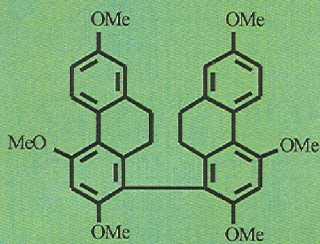


ISSN 0023 - 1150

АКАДЕМИЯ НАУК
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН



Химия Природных Соединений

*Chemistry of
Natural Compounds*

1 2016 стр.1-164

ЛИПИДЫ И ПОЛИСАХАРИДЫ СЕМЯН *Stachys hissarica*

М. Х. Маликова, А. А. Сиддикова, Ш. К. Хидоятова, Н. Т. Ульченко,
Р. К. Рахманбердыева, С. Д. Гусакова*

Институт химии растительных веществ им. акад. С. Ю. Юнусова АН РУз,
Ташкент, e-mail: rakhmanberdieva@mail.ru, s.gusakova2004@mail.ru

Установлен состав липидов и жирных кислот, углеводный комплекс семян эндемичного растения *Stachys hissarica*. В нейтральных липидах преобладают жирные кислоты 18:2 ω 6 и 18:1. В глико- и фосфолипидах основной кислотой является 16:0. В составе жирных кислот нейтральных липидов в незначительных количествах обнаружена лабалленовая кислота с кумулированными двойными связями 18:2 (5,6). Изучен углеводный комплекс семян *S. hissarica*, показано наличие водорастворимых полисахаридов, пектиновых веществ и гемицеллюлоз, дана их физико-химическая характеристика.

Ключевые слова: *Stachys hissarica* Regel, нейтральные липиды, гликолипиды, фосфолипиды, лабалленовая кислота 18:2 (5, 6), водорастворимые полисахариды, пектиновые вещества, гемицеллюлозы, степень этерификации.

Stachys hissarica Regel – многолетнее травянистое растение семейства *Lamiaceae*. На территории Центральной Азии произрастает пять видов растений рода *Stachys*. *S. hissarica* – эндемик Памиро-Алая, растет в горных районах, по каменистым местам [1]. В народной медицине настой и настойку травы растений этого рода используют при различных нервных расстройствах, повышенном артериальном давлении, как успокоительное и желчегонное средства.

В химическом отношении исследована надземная часть различных видов *Stachys*, определено наличие низкомолекулярных соединений, дубильных веществ, смол, эфирных масел, аскорбиновой кислоты и органических кислот, в семенах найдены жирные кислоты и эфирные масла. Сообщалось, что жирные кислоты семян другого вида *Stachys betoniciflora* содержат редко встречающуюся необычную по структуре жирную лабалленовую кислоту с кумулированными двойными связями 18:2 (5, 6), которая характерна для семейства *Lamiaceae* и, как правило, присутствует в липидах семян с высоким содержанием линолевой кислоты 18:2 (9,12) [2]. Липиды и углеводы семян *S. hissarica* не изучены.

Мы исследовали липиды и полисахариды семян *S. hissarica*, собранных в Ташкентской области в 2014 г. Содержание нейтральных липидов (НЛ) в семенах составило 15.29% (на абс. сух. вещ.). Из шрота, оставшегося после выделения НЛ, смесью хлороформа с метанолом экстрагировали 2.07% полярных липидов (ПЛ), которые разделили КХ на силикагеле на отдельные группы, при этом НЛ элюировали хлороформом, гликолипиды (ГЛ) – ацетоном и фосфолипиды (ФЛ) – метанолом. Их выход установили гравиметрически, результаты представлены ниже:

Показатель	Содержание, % от массы семян
Влага и летучие вещества	8.32
Нейтральные липиды	15.29
Полярные липиды, в том числе:	2.07
нейтральные	1.30
гликолипиды	0.47
фосфолипиды	0.30

Состав классов НЛ и каждой группы ПЛ установили аналитической ТСХ на силикагеле. Для разделения классов НЛ использовали системы растворителей 1 и 2, для ГЛ – систему 3 и ФЛ – системы 4, 5. Липиды идентифицировали с помощью модельных классов соединений и специфических проявителей [3].

По результатам НЛ состояли в основном из триацилглицеридов (ТАГ), им сопутствовали свободные жирные кислоты (ЖК), сложные эфиры ЖК с фитостеролами, углеводороды, свободные стеролы и тритерпенолы. Щелочным гидролизом из НЛ выделили неомыляемые вещества с выходом 1.02%, в составе которых обнаружили (ТСХ, системы растворителей 1, 2) перечисленные выше классы липофильных соединений, не содержащих остатки ацилов.

В ГЛ преобладали сложные эфиры стерилгликозидов и цереброзиды, в следовых количествах присутствовали дигалактозил- и моногалактозилдиацилглицериды. Из классов ФЛ обнаружили фосфатидилхолины, фосфатидилинозитолы и следовые количества фосфатидилэтаноламинов.

Для установления состава ЖК каждую группу липидов гидролизовали спиртовым раствором щелочи, выделенные ЖК в виде метиловых эфиров анализировали методом ГХ (табл. 1).

Из данных табл. 1 видно, что в НЛ преобладали ненасыщенные ЖК – линолевая (18:2 ω 6) и олеиновая (18:1). В НЛ, входящих в состав ПЛ, доминировали ненасыщенные ЖК – 18:2 ω 6 и сумма 18:1 и 18:3 ω 3. В гликолипидах и фосфолипидах основной кислотой была насыщенная кислота 16:0, а из ненасыщенных кислот в ГЛ преобладала сумма 18:1 и 18:3, а ФЛ – 18:2.

Для обнаружения лабалленовой кислоты провели дополнительные исследования. В ИК-спектре НЛ и метиловых эфиров их ЖК (МЭЖК) наблюдались слабые полосы колебаний при 1070 и 1960 см⁻¹, характерные для алленовой группы [3].

ТАБЛИЦА 1. Состав жирных кислот липидов семян *Stachys hissarica*, ГХ, % от их массы

Жирная кислота	НЛ*	Полярные липиды		
		НЛ	ГЛ	ФЛ
10:0	1.22	0.05	0.28	0.31
12:0	Сл.	0.10	1.80	1.13
14:0	Сл.	0.36	2.85	1.27
15:0	–	0.11	0.88	0.57
16:0	12.47	7.65	41.11	48.32
16:1	0.80	0.23	1.12	–
17:0	–	0.12	0.91	0.72
18:0	4.30	18.02	10.15	8.82
18:1	35.02	–	–	–
18:1 + 18:3	–	25.88	18.46	12.41
18:3	1.63	–	–	–
18:2	44.56	43.97	9.96	23.85
20:0	Сл.	0.49	2.52	0.93
22:0	–	1.97	5.63	1.19
24:0	–	0.97	3.50	0.48
26:0	–	0.08	0.83	–
Σ насыщ.	17.99	29.92	70.46	63.74
Σ ненасыщ.	82.01	70.08	29.54	36.26

*Хроматограф Chrom-5, набивная колонка с полярной фазой.

При разделении МЭЖК препаративной ТСХ на силикагеле с добавкой 30% AgNO_3 в системе б получили четыре пятна, соответствующие МЭ насыщенных (R_f 0.86), не отделившееся четко пятно с R_f 0.82, относящееся к МЭ 18:2 (5,6) [2], моноеновых (R_f 0.71), диеновых (R_f 0.46) и триеновых (R_f 0.11) жирных кислот. В ИК-спектре только фракции МЭ насыщенных ЖК в сумме с МЭ 18:2 (5,6) обнаружили полосы колебаний при 1070 и 1960 cm^{-1} . Выделить кислоту 18:2 (5,6) из фракции МЭ насыщенных ЖК с помощью препаративной ТСХ в указанных выше условиях не удалось, возможно, из-за незначительного ее содержания. На хроматограмме ГХ этой фракции в использованных условиях разделения отдельного пика МЭ лабалленовой кислоты не обнаружили, очевидно, из-за ее малого содержания либо наложения пика 18:2 (5,6) на пик МЭ 18:0.

Как было сказано выше, углеводы семян *S. hissarica* не изучены, поэтому для выделения углеводов остаток сырья после удаления липидов экстрагировали кипящим 82° этиловым спиртом и выделили спирторастворимые сахара (СРС), которые представлены, по данным БХ, фруктозой, сахарозой и фруктоолигосахаридами. Далее были выделены (холодной и горячей экстракцией) водорастворимые полисахариды (ВРПС-х и ВРПС-г), пектиновые вещества (ПВ) и гемицеллюлозы (ГМЦ-А и ГМЦ-Б) [4].

ТАБЛИЦА 2. Содержание и моносахаридный состав полисахаридов семян *Stachys hissarica*

Тип ПС	Выход, %	Rha	Ara	Xyl	Glc	Gal	Uac, %
ВРПС-х	0.31	1.0	1.8	3.4	2.4	2.0	10.0
ВРПС-г	0.5	1.0	1.5	3.8	3.1	2.8	29.3
ПВ	2.32	1.0	1.4	2.9	3.2	1.0	75.8
ГМЦ-А	4.96	–	1.6	4.5	1.8	1.0	10.0
ГМЦ-Б	0.82	Сл.	4.2	5.8	2.5	1.0	30.4

Как видно из табл. 2, наибольшее накопление характерно для ПВ и ГМЦ-А. Все выделенные полисахариды по природе кислые, нейтральные сахара находились в различных соотношениях, но

доминирующими моносахаридами были ксилоза и глюкоза.

ВРПС – аморфные порошки коричневого цвета, полностью растворяющиеся в воде. Моносахаридный состав ВРПС представлен рамнозой, арабинозой, ксилозой, глюкозой, галактозой и урановой кислотой. В ИК-спектре ВРПС обнаружены полосы поглощения, характерные для полисахаридов высших растений [5].

После выделения суммы ВРПС экстрагированием остатка сырья равной смесью 0.5% растворов шавелевой кислоты и оксалата аммония получили пектиновые вещества с выходом 3.6% от воздушно-сухого сырья.

Пектиновые вещества (ПВ) – аморфный порошок кремового цвета, частично растворяющийся в воде и полностью в 0.1 н. NaOH с образованием вязкого раствора с относительной вязкостью ($\eta_{\text{отн}}$) 3.22 (c 1; 0.1 н. NaOH), $[\alpha]_D^{25} + 148^\circ$ (c 1.0; 0.1% NH_4OH). В гидролизате ПВ идентифицировали нейтральные сахара и урановую кислоту.

Важным показателем пектиновых веществ является наличие метоксильных групп, что позволяет отнести их к низко- или высокоэтерифицированным ПВ [6]. Установили следующие количественные характеристики изучаемых ПВ, %: Кс (свободные карбоксильные группы) – 3.6; Кэ (этерифицированные карбоксильные группы) – 6.7; степень этерификации (λ) 64.9%, из чего следует, что ПВ являются высокоэтерифицированным пектином. Частичным гидролизом ПВ получили полисахарид, состоящий только из остатков галактуроновой кислоты, т.е. галактуронан.

Галактуронан – белый аморфный порошок, растворяется в воде, частично в слабощелочной среде аммиака с образованием прозрачного раствора с $[\alpha]_D^{25} + 175^\circ$ (c 1.0; 0.1% NH_4OH), ММ 34500 Da.

Удельное вращение раствора галактуронана выше, чем исходного пектина, объясняемое тем, что неуронидный материал в известной мере понижает удельное вращение пектиновых веществ, т.е. удельное вращение пропорционально количеству уронидного материала.

Исследование ПВ и галактуронана методом ИК-спектроскопии позволило установить следующие характерные полосы поглощения. Полоса поглощения в области 832 см^{-1} характерна для пектинов с α -конфигурацией гликозидных связей между остатками D-галактурононовой кислоты, а полоса поглощения 889 см^{-1} характеризует 1,4 тип этой связи. Полосы поглощения при 1102 и 1749 см^{-1} показывают валентные колебания сложноэфирного карбонила карбоксильной группы. Ионизированный карбоксил, связанный с металлами, отражается полосами поглощения 1420 и 1601 см^{-1} . При омылении ПВ раствором NaOH увеличивается интенсивность полосы поглощения при 1749 см^{-1} , полоса поглощения при 1420 см^{-1} уменьшается, а полоса поглощения при 1370 см^{-1} , определяющая наличие метоксильных групп, полностью исчезает. Указанные полосы поглощения присутствуют и в галактуронане, но отличаются большей интенсивностью от таковых в ПВ. В галактуронане отсутствует также полоса поглощения при 1370 см^{-1} .

Для доказательства порядка связи между остатками галактурононовой кислоты в галактуронане его окисляли йодной кислотой с последующим гидролизом и доокислением продуктов гидролиза бромом [7], в итоге получили винную кислоту с четырьмя углеродными атомами. Получение такого соединения показывает окисление α -диольных группировок у C-2 и C-3 углеродных атомов галактурононовой кислоты, что возможно при наличии пиранозного цикла с порядком 1 \rightarrow 4 гликозидной связи между сахарами.

Следовательно, пектиновые вещества семян *S. hissarica* представляют собой полимер, основную цепь которого составляет α -1,4-галактуронан, а нейтральные сахара занимают периферическое место относительно основной цепи.

Гемицеллюлозы экстрагировали 5% раствором КОН при комнатной температуре и получили ГМЦ-А и ГМЦ-Б с выходами соответственно 4.9 и 0.8%.

ГМЦ-А и ГМЦ-Б – темно-коричневые порошки, отличающиеся растворимостью. ГМЦ-А не растворяется в воде, хорошо растворяется в разбавленных растворах щелочи, ГМЦ-Б растворяется в воде. В гидролизатах ГМЦ присутствуют уроновые кислоты, галактоза, глюкоза, арабиноза и следы рамнозы. Доминирующий моносахарид в ГМЦ-А и Б – ксилоза. Следовательно, ГМЦ являются гетерополисахаридами, в которых преобладает ксилан.

Таким образом, исследованы липиды, жирные кислоты и углеводный комплекс семян *S. hissarica*. Установлено, что жирные кислоты состоят в основном из семи компонентов с преобладанием линолевой (18:2 ω 6, 44.6%). Впервые в семенах *S. hissarica* в составе жирных кислот нейтральных липидов в незначительных количествах найдена лабалленовая кислота с кумулированными двойными связями 18:2 (5,6). Семена *S. hissarica* содержат углеводный комплекс: спирторастворимые сахара, водорастворимые полисахариды, пектиновые вещества и гемицеллюлозы с количественным преобладанием последних. Пектиновые

вещества – высокоэтерифицированные пектины, основную цепь которых составляет галактуронан, где остатки галактурононовой кислоты соединены α -1,4-гликозидными связями.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Семена *S. hissarica* собрали в период их созревания (август 2014 г.) в Ахангаранском районе Ташкентской области. ИК-спектры образцов снимали на ИК-Фурье спектрометре фирмы PerkinElmer, модель 2000, в пленке или в прессованных с KBr, число сканирований 100. ГХ метиловых эфиров ЖК проводили на приборе Agilent 6890N с пламенно-ионизационным детектором по методу FAMES.M, используя капиллярную колонку $30\text{ м} \times 0.32\text{ мм}$ с неподвижной фазой HP-5, газ-носитель – гелий, температура программирования $150\text{--}270^\circ\text{C}$ и на хроматографе Chrom-5 с пламенно-ионизационным детектором при использовании стальной колонки ($2.5\text{ м} \times 4\text{ мм}$), заполненной полярной фазой Chromaton-N-AW с 15% Reoplex-400 и температуре колонки 196°C , газ-носитель – азот. ГЖХ-анализ моносахаридов проводили на хроматографе Chrom-5 с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях: колонка из нержавеющей стали ($200 \times 0.3\text{ см}$), 5% Silicone XE-60 на хроматоне NAW-0.200–0.250 меш, 210° , газ-носитель – азот, 60 мл/мин, моносахариды снимали в виде ацетатов альдононитрилов [8]. ТСХ липидов проводили на силикагеле марки Chromarol (Чехословакия) с размером частиц 5/40 μ и на силикагеле с добавкой 30% AgNO₃, а КХ – на силикагеле этой же марки с размером частиц 100/160 μ .

Системы растворителей: 1) гексан–диэтиловый эфир 4:1; 2) 7:3; 3) хлороформ–ацетон–метанол–уксусная кислота–вода 65:20:10:10:3; 4) хлороформ–метанол–аммиак 13:7:1; 5) хлороформ–метанол–уксусная кислота–вода 14:5:1:1; 6) бензол. Пятна НЛ проявляли в парах I₂, опрыскиванием пластинок 50% водным раствором H₂SO₄ с последующим нагреванием, ГЛ – α -нафтолом, ФЛ – реактивами Васьковского и Драгендорфа [3]. Удельное вращение ПВ и галактуронана измеряли на поляриметре Цейса в трубке длиной 1 дм, объемом 10 мл при $20\text{--}23^\circ\text{C}$. Бумажную хроматографию углеводов проводили на бумаге Filtrak-FN 18 в системе растворителей бутанол-1–пиридин–вода 6:4:3. Для индикации пятен применяли кислый фталат анилина (гексозы) и 5% спиртовой раствор мочевины (кестозы).

Полный кислотный гидролиз полисахаридов проводили как указано в [4]. Количество галактурононовой кислоты определяли фотоэлектроколориметрическим методом на основе цветной реакции с карбазолом [6]. Титриметрическим методом установили количественные характеристики ПВ [7]. Молекулярные массы определяли седиментационным методом на ультрацентрифуге MOM-3170 (50000 об/мин) при 20° , скорость съемки 30 мин. Вязкость растворов полисахаридов измеряли в вискозиметре Оствальда с диаметром 0.73 мм.

Выделение липидов. Нейтральные липиды извлекали из измельченных семян пятикратным настаиванием с гексаном. Из шрота экстрагировали полярные липиды также пятикратным настаиванием со смесью хлороформа с метанолом (2:1, v/v). Хлороформ-метанольную смесь обрабатывали 0.05% водным раствором CaCl_2 для удаления нелипидных компонентов. Выход липидов устанавливали гравиметрически после отгонки экстрагентов с последующим высушиванием образцов в вакуум-сушильном шкафу при 60°C.

Жирные кислоты выделяли из ацилсодержащих липидов щелочным гидролизом [9]. Метилловые эфиры получали обработкой ЖК свежеприготовленным диэтиловым эфиром [10] с последующей их очисткой ТСХ на силикагеле в системе 1.

Выделение СРС. Остаток семян после экстракции смесью хлороформа с метанолом обрабатывали 82° этиловым спиртом. Спиртовой экстракт упаривали и изучали моносахаридный состав методом БХ (система 1, проявитель 2).

Выделение ВРПС-х проводили экстракцией сырья холодной водой при комнатной температуре при гидромодуле 1:2, экстрагировали дважды по 1.5 ч, экстракты объединяли, упаривали и осаждали тремя объемами спирта, выпавший осадок отделяли центрифугированием, высушивали спиртом. Выход ВРПС-х 0.31 г.

Выделение ВРПС-г. Остаток сырья экстрагировали водой при 70°C в течение 1.5 ч дважды, экстракты объединяли и обрабатывали как указано выше, выход ВРПС-г 0.5 г.

Выделение ПВ. Остаток сырья дважды обрабатывали смесью равных объемов 0.5% растворов щавелевой кислоты и оксалата аммония (1:1) при 80–85°C в течение 2 ч. Объединенные экстракты упаривали, диализовали в проточной воде, диализат осаждали спиртом 1:3, осадок обрабатывали как указано выше, выход 2.32 г.

Частичный гидролиз ПВ. 0.5 г ПВ растворяли в 30 мл воды, затем добавляли 30 мл 1 н. H_2SO_4 и нагревали при 100°C в течение 3.5 ч. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, промывали до нейтральной реакции 70% метанолом, обезвоживали ацетоном, выход

галактуронана 0.24 г. Галактуронан окисляли как описано в [7].

Выделение ГМЦ проводили дважды экстракцией 5% щелочью при комнатной температуре и гидромодуле 1:1. Щелочные экстракты объединяли, нейтрализовали уксусной кислотой, выпавший осадок ГМЦ-А отделяли центрифугированием, промывали и высушивали спиртом, выход ГМЦ-А 4.96 г. Центрифугат диализовали против проточной воды до нейтральной среды, упаривали, осаждали двумя объемами спирта, осадок отделяли, промывали спиртом и высушивали, выход ГМЦ-Б 0.82 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Флора Узбекистана*, т. V, Ташкент, 1962, с. 379
2. S. D. Gusakova, A. U. Umarov, *Chem. Nat. Compd.*, **8**, 23 (1972)
3. М. Кейте, *Техника липидологии*, Мир, Москва, 1975, 311 с. [M. Kates, *Techniques of Lipidology. Isolation, Analysis and Identification of Lipids*, New York, 1972, 311 p.
4. А. А. Сиддикова, М. Х. Маликова, Р. К. Рахманбердыева, У. Н. Зайнутдинов, *Фарм. журн.*, **4**, 20 (2014)
5. Р. К. Рахманбердыева, М. П. Филиппов, *Химия природ. соедин.*, 166 (2011)
6. *Биохимические методы анализа плодов*, под ред. В. В. Арасимовича, Шгинца, Кишинев, 1984, с. 12
7. Н. П. Щелухина, З. Д. Ашубаева, Г. Б. Аймухамедова, *Пектиновые вещества, их некоторые свойства и производные*, Илим, Фрунзе, 1970, с. 32–34
8. D. Lance G., J. K. N. Jones, *Can. J. Chem.*, **45**, 1995 (1967)
9. *Руководство по методам исследования, технохимическому контролю и учету производства в масложировой промышленности*, **1**, кн. 2, Ленинград, 1967, с. 937
10. Л. Физер, М. Физер, *Реагенты для органического синтеза*, т. 1, Мир, Москва, 1970, с. 242

Поступило в редакцию 08.07.15