

УДК 551.464.797.9:582.651.224(470.638)

ПИГМЕНТЫ ЛИСТЬЕВ ОМЕЛЫ БЕЛОЙ (*VISCUM ALBUM* L.)

Симилла Леонтьевна Аджиахметова, Надежда Михайловна Дибижева,
Дмитрий Игоревич Поздняков, Эдуард Тоникович Оганесян

Пятигорский медико-фармацевтический институт –
филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России,
357532, Россия, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11
E-mail: similla503@mail.ru

В работе представлена взаимосвязь изменений количества пигментов от вегетационного периода, потому что их содержание показывает, как растение реагирует на факторы внешней среды. Цель исследования – проведение комплексного изучения сезонной динамики содержания хлорофилла *a* и каротиноидов в листьях вечнозеленого растения омелы белой (*Viscum album* L.). При идентификации пигментов (хлорофилла *a*, феофитина, β -каротина) наилучшее хроматографическое разделение наблюдается при использовании системы элюентов: гексан – этилацетат – пропанол-2 (75:18:7) и гексан – пропанол-2 – водный раствор карбоната натрия (50:5:0,25). Максимум накопления хлорофилла в листьях *Viscum album* L. наблюдается в летне-осенний период, а в зимнее время происходит уменьшение этого показателя. Максимум накопления каротиноидов наблюдается в зимнее время, а минимум приходится на летне-осенний период. Количество хлорофилла *a*, найдено с помощью расчетных формул и изменяется в зависимости от фазы вегетации от 0,150% до 0,431%. Обнаружено, что содержание хлорофилла *a*, вычисленного с помощью расчетных формул в два раза выше, чем значение, найденное с использованием удельного показателя поглощения (от 0,072% до 0,241%). Содержание феофитина, найденного с помощью расчетных формул колеблется в пределах от 0,091% до 0,424%, а каротиноидов в пересчете на β -каротин составляет от 0,006% до 0,0124%.

Ключевые слова: омела белая, *Viscum album* L., листья, хлорофилл *a*, феофитин, каротиноиды.

Введение

Фотосинтетический аппарат вечнозеленых растений испытывает неблагоприятное воздействие низкой температуры в сочетании с высокой инсоляцией. Следует отметить, что зимой активного распада хлорофилла не наблюдается, так как у вечнозеленых растений имеется комплексная система защитных механизмов фотосинтетического аппарата, что позволяет избегать его фотодинамического разрушения в условиях перепада температур. Установлено, что каротиноиды являются одной из главных составляющих системы защиты [1, 2].

Пигменты поглощают видимый свет и тем самым запускают химические реакции фотосинтеза. Пигменты пластид можно разделить на хлорофиллы, каротиноиды и фикобилины [2].

Хлорофиллы являются производными тетрапиррольных соединений, содержащие магний, и различаются природой боковых заместителей. В естественных условиях при старении листьев под влиянием неблагоприятных факторов происходит феофитинизация хлорофилла. Этот процесс подразумевает под собой каталитическое замещение атома магния атомами водорода под действием феофитиназы. В природе феофитин вызывает увеличение проницаемости мембран и проникновение кислого клеточного сока в хлоропласт [3].

Установлено, что от сезонных факторов и места произрастания зависит содержание пигментов [4, 5, 6].

В осенне-зимний период у вечнозеленых растений увеличивается степень защищенности хлорофиллов от фотоокисления дополнительным синтезом каротиноидов в фотосинтезирующих клетках и уменьшается соотношение суммарного содержания хлорофиллов к каротиноидам [2, 7, 8].

Цель исследования – проведение комплексного изучения сезонной динамики содержания хлорофилла *a* и каротиноидов в листьях вечнозеленого растения *Viscum album* L.

Объекты и методы исследования

Объект – листья *Viscum album* L., собранные в окрестностях с. Татарка Шпаковского района Ставропольского края в разные фазы вегетации. Растение – хозяин: яблоня домашняя (*Malus domestica* Borkh.).

Идентификация пигментов методом тонкослойной хроматографии.

Проводили экстракцию из сырья ацетоном для обнаружения хлорофиллов, а для каротиноидов – смесью спирта этилового 95% и ацетона (3:1).

В качестве подвижной фазы применяли системы элюентов: гексан – этилацетат – пропанол-2 (75:18:7), гексан – ацетон (7:3), петролейный эфир – спирт этиловый 95% (16:1), гексан – пропанол-2 – водный раствор карбоната натрия (50:5:0,25), хлороформ – спирт этиловый 95% (19:1); для каротиноидов – гексан – бензол (29:1) [4-10]. Неподвижной фазой являлись пластинки «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ».

Для нанесения пробы использовали дозатор механический 1-канальный варьируемого объема, 0,5-10 мкл ВЮНИТ. Объем наносимой пробы 5 мкл.

Методика получения извлечений для дальнейшего спектрофотометрического определения содержания хлорофилла *a* представлена в работах О.Г. Струсовской и Е.Г. Санниковой с соавторами [4, 11]. Определение проводили на спектрофотометре СФ-102.

Определение содержания хлорофилла *a* с помощью удельного показателя поглощения.

Содержание хлорофилла в сырье (X , %), используя значение оптической плотности и удельного показателя поглощения хлорофилла *a* при длине волны 664 нм, рассчитывали по формуле 1 [4, 11, 12]:

$$X = \frac{A \cdot W_x \cdot 100 \cdot 100}{944,5 \cdot a \cdot V_{ax} \cdot (100 - W)} ; \quad (1)$$

где: A – оптическая плотность исследуемого раствора; 944,5 – удельный показатель поглощения $A_{1\text{см}}^{1\%}$ хлорофилла *a* при длине волны 664 нм; a – навеска сырья, г; V_{ax} и W_x – аликвота (5мл) и объем мерной колбы (25 мл); W – влажность сырья, %.

Определение содержания хлорофилла *a* и феофитина с помощью расчетных формул.

Далее после измерения в кювету добавляли 0,1 мл кислоты хлористоводородной (1 моль/л) и через 2 мин определяли оптическую плотность при длине волны 664 нм [4, 12, 13].

Содержание хлорофилла (C_x , мг/%) и феофитина (C_f , мг/%) в исследуемом растворе рассчитывали по формулам 2 и 3:

$$C_x = 29,11 \cdot [A_{6640} - A_{6641}], \quad (2)$$

$$C_f = 29,11 \cdot [1,7 \cdot A_{6641} - A_{6640}], \quad (3)$$

где A_{6640} , A_{6641} – оптическая плотность анализируемого раствора до и после подкисления, соответственно.

Далее определяли содержание хлорофилла *a* (X_1 , %) и феофитина (X_2 , %) в сырье по формулам 4 и 5:

$$X_1 = \frac{C_x \cdot 5 \cdot 25 \cdot 100}{a \cdot (100 - W) \cdot 1000} ; \quad (4)$$

$$X_2 = \frac{C_{\phi} \cdot 5 \cdot 25 \cdot 100}{a \cdot (100 - W) \cdot 1000} ; \quad (5)$$

где C_x и C_{ϕ} – содержание хлорофилла и феофитина в анализируемом растворе, мг/%; a – навеска сырья, г; W – влажность сырья, %.

Количественное определение каротиноидов в пересчёте на β -каротин.

Суммарное содержание каротиноидов определяли в гексановом извлечении спектрофотометрическим методом, представленным в работе Д.Н. Оленникова с соавторами [4, 14].

Содержание суммы каротиноидов в пересчёте на β -каротин и абсолютно сухое сырьё (X) в процентах рассчитывали по формуле (6):

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 100}{2592 \cdot a \cdot (100 - W)} , \quad (6)$$

где: A – оптическая плотность исследуемого раствора; a – навеска сырья, г; W – влажность сырья, %; 2592 – удельный показатель поглощения $A_{1\text{см}}^{1\%}$ β -каротина при длине волны 450 нм.

Результаты и обсуждение

При идентификации пигментов наилучшее разделение наблюдали при использовании систем элюентов: гексан – пропанол-2 – водный раствор карбоната натрия (50:5:0,25) и гексан – этилацетат – пропанол-2 (75:18:7).

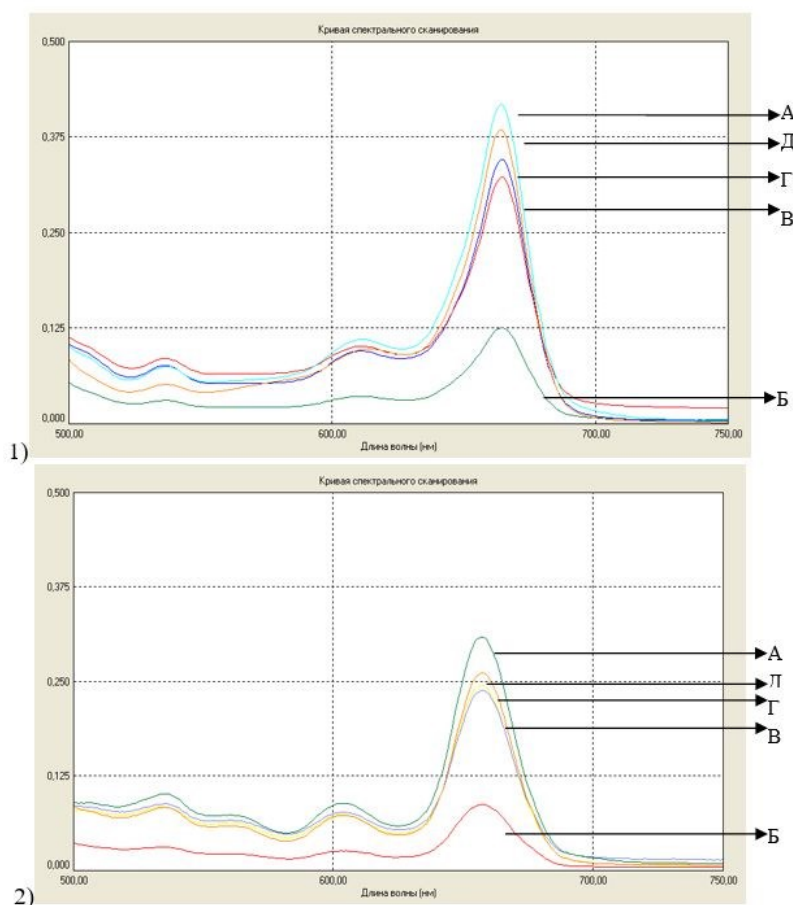


Рис. 1 УФ-спектры поглощения до (1) и после (2) подкисления извлечений, полученных экстракцией спиртом этиловым 95% из листьев *Viscum album* L., собранных осенью (А), зимой (Б), весной (перезимовавшие) (В), весной (вновь образованные) (Г) и летом (Д)

В результате хроматографирования в первой системе растворителей в извлечении из листьев *V. album*, полученном экстракцией ацетоном, по окраске зон адсорбции были идентифицированы: хлорофилл **а**, феофитин. Идентифицировали четыре зоны адсорбции. Значение фактора удерживания $0,49 \pm 0,02$ соответствовало сине-зеленой зоне адсорбции, которое можно отнести к хлорофиллу **а** по данным литературы; также наблюдали адсорбцию серого цвета с фактором удерживания $0,60 \pm 0,03$, что соответствует феофитину (продукт деградации хлорофиллов) [4, 11].

При использовании второй системы элюентов пигменты (хлорофилл **а**, феофитин и каротиноиды) идентифицированы по окраске зон адсорбции. Наблюдали 5 зон на хроматограмме: хлорофиллу **а** соответствует сине-зеленая зона адсорбции в видимом свете и красная – в УФ-свете с фактором удерживания $0,196 \pm 0,011$; серая зона адсорбции с фактором удерживания $0,30 \pm 0,01$ соответствует феофитину; желтая зона адсорбции соответствует β -каротину с фактором удерживания $0,67 \pm 0,03$. Также на хроматограмме наблюдали зеленую и желтую зоны адсорбции, которые по можно отнести к ксантофилами продуктам окисления хлорофилла **а** [9, 10].

Идентификацию каротиноидов проводили в элюирующей системе: гексан – бензол (29:1). Наблюдали желто-оранжевую зону адсорбции: фактор удерживания составляет $0,36 \pm 0,02$, что соответствует по данным литературы относительному фактору удерживания β -каротина [9].

Нами выявлены закономерности сезонных изменений количества пигментов. У анализируемого объекта максимум накопления хлорофилла **а** наблюдали в летне-осенний период (табл. 1), а в зимнее время – уменьшение этого показателя. Это связано с тем, что в зимнее время образование хлорофилла **а** снижается, так как листья находятся под снежным покровом и так же происходит подготовка фотосинтетического аппарата [2, 3, 5]

Содержание хлорофилла **а** в присутствии феофитина определяли спектрофотометрически (рис. 1) [12, 13].

На следующем этапе нашего исследования осуществляли анализ каротиноидов в листьях *V. album*. Содержание каротиноидов в разное время вегетационного периода также изменяется (рис. 2).

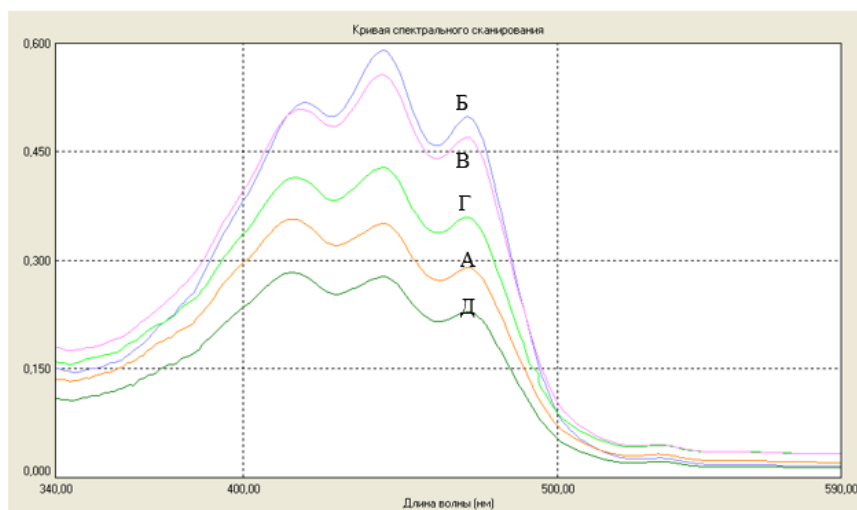


Рис. 2 УФ-спектры поглощения гексановых извлечений из листьев *Viscum album* L., собранных осенью (А), зимой (Б), весной (перезимовавшие) (В), весной (вновь образованные) (Г) и летом (Д)

В зимнее время в *V. album*, наблюдали повышение содержания каротиноидов, а минимум – в летне-осенний период.

Установлено содержание хлорофилла **a** с помощью удельного показателя и расчетных формул. Анализируя данные таблицы 1, обнаружено, что содержание хлорофилла **a**, вычисленное с помощью расчетных формул в два раза больше, чем содержание, найденное с использованием значения удельного показателя поглощения.

Таблица 1

Содержание пигментов в листьях омелы белой, в зависимости от времени сбора

Название сырья	Содержание хлорофилла, % (n=3)		Содержание феофитина, % (n=3) по расчетной формуле	Содержание каротиноидов, % (n=3) по удельному показателю
	по удельному показателю	по расчетной формуле		
листья <i>V. album</i> , собранные				
зимой	0,072±0,003	0,150±0,006	0,091±0,003	0,0124±0,0012
весной (перезимовавшие)	0,186±0,007	0,332±0,013	0,329±0,012	0,0116±0,0013
весной (вновь образованные)	0,199±0,006	0,399±0,011	0,279±0,009	0,009±0,001
летом	0,222±0,007	0,490±0,014	0,232±0,008	0,006±0,001
осенью	0,241±0,008	0,431±0,015	0,424±0,014	0,007±0,001

Содержание каротиноидов и феофитина, в зависимости от времени сбора, представлено в таблице 1.

Выводы

Выявлены закономерности сезонных изменений количества хлорофиллов и каротиноидов, что является показателем реакции *V. album* на факторы внешней среды.

Наблюдали, что на летне-осенний период приходится максимум накопления хлорофилла **a**. Образование хлорофилла снижается в зимнее время, но не наблюдается активный распад хлорофилла **a**.

В зимнее время у *V. album* наблюдали повышение содержания каротиноидов, которые, как отмечалось ранее, выполняют защитную функцию фотосинтетического аппарата. Минимум накопления каротиноидов наблюдали в летне-осенний период.

Список литературы

1. Великая Т.В., Кожанова К.К., Жетерова С.К., Дрегерт О. Определение качественного состава крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) методом ТСХ // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – № 1 (43). Часть 3. – С. 78-80.
2. Маслова Т.Г., Мамушина Н.С., Шерстнева О.А., Буболо Л.С., Зубкова Е.К. Структурно-функциональные изменения фотосинтетического аппарата у зимневегетирующих хвойных растений в различные сезоны года // Физиология растений. – 2009. – Т.56, № 5. – С. 672-681.
3. Оленников Д.Н., Потанина О.Г., Танхаева Л.М., Николаева Г.Г. Фармакогностическая характеристика листьев какалии копьевидной (*Cacalia hastata* L.) // Химия растительного сырья. – 2004. – № 3. – С. 43-52.
4. Патент 2531940 (РФ). Способ спектрофотометрического количественного определения в листьях крапивы двудомной при совместном присутствии хлорофилла, каротиноидов и гидроксикоричных кислот / О.В. Тринеева, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин, С.В. Воропаева. 27.10.2014. – Бюл. №30. – 8 с.
5. Попова О.И., Муравьева Д.А. Омела белая как источник ценных фармакологически активных веществ // Химико-фармацевтическое производство. Обзорная информация. – 1996. – Вып. 8. – 36 с.

6. Санникова Е.Г., Компанцева Е.В., Попова О.И., Айрапетова А.Ю. Определение пигментов в сырье ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L.) методами тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии // Химия растительного сырья. – 2019. – №2. – С. 119-127. DOI: 10.14258/jcrpm.2019024077.

7. Струсовская О.Г. Определение пигментного состава *Cochlearia officinalis*, произрастающей на островах Соловецкого архипелага // Фармация и общественное здоровье: материалы V Междунар. науч.-практ. конф. Екатеринбург. – 2012. – С. 184-187.

8. Тюлькова Е.Г., Савченко Г.Е., Кабашикова Л.Ф. Деградация хлорофилла в листьях овсяницы тростниковой (*Festuca arundinacea*) при действии летучих органических соединений и бенз(а)пирена // Физиология растений. Известия РАН. Серия биологическая. – 2022. – № 4. – С 363-373.

9. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений: учеб. Пособие для вузов. СПб.: СПбГУ. – 2002. – 244 с.

10. Чечета О.В., Сафонова Е.Ф., Сливкин А.И. Методика определения каротиноидов методом хроматографии в тонком слое сорбента // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т. 8. – Вып. 2. – С. 320-326.

11. Шавнин С.А., Юсупов И.А., Марина Н.В., Монтиле А.А., Голиков Д.Ю. Сезонные изменения содержания хлорофиллов и каротиноидов в хвое сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в зоне влияния теплового поля газового факела // Физиология растений. – 2021. – Т. 68, № 3. – С. 315-325.

12. Kalituho L., Rech J., Jahns P. The roles of specific xanthophylls in light utilization // Planta. – 2007. – V. 225. – P. 423.

13. Öquist G., Huner N.P.A. Photosynthesis of overwintering evergreen plants // Annu. Rev. Plant Biol. – 2003. – Vol. 54. – P. 329-355.

14. Vernon L.P. Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts // Analytical Chemistry. 1960. – Vol. 32, №9. – P. 1144-1150.

Статья поступила в редакцию 15. 04. 2024 г.

Adzhiakhmetova S.L., Dibizheva N.M., Pozdnyakov D.I., Oganessian E.T. Pigments of leaves of *Viscum album* L. // Bull. of the State Nikit. Botan. Gard. – 2024. – № 151. – P. 62-67

The work presents the relationship between changes in the amount of pigments from the growing season, because their content shows how the plant reacts to environmental factors. The objective of the study is to conduct a comprehensive research of the seasonal dynamics of the content of chlorophyll a and carotenoids in the leaves of the evergreen plant *Viscum album* L. When identifying pigments, the best chromatographic separation is observed when using identifying pigments (chlorophyll a, pheophytin, β -carotene), the best chromatographic separation is observed when using the eluent system: hexane – ethyl acetate – propanol-2 (75:18:7) and hexane – propanol-2 – aqueous solution of sodium carbonate (50:5:0.25). The maximum accumulation of chlorophyll in the leaves of *V. album* is observed in the summer-autumn period, and in winter this indicator decreases. The maximum accumulation of carotenoids is observed in winter, and the minimum occurs in the summer-autumn period. The amount of chlorophyll a was found using calculation formulas and varies depending on the growing season from 0.150% to 0.431%. It should be noted that the content of chlorophyll a calculated using the calculation formulas is two times higher than the value found using the specific absorption rate (from 0.072% to 0.241%). The content of pheophytin found using calculation formulas ranges from 0.091% to 0.424%, and carotenoids in terms of β -carotene range from 0.006% to 0.0124%.

Key words: *Viscum album* L.; leaves; chlorophyll a; pheophytin; carotenoids