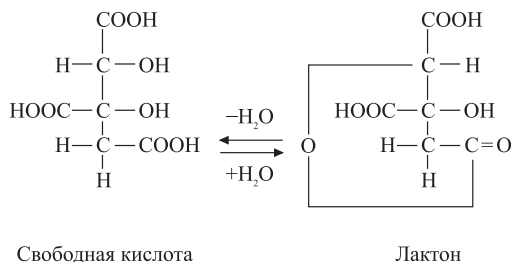


По всей видимости, такое действие гидроксилимонной кислоты представляет анаплеротическую реакцию, поставляющую 2-оксоглутарат в цикл ДТК, а также для

биосинтеза глутаминовой кислоты. Показано, что метка из C^{14} -гидроксилимонной кислоты может попадать в кислоты цикла ДТК и в аминокислоты [8].

Интересна судьба углекислоты, выделяющейся при распаде гидроксилимонной кислоты. Возможно, в листьях кенафа активна ФЭП-карбоксилаза, действие которой приводит в конечном счете к биосинтезу в них яблочной кислоты. Из таблицы видно, что содержание ее в листьях кенафа возрастает вместе с увеличением гидроксилимонной кислоты. В листьях фасоли и кукурузы метка C^{14} из C^{14} -гидроксилимонной кислоты попадала в яблочную кислоту, причем радиоактивность в ней была значительно выше, чем в других кислотах [8]. Эти факты могут быть доводами в пользу нашего предположения.

По всей вероятности, гидроксилимонная кислота играет большую роль в регуляции водного и рН-обмена в листьях кенафа. Кенаф культивируется в Африке и странах Юго-Восточной Азии, где засуха достаточно частое явление. Потеря влаги листьями при засухе может частично восполняться образованием внутриклеточной воды при распаде гидроксилимонной кислоты под действием оксидитратгидратазы, а также при переходе свободной молекулы гидроксилимонной кислоты в лактон, который приводит к выделению молекулы воды и возрастанию рН в окружающей среде:



Лактон образуется очень быстро и также быстро может разрываться при изменении внешних условий, например температуры и влажности.

Возможно, гидроксилимонная кислота, кроме кенафа, содержится и в листьях других растений, но изучение ее происхождения и метаболизма в них сдерживается методическими трудностями, возникающими при выделении и идентификации. На наш взгляд, проведение разносторонних и глубоких исследований, посвященных обмену гидроксилимонной кислоты у живых организмов, представляет большой интерес.

Литература

1. Lippman E. O. Veber eine neue im Rubensaft vorkommende Saure // Ber. Deut. Chem. 1883. N 16. P. 1078.
2. Griebel C. Uber die konstitution und den Nachweis von Hibiscus saure ((+)-allo-oxycitronen saurelacton) // Zeit. Un. Lebensm. 1942. N 83. P. 481–490.
3. Lewis Y. S., Neelakantan S. (-)-hydroxycitric acid — the principal acid in the fruits of *Garcinia cambogia* // Phytochemistry. 1965. N 4. P. 619–629.
4. Jena B. S., Jayaprakasha G. K., Singh R. P., Sakariah K. K. Chemistry and biochemistry of (-)-hydroxycitric acid from *Garcinia* // J. Agric Food Chem. 2002. N 10. P. 10–22.
5. Щупарёв С. М., Солдатенков С. В. Изучение образования и превращения оксиллимонной кислоты в листьях кенафа // Физиология растений. 1972. Т. 19, вып. 6. С. 1261–1265.
6. Martius C. Darstellung, physiologisches verhalten und Bedeutung der (+) oxycitronensaure und ihrer isomeren // Zeit Physiol. Chem. 1941. P. 33–269.
7. Землянухин А. А., Землянухин Л. А. Метаболизм органических кислот растений. Воронеж, 1995. 152 с.
8. Солдатенков С. В., Щупарёв С. М. О превращениях оксиллимонной кислоты в растениях // Вестн. Ленингр. ун-та. 1970. № 9. С. 155–159.

Статья поступила в редакцию 11 декабря 2012 г.