Е. В. Власова, зав. лаб. полевых культур, к. б. н.,

С. М. Мотылева, зав. лаб. биохимии, к. с.-х. н.,

М. Е. Мертвищева, нс лаб. биохимии

ФГБНУ ВСТИСП, г. Москва

stevlas@yandex.ru, motyleva_svetlana@mail.ru, denkviz@yandex.ru

УДК 633.367.2:577.13:57.054

DOI 10.31676/2073-4948-2018-55-106-111

ВЭЖХ-АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В ПРОРОСТКАХ *LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* L.

Резюме. Хроматографические профили ВЭЖХ спиртовых экстрактов четырехдневных проростков *Lupinus angustifolius* L. указывали на идентичность набора индивидуальных веществ в семядолях и первых пальчатых листьях. Содержание феруловой кислоты в семядолях и листьях составляло 76,5-325,8 мг/100 г сухого веса, галловой кислоты - 0,5-2,0 мг/100 г с. в. Хлорогеновую кислоту обнаруживали в семядолях в пределах 60,3-242,8 мг/100 г с. в., в то время как в молодых листьях она присутствовала в следовых количествах. Особенность распределения хлорогеновой кислоты в проростках связана со стадией развития органов.

Ключевые слова: люпин узколистый, хлорогеновая кислота, галловая кислота, феруловая кислота, семядоли.

Summary. HPLC - chromatograms of the methanol extracts of four-day *Lupinus angustifolius* L. sprouts were attested to identical set of individual substances of cotyledons and first palmate leaves. The quantities of ferulic acid was 76.5-325.8 mg/100 g dry weight as well as gallic acid content was 0.5-2.0 mg/100 g d.w. both in cotyledons and in palmate leaves. The chlorogenic acid was discovered in cotyledons within 60.3-242.8 mg/100 g d.w., whereas in young foliage leaflets it presented in trace amounts. The peculiarity of the distribution in sprouts of chlorogenic acid was associated with the stages of organs development.

Keywords: narrow-leaved lupine, chlorogenic acid, gallic acid, ferulic acid, cotyledons.

Введение

Люпин характеризуется надземным прорастанием, при котором семядоли поднимаются над поверхностью почвы и становятся первыми фотосинтезирующими органами. Растущие ткани всходов круглосуточно снабжаются углеродом благодаря двум физиологическим процессам, протекающим в семядолях и имеющим суточные циклы: распаду запасных веществ семени и фотосинтезу [1]. Семядоли, так же, как листья, проходят этапы развития и старения [2]. Удаление семядолей у всходов приводит к угнетению роста растений [3]. В большинстве опытов по получению растений-регенерантов люпина в культуре *in vitro* также отмечают необходимость присутствия участков семядолей в экспланте. Их наличие способствует более быстрому

развитию побегов как из почек, так и из меристем, а наиболее подходящими для клонального микроразмножения являются пазушные почки с семядолей и фрагментом зародышевой оси. Такие особенности органогенеза связывают с низким уровнем тотипотентности клеток бобовых культур, а также присутствием в семядолях ценных питательных веществ – полисахаридов, белков, липидов, аминокислот [4]. В процессе прорастания происходит также массовый синтез фенольных соединений, которые принимают участие в работе антиоксидантной системы и оказывают влияние на активность гормонов, под контролем которых идет процесс клонального микроразмножения [5-7]. Поскольку метаболизм фенольных соединений в проростках люпина менее изучен по сравнению с процессами мобилизации полисахаридов, липидов, белков и аминокислот, сравнительная оценка содержания ароматических карбоновых кислот в семядолях и первых пальчатых листьях проростков люпина узколистного является актуальной.

Материалы и методы

Объектом исследования были генетически родственные образцы люпина узколистного [8], различающиеся по алкалоидности и особенностям ветвления: сорта Немчиновский 846 и Беляк (индетерминантные, среднеалкалоидные), эпигональные мутанты (колосовидные): сорт Ладный (малоалкалоидный) и линия Немчиновский 846 x Mut1 (алкалоидная).

Методы исследований

Растения выращивались в полевом опыте в природно-климатических условиях Московской области на дерново-подзолистых среднесуглинистых почвах. Посев семян проведен в момент физической зрелости почвы, 10 мая 2016 г. на глубину 4 см. Для анализа проростки отбирали на 4-й день после появления всходов в стадии открытия семядолей – появления первичных ювенильных листьев. Образцы были взяты одновременно в 10 утра и высушены в термостате при температуре +55 °С. После измельчения 0,2 г сухого вещества экстрагировали 10 мл метанола.

Количественное определение фенольных соединений в полученных спиртовых экстрактах проводили на жидкостном хроматографе фирмы KNAUER со спектрофотометрическим детектором Smart Line 2500. Условия хроматографирования: детектирование на длине волны 254 нм, подвижная фаза ацетонитрил, 0,03% трифторуксусная кислота (15:85). Результаты рассчитаны исходя из проведения анализов в пяти повторностях ($n = 5$) и представлены в мг/100 г сухого вещества. Статистическую оценку результатов опытов проводили по Г. Ф. Лакину [9] с использованием программы Microsoft Office Excel. Средние значения ($\bar{x}_{cp}$) в таблицах представлены с 95%-ным доверительным интервалом: $\bar{X}_{cp} \pm t_{05} Sx_{cp}$, где $\bar{X}_{cp}$ – выборочная средняя, $t_{05} Sx_{cp}$ – предельная

ошибка выборочной средней, t_{05} – критерий Стьюдента для 0,05%-ного уровня значимости, Sx_{cp} – ошибка выборочной средней.

Результаты исследований

Хроматографические профили семядолей и листьев содержали в среднем 13 характерных пиков с одинаковой формой и временем выхода (от 3,1 до 80 мин.), что свидетельствовало об идентичности набора индивидуальных веществ (рис.).

Рис. Сопоставление пиков индивидуальных веществ на хроматограммах ВЭЖХ метанольных экстрактов листьев (верх) и семядолей (низ) у сорта Немчиновский 846 в зеркальном отображении.

Характерным для экстрактов семядолей всех образцов было большее содержание веществ со временем выхода 3,4, 5,8, 10,1 мин и меньшее – со временем удерживания 3,6, 38,3, 40,8 мин по сравнению с экстрактами листьев. Это свидетельствует об общей тенденции распределения ряда фенольных соединений в семядолях и листьях.

Исходя из наличия химических эталонных стандартов, по результатам ВЭЖХ-анализа спиртовых экстрактов листьев и семядолей определили количественное содержание хлорогеновой, галловой и феруловой кислот (время выхода 5,8, 3,6, 17,0 мин соответственно). Общая картина распределения ароматических кислот в исследуемых образцах представлена в табл.

Таблица.

Содержание ароматических карбоновых кислот в экстрактах проростков сортов люпина узколистного

Образцы	Содержание ароматических кислот (мг/100 г с. в.) в экстрактах:					
	семядолей			первого листа		
	хлорогеновая	галловая	феруловая	хлорогеновая	галловая	феруловая
Ладный	242,80 ±13,51	2,03 ±0,09	168,30 ±6,97	не обнаруж.	1,40 ±0,10	197,71 ±7,35
Немчиновский 846 х Mut1	69,71 ±4,07	1,20 ±0,06	76,52 ±4,40	не обнаруж.	0,90 ±0,06	101,21 ±4,51
Немчиновский 846	60,30 ±4,20	1,32 ±0,05	77,23 ±4,16	3,40 ±0,21	0,99 ±0,07	134,70 ±4,59
Беляк	126,4 ±8,32	0,5 ±0,01	325,8 ±8,22	4,1 ±0,27	1,1 ±0,08	309,1 ±8,59

В семядолях и листьях феруловая кислота содержалась в диапазоне от 76,5 до 325,8 мг/100 г с. в., галловая кислота обнаружена в минимальных количествах 0,5-2,0 мг/100 г с. в. Содержание феруловой кислоты в семядолях тесно связано с ее содержанием в листьях ($r = 0,99$). В то же время по содержанию галловой кислоты корреляционная связь средняя ($r = 0,58$).

Хлорогеновая кислота в существенных количествах обнаружена главным образом в семядолях (от 60,3 до 242,8 мг/100 г с. в.). Присутствие хлорогеновой кислоты в молодых листьях в значительно меньшем количестве (3,4 и 4,1 мг/100 г с. в.) отмечено только в двух образцах – Немчиновский 846 и Беляк.

Обсуждение и выводы

Результаты опыта согласуются с данными, полученными на проростках *Coffea* [10]. Сравнительно высокое содержание хлорогеновой и феруловой

кислот в семядолях *Lupinus angustifolius* L. свидетельствует об их зрелости, поскольку по мере старения семядолей хлорогеновая кислота расходуется на формирование фенольных полимеров (лигнина). При этом авторы предполагают, что процесс деградации хлорогеновой кислоты сопровождается синтезом феруловой. В проведенном нами опыте не установлено тесной связи между содержанием хлорогеновой / феруловой кислот в семядолях ($r=0,38$) из-за сортовых различий, обусловленных неодинаковым индивидуальным ритмом прорастания семян.

Поскольку хлорогеновая кислота имеет свойство накапливаться в листовых пластинках по мере их расширения [10], малое содержание хлорогеновой кислоты у молодых растений *Lupinus angustifolius* L. в раскрывающихся первых пальчатых листьях связано с их возрастным состоянием. Обращает на себя внимание тот факт, что хлорогеновую кислоту в небольших количествах удалось обнаружить только в листочках индетерминантных сортов, онтогенетическое развитие которых отличается от колосовидных сортов.

Анализируя особенности распределения галловой кислоты в проростках образцов *Lupinus angustifolius* L., следует отметить, что по ее содержанию в семядолях и первых листьях малоалкалоидный сорт Ладный превышает остальные образцы как минимум на 54 и 27% соответственно.

Различия в количестве моно- и полифенольных веществ, присутствующих в семядолях, может быть одним из эндогенных факторов, оказывающих влияние на высокую сортовую специфичность к условиям культивирования и различия в регенерационной способности сортов *Lupinus angustifolius* L. в культуре *in vitro*, которые отмечают в биотехнологических опытах [4, 11].

Список использованной литературы

1. Velho Do Amaral L. I., Santos H. P., Rossatto D. R., Buckeridge M. S. Diurnal changes in storage carbohydrate metabolism in cotyledons of the tropical tree *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) // Brazilian Journal of Botany, 2012. – 35(4). – P. 6-35.
2. Brown A. V., Hudson K. A. Developmental profiling of gene expression in soybean trifoliolate leaves and cotyledons // BMC Plant Biology, 2015. – № 15. – P. 169.
3. Peat J. R., Summerfield R. J., Jeffcoat B., Minchin F. R. The Role of Cotyledons in Vegetative Growth and Nitrogen Assimilation by Soya Bean // Ann. Bot., 1981. – 48 (2). – P. 183-188.
4. Балакина А. А., Калашникова Е. А. Влияние типа первичного экспланта на морфогенез люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) в культуре *in vitro* // Materialy VII Mezinarodni vedecko-prakticka konference «Vedecky prumysl evropskeho kontinentu – 2011». – Praha, Ceska Reublika, 2011. – P. 47-50.
5. Khang D. T., Dung T. N., Elzaawely A. A., Xuan T. D. Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Germinated Legumes // Foods, 2016. – 5(2). – P. 27.

6. Балакина А. А. Влияние условий культивирования *in vitro* на морфогенные процессы и активность ферментов антиоксидантной системы в растениях люпина узколистного: автореф. дисс. ... к.с.-х. наук. – М., 2007. – 19 с.
7. Упадышев М. Т. Роль фенольных соединений в процессах жизнедеятельности садовых растений. – М.: Издательский Дом МСП, 2008. – 320 с.
8. Дебелый Г. А., Дербенский В. И., Меднов А. В., Коновалов Ю. Б., Ключко Н. А., Анисеева Н. Ф., Конорев П. М. Родословные немчиновских (НИИСХ ЦРНЗ) и ТСХА сортов узколистного люпина на фоне отечественных и зарубежных сортов // АгроЭко-Инфо (электронный журнал), 2008, №1. [Электронный ресурс]. URL: <http://agroecoinfo.narod.ru/journal/index.html> (дата публикации: 03.04.2008, дата обращения: 03.10.2018).
9. Лакин Г. Ф. Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов / 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
10. Aerts R. J., Baumann T. W. Distribution and utilization of chlorogenic acid in *Coffea* seedlings // J. Exp. Bot., 1994. – 45 (4). – P. 497-503.
11. Фоменко Т. И., Малюш М. К. Особенности морфогенеза и регенерации растений в культуре *in vitro* люпина узколистного // Физиология и биохимия культурных растений, 2010. – 42 (4). – P. 306-314.

E. V. Vlasova, S. M. Motyleva, M. E. Mertvischeva
FSBSI ARHIBAN, Moscow

HPLC ANALYSIS OF DISTRIBUTION OF AROMATIC CARBOXYLIC ACIDS IN *LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* L. SPROUTS