

ННЦ «ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНИ»
КАФЕДРА БІОЛОГІЇ РОСЛИН

Войцехівська О.В., Белава В.Н., Смірнов О.Є.

ФІЗІОЛОГІЯ ВТОРИННОГО МЕТАБОЛІЗМУ РОСЛИН

Навчально-методичні рекомендації



Київ – 2020

ННЦ «ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНИ»
КАФЕДРА БІОЛОГІЇ РОСЛИН

Войцехівська О.В., Белава В.Н., Смірнов О.Є.

ФІЗІОЛОГІЯ ВТОРИННОГО МЕТАБОЛІЗМУ РОСЛИН
Навчально-методичні рекомендації

Київ – 2020

УДК 581.19(07)

Рецензенти:

доктор біологічних наук, професор Сокур Л.В.
кандидат біологічних наук, доцент Бойко О.А.

Рекомендовано до друку вченою радою ННЦ «Інститут біології та медицини»
(протокол № 11 від 25 червня 2020 року)

Войцехівська О.В., Белава В.Н., Смірнов О.Є. Фізіологія вторинного метаболізму рослин (*Навчально-методичні рекомендації*) – К.: АВЕГА, 2020. - 47 с.

Наведено основні відомості щодо вторинного обміну рослин: механізми накопичення та виділення, фізіологічне значення, класифікація, функції, шляхи біосинтезу вторинних метаболітів, висвітлено сучасні підходи та методи якісного та кількісного аналізу вторинних сполук. Науково-методичні рекомендації призначені для студентів, аспірантів, науково-педагогічних працівників вищих навчальних закладів природничих спеціальностей.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
Тема 1. ОСОБЛИВОСТІ ВТОРИННОГО МЕТАБОЛІЗМУ РОСЛИН	7
Характерні ознаки речовин вторинного обміну.	7
Особливості накопичення та виділення вторинних метаболітів.	7
Фізіологічне значення вторинних метаболітів.	9
БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ СПЕЦІАЛІЗОВАНОГО (ВТОРИННОГО) ОБМІНУ	11
Тема 2. ТЕРПЕНИ ТА ТЕРПЕНОЇДИ (ІЗОПРЕНОЇДИ)	11
Загальна характеристика.	11
Класифікація ізопреноїдів.	11
Функції ізопреноїдів.	14
Біосинтез ізопреноїдів.	14
Лабораторна робота № 1. Визначення ациклічних терпенових спиртів ефірних олій колориметричним методом.	15
Тема 3. ФЕНОЛЬНІ СПОЛУКИ	18
Загальна характеристика.	18
Класифікація фенольних сполук.	19
Функції фенольних сполук.	19
Біосинтез фенольних сполук.	20
Лабораторна робота № 2. Визначення загального вмісту фенольних сполук.	22
Лабораторна робота № 3. Визначення вмісту ксантонів.	24
Лабораторна робота № 4. Визначення вмісту антоціанів спектрофотометричним методом.	30
Тема 4. АЛКАЛОЇДИ ТА ЇХНІ ПОХІДНІ	34
Загальна характеристика.	34

Класифікація алкалоїдів.	34
Функції алкалоїдів.	35
Біосинтез алкалоїдів.	36
Лабораторна робота № 5. Визначення вмісту кофеїну в рослинному матеріалі.	37
ДОДАТКИ	40
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	44

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ІППФ – ізопентенілпірофосфат

ФПФ – фарнезилпірофосфат

ФЕП – фосфоенолпіруват

ВСТУП

На сьогодні одним із найбільш перспективних напрямків досліджень у галузі біології рослин є вивчення особливостей вторинного (спеціалізованого) обміну. Унікальність рослинного організму полягає не тільки у здатності до акумуляції сонячної енергії та синтезі речовин первинного обміну (амінокислот, вуглеводів, жирних кислот), а й у здатності використовувати основні метаболічні шляхи для біосинтезу специфічних сполук з високою біологічною активністю, різноманітністю будови, поширення та значення.

Рослинам притаманні унікальні шляхи обміну речовин, деякі з яких достатньо вивчені, позаяк дослідження фізіолого-біохімічних особливостей спеціалізованого обміну у рослин – перспективний напрямок досліджень, що має як наукове, так і прикладне значення. Терпеноїди, алкалоїди, фенольні сполуки – речовини вторинного обміну, різноманітність яких вражає і свідчить про виняткові біосинтетичні можливості рослинного організму. Вторинні метаболіти синтезуються на відгалуженнях метаболічних шляхів первинного обміну завдяки наявності мультиферментних систем, проте щороку ідентифікують сотні нових сполук, механізми та регуляція синтезу яких досліджені недостатньо.

Метою науково-методичних рекомендацій є закріплення теоретичних знань студентів ОР «Магістр» з навчальної дисципліни «Вторинний метаболізм рослин», забезпечення ефективності їх самостійної роботи та набуття навичок експериментальних досліджень в галузі біологічних досліджень. Самостійна робота студентів полягає в опануванні теоретичного матеріалу, підготовці рефератів і презентацій з окремих тем, самоперевірки знань з використанням контрольних запитань. Для поглибленого вивчення окремих питань курсу, підготовки рефератів, презентацій наведено список рекомендованої літератури. Рекомендації складено у відповідності до робочої навчальної програми вищезазначеної дисципліни, висвітлено сучасні науково-методичні підходи для якісного та кількісного аналізу вторинних метаболітів.

Тема 1. ОСОБЛИВОСТІ ВТОРИННОГО МЕТАБОЛІЗМУ РОСЛИН

Наразі відомо більше 10 груп вторинних метаболітів рослин. Найбільш поширеними серед них є: терпеноїди, фенольні сполуки та алкалоїди.

Характерні ознаки речовин вторинного обміну:

- висока біологічна активність: переважно синтезуються у незначних кількостях, беруть участь у регуляції на рівні тканин, органів та цілісного організму;
- різноманітність (ідентифіковано понад 100 тис. речовин) та видоспецифічність: вони можуть синтезуватися в рослинах одного або декількох видів і слугувати таксономічною ознакою;
- біосинтез відбувається на відгалуженнях метаболічних шляхів білків, вуглеводів, ліпідів;
- утворюються з незначної кількості попередників: необхідно 5-6 амінокислот для синтезу алкалоїдів, фенілаланін або тирозин – для фенольних сполук, мевалонова кислота або 5-оксиксилулоза – для ізопреноїдів.

Особливості накопичення та виділення вторинних метаболітів.

Вторинні метаболіти у клітинах, тканинах і органах рослин розподілені нерівномірно. На клітинному рівні основним депо цих сполук є метаболічно неактивний компартмент – вакуоля та апопласт, наразі їх синтез відбувається у інших компертментах клітини – цитозолі, ендоплазматичному ретикулюмі, хлоропластах. Вони акумулюються у внутрішніх секреторних структурах: спеціалізованих клітинах – ідіобластах, залозистих волосках, та тканинах – секреторних вмістилищах, молочниках, міжклітинних порожнинах (рис. 1). В ідіобластах накопичуються бальзами, таніни, слизи, камеді; у секреторних вмістилищах та міжклітинних порожнинах – терпени, в'язкі бальзами, камеді, смоли, слизи; у молочниках – латекс.

Зазвичай вторинні метаболіти депонуються не в тих тканинах та органах, в яких синтезуються. Виділення вторинних метаболітів назовні може відбуватися пасивно – внаслідок механічного пошкодження внутрішніх

секреторних структур, або ж активно, із витратами метаболічної енергії – шляхом мерокринної, апокринної та голокринної секреції.

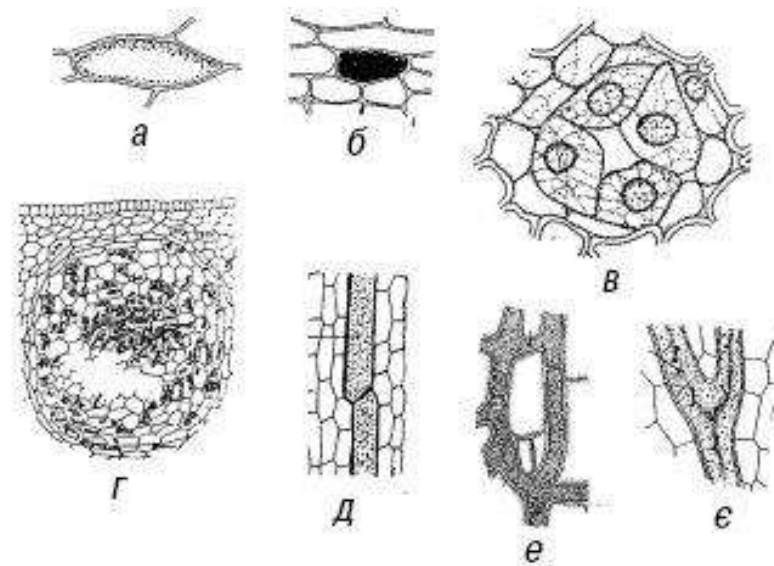


Рис. 1. Видільні тканини внутрішньої секреції: а–б – клітини-ідіобласти, в – схізогенні вмістища, г – лізигенні вмістища, д–е – членисті молочники, є – нечленисті молочники

Активне виділення специфічних продуктів обміну речовин здійснюється зовнішніми секреторними структурами – трихомами, залозистими волосками, залозками, нектарниками, осмофорами (рис. 2), однак, на відміну від тварин, у рослинному організмі кожній клітині притаманна видільна функція.

Трихоми – одно-, або багатоклітинні вирости епідермальних клітин, що виділяють олії, слизи, водні розчини; нектарники – залозисті ділянки на поверхні органів (квітки, листки, черешки, стебла), або спеціалізовані залозки з власною провідною системою, що виділяють нектар; осмофори – залозки, що диференціюються з різних частин квітки і виділяють леткі ефірні олії.

Фізіологічне значення вторинних метаболітів. Наявність вторинних метаболітів проаналізовано лише у 10-15 % рослин земної кулі. Щороку ідентифікують все нові сполуки вторинного обміну, розкривають нові ланки метаболізму, у яких задіяні ці речовини. Різноманітність вторинних метаболітів обумовлює і різноманітність функцій, які вони виконують.

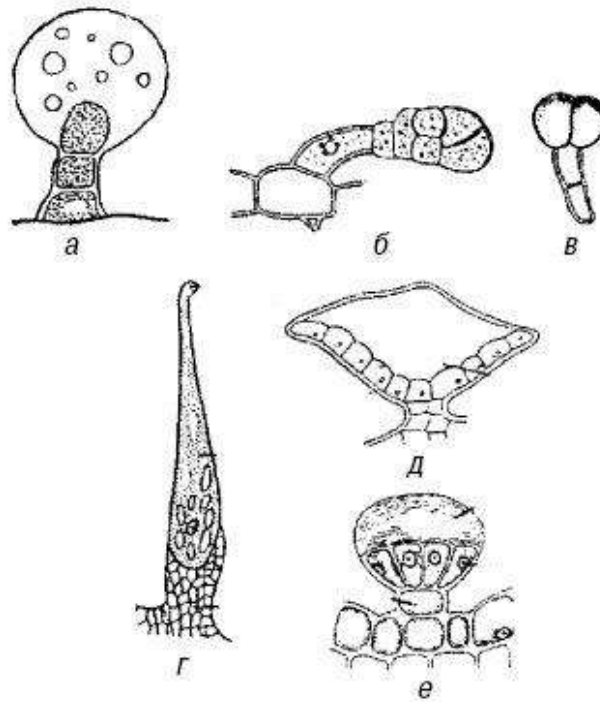


Рис. 2. Видільні тканини зовнішньої секреції: а-в – залозисті волоски, г – жалкі волоски, д-е – залозки

На початку вивчення, вторинні метаболіти розглядали як «випадково» синтезовані сполуки, кінцеві продукти життєдіяльності рослин, які не беруть участі у метаболізмі рослин (теорія А. Коссея). На сьогодні є думка, що всі вторинні метаболіти є первинними, проте недостатньо вивчені шляхи їх перетворень та фізіологічне значення.

Наразі можна виділити наступні *функції вторинних метаболітів*:

1. Запасаюча та енергетична: більшість речовин вторинного обміну у рослин зустрічаються у складі глікозидів. Після гідролізу цукровий залишок може бути використаний для енергетичних потреб клітин, або ж модифікований у запасний полісахарид.
2. Регуляторна: вторинні метаболіти можуть брати участь у регуляції росту та морфогенезу у рослин.
3. Захисна: відмічено активацію синтезу вторинних метаболітів за дії негативних біотичних та абіотичних факторів.
4. Екологічна функція: забезпечують взаємодію рослин із навколишнім середовищем – захищають рослини від травоядних тварин і фітопатогенів, беруть участь у розмноженні рослин (обумовлюють забарвлення квіток,

плодів), а також забезпечують хімічну взаємодію рослин, мікроорганізмів в екосистемі (явище алелопатії).

Отже, на відміну від первинних метаболітів, провідне фізіологічне значення сполук вторинного обміну розглядають не на клітинному рівні, а на рівні цілісного організму. Наразі всі функції вторинних метаболітів остаточно не з'ясовані.

БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ СПЕЦІАЛІЗОВАНОГО (ВТОРИННОГО) ОБМІНУ

Тема 2. ТЕРПЕНИ ТА ТЕРПЕНОЇДИ (ІЗОПРЕНОЇДИ).

Загальна характеристика. Ізопреноїди – це найбільш чисельний клас вторинних метаболітів, який нараховує більше ніж 20 тис. сполук, похідних ізопрену (рис. 3.А), з емпіричною формулою $(C_5H_8)_n$. Терпени та їх кисневмісні похідні (терпеноїди) належать до аліфатичного (характеризуються наявністю трьох подвійних зв'язків), або циклічного (містять один, два або три цикли) ряду сполук. Ізопреноїди, на відміну від алкалоїдів, одразу після синтезу вилучаються з протопласту клітини (інколи, накопичуються у вакуолі) та депонуються в клітинній стінці, частіше у спеціалізованих внутрішніх та зовнішніх секторних структурах – ідіобластах, молочниках, смоляних ходах, осмофорах, ефірних залозках. Питання щодо наявності у рослин величезної кількості різноманітних ізопреноїдів, функції багатьох з них на сьогодні залишаються нез'ясованими.

Класифікація ізопреноїдів. Класифікують терпени та терпеноїди за кількістю залишків ізопрену в будові молекули. Наразі сполуки, що містять тільки один залишок ізопрену (*гемітерпени*), у рослинах було ідентифіковано відносно недавно. Тому *монотерпенами* назвали сполуки, до складу яких входить дві ізопренові одиниці ($C_{10}H_{16}$), *сесквітерпени* містять три молекули ізопрену ($C_{15}H_{24}$), *дитерпени* – чотири ($C_{20}H_{32}$), *тритерпени* – шість ($C_{30}H_{48}$), *тетратерпени* – вісім ($C_{40}H_{64}$), *політерпени* – каучук і гута – побудовані з 100—5000 молекул ізопрену.

Гемітерпени. Ізопрен – летка сполука – міститься у рослинах у незначних кількостях, проте за певних умов кількість його суттєво зростає. Так, за інтенсивного освітлення, підвищенні температури, низькій концентрації CO_2 , рослини інтенсивно виділяють газоподібний ізопрен. Ймовірно це пов'язано з адаптацією рослин до дії несприятливих факторів.

Монотерпени - переважно рідини, леткі, мають сильний аромат, входять до складу ефірних олій, накопичуються у зовнішніх секреторних структурах –

ефірних залозках. У рослинах найбільш поширеними представниками моно терпенів є їх кисневі похідні – спирти гераніол, ліналоол і цитронелол (рис. 3.Б, В, Г).

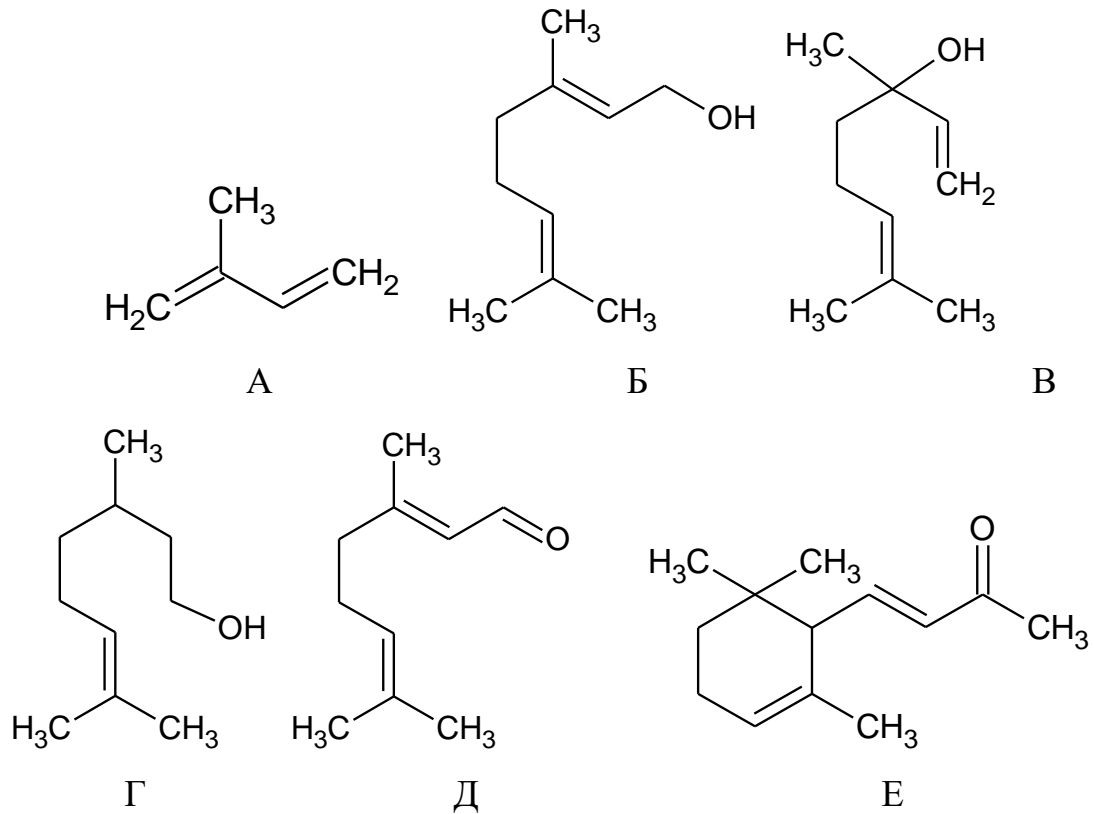


Рис. 3. А – ізопрен, Б – гераніол, В – ліналоол, Г – цитронелол, Д – цитраль, Е – іонон

Внаслідок окиснення гераніолу утворюється альдегід цитраль, який при взаємодії з ацетоном перетворюється на циклічну сполуку іонон (входить до складу каротину, вітаміну А) (рис. 3. Д, Е). Камфора відноситься до біциклічних кисневмісних монотерпенів. На відміну від інших представників є твердою речовиною. Накопичується у значній кількості в листках камфорного лаврового дерева.

Сесквітерпени. Можуть бути аліциклічними (з незамкненим ланцюгом атомів); циклічними (наявні 1-3 цикли); а також містити різноманітні функціональні групи (гідрокси-, карбокси- та кето-групи). Це найбільш чисельна група ізопреноїдів. Вони разом з монотерпенами є основними компонентами ефірних олій. Найчастіше зустрічаються у формі лактонів. Сесквітерпенові лактони –

гіркоти – мають специфічний гіркий смак, збуджують апетит і покращують травлення.

Дитерпени. Похідні дитерпенів – циклічні кислоти – є основним компонентом смол у голонасінних (живиці). Утворюються і накопичуються у внутрішніх секреторних структурах – смоляних ходах. Смоли мають рідку консистенцію, проте тверднуть на повітрі. Дитерпенові глікозиди листків стевії (стевіозиди) у 300 разів солодші, ніж цукроза, можуть бути заміником цукру у харчуванні людей, хворих на цукровий діабет.

Тритерпени. До них відносять серцеві, стероїдні, тритерпенові глікозиди. Серцеві глікозиди – стероїди з додатковим кисневмісним п'ятичленним або шестичленним кільцем. Вуглеводнева складова молекули містить від одного до п'яти моносахариди, з'єднаних між собою. Серцеві глікозиди впливають на роботу серцевого м'яза і широко використовуються у медичній практиці. Численним похідним стероїдних глікозидів притаманна поверхнева активність та здатність зумовлювати гемоліз еритроцитів. Ці глікозиди називають сапонінами. Ще однією групою тритерпенів, ідентифікованих у рослин, грибів, водоростей, мохів і папоротеподібних є екдистероїди – гормони линьки комах. Вивченням цих сполук в останні роки займаються численні лабораторії світу. До найбільш поширених в рослинах тритерпенів належать каротиноїди – пластидні пігменти, що беруть участь у фотосинтетичних реакціях і які, на нашу думку, недоцільно розглядати як речовини вторинного обміну

Політерпени. Каучук і гута – це високомолекулярні полімерні сполуки, продукти полімеризації ізопрену. Поліізопреновий ланцюжок гутти має транс-конфігурацію і налічує близько 100 залишків ізопрену, натомість для каучуку характерна цис-конфігурація і – від 1000 до 6000 залишків ізопрену. Молекулярна маса каучуку варіює в процесі росту та розвитку рослин. Каучук синтезується і накопичується у клітинах основної паренхіми, мезофілі листка, асимілюючих тканинах стебла, молочниках. Гута накопичується у молочниках, або у замкнених вмістилищах. Молочний сік (латекс) містить значну кількість протеолітичних ферментів та ферментів окиснення.

Функції ізопреноїдів. Ізопреноїди в рослинах беруть участь як у первинному, так і вторинному метаболізмі. Наразі, більшість з них відноситься до речовин вторинного (спеціалізованого) обміну. Як вторинні метаболіти вони беруть участь у:

- процесах сигналізації,
- захисті від дії негативних абіотичних та біотичних факторів;
- атрагуючій дії комах-запилювачів;
- алелопатичних взаємодіях рослин у екосистемі.

Біосинтез ізопреноїдів. Попередником ізопрену – структурної одиниці усіх ізопреноїдів та їхніх похідних – є ізопентенілпірофосфат (ІППФ) (рис. 4.А).

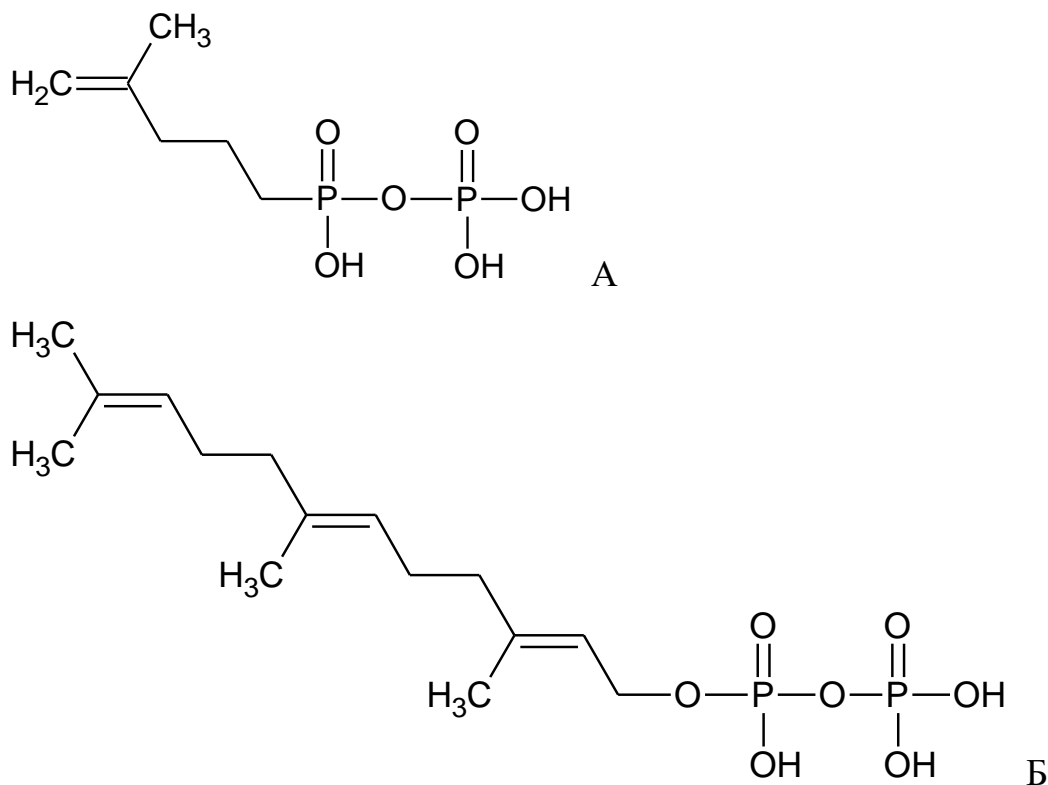


Рис. 4. А – ізопентенілпірофосфат, Б - фарнезилпірофосфат

Наразі існує два незалежних шляхи синтезу ізопреноїдів – мевалоновий (у цитозолі) та альтернативний (в пластидах). Мевалоновим шляхом у цитозолі синтезуються моно-, сескві- та тритерпени, водночас в пластидах синтезуються ди- та тетратерпени. Політерпени синтезуються у процесі димеризації фарнезилпірофосфату (ФПФ) (рис. 4. Б). Біосинтез ізопреноїдів каталізується

ферментами з високим ступенем специфічності, у визначених компертментах, регулюється експресією відповідних генів за дії внутрішніх регуляторних систем, а також еліситорів. Це обумовлює високу пластичність ізопреноїдного метаболізму за дії зовнішніх чинників.

Лабораторна робота № 1. Визначення ациклічних терпенових спиртів ефірних олій колориметричним методом.

Ефірні олії – це багатокомпонентні суміші летких та нелетких органічних сполук: вуглеводнів, спиртів, ефірів, альдегідів, кетонів, кислот аліфатичного ряду, терпенів та їхніх похідних. Ефірні олії – речовини вторинного обміну, вміст яких залежить від метаболічних процесів ліпідного обміну, зокрема від вмісту триацилгліцеролів та їх компонентів. Сучасними методами отримання і визначення вмісту ефірної олії та її компонентів у рослинах є: метод перегонки з водяною парою (метод гідро дистиляції); екстракційний метод; метод газорідкісної хроматографії; метод пропускання ефірної олії через колонку з оксидом алюмінію; метод мас-спектрометрії; метод визначення компонентів ефірної олії за інфрачервоним та ультрафіолетовим спектром поглинання. Найбільш цінними компонентами ефірних олій є оксигенвмісні сполуки, зокрема ациклічні терпенові спирти, вміст яких визначають у даній роботі. Принцип методу полягає у знебарвленні розчину KMnO_4 (як реагент для якісного виявлення ненасичених речовин він відомий під назвою реактиву Байера). Метод дозволяє визначати від 10 до 170 мкг ациклічних терпенових спиртів у складі ефірних олій (гераніюлу, ліналоолу, цитронеололу та ін.).

Мета роботи: провести порівняльний аналіз вмісту ациклічних терпенових спиртів у ефірних оліях троянди, лаванди, жасмину.

Реактиви: розчин, що містить 3,1 мМ KMnO_4 і 10 мМ MgSO_4 в 1 л води, 30 % ацетон, дистильована вода.

Обладнання: ваги, порцелянові ступки з товчачиками, шпателі, пробірки, термометр, мірні колби місткістю 0,1–1 л, хімічні стакани, дозатори,

скляні піпетки, центрифужну пробірки, центрифуга, ФЕК, кювети з товщиною шару 1 см.

Рослинний матеріал: трояндова, лавандова, жасминова ефірні олії.

Хід роботи:

1. Наважку ефірної олії (10-15 мг) розчинити у 20 мл теплої води, підігрітої до температури 25-30°C.

Примітка. Якщо досліджувана ефірна олія погано розчиняється, її наважку розчиняють у 30% ацетоні, вільному від перекисів.

2. Суміш перенести у мірну колбу, місткістю 100 мл, довести водою до мітки.

3. У дві центрифужні пробірки налити по 5 мл розчину перманганату калію та сірчаноокислого натрію (див. реактиви). У першу пробірку додати 5 мл дослідного розчину; у другу – 5 мл води (контроль).

4. Суміш експонувати впродовж 5 хвилин за кімнатної температури.

Примітка. Інтенсивність рожевого забарвлення перманганату у дослідному розчині зменшується і розчин набуває буруватого кольору внаслідок утворення перекису марганцю.

5. Розчини центрифугувати впродовж 10 хв зі швидкістю 3-5 тис. об/хв.

6. Оптичну густину контрольного та дослідного розчинів виміряти на ФЕК за довжини хвилі 525 нм.

Примітка. Оптична густина дослідного розчину зменшується пропорційно кількості ненасичених сполук, що знаходяться в реакційній суміші.

7. Вміст ациклічних терпенових спиртів X (%) розрахувати за формулою:

$$X = \frac{(K - D) \cdot V_1}{V \cdot m} \cdot 100\% , \text{ де}$$

K – оптична густина контрольного дослідіду;

D – оптична густина дослідного розчину;

V_1 – об'єм, взятий для аналізу, мл;

V – загальний об'єм витяжки, мл;

m – наважка ефірної олії, мг.

8. Порівняти вміст ациклічних терпенових спиртів у досліджуваних ефірних оліях. Зробити висновки щодо якості ефірних олій.

Питання для самоперевірки:

1. Наведіть характерні ознаки речовин вторинного обміну.
2. Схарактеризуйте особливості накопичення та виділення вторинних метаболітів.
3. Розкрийте фізіологічне значення вторинних метаболітів.
4. Поясніть роль зовнішніх секреторних структур у рослин.
5. Поясніть, які речовини називають терпенами та терпеноїдами.
6. За яким принципом та на які групи поділяють ізопреноїди?
7. Поясніть, чим сесквітерпени відрізняються від дитерпенів.
8. Функції ізопреноїдів.
9. Біосинтез ізопреноїдів.
10. Поясніть, які речовини називають ефірними оліями.
11. Які методи отримання і визначення вмісту ефірних олій ви знаєте?

Тема 3. ФЕНОЛЬНІ СПОЛУКИ.

Загальна характеристика. Фенольні сполуки – найбільш поширений клас вторинних метаболітів рослинного походження. У 1989 році Харборн ввів термін «феноли», що об'єднує групу ідентифікованих хімічних сполук, у молекулі яких наявне ароматичне кільце, пов'язане з однією, або декількома гідроксильними групами (рис. 5). Якщо до складу молекули входить декілька фенольних груп, речовина називається поліфенолом.

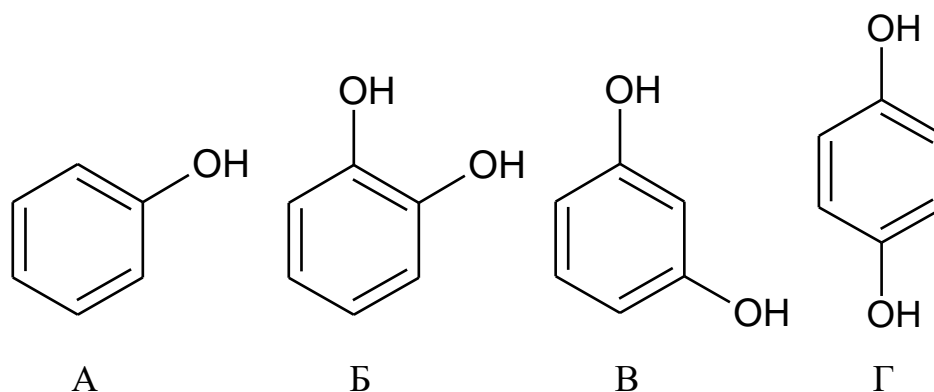


Рис. 5. А – фенол, Б – пірокатехін, В – резорцин, Г - гідрохінон

Характерною ознакою фенолів є їх здатність до модифікацій молекули, а також утворення кон'югатів з різноманітними речовинами. Наразі феноли можуть зв'язуватися з цукрами, органічними кислотами, амінами, алкалоїдами, ізопреноїдами – внаслідок чого утворюється величезна кількість сполук. Тривалий час фенольні сполуки вважали кінцевими продуктами метаболізму рослин. Однак, експериментально доведено, що вищим рослинам притаманна здатність до окиснення фенолів, внаслідок чого відбувається редукція бензольного кільця з утворенням продуктів первинного обміну речовин аж до утворення CO_2 . Значна кількість фенолів бере участь у первинному обміні речовин (пластохінон, убіхінон - у процесах фотосинтезу, дихання), проте більшість фенольних сполук – біологічно активні сполуки вторинного метаболізму. Фенольні сполуки, в основному, накопичуються в листках та корі (деревних та чагарникових форм рослин) разом з іншими сполуками вторинного обміну речовин. Також фенольні сполуки накопичуються у насінні, де запобігають окисненню ненасичених жирних кислот. В організмі людини і тварин ароматичні кільця не синтезуються, а надходять разом з рослинною

їжею та включаються до складу багатьох життєво необхідних фенольних сполук – адреналіну, тироксину, серотоніну та ін. Саме тому феноли – важлива складова харчового раціону людини.

Класифікація фенольних сполук. За будовою вуглецевого скелету феноли класифікують на:

C_6 – прості феноли (наприклад, пірокатехін), бензохінон;

C_6-C_1 – фенольні кислоти (ванілінова, *n*-гідроксибензойна, протокатехова, галова, саліцилова);

C_6-C_2 – ацетофенон, фенілоцтові кислоти, фенолоспирти (саліциловий спирт, ванільний альдегід);

C_6-C_3 – гідроксикоричні кислоти, гідроксикоричні спирти, фенілпропени, кумарини, ізокумарини, хромони;

C_6-C_4 – нафтохінони (вітамін К – філохінон);

$C_6-C_1-C_6$ – ксантони, бензофенони;

$C_6-C_2-C_6$ – стильбени, антрахінони;

$C_6-C_3-C_6$ – флавоноїди, ізофлавоноїди;

$(C_6-C_3)_2$ – лігнани, неолігнани;

$(C_6-C_3-C_6)_2$ – біофлавоноїди;

$(C_6-C_3)_n$ – лігніни,

$(C_6)_n$ – катехіни, меланіни,

$(C_6-C_3-C_6)_n$ – конденсовані дубильні речовини.

Феноли також класифікують за кількістю ароматичних кілець у молекулі та хімічною природою структурних елементів, які поєднують ці кільця.

Функції фенольних сполук. Фенольні сполуки наявні у всіх тканинах рослин, різноманітні як за своєю структурою, так і за функціями. У залежності від структури, фенольні сполуки мають різну біологічну активність і відіграють певну роль у рослинному організмі. Позаяк не всі функціональні аспекти їхнього фізіологічного впливу остаточно з'ясовано. Основними функціями фенольних сполук є:

- *структурна та захисна* (лігнін, суберин – компоненти клітинних стінок запобігають проникненню патогенів, втратам води; флавоноїди здатні до комплексоутворення з йонами важких металів; ксантони запобігають руйнації клітинних структур активними формами кисню, тощо);
- *фотопротекторна* (антоціани – знижують ризик фотоокиснювальних пошкоджень клітини за рахунок зменшення кількості активних форм оксисену);
- *сигнальна* (флавоноїди аригенін і лютеолін беруть участь у формуванні бульбочок у бобових рослин; саліцилова кислота запускає процес термогенезу при цвітінні ароїдних, реакцію надчутливості при пораненнях та проникненні патогенів);
- *регуляторна* (впливають на синтез гормонів-активаторів росту, впливають на проникність мембран);
- *алелопатична* (забезпечують хімічну взаємодію рослин в екосистемі).

Біосинтез фенольних сполук. На сьогодні відомо два шляхи біосинтезу фенольних сполук (рис. 6): шикиматний (з утворенням шикімової кислоти) і ацетатно-малонатний. Вихідними сполуками у шикиматному шляху є фосфоенолпіровиноградна кислота і еритрозо-4-фосфат, які утворюються відповідно у гліколізі і у пентозофосфатному шунті. Шикиматний шлях біосинтезу здійснюється у хлоропластах, а необхідний фосфоенолпіруват (ФЕП) транспортується у хлоропласти специфічним трансмембранним переносником (ФЕП-фосфатним-транслокатором). Встановлено, що деякі ізоформи ферментів шикиматного шляху локалізовані у цитозолі. Проте, їхня активність є нижчою, ніж у ізоформ, локалізованих у пластидах. Наявність повного шикиматного шляху в цитозолі наразі є предметом дискусії. Шикиматний шлях є також джерелом утворення важливих амінокислот – фенілаланіну і тирозину. Оскільки сумарна кількість фенольних сполук становить значну частку від загальної маси клітин (у деяких рослин до 50% маси сухої речовини), шикиматний шлях можна вважати одним із ключових біосинтетичних шляхів у рослин.

Ацетатно-малонатний шлях біосинтезу фенольних сполук спряжений з синтезом полікетометиленових попередників. Вихідним продуктом цього шляху є ацетил-КоА. За дії карбоксилази і АТФ у присутності йонів Mn^{2+} ацетил-КоА перетворюється в малоніл-ацетил-КоА. Таким чином при поступовому нарощуванні карбонового ланцюга виникає полі- β -кетометиленовий ланцюг, подальша циклізація якого призводить до утворення різноманітних фенольних сполук. Ацетатно-малонатний шлях біосинтезу фенольних сполук широко розповсюджений у грибів, лишайників і мікроорганізмів (бактерій). У рослин він зазвичай реалізується у поєднанні з шикиматним шляхом при біосинтезі флавоноїдів.

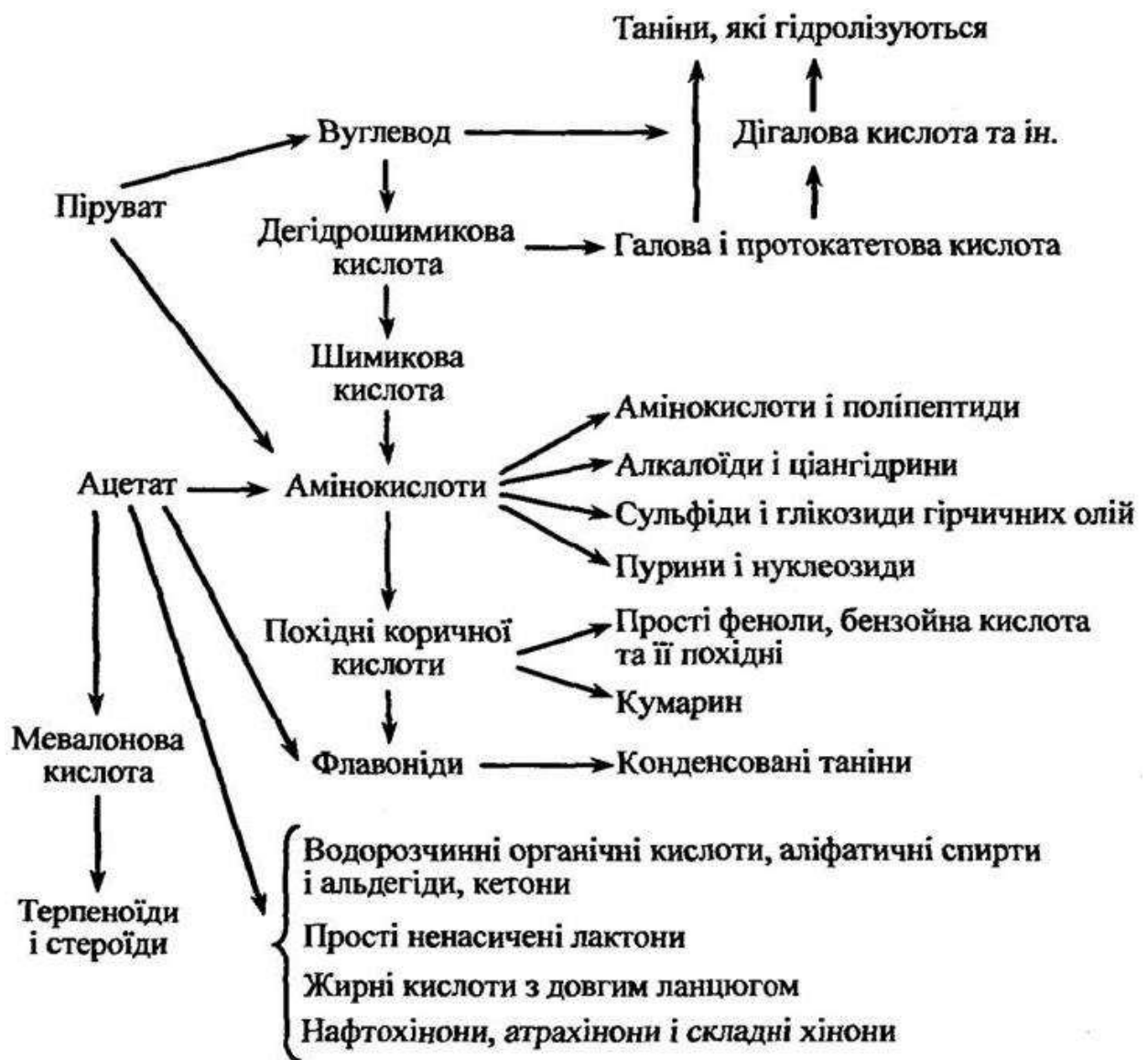


Рис. 6. Шляхи біосинтезу фенольних сполук.

Лабораторна робота № 2. Визначення загального вмісту фенольних сполук

Загальний вміст фенольних сполук визначають модифікованим методом Фоліна-Чокальтеу. Поліфенольні сполуки окснюються реактивом Фоліна-Чокальтеу, до складу якого входить суміш фосфорно-вольфрамової ($H_2PW_{12}O_{40}$) та фосфорно-молібденової ($H_3PMo_{12}O_{40}$) кислот, які наразі відновлюються до окису вольфраму (W_8O_{23}) блакитно-синього кольору та окису молібдену (Mo_8O_{23}). Адсорбція розчину за довжини хвилі 765 нм пропорційна вмісту фенольних сполук. У розрахункову формулу визначення вмісту суми фенольних сполук вводять коефіцієнт, розрахований за калібрувальною кривою поліфенольного стандарту (за галовою кислотою).

Мета роботи: провести порівняльний аналіз вмісту фенольних сполук у рослинній сировині чаю різного ступеня ферментації.

Реактиви: 96% етанол; реактив Фоліна-Чокальтеу, Na_2CO_3 , дистильована вода.

Приготування робочих розчинів:

- 1) реактив Фоліна-Чокальтеу, розвести у співвідношенні 1:10;
- 2) 7,5 % розчин Na_2CO_3 (75 г Na_2CO_3 розчинити в 1 л води).

Обладнання: ваги, порцелянові ступки з товчачиками, шпателі, пробірки з корками, мірні колби місткістю 0,1–1 л, хімічні стакани, дозатори, скляні піпетки, спектрофотометр, кювети з товщиною шару 1 см.

Рослинний матеріал: повітряно-суха рослинна сировина (чай чорний, зелений, білий).

Хід роботи:

1. Наважку (25-50 мг) повітряно-сухої рослинної сировини розтерти у порцеляновій ступці зі скляним порошком.
2. Розтертий матеріал перенести у пробірки, додати 1 мл етанолу, пробірки закрити корками та залишити у холодильнику для екстракції речовин впродовж 24 год.

3. Дозатором відібрати 0,2 мл надосадової рідини, додати 1,8 мл етанолу (розведення 1:10). Суміш у пробірці ретельно перемішати.
4. Відібрати 0,2 мл суміші, додати 2 мл робочого реактиву Фоліна-Чокальтеу та 2 мл розчину Na_2CO_3 ; експонувати впродовж 1 год.
5. Приготувати розчин для оптичного контролю: до 0,2 мл етанолу додати 2 мл робочого реактиву Фоліна-Чокальтеу та 2 мл розчину Na_2CO_3 .
6. Визначити оптичну густину дослідних розчинів відносно оптичного контролю за довжини хвилі 765 нм.
7. Обчислити загальний вміст фенольних сполук у досліджуваних зразках за формулою:

$$A = \frac{A k \times 100 \times 25 \times 100}{540 \times m \times (100 - W) } ,$$

де:

A – абсорбція досліджуваного розчину;

m – маса наважки сировини, г;

540 – коефіцієнт питомого поглинання розчину кислоти реактиву при довжині хвилі 765 нм;

W – втрата в масі при висушуванні сировини, %

8. Зробити висновки щодо впливу ступеня ферментації чаю на вміст фенольних сполук.

Питання для самоперевірки:

1. Схарактеризуйте функції фенольних сполук у метаболізмі рослин.
2. Чи пов'язані процеси первинного обміну у рослин з синтезом фенольних сполук?
3. Які фактори впливають на інтенсивність накопичення фенольних сполук у рослинах?
4. У чому полягає суть методу визначення фенольних сполук з використанням реактиву Фоліна-Чокальтеу?
5. Які методи визначення фенольних сполук Вам відомі?

6. Поясніть, як змінюється компонентний склад фенольних сполук під час ферментації чаю.
7. Наведіть рекомендації щодо вживання чаю різного ступеня ферментації.

Лабораторна робота № 3. Визначення вмісту ксантонів

Ксантони – клас фенольних сполук, що мають в складі своєї структури дібензо-у-пірон (рис.5.А.). Назва ксантонів походить від грецького *xanthos*, що означає жовтий, так як природні похідні ксантону мають жовте або кремове забарвлення. На сьогоднішній день відомо близько 300 ксантонів рослинного походження. Особливо широко поширені 3-глікозиди мангіферину і ізомангіферину. Ксантони погано розчиняються у воді, розчинні в спирті, ацетоні, етилацетаті, нерозчинні в хлороформі, діхлоретані. Молекули всіх ксантонів плоскі, каркас складається з двох бензойних кілець, що пов'язані між собою за допомогою карбонільної групи та кисню. Кожне кільце зв'язане у міцну сполуку, що не допускає вільного обертання між атомами карбону. До каркасу можуть прикріплюватися різні замісники, які дозволяють кожному ксантону здійснювати свою специфічну функцію. Можуть перебувати у вигляді димерів.

Ксантони класифікують на 5 груп (рис. 7.А-Е):

- 1) власне ксантони – це дібензо- γ -пірони, заміщені в положеннях 1–8 окси-, алкокси-, алкільними групами, С- і О-глікозильними залишками й атомами хлору (А); За кількістю замісників власне ксантони поділяються на моно-, ди-, три-, тетра-, пента-, гекса-, гепта- і октазаміщені. Найчастіше зустрічаються три- та чотиризаміщені сполуки.
- 2) пірано- і дигідропіраноксантони лінійні й ангулярні:
 - лінійні піраноксантони (Б);
 - ангулярні дигідропіраноксантони (В);
- 3) дипіраноксантони (Г);
- 4) ксантолігноїди (Д);
- 5) фураноксантони (Е).

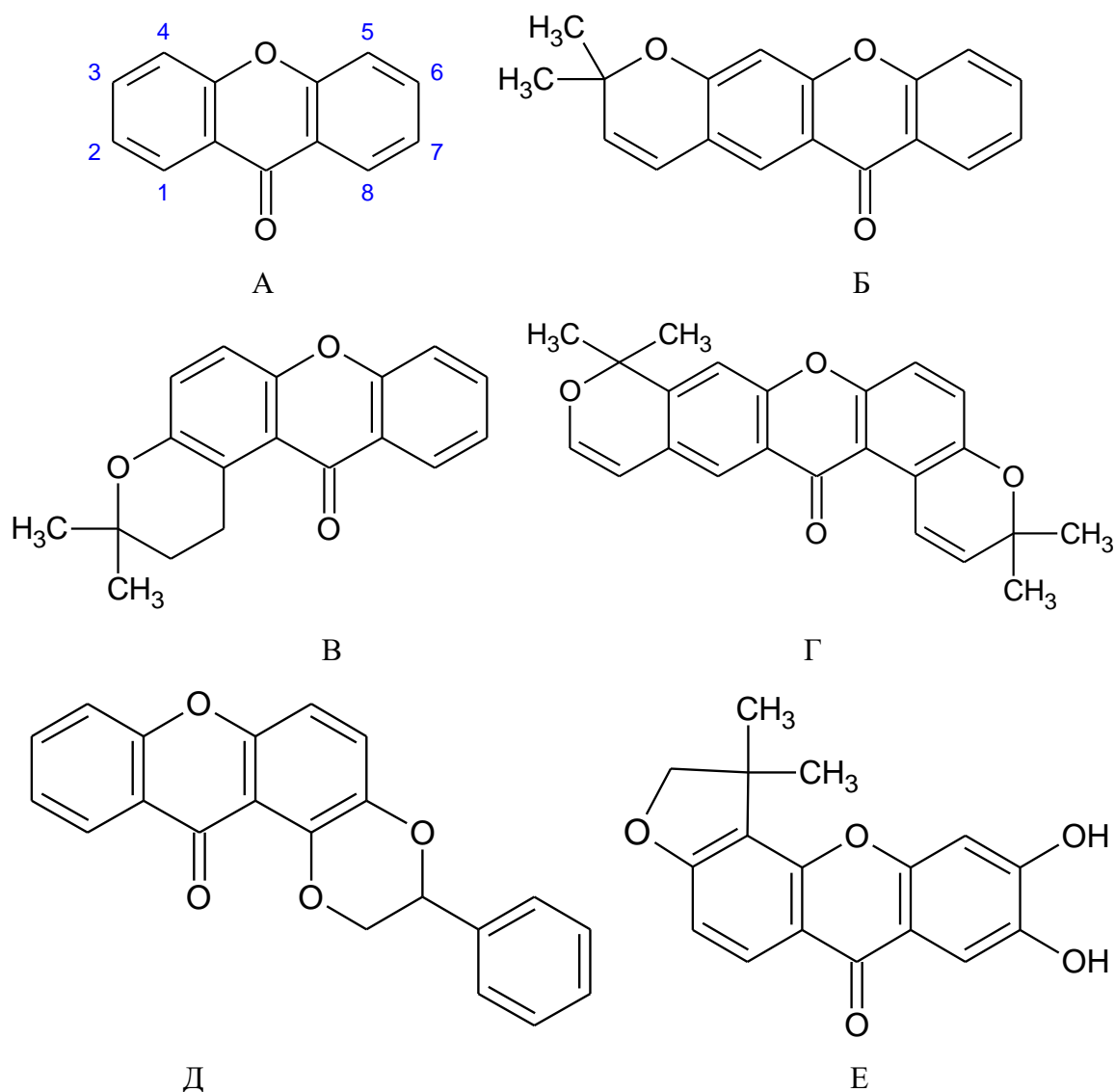


Рис.7. Будова ксантонів різних груп

Будова ксантонів дозволяє змінювати концентрацію кисню в клітині, захищати вразливі ділянки й реакційні центри, і постачати кисень при його загальному дефіциті. Дослідження виявили антимікробні властивості ксантонів, а також їх антивірусну, протигрибкову і антипаразитарну ефективність. У 2002 році при дослідженнях *in vitro* було виявлено, що ксантон гарціон Е, перевершує за своєю антираковою дією шість найсильніших хімотерапевтичних засобів, в тому числі цисплатин, метатрексат і мітоксантрон. Антиоксидантна активність ксантонів, вище, ніж у вітаміну Е і селену приблизно в 50 разів і в 20 разів сильніше, ніж у вітаміну С. Ксантони дезактивують вільні радикали та інші продукти перекисних процесів, надають протиалергенну, протизапальну,

протипухлинну дію, сприяють виведенню шлаків і токсинів, стабілізують клітинні мембрани і перешкоджають старінню клітин.

До сьогоднішнього дня масовий збір лікарських рослин як сировини, що є джерелом ксантонів, деструктивно впливає на видовий склад природних фітоценозів. Так, види рослин, що інтенсивно накопичують ксантони, з родин *Gentianaceae*, *Hypericaceae* та ін. вже мають статус рідкісних і зникаючих. Тому інтенсивно ведеться пошук альтернативних джерел цих речовин. Зокрема використовують високопродуктивні культури рослинних тканин *in vitro*. В якості додаткових джерел ксантонів, в такому разі, можуть бути також використані живильні середовища, на яких культивували *in vitro*-рослини, корені яких, як відомо, під час вирощування, виділяють вторинні метаболіти, в тому числі широкий спектр фенольних сполук.

Мета роботи:

- 1) Провести порівняльний аналіз вмісту ксантонів в органах лікарських рослин.
- 2) Дослідити динаміку накопичення ксантонів в агаризованому живильному середовищі, на якому вирощували *in vitro*-рослини.

Реактиви: 70 % етанол, 60 % етанол, 40 % оцтова кислота.

Обладнання: ваги, порцелянові ступки з товчачиками, шпателі, мірні пробірки, дозатори, термостійкі конічні колби 100 мл зі зворотними холодильниками, водяна баня, фільтри Шота, папір та камера для хроматографії, УФ-лампа, ножиці, спектрофотометр, центрифуга (2000 об./хв), центрифужні пробірки з кришками.

Матеріали:

- 1) органи (пагони, листки, корені) лікарських рослин (аір, звіробій, алое, золотий вус).
- 2) агаризоване живильне середовище на якому вирощували *in vitro*-рослини впродовж 2, 4 та 6 місяців.

Хід роботи 1:

Отримання екстрактів ксантонів із рослинного матеріалу:

1. Наважку 0,1-0,3 г сирого рослинного матеріалу розтерти у порцеляновій ступці із невеликою кількістю 70 % етанолу.

2. Додати до гомогенату 70 % етанол і кількісно перенести у термостійкі конічні колби (об'ємом 100 мл) зі зворотними холодильниками так, щоб загальний об'єм екстракту не перевищував 4-5 мл.

3. Екстрагувати на киплячій водяній бані 3 год.

4. Охолоджений екстракт відфільтрувати через фільтр Шота у термостійкі колби; внести у фільтр Шота порційно (по 0,3-0,5 мл) 70 % етанол кілька разів поки розчин, що скраплюється з фільтру, не стане безбарвним; фільтрати об'єднати.

5. Термостійкі колби з отриманим сумарним фільтратом помістити на водяну баню й упарити вміст досуха.

У разі потреби охолоджені колби із сухим залишком герметично закрити гумовими пробками і залишити на добу за температури 3-7 °С.

6. Додати до сухого залишку 0,5-1 мл 70 % етанолу (для кращого розчинення залишку колби можна підігріти до 60 °С).

7. Для проведення паперової хроматографії висхідним способом на хроматографічному папері, позначити лінію старту на відстані 1 см від нижнього краю; отриманий екстракт поетапно нанести на позначену лінію (при цьому на кожному етапі до кінця висушити пляму); тричі невеликими порціями (0,1-0,2 мл) 70 % етанолу змити залишки екстракту з колби, нанести на лінію старту.

8. Хроматографію висхідним способом провести у малій хроматографічній камері, використовуючи 40 % оцтову кислоту в якості рухомої фази (час, необхідний для проведення 1 хроматографії на папері 8×11 см, становить 15-20 хв. за нормальних умов).

9. Висушити хроматограми, помістити під ультрафіолетове опромінення, яскраво-оранжеві плями ксантонів обвести олівцем.

Висушені хроматограми можна зберігати впродовж доби за нормальних умов.

10. Вирізати обведені ділянки, подрібнити, помістити у пробірки і додати по 4 мл 60 % етанолу, пробірки герметично закрити гумовими пробками і залишити їх на 6 год.

11. У разі насиченого яскраво-помаранчевого забарвлення отриманих елюатів (що свідчить про високу концентрацію ксантонів у досліджуваному рослинному матеріалі), їх необхідно розвести 60 % етанолом, а потім кратність розведення врахувати під час розрахунків.

12. Отримані елюати використати для проведення спектрофотометричного аналізу (діапазон довжин хвиль, використаних під час аналізу: 200-400 нм (табл. 1).

Таблиця 1.

Максимуми поглинання розчинів ксантонів в етанолі

№	Назва ксантону	Довжина хвилі
1	Mangostenol	243, 319, 358
2	Mangostenone A	285, 344
3	Mangostenone B	293, 334, 366
4	α -Mangostin	223; 243,3; 280,4; 316,5
5	1-гідрокси-2,3,4,5-тетраметоксиксантон	260 \pm 1
6	1-гідрокси-2,3,5-триметоксиксантон	257 \pm 2
7	Sverciaperenin (1,8-дигідрокси-3,7-диметоксиксантон)	241, 266, 312, 328, 386
8	-окси-4,6,8-триметоксиксантон	238, 256, 281, 303, 305
9	Dekusatin (1-окси-3,7,8-триметоксиксантон)	243, 262, 312, 380
10	Sverhirin (1,8-дигідрокси-3,5-диметоксиксантон)	238, 253, 277, 303, 333
11	Mangiferin	319

13. Для обчислення вмісту ксантонів в 1г сирого рослинного матеріалу використати формулу:

$$C = \frac{D \times z \times 10}{P \times l \times Mr \times E} ,$$

де:

C – вміст ксантонів у рослинному матеріалі,%;

D – оптична густина досліджуваного розчину;

Mr – молекулярна маса ксантону;

l – товщина кювети, см;

E (1%)!1cm- питомий коефіцієнт поглинання ксантону (використовують коефіцієнт для мангіферину 295 в якості базового);

P – наважка рослинного матеріалу, г;

z - коефіцієнт розведення (див. пункт 11).

14. Зробити висновки щодо накопичення ксантонів в органах лікарських рослин.

Хід роботи 2:

Отримання екстрактів ксантонів із живильного середовища:

1. Підготувати центрифужні пробірки у кількості, що відповідає кількості варіантів – підібрати пари за вагою.

2. Наважку 0,5 г живильного середовища розтерти у порцеляновій ступці.

2. Кількісно, з використанням малих доз етанолу, перенести гомогенат у центрифужну пробірку.

Зерніть увагу! Загальний об'єм етанолу на кожний варіант – 3 мл!

3. Ретельно перемішати, закрити кришкою і помістити на холод на 1 добу (за температури 5 °С).

4. Перемішати і центрифугувати 10 хв. при 2000 об./хв.

5. Супернатант обережно відібрати у термостійку конічну колбу (об'ємом 100 мл).

6. До осаду, що залишився в центрифужній пробірці, додати ще 1 мл 70 % етанолу, перемішати і центрифугувати 10 хв.

7. Отриманий супернатант відібрати й об'єднати з попереднім екстрактом (процедуру повторити ще 2 рази).

8. Термостійку колбу з отриманим сумарним супернатантом помістити на водяну баню й упарити вміст до об'єму 0,5-1 мл.

9. Кількісне визначення ксантонів провести за допомогою паперової хроматографії, як описано в ході роботи 1, пункти 7-13.

Зробити висновки щодо динаміки накопичення ксантонів в агаризованому живильному середовищі, на якому вирощували *in vitro*-рослини.

Питання для самоперевірки:

1. Які речовини називають ксантонами, схарактеризуйте особливості їхньої будови.
2. Поясніть, чому ксантони відносять до фенольних сполук.
3. Схарактеризуйте розчинність ксантонів та їхній стан в рослинній клітині.
4. На які групи поділяють ксантони?
5. Яка роль ксантонів для рослин?
6. Чому ксантони використовують, як фармакологічно-цінні речовини?
7. Які джерела природних ксантонів ви знаєте?
8. Поясніть чому і які саме речовини виділяють корені рослин в середовище. Яка роль цих речовин?

Лабораторна робота № 4. Визначення вмісту антоціанів спектрофотометричним методом.

Антоціани – сполуки класу флавоноїдів ($C_6-C_3-C_6$), водорозчинні непластидні пігменти рослин, що зумовлюють забарвлення квітів, плодів і листків від рожевого до чорно-фіолетового кольору. Антоціани – це глікозиди, агліконами яких є антоціанідини, у гетероциклічному кільці яких наявний чотиривалентний кисень (оксоній) і вільна позитивна валентність (рис. 8.).

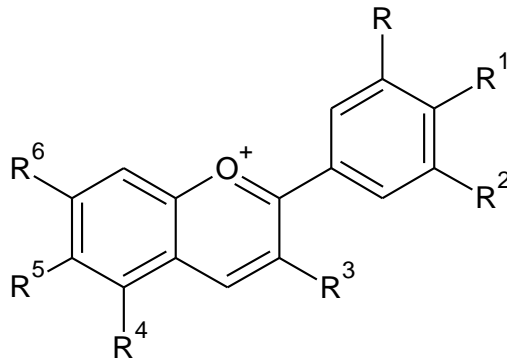


Рис.8. Загальна структура антоціанів

Завдяки вільному позитивному заряду антоціанідини у середовищі $\text{pH} < 7$ утворюють солі з кислотами, а у лужному середовищі – солі з основами. Наразі відомо понад 20 антоціанідинів (ціанідин, пеларгонідин, дельфінідин, мальвідин), серед яких найбільш поширеним є ціанідин. Глікозиди ціанідину входять до складу барвних речовин плодів вишні, сливи, суниць, винограду, брусниці тощо.

Визначення вмісту антоціанів здійснюють спектрофотометричним методом. Оптичну густину вимірюють за довжини хвилі 510 нм, що відповідає максимуму поглинання ціанідину – домінуючого компонента суми антоціанідинів. Для кількісного визначення вмісту антоціанів використовують питомий показник поглинання ціанідин-3,5-диглікозиду в 1% водному розчині соляної кислоти. Вимірюючи оптичну густину отриманих екстрактів за довжини хвилі 657 нм, у розрахункову формулу вносять поправку на вміст пластидних пігментів (хлорофілів).

Мета роботи: порівняти сумарний вміст антоціанів у плодах різних видів рослин.

Реактиви: соляна кислота (HCl), дистильована вода.

Обладнання: ваги, порцелянові ступки з товчачиками, шпателі, термостійкі колби місткістю 50 мл, мірні циліндри, водяна баня, спиртовий термометр, хімічні стакани, пляшки для зберігання розчинів, дозатори, скляні піпетки, центрифужні пробірки, центрифуга, спектрофотометр, кювети з товщиною шару 10 см.

Рослинний матеріал: свіжі та заморожені плоди вишні, сливи, винограду.

Хід роботи:

1. Наважку (175 мг) рослинної сировини розтерти у порцеляновій ступці, додаючи 10 мл 1 % розчину соляної кислоти.
2. Суміш перенести у термостійку колбу, місткістю 50 мл.
3. Вміст колби експонувати на водяній бані за температури 40-45°C протягом 20 хв.
4. Отриманий екстракт перенести у центрифужні пробірки, суміш центрифугувати 25 хв за 4000 об/хв.

Зверніть увагу! Перед центрифугуванням пробірки необхідно урівноважити.

5. За допомогою піпетки відібрати надосадову рідину, визначити оптичну густину розчину за довжин хвиль 530 і 657 нм в кюветі з товщиною шару 1 см. Оптичний контроль – 1 % розчин соляної кислоти.
6. Сумарний вміст антоціанів (%) обчислити за формулою:

$$X = \frac{(D_{530} - D_{657}) \cdot M \cdot k \cdot V}{\varepsilon \cdot l \cdot m} \cdot 100\% , \text{ де}$$

D_{530} - оптична густина розчину за довжини хвилі 530 нм;

D_{657} - оптична густина розчину за довжини хвилі 657 нм;

M – молекулярна маса ціанідину (449,2 г/моль);

k – розведення ($k=1$);

V – об'єм екстракту, взятого для аналізу (10 мл);

ε – коефіцієнт для перерахунку, питомий показник поглинання ціанідинглікозиду ($\varepsilon = 26\,900 \frac{1}{\text{см} \cdot \text{моль}}$);

l – товщина кювети, см;

m – маса рослинної сировини, мг.

7. Зробити висновки про зміни вмісту антоціанових пігментів у плодах рослин різних видів за умов зберігання.

Питання для самоперевірки:

1. Схарактеризуйте сполуки класу флавоноїдів.
2. Яка відміна між антоціанами і антоціанідинами? Які з названих сполук частіше зустрічаються у рослин?
3. Яка особливість будови антоціанідинів обумовлює їх здатність утворювати солі з кислотами та основами?
4. Як впливає рН розчину на хімічну активність антоціанідинів?
5. Від чого залежить забарвлення антоціанідинів?
6. Що таке копігментація? Чи враховано явище копігментації при виконанні лабораторної роботи?
7. Для чого у розрахункову формулу визначення антоціанів вводили коефіцієнт для перерахунку?

Тема 4. АЛКАЛОЇДИ ТА ЇХНІ ПОХІДНІ

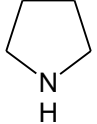
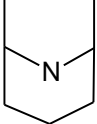
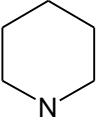
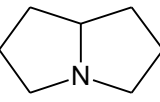
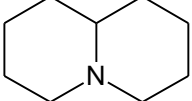
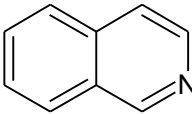
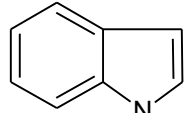
Загальна характеристика. Алкалоїди – гетерогенна група азотовмісних гетероциклічних сполук, яким притаманна висока біологічна активність. Алкалоїди – вторинні метаболіти, які найбільш поширені серед покритонасінних, зокрема у дводольних рослин. У клітинах рослин переважно накопичуються у водорозчинній формі солей яблучної, винної, лимонної кислот. З водних розчинів алкалоїди осаджуються дубильними речовинами, солями важких металів, йодидами, позаяк це обумовлює їх несумісність у лікарських препаратах.

У вільному вигляді алкалоїди – це органічні основи, які нерозчинні (слабкорозчинні) у воді проте легкорозчинні в органічних розчинниках – спирті, ефірі, хлороформі й слабких розчинах кислот. Навпаки, солі алкалоїдів розчинні у воді та спирті (у інших органічних розчинниках нерозчинні). Інші реакції, що характеризують певні алкалоїди, залежать від їх хімічної будови й наявності в молекулі функціональних груп.

Вміст алкалоїдів в тканинах рослин незначний і складає від 0,01 до 3%, за винятком хінного дерева – до 20 %. Цікавим є те, що дослідження показали наявність певних груп алкалоїдів у рослин-представників систематично далеких родин рослин.

Класифікація алкалоїдів. Так як алкалоїди – найбільш гетерогенна група речовин вторинного обміну, існує декілька підходів щодо їхньої класифікації. За хімічною будовою їх класифікують на: справжні алкалоїди (містять азот в гетероциклі): протоалкалоїди (містять азот не в гетероциклі, синтезуються з амінокислот); та ізопреноїдні псевдоалкалоїди (синтезуються не з амінокислот, стероїдні та терпеноїдні алкалоїди). Біохімічна класифікація ґрунтується на особливостях біосинтезу алкалоїдів, зокрема за типом вихідної для біосинтезу амінокислоти (похідні *L*-орнітину; *L*-лізину; *L*-триптофану; *L*-фенілаланіну; антранілової кислоти; *L*-тирозину; гістидину).

Найбільшу групу алкалоїдів – справжні алкалоїди, класифікують за принципом, в основі якого лежить будова нітрогенвмісного циклу (табл. 2).

Тип алкалоїдів	Структура	Попередник	Приклад
Піролідини		Орнітин	Нікотин
Похідні тропану		Орнітин	Атропін, кокаїн
Група піперидину		Лізін або ацетат	Коніїн
Група піролізидину		Орнітин	Ретрорсин
Група хінолізидину		Лізін	Лупінін
Ізохіноліни		Тирозин	Кодеїн, морфін
Похідні індолу		Триптофан	Стрихнін, резерпін

Серед наведених груп найбільш чисельною є група похідних індолу, що налічує більш ніж тисячу сполук. Індольні алкалоїди переважно синтезуються рослинами тропіків та субтропіків, високотоксичні, широко застосовуються у медицині.

Функції алкалоїдів. Тривалий час алкалоїди вважали кінцевими продуктами обміну речовин, однак на сьогодні доведено, що вони є активними учасниками метаболічних процесів, а їхнє виключно важливе значення в обміні речовин не викликає жодних сумнівів. Зокрема, алкалоїди:

– накопичуються у різних органах рослин, є запасною формою нітрогену;

- є транспортною формою нітрогену;
- регулюють рН клітинного соку, зв'язуючись з органічними кислотами;
- беруть участь у підтримці йонного балансу (здатні до утворення хелатних комплексів);
- регулюють активність деяких ферментів;
- підвищують стійкість рослин до дії патогенів;
- захищають від поїдання фітофагами;
- впливають на морфо- та органогенез рослин.

Біосинтез алкалоїдів. Синтез алкалоїдів здійснюється в пластидах, або в цитозолі чи ендоплазматичному ретикулюмі. У біосинтезі різних алкалоїдів задіяна значна кількість вихідних сполук. Біогенетичними попередниками більшості алкалоїдів є амінокислоти: орнітин, лізин, фенілаланін, тирозин, триптофан, гістидин, аспарагінова і антранілова кислоти. Основними реакціями біосинтезу в більшості випадків є декарбоксілювання, окисне дезамінування або переамінування амінокислот чи їхніх амінів, первинне метилювання, трансметилювання, а також циклізація аліфатичних вихідних сполук до гетерокарбоциклічних сполук. Виключно важливе значення у синтезі алкалоїдів мають реакції метилювання. Вони здійснюються на етапі циклізації молекули, стабілізуючи її структуру. На наступних етапах біосинтезу алкалоїдів відбуваються процеси конденсації, внаслідок яких окремі кільця, сполучаючись один з одним, утворюють більш складні структури. Крім циклізації і конденсації, здійснюються також внутрішньо молекулярні перегрупування з утворенням нових С–С- та С–N-зв'язків спряжені з включенням функціональних груп і замісників на різних етапах метаболізму.

Таким чином, початкові етапи біосинтезу більшості алкалоїдів є подібними, позаяк заключні – характеризуються значною різноспрямованістю ферментативних перетворень, наслідком яких є виникнення у природі різноманітних структурних типів рослинних алкалоїдів.

Лабораторна робота № 5. Визначення вмісту кофеїну в рослинному матеріалі

Кофеїн (1,3,7-триметилксантин) – алкалоїд, накопичується у листках та бобах кавового дерева, чаю, мате, ягодах гуарани, а також у невеликих кількостях у какао та горіхах коли.

Хімічночистий кофеїн це безбарвна з гірким смаком кристалічна речовина, без запаху, за структурною будовою гетероциклічний алкалоїд пуринового ряду (рис. 9). Добре розчинний у хлороформі, погано розчинний у холодній воді (1:60), легко - в гарячій (1:2), важко розчинний в етанолі (1:50). Розчини мають нейтральну реакцію. Вперше добутий з кавового екстракту в 1821 році.

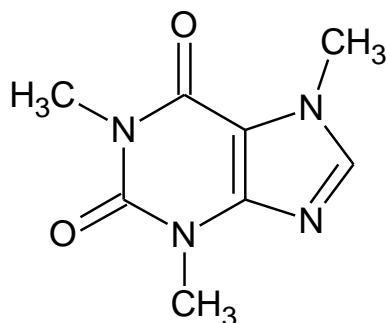


Рис. 9. Будова кофеїну

У рослиному організмі кофеїн відіграє роль природнього пестициду, який паралізує та вбиває комах-фітофагів.

Кофеїн є стимулятором центральної нервової системи (ЦНС); дослідження показують, що кофеїн підсилює процеси збудження в корі головного мозку, у відповідних дозах він підсилює позитивні умовні рефлексії і підвищує рухливу активність. Стимулююча дія призводить до підвищення розумової та фізичної працездатності, зменшення втоми та сонливості. Великі дози призводять до виснаження нервових клітин. Серцева діяльність під дією кофеїну підсилюється, серцеві скорочення стають більш інтенсивні та частіші. Під дією кофеїну підсилюється секреторна діяльність шлунку. Симптоми отруєння надлишковими дозами кофеїну як психологічні, так і фізіологічні: неспокій, нервовість, збудливість, безсоння, диурез, посмикування м'язів, непослідовні думки і мова, параноя, аритмія серця, тахікардія, підвищений кров'яний тиск,

частий пульс. У виняткових випадках може спостерігатись манія, депресія, дезорієнтація, галюцинації, психози.

Мета роботи: визначити вміст кофеїну у рослинному матеріалі.

Реактиви: дистильована вода, хлороформ, кристалічний медичний кофеїн.

Обладнання: порцелянові ступки з товчачиками, лійка, пензлик, мірна термостійка колба на 100 мл, водяна баня, паперовий фільтр, пробірки з пробками, дозатори на 0,1-1,0 мл.

Рослинний матеріал: висушені та свіжі листки лікарських рослин, різні сорти чаю та кави.

Хід роботи:

1. Наважку рослинного матеріалу (для сухого матеріалу беруть 1 г, для свіжого – 4 г) ретельно розтерти в ступці, кількісно перенести у мірну термостійку колбу на 100 мл (для повного перенесення сухого матеріалу – користуватися пензликом, у разі дослідження свіжого рослинного матеріалу – тричі змити ступку дистильованою водою по 1 мл, поєднати з основним гомогенізатором).

2. Обережно порціями додати в колбу 80 мл киплячої дистильованої води, поставити на водяну баню на 1 годину.

3. Охолоджений до кімнатної температури екстракт довести дистильованою водою до мітки 100 мл, ретельно перемішати.

4. Фільтрувати через паперовий фільтр.

5. Для визначення вмісту кофеїну 0,1 – 0,5 мл фільтрату (в залежності від вмісту кофеїну в рослинному матеріалі, врахувати при побудові калібрувального графіка) помістити в пробірку, додати 5 мл хлороформу, щільно закрити корком. Енергійно струшувати впродовж 10 хвилин.

6. Залишити закупорену пробірку з екстрактом на 1 годину для відстоювання емульсії (в разі повільного відстоювання, термін можна подовжити до 2 год.).

7. Прозорий верхній шар дозатором обережно зібрати в спектрофотометричну кювету.

Увага! Не дозволяйте потрапляти краплинам води в хлороформну фазу!

8. Визначити оптичну густину хлороформного екстракту кофеїну на спектрофотометрі при довжині хвилі 275 нм.

9. Побудувати калібрувальний графік, використовуючи медичний кофеїн. Для цього взяти наважки 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 та 50 мг кристалічного кофеїну, помістити у мірні термостійкі колби на 100 мл і виконати пункти 2-8.

10. Використовуючи калібрувальний графік визначити вміст кофеїну у досліджуваному матеріалі, зробити висновки.

Питання для самоперевірки:

1. Які речовини називають алкалоїдами?
2. За яким принципом та на які групи ділять алкалоїди?
3. Яка роль алкалоїдів в рослинному організмі?
4. Схарактеризуйте особливості біосинтезу алкалоїдів.
5. Схарактеризуйте речовину кофеїн.
6. Яка особливість будови кофеїну дозволяє віднести його до алкалоїдів?

ВИЗНАЧЕННЯ МАСИ СУХОЇ РЕЧОВИНИ У РОСЛИННОМУ МАТЕРІАЛІ

Матеріали та обладнання. рослинний матеріал; ножиці, аналітичні ваги, бюкси, сушильна шафа, ексікатор, щипці.

Хід роботи.

1. Вимити бюкси і висушити їх до постійної маси. Для цього відкриті бюкси витримати 60-90 хв. в шафі за 100-105 °С, потім охолодити їх в ексікаторі, закрити кришками і зважити на аналітичних вагах. Записати масу порожнього бюкса.

Зверніть увагу! Висушування і зважування бюксів повторювати доти, доки їх маса не стане сталою.

2. Наважку рослинного матеріалу (1-3-5 г) помістити в підготовлені бюкси.

Зверніть увагу! Сирий матеріал повинен лежати в бюксах пухко.

3. Бюкси з рослинним матеріалом зважити на аналітичних вагах. Записати масу бюкса з рослинним матеріалом.

4. Бюкси з рослинним матеріалом поставити відкритими в нагріту до 105 °С сушильну шафу на 5 год.

Зверніть увагу! Не можна витримувати рослинний матеріал в шафі без перерви понад 5 год. Бажано розмістити бюкси на одному рівні і не впритул до стінок шафи.

4. Бюкси закрити, перенести в ексікатор, охолодити і знову зважити.

Зверніть увагу! Брати бюкси слід щипцями, а не руками, тому що в останньому випадку маса буде змінюватись.

5. Досушування і зважування бюксів з рослинним матеріалом необхідно повторювати до досягнення постійної маси бюксів.

6. Розрахувати масу сухої речовини ($m_{\text{ср}}$) в 1 г рослинного матеріалу:

$$m_{\text{ср}} = m_{\text{к}} / m_{\text{п}}, \text{ де}$$

$m_{\text{к}}$ – маса висушеного рослинного матеріалу (г),

$m_{\text{п}}$ – маса сирого рослинного матеріалу (г).

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ БІЛКА ЗА М. BRADFORD

Принцип цього методу заснований на утворенні комплексів барвника кумасі блакитного з білками за рахунок електростатичної взаємодії. Максимум поглинання комплексу у видимій області не співпадає з максимумом поглинання для чистого барвника, що і дозволяє проводити кількісне визначення утворених комплексів.

Хід роботи

1. Приготувати робочі розчини.

Боратний буфер (pH = 10):

бура $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (м.м. 381,43 г)

0,05 М розчин бури: 19,07 г на 1 л (1,907 г на 100 мл)

0,2 М розчин NaOH: 8 г на 1 л (0,8 г на 100 мл)

Змішати обидва розчини в пропорції:

50 мл 0,05 М розчину бури

43 мл 0,2 М розчину NaOH

і довести об'єм до 200 мл дистильованою водою.

Розчин барвника:

10 мг кумасі (діамантовий голубий G-250),

5 мл 95%-вого етанолу,

10 мл 85%-вої H_3PO_4 – змішати і довести дистильованою водою до 100мл.

2. Побудувати калібрувальну криву.

Для побудови калібрувальної кривої використовують робочі розчини, які отримують шляхом розведення III-го стандартного розчину бичачого сироваткового альбуміну (БСА) з концентрацією 0,1 мг/мл. Цей розчин отримують із II-го стандартного розчину БСА з концентрацією 1 мг/мл. I-й вихідний стандартний розчин БСА містить 10 мг білка/мл.

Схема послідовності розведення стандартних робочих розчинів:

I-й вихідний стандартний розчин БСА, концентрація 10 мг білка/мл:

100мг БСА + 10мл буфера.

II-й стандартний розчин БСА, концентрація 1 мг білка/мл:

1мл I-го розчину + 9мл буфера.

III-й стандартний розчин БСА, концентрація 0,1 мг білка/мл:

1мл II-го розчину + 9мл буфера.

З III-го стандартного розчину БСА готують робочі розчини (таблиця 3).

Кінцевий об'єм робочого розчину становить 1мл.

Таблиця 3.

Приготування робочих розчинів

III-й стандартний розчин, мл	Вміст БСА в 1 мл робочого розчину, мкг	Буфер, мл	Концентрація робочого розчину, мкг/0,1 мл	Вміст БСА у 0,2 мл робочого розчину, мкг	Оптична густина робочого розчину, у. о.
0,1	10	0,9	1	2	
0,2	20	0,8	2	4	
0,3	30	0,7	3	6	
0,4	40	0,6	4	8	
0,5	50	0,5	5	10	
0,6	60	0,4	6	12	
0,7	70	0,3	7	14	
0,8	80	0,2	8	16	
0,9	90	0,1	9	18	
10	100	0	10	20	

Із робочих розчинів відібрати 0,2 мл у кювету СФ, додати 1 мл кумасі і виміряти оптичну густина через 1 хвилину на СФ за довжини хвилі 595 нм.

Побудувати калібрувальну криву за даними двох останніх колонок таблиці:

по осі ОУ – оптична густина робочого розчину (у. о.),

по осі ОХ – вміст білка в 0,2 мл робочого розчину, взятого для вимірювання на СФ (мкг).

3. До 0,1 мг подрібненого рослинного матеріалу додати 2 мл боратного буфера (рН = 10). Екстракцію білків проводити протягом однієї години, на холоді періодично помішуючи.

Зверніть увагу! Для кожного варіанта використовувати по три повторності для підвищення точності отриманих результатів.

4. Екстракт центрифугувати 15 хвилин при 12000 об/хв.

5. Відібрати 0,2 мл супернатанту у кювету СФ, додати 1мл розчину барвника кумасі і через 0,5-1 хвилину виміряти оптичну густину на СФ (довжина хвилі 595 нм). Вимірювання проводити проти контролю – 0,2 мл буфера + 1 мл кумасі.

6. Експериментальні результати отримані на СФ порівняти з даними калібрувального графіка.

7. Визначити вміст білка за формулою:

$$X = \frac{a \times V_{\text{заг}}}{V_{\text{досл}} \times m \times 1000},$$

де

X – вміст білка, мг/г сирової речовини,

a – концентрація білка за калібрувальним графіком, мкг/мл,

$V_{\text{заг}}$ – об'єм, в якому розчинена наважка, мл,

$V_{\text{досл}}$ – об'єм, взятий для дослідження, мл,

m – наважка рослинного матеріалу, г,

1000 – перерахунок з мкг/г на мг/г.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Пороннік О.О., Кузьменко А.В., Воловик А.В., Швачко Л.В., Войцехівська О.В., Мирюта Г.Ю., Рубан Т.А., Парнікоза І.Ю., Кунах В.А. Клоновані *in vitro* рослини роду *Deschampsia* як джерело фенольних сполук з протипухлинними властивостями // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 200-204.
2. Войцехівська О.В., Ситар О.В., Таран Н.Ю. Фенольні сполуки: різноманітність, біологічна активність, перспективи застосування // Вісник Харківського національного аграрного університету. Сер. Біологія. – вип. 1(34). – 2015. – С. 104-119. <http://knau.kharkov.ua/vsник-hnau-2015-vip-1.html>
3. Інноваційні підходи до викладання фізіології рослин у світлі сучасної європейської освіти/ Таран Н.Ю., Косик О.І., Панюта О.О., Войцехівська О.В., Смоля А.Л. Смірнов О.Є. // Гуманітарний вісник ДВНЗ «Переяслав-Хмельницький державний педагогічний університет імені Григорія Сковороди» - Додаток 1 до Вип. 36, Том ІV (64): Тематичний випуск «Вища освіта України у контексті інтеграції до європейського освітнього простору». -К.: Гнозис, 2015 – С. 448-456.
4. Voytsekhivskiy V., Tokar A., Smetanska I., Voytsekhyvska O. Dynamics of anthocyanins and ascorbic acid in exposure on drop and storage spirited strawberry juice from different varieties // SWorld journal. - Technical sciences, Ivanovo: Scientific world. – 2015. –P. 78-84.
<http://www.sworldjournal.com/e-journal/j21510.pdf>
5. Войцехівський В.І., Войцехівська О.В. Формування біологічно активних речовин плодів суниці садової за впливу природних та антропогенних факторів// Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур: матеріали V Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених і спеціалістів (с. Центральне, 21.04.2017 р.) / НААН, МПП ім. В. М. Ремесла, М-во аграр. політики та прод. України, Укр. ін-т експертизи сортів рослин, М-во освіти та науки України, БНАУ, НУБІП - Вінниця : ТОВ «Нілан-ЛТД», 2017. – С.27.

6. Войцеховский В.И, Сметанская И Н., Войцеховская Е.В. Изменения содержания полифенолов и аскорбиновой кислоты в черносмородиновых компотах, джемах и вареньях при хранении // Сб. науч. тр. Инновационные подходы и перспективные идеи молодых ученых в аграрной науке. – 2017. – С.170-174.
7. Войцехівський В.І., Войцехівська О.В. Токар А.Ю. Зміни терпеноїдів у суничних соках за тривалого зберігання // Біологічна цінність деяких зеленних культур // Мат. VI Міжн. наук.-практ. конф. мол. вчених і спеціалістів "Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур". – 2018. – С.91, С. 16
8. Войцехівський В.І., Войцехівська О.В. Формування антоціанового комплексу в плодах суниці залежно від термінів збирання та режимів удобрення // Мат. VI Міжн. наук.-практ. конф. мол. вчених і спеціалістів "Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур". – 2018. – С.91, С. 17.
9. Войцехівський В.І., Войцехівська О.В. Формування антоціанового комплексу в плодах суниці залежно від термінів збирання та режимів удобрення // Мат. VI Міжн. наук.-практ. конф. мол. вчених і спеціалістів "Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур". – 2018. – С.91, С. 17.
10. Voitsekhivska O.V., Voiytsekhivskiy V.I., Nesterova N.G., Vaskivska S.V. The effect of the biostimulators on the physiological parameters of the strawberry leaves // Breeding, genetics and growing technology for agricultural crops: Book of proceedings VII International applied science conference of young scientists and experts (April 19, 2019) / NAAS, The V.M. Remeslo Myronivka Institute of Whea. Vinnytsia: «TVORU», 2019. P. 26-27.
11. Войцехівський В., Андрусик А., Васківський Б., Войцехівська О., Васківська С., Токар А. Біологічна цінність плодів малини // Вісник КНУ імені Т.Шевченка. – 2019. №1(26). – С. 21-25.

12. Revutska A., V. Belava, A. Golubenko, Taran N. Determination of xanthones in plants and the nutrient medium under in vitro cultivation conditions // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. – 2018. - № 2 (76). - С. 33-37.
13. Ревуцька А. З. Вміст фенольних сполук у тканинах Аїру звичайного (*Acorus calamus* L.) та живильному середовищі за умов вирощування in vitro / А. З. Ревуцька, В. Н. Белава, А. В. Голубенко, Н. Ю. Таран // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2016. – Т. 14, № 2 – С. 211–215.

Посібник

1. Подпряттов Г.І., Войцехівський В.І., Кіліан М., Сметанська І.М., Токар А.Ю., Войцехівська О.В., Орловський М.Й. Технології зберігання, переробки та стандартизація сільськогосподарської продукції. Ч.1. Основи післязбиральної доробки, зберігання, переробки та стандартизації плодоовочевої продукції: Навчальний посібник. – К.: ЦІТ Компрінт, 2017. – 660 с.

Видавництво «Авега»
м. Київ, б-р Перова, 23
Свідоцтво ДК №972 від 02.07.2002
Надруковано ФОП «Лановенко О.О.»
м. Київ, вул. Гмирі, 1
тел. 441-82-44
Підписано до друку 16.08.2020 р.
Формат 60x84/16. Гарнітура Times. Папір офсетний.
Умовн.-друк. арк. 3. Наклад 300 прим.

