

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА СВЕРХКРИТИЧЕСКИХ УГЛЕКИСЛОТНЫХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ СЕМЯН ЧЕРНУШКИ ПОСЕВНОЙ

¹Рудь Н.К., ¹Сампиев А.М.

¹ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России», Краснодар, Россия (350063, Краснодар, ул. Седина, 4), e-mail: farmdep@mail.ru

Целью исследования являлось сравнительное изучение аминокислотного состава сверхкритических углекислотных экстрактов из семян чернушки посевной. Объектом исследования служили экстракты №1, №2, №3 из семян чернушки посевной, полученные при различных режимах методом сверхкритической углекислотной экстракции. Исследование аминокислотного состава проводили методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель-103Р», основанного на разделении анионных форм N-фенилтиокарбамил-производных аминокислот под действием электрического поля вследствие их различной электрофоретической подвижности. Для идентификации и количественного определения аминокислот регистрировали ультрафиолетовое поглощение при длине волны 254 нм. В экстракте №1 были обнаружены аргинин, пролин и треонин, суммарное содержание которых составило 50,57 мг/кг. В составе экстракта №2 идентифицированы аргинин, лейцин, метионин, валин, пролин, треонин, серин и α-аланин, концентрация которых оказалась равной 21,87 мг/кг. Наиболее широко представлен качественный состав экстракта №3, содержащий пять незаменимых (лейцин, аргинин, метионин, валин, треонин) и четыре заменимых (пролин, серин, аланин, глицин) аминокислоты. Общее количественное содержание аминокислот в экстракте №3 составило 175,34 мг/кг, что свидетельствовало о большей степени их извлекаемости из растительного сырья в заданных режимах сверхкритической углекислотной экстракции.

Ключевые слова: семена чернушки, аминокислоты, капиллярный электрофорез

COMPARATIVE STUDY OF AMINO ACID COMPOSITION SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE EXTRACTS RINGLETS SEEDING FROM SEED

¹Rud N.K., ¹Sampiev A.M.

¹Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia (350063, Krasnodar, street Sedina, 4), e-mail: farmdep@mail.ru

The aim of the study was a comparative study of the amino acid composition of supercritical carbonic acid. The aim of the study was a comparative study of the amino acid composition of supercritical - yi lekislotnyh extracts from seeds Nigella seed. The object of the study were extracts № 1, № 2, № 3 of seeds Nigella seed obtained in different modes by supercritical carbon dioxide extraction. Study of the amino acid composition was performed by capillary electrophoresis instrument " Capel- 103R ", based on the separation of anionic forms of N- feniltio- karbamil - amino acid derivatives in the electric field due to their dif-ferent electrophoretic mobility . For identification and quantification of amino acids were recorded ultraviolet absorption at a wavelength of 254 nm. Number 1 in the extract were detected arginine, proline and threonine, total content was 50.57 mg / kg. In ve extract amounted number 2 identified arginine, leucine, methionine, valine, proline, threonine, serine, α- alanine, which was equal to the concentration of 21.87 mg / kg. The most widely represented qualitative in the extract composition number 3, containing five essential (leucine, arginine, methionine, valine, threonine) and four replaceable (proline, serine, alanine, glycine) residue. Total quantitative amino acid content in the extract number 3 was 175.34 mg / kg, indicating a greater degree of recoverability of plant materials in the specified mode of supercritical carbon dioxide extraction.

Keywords: Nigella seeds, amino acids, capillary electrophoresis

Введение

Чернушка посевная (*Nigella sativa* L.) – перспективный источник ценнейших биологически активных веществ (БАВ), семена которой используются с лечебной целью в таких областях, как гастроэнтерология, онкология, кардиология, аллергология, гинекология и инфектология [9]. Такой разнообразный спектр направлений использования семян чернушки обусловлен ее богатейшим компонентным составом жирного и эфирного масла [5, 9, 10]. В

настоящее время из семян чернушки посевной получают жирное масло методом холодного отжима и экстракционным путем [8]. Однако используемые способы получения позволяют извлекать из растительного сырья в основном гидрофобные группы веществ (жирные кислоты и компоненты эфирного масла). Хотя, помимо липофильных соединений семян чернушки посевной, определяющих ее медицинское применение, заслуживают внимания и гидрофильные вещества как носители разных фармакологических видов активности. В этой связи присутствие гидрофильных веществ, наряду с гидрофобными, будет способствовать расширению спектра фармако-биологического действия комплексных продуктов из чернушки посевной. К одним из современных, эффективных и экологически чистых способов, позволяющих извлекать из растительного сырья различной по полярности природы БАВ, можно отнести активно внедряющую в фармацевтическую промышленность технологию сверхкритических флюидов. Фитоэкстракты, полученные данным способом, содержат в нативном виде все извлеченные БАВ, являются практически стерильными, зачастую содержат природные антиоксиданты, позволяющие сохранить продукт в процессе хранения и исключить использование синтетических консервантов [1, 7].

Согласно данным [11], в семенах чернушки содержатся в достаточно большом количестве аминокислоты. Присутствие аминокислот в разрабатываемых целевых продуктах из чернушки в сочетании с гидрофобными БАВ повысило бы их фармако-терапевтическую ценность. Аминокислоты участвуют в продукции ферментов, некоторых гормонов, в построении мышц, кожи и волос, поддерживают работу иммунной системы и общего обмена веществ. Помимо этого, некоторые аминокислоты действуют в качестве нейротрансмиттеров – передатчиков информации от одной клетки к другой.

Таким образом, исследование аминокислот в экстрактах чернушки посевной, полученных методом сверхкритической углекислотной экстракции при различных режимах CO₂, и их сравнительная оценка представляет интерес для разработки продуктов с сочетанным содержанием гидрофобных и гидрофильных БАВ и потенциально обладающих полифункциональным лечебно-профилактическим действием.

Целью исследования являлось сравнительное изучение аминокислотного состава экстрактов из семян чернушки посевной, полученных методом сверхкритической углекислотной экстракции.

Материал и методы исследования

Объектом исследования служили экстракты №1, №2, №3 из семян чернушки посевной, полученные при различных режимах методом сверхкритической углекислотной экстракцией. Режимы экстракции отличались увеличивающимися значениями температуры и давления (равный прирост) в ряду: экстракт №1 > экстракт №2 > экстракт №3.

Сравнительное исследование аминокислотного состава экстрактов из семян чернушки осуществляли методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель-103Р» (ОАО «НПФ Люмэкс», Россия) с кварцевым капилляром $L_{эф}/L_{общ}=50/60$ см, $ID=75$ мкм. Данный метод основан на разделении анионных форм N-фенилтиокарбамил-производных аминокислот под действием электрического поля вследствие их различной электрофоретической подвижности. Пробоподготовку проводили путем СВЧ-экстракции сверхкритических углекислотных экстрактов из семян чернушки посевной 10% спиртом этиловым на СВЧ-минерализаторе «Минотавр-1». Точную навеску экстракта в количестве 1,0 г помещали во фторопластовый контейнер СВЧ-минерализатора, добавляли 25 мл 10% спирта этилового, устанавливали контейнер в магнетрон минерализатора. Минерализацию проводили, используя режим «разложение без давления», в течение 10 мин. По истечении указанного времени контейнер извлекали из СВЧ-минерализатора, охлаждали в естественных условиях в течение 3-5 мин. Полученное извлечение количественно переносили в мерную колбу объемом 25 мл [2, 3].

К полученному извлечению добавляли 10% водный раствор карбоната натрия и раствор фенилизотиоцианата в изопропиловом спирте. Реакционную смесь перемешивали, выдерживали в течение 35 минут при комнатной температуре для прохождения реакции между фенилизотиоцианатом и аминокислотами, содержащимися в экстрактах из семян чернушки посевной, после чего высушивали в потоке теплого воздуха. К сухому остатку прибавляли воду очищенную, тщательно перемешивали и центрифугировали при 6000 об^{-1} в течение 5 минут, полученную пробу (фугат) переносили в систему капиллярного электрофореза и пневматическим методом под давлением 30 миллибар в течение 5 секунд дозировали пробу в капилляр. Капилляр перед измерением подготавливали к работе, промывая его последовательно 3,5% раствором соляной кислоты, водой очищенной, 4% раствором гидроксида натрия и рабочим буферным раствором. Электрофорез проводили под напряжением в 10 кВольт. Анализируемую пробу дозировали в прибор не менее двух раз. Градуировку прибора осуществляли при помощи калибровочных растворов стандартных образцов аминокислот. Градуировочную смесь готовили путем смешения исходных растворов аминокислот, 10% водного раствора карбоната натрия и раствора фенилизотиоцианата в изопропиловом спирте. Для идентификации и количественного определения анализируемых компонентов регистрировали ультрафиолетовое поглощение при длине волны 254 нм. По электрофореграмме определяли качественную характеристику вещества – время миграции и количественную (после построения градуировочной зависимости) – высоту или площадь пика, пропорциональную концентрации вещества [4, 6]. Массовую концентрацию аминокислот в исследуемой пробе (X) вычисляли по формуле:

$$X = K \cdot C, \text{ где}$$

K – коэффициент разбавления пробы;

C – концентрация аминокислоты, найденная по градуировочному графику, мг/кг.

Результаты исследования и их обсуждение

Обобщенные результаты качественного и количественного аминокислотного состава сверхкритических углекислотных экстрактов из семян чернушки посевной, полученные с помощью метода капиллярного электрофореза, представлены в таблице.

Таблица

Качественный и количественный состав аминокислот сверхкритических углекислотных экстрактов из семян чернушки посевной

Качественный состав аминокислот	Количественный состав аминокислот, мг/кг		
	Экстракт №1	Экстракт №2	Экстракт №3
Аргинин	30,86±0,56	14,25±0,42	34,98±1,22
Лейцин	-	1,32±0,04	19,15±0,57
Метионин	-	0,002±0,0004	7,79±0,23
Валин	-	0,46±0,014	0,06±0,002
Пролин	16,90±0,29	4,65±0,12	25,70±0,77
Треонин	2,81±0,23	0,31±0,008	41,45±1,16
Серин	-	0,61±0,02	12,53±0,36
α -Аланин	-	0,27±0,008	28,39±0,85
Глицин	-	-	5,29±0,15
Сумма аминокислот	50,57±1,08	21,87±0,63	175,34±5,31

Как видно из данных таблицы, в экстракте №1 были обнаружены аргинин, пролин и треонин, суммарное содержание которых составило 50,57±1,08 мг/кг. В составе экстракта №2 идентифицированы аргинин, лейцин, метионин, валин, пролин, треонин, серин и α -аланин, концентрация которых оказалась равной 21,87±0,63 мг/кг. Наиболее широко представлен качественный состав экстракта №3 (рис.), содержащий незаменимые (лейцин, аргинин, метионин, валин, треонин) и заменимые (пролин, серин, аланин, глицин) аминокислоты. По количественному содержанию экстракт №3 (175,34±5,31 мг/кг) также преобладает над экстрактами №1 и №2, что свидетельствует о большей степени извлекаемости аминокислот из растительного сырья с повышением температуры и давления в процессе сверхкритической углекислотной экстракции.

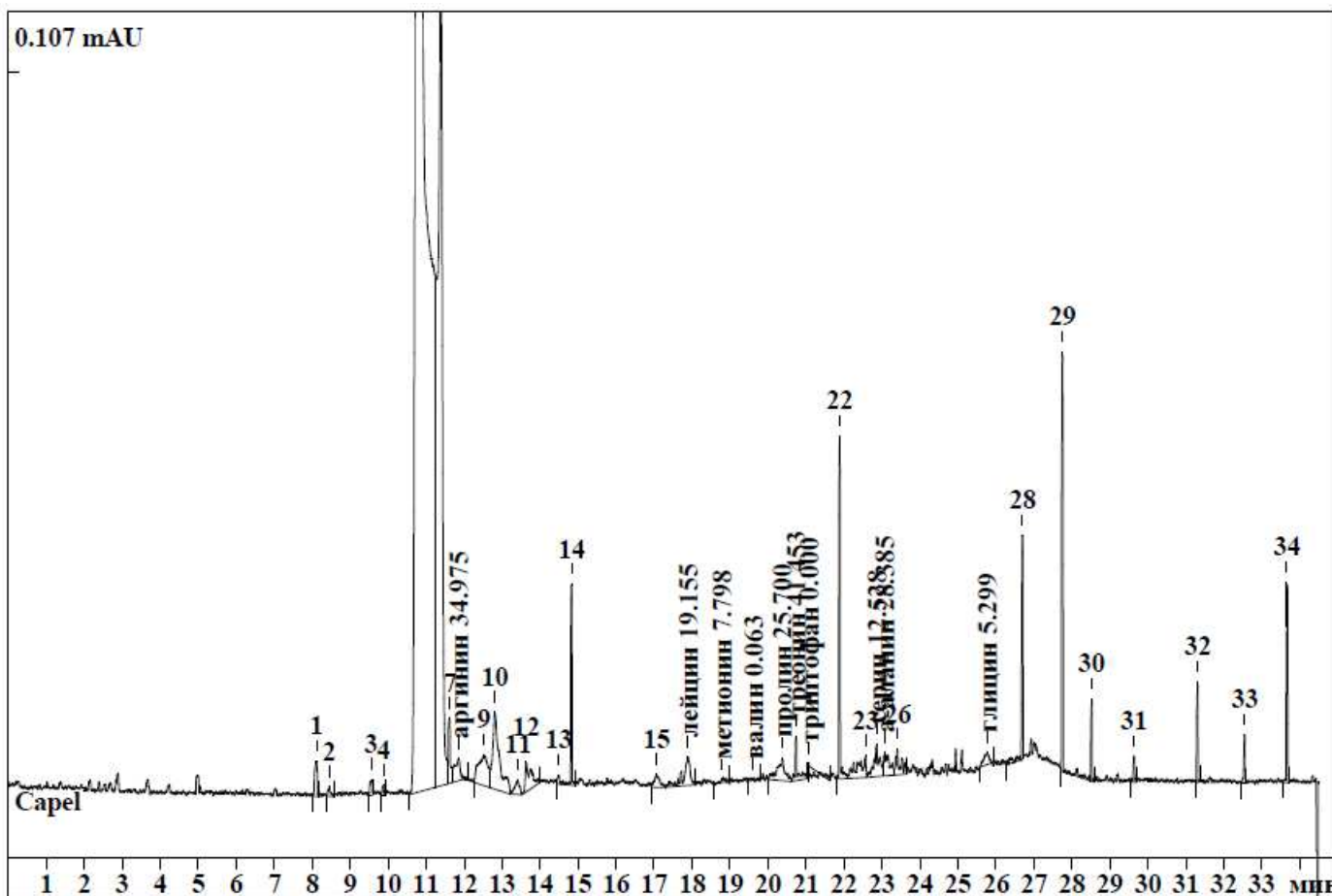


Рисунок. Электрофореграмма аминокислотного состава флюидного экстракта №3

Заключение

В результате проведенных исследований установлено наличие аминокислот в сверхкритических углекислотных экстрактах №1, №2 и №3 из семян чернушки посевной. Сравнительный анализ аминокислотных составов во флюидных экстрактах чернушки посевной позволили дифференцировать их по степени насыщенности гидрофильными соединениями – аминокислотами. Наиболее богатым по составу аминокислот оказался экстракт №3, при получении которого использовались высокие значения давления и температуры, в отличие от других получаемых экстрактов. Таким образом, регулируя отдельные параметры (температуру и давление) при производстве фитоэкстрактов из чернушки посевной методом сверхкритической углекислотной экстракции можно получать готовый продукт, содержащий комплекс гидрофобных (жирные кислоты и компоненты эфирного масла) и гидрофильных БАВ, в частности, аминокислот.

Список литературы

1. Боголицын К.Г. Перспективы применения сверхкритических флюидных технологий в химии растительного сырья // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. – 2007. - № 1. – С. 16-27.
2. Давитавян Н.А. Разработка технологии и нормирование качества жидкого и сухого экстрактов травы стальника полевого: Автореф. дис. канд. фармацевт. наук. – Пятигорск, 2007. – 24 с.
3. Дроздова И.Л., Денисова Н.Н. Изучение аминокислотного состава травы короставника полевого // Традиционная медицина. – 2012. - №29. – С. 49-51.
4. Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ». – СПб.: Веста, 2006. – С. 50-51.
5. Маширова, С.Ю., Орловская Т.В. Изучение компонентного состава липидов чернушки посевной и чернушки дамасской // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия. Медицина. Фармация. – 2012. – Вып. 17. - №4(123). – С. 223-226.
6. Методическое и аналитическое обеспечение исследований по садоводству / под ред. Э.В. Макаровой. – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ, 2010. – 300 с.
7. Развитие технологий, основанных на использовании сверхкритических флюидов / Д.Ю. Залепугин [и др.] // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. – 2006. - № 1. – С. 27-51.
8. Шиков А.Н., Макаров В.Г., Рыженков. Растительные масла и масляные экстракты: технология, стандартизация, свойства. – М.: Издательский дом «Русский врач», 2004. – 264с.
9. *Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction / Salma Cheikh-Rouhou, Souhail Besbes, Basma Hentati [et al] // Rouhou Food Chemistry. – 2007. - №101. – P. 673–681.
10. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots / Soumaya Bourgou, Riadh Ksouri, Amor Bellila [et al] // C. R. Biologies. – 2008. - №331. – P. 48–55.
11. Российский сводный каталог по НТЛ [Электронный ресурс]. - Электрон, Dr. Duke's. Phytochemical and Ethnobotanical Database. 2004.-Режим доступа: <http://www.ars-grin.gov/duke/>. – Загл. с экрана (дата обращения 23.08.2013).

Рецензенты:

Дроздова И.Л., д.фарм.н., декан фармацевтического и биотехнологического факультетов, профессор кафедры фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Курск.

Коновалов Д.А., д.фарм.н., заведующий кафедрой фармакогнозии пятигорского филиала ГБОУ ВПО Волгоградского государственного медицинского университета Минздрава России, г. Пятигорск.