

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ЛИСТЬЕВ КРЫЖОВНИКА ОТКЛОНЕННОГО (*GROSSULARIA RECLINATA* (L) MILL.)

Аджирахметова С.Л.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск, Россия (357532, Пятигорск, пр. Калинина. 11), e-mail: similla503@mail.ru

Изучен качественный и количественный состав аминокислот в листьях крыжовника отклоненного. Предварительно содержание свободных аминокислот определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием стандартных образцов индивидуальных соединений. В исследуемом экстракте таким путем обнаружены глутаминовая кислота, глицин, метионин и тирозин. В дальнейшем содержание суммы аминокислот определяли на аминокислотном анализаторе АА-33. Установлено, что в листьях крыжовника отклоненного содержится 15 аминокислот, в том числе 7 незаменимых (валин, метионин, изолейцин, лейцин, гистидин, триптофан, фенилаланин). В наибольшем количестве представлены глутаминовая кислота, тирозин, глицин и метионин. Разработана методика спектрофотометрического определения суммы аминокислот по реакции с нингидрином. Установлено, что содержание аминокислот в листьях крыжовника составляет 16,20 % (в пересчете на глутаминовую кислоту).

Ключевые слова: листья крыжовника отклоненного, заменимые и незаменимые аминокислоты.

COMPARATIVE ANALYSIS OF AMINO ACID COMPOSITION OF GOOSEBERRY REJECTEDLEAVES (*GROSSULARIA RECLINATA* (L) MILL.)

Adzhiakhmetova S.L.

Piatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute – branch GBOU VPO «Volgograd State MedicalUniversity», Pyatigorsk, e-mail: similla503@mail.ru

The qualitative and quantitative composition of amino acids in the leaves of gooseberry rejected was studied. Preliminary content of free amino acids was determined by thin layer chromatography (TLC) using standard samples of the individual compounds. In the test extract thus detected by glutamic acid, glycine, methionine and tyrosine. Subsequently, total content of amino acids was determined by amino acid analyzer AA-33. It was found that in the deflected leaf gooseberry contains 15 amino acids including essential 7 (valine, methionine, isoleucine, leucine, histidine, tryptophan, phenylalanine). In the largest amount represented glutamic acid, tyrosine, glycine and methionine. The technique of spectrophotometric determination of the amount of amino acids was developed by reaction with ninhydrin. It was established that the amino acid content in the leaves of gooseberry was 16.20 % (converted to glutamic acid).

Keywords: leaves gooseberry rejected, and nonessential amino acids.

Введение

В 2004 году НИИ питания РАМН были проведены исследования ежедневного рациона питания и на этой основе были утверждены рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ [4]. В качестве одного из альтернативных источников полифенольных соединений, в том числе флаван-3-олов (катехинов) (катехин, эпикатехин, галлокатехин, эпигаллокатехин) или янтарной кислоты предложено использовать крыжовник отклоненный (*Grossularia reclinata* (L) Mill.).

С этой целью нами были отобраны три сорта, наиболее распространенных на Северном Кавказе, а именно – «Московский красный», «Юбилейный ярко-жёлтый» и «Огни Краснодара без шипов». Сырьё собрано в период плодоношения в июле 2011 г.

Установлено содержание антиоксидантов в спиртовых и водно-спиртовых, водных извлечениях надземной части. В извлечении из листьев крыжовника отклоненного сорт «Московский красный», полученного спиртом этиловым 40 %, содержание антиоксидантов оказалось максимальным и составило в пересчете на кверцетин и на галловую кислоту ($1,715 \pm 0,021$ мг/г и $1,101 \pm 0,023$ мг/г соответственно). Эти данные явились обоснованием для выбора спирта этилового 40 % в качестве оптимального экстрагента при получении извлечения, содержащего максимальное количество антиоксидантов [1].

Поскольку именно эта фракция характеризуется максимальным содержанием количества антиоксидантов, то она была выбрана для дальнейшего изучения качественного и количественного состава фенольных соединений методом ВЭЖХ. Впервые установлено наличие витексина, изовитексина, хлорогеновой и циклоретеновой, феруловой кислот. В экстракте крыжовника обнаружено 23 вещества, из которых идентифицировано 13 соединений полифенольной природы. Они представлены главным образом флавоноидами, кумаринами и фенолкарбоновыми кислотами.

Проведено количественное определение основных групп БАВ. Установлено, что по содержанию элементов количественно преобладают калий (3,0 %), кальций (0,3 %), магний (0,5 %) и фосфор (1,0 %); содержание пигментов в листьях крыжовника (хлорофилла содержится $14,0 \text{ мг/\%} \pm 0,07$, каротиноидов - $2,7 \text{ мг/\%} \pm 0,13$); полисахариды листьев крыжовника представлены водорастворимыми полисахаридами (0,4 %), пектиновыми веществами (10,4 %), гемицеллюлозой А (9,6 %) и гемицеллюлозой Б (4,8 %). Из листьев крыжовника отклоненного выделены полисахариды и изучены некоторые физико-химические свойства пектинов: определена средняя молекулярная масса (у стеблей – 19007 г/моль, листьев – 16849 г/моль, ягод - 10071 г/моль); поверхностная активность.

Выявлена высокая комплексообразующая способность ПВ из листьев, ягод и стеблей крыжовника отклоненного по отношению к ионам Pb^{2+} [1,3]. Степень извлечения ионов свинца пектином, полученным из листьев крыжовника отклоненного, составляет 56,3 % (373 мг-ион/г), что значительно выше, чем ПВ из ягод – 39,6 % (262,7 мг-ион/г). Важно заметить, что сорбционная активность из стеблей крыжовника значительно превышает 67,7 % (555,0 мг-ион/г).

Целью настоящей работы явилось исследование аминокислотного состава листьев крыжовника отклоненного.

Материал и методика

В качестве объекта исследования был выбран наиболее распространённый на Северном Кавказе сорт «Московский красный». Сырьё собрано в период плодоношения в июле 2011 г.

Для определения свободных аминокислот: 50,0 г (точная навеска) сырья исчерпывающе

экстрагировали смесью хлороформ-бензол (1:1) в аппарате Сокслета (в течение 28 часов). После удаления растворителя сырье количественно переносили в круглодонную колбу, добавляли 300 мл горячей воды (80–90° С) и кипятили с обратным холодильником в течение 1 часа. Данную операцию проводили трехкратно, используя каждый раз свежий экстрагент. Объединенные извлечения упаривали до сиропообразной консистенции и добавляли пятикратный объем метанола для осаждения высокомолекулярных соединений. Осадок центрифугировали, и полученный фильтрат упаривали досуха [2,5,7].

12 мг порошка растворяли в 2,2 мл натрий-цитратного раствора и вводили в колонку аминокислотного анализатора АА-33. Качественный состав аминокислот в образце определяли по времени удерживания. В качестве стандарта использовали стандартную смесь, состоящую из 18 аминокислот.

Идентификацию проводили по времени удерживания методом тестеров, а количественный расчет содержания аминокислот – по площади пика методом внутреннего стандарта [2,6].

Формула расчета:

$$1) C = \frac{S \cdot C_{cm} \cdot 1000}{S_{cm} \cdot a}, \quad (1)$$

где:

C – содержание аминокислот в образце сырья, г/кг; C_{ст} – содержание аминокислот в стандарте, г/100мл; S – площадь пика определяемой аминокислоты, мм²; S_{ст} – площадь пика определяемой аминокислоты при анализе стандарта, мм²; а – масса навески сырья, взятой на анализ, г.

Идентификация свободных аминокислот. Предварительно содержание свободных аминокислот в листьях крыжовника отклоненного проводили методом ТСХ с использованием стандартных образцов индивидуальных соединений, в качестве неподвижной фазы хроматографических пластин «Kiselgel» размером 15x20 см, в качестве подвижной фазы смесь растворителей: н-бутанол- ледяная уксусная кислота – вода (80:40:40). Смесь растворителей помещали в стеклянную камеру для хроматографии, которую насыщали в течение 2-х часов.

В качестве исследуемого раствора использовали раствор экстракта в разведенной хлористоводородной кислоте. Для этого к 0,100 г экстракта прибавляли по 5 мл разведенной хлористоводородной кислоты, перемешивали (исследуемый раствор).

В качестве растворов сравнения использовали 0,05 % растворы рабочих стандартных образцов аминокислот: аргинин, аспарагиновая кислота, глицин,серин, глутаминовая кислота, треонин, валин, метионин, триптофан, фенилаланин, аланин, тирозина, пролина,

лейцина, изолейцин, лизин, гистидина, серина.

Для приготовления рабочих стандартных образцов 0,05 (точные массы) соответствующих аминокислот помещали в мерные колбы объемом 100 мл, прибавляли по 50 мл воды дистиллированной, перемешивали до растворения в ультразвуковой бане при температуре 50 °С и доводили до метки тем же растворителем.

На линию стартахроматографической пластины наносили по 20 мкл исследуемых растворов и по 5 мкл рабочих стандартных образцов аминокислот. Длина пробега растворителей 15 см. Хроматограмму высушивали при комнатной температуре в вытяжном шкафу до полного удаления растворителей и опрыскивали 0.2 % раствором нингидрина в 95 % этаноле (1,0 г нингидрина, 2,5 г ацетата кадмия, 10 мл уксусной кислоты ледяной растворяют в 500 мл спирта этилового) и нагревали в сушильном шкафу при температуре 100–105 градусов в течение 5 минут. На хроматограммах в исследуемых растворах после проявления 0,2 % раствором нингидрина обнаружены окрашенные зоны.

Для определения суммы аминокислот в экстракте была использована методика, основанная на реакции взаимодействия аминокислот с раствором нингидрина с последующим спектрофотометрированием полученного окрашенного комплекса при длине волны около 570 нм. В ходе эксперимента нами был уточнен максимум поглощения окрашенного комплекса глютаминовой кислоты с нингидрином и водного извлечения из экстракта (рисунок 1). Комплекс и раствор для исследования получали по нижеприведенной методике. Согласно полученным данным комплекс глютаминовой кислоты и нингидрина имеет максимум поглощения при длине волны 568 ± 2 нм, а комплекс водного извлечения с нингидрином имеет максимум поглощения при длине волны $568,5 \pm 2$ нм. Поэтому в наших исследованиях мы использовали длину волны 568 нм.

Для исследования около 0,0500 (точная навеска) экстракта помещали в мерную колбу вместимостью 250 мл. Прибавляли 150 мл воды очищенной и перемешивали до растворения с использованием ультразвуковой бани. Охлаждали, объем доводили до метки водой очищенной, перемешивали и извлечение фильтровали через обеззоленный фильтр (исследуемый раствор).

Около 0,0500 г (точная навеска) кислоты глютаминовой (ВФС 42-2722-96) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20–30 мл воды и доводят раствор водой до метки (PCO).

2 мл исследуемого раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 1 мл 0,25 % раствора натрия карбоната, 2 мл спиртового раствора нингидрина и нагревали 10 минут на кипящей водяной бане. После охлаждения раствор доводили водой до метки. Параллельно в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 2 мл раствора PCO

кислоты глутаминовой, и далее поступали, как указано выше. Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре при длине волны 568 нм в кювете с толщиной слоя жидкости 10 мм относительно воды. Содержание суммы аминокислот в сырье в % X, в пересчёте на кислоту глутаминовую кислоту рассчитывали по формуле:

$$x = \frac{D^* \times 250 \times M \times 50 \times 2 \times 100 \times 100}{D \times m \times 2 \times 100 \times 50 \times (100 - W)}; (2)$$

Где D* – оптическая плотность испытуемого раствора, D – оптическая плотность РСО глутаминовой кислоты; M – масса РСО глутаминовой кислоты в граммах; m-масса экстракта в г; W – потеря массы при высушивании экстракта в %.

Результаты проведенных испытаний приведены в таблицах 1, 2.

Результаты и их обсуждение

В исследуемом экстракте предварительно методом ТСХ обнаружено 5 окрашенных зон, из которых удастся идентифицировать глицин, глутаминовую кислоту, метионин и тирозин. Испытание проводилось в нескольких системах растворителей: н-пропанол: вода(70:30); этанол 96 %: аммиакконц.(70:30); н-бутанол-уксусная кислота конц. – вода (80:40:40). Во всех системах зоны идентичны. Наилучшее разделение получено в системе н-бутанол—уксусная кислота—вода (80:40:40), данные по которому приведены в таблице.

Таблица 1. Результаты хроматографического исследования аминокислотного состава экстракта крыжовника методом хроматографии в тонком слое сорбента в системе н-бутанол—уксусная кислота—вода (80:40:40)

Образец	Кол-во окраш. зон	№ зоны	Значения Rf около	Идентифицировано
Экстракт крыжовника отклоненного	5	1	0,35(розовая)	Глицин
		2	0,40(фиолетовая)	Неидентифицированно
		3	0,48(розовая)	Глутаминовая кислота
		4	0,60(розовая)	Метионин
		5	0,69(розовая)	тирозин

Далее содержание суммы аминокислот в полученной фракции определяли на аминокислотном анализаторе АА-33 [2,5], что представлено ниже.

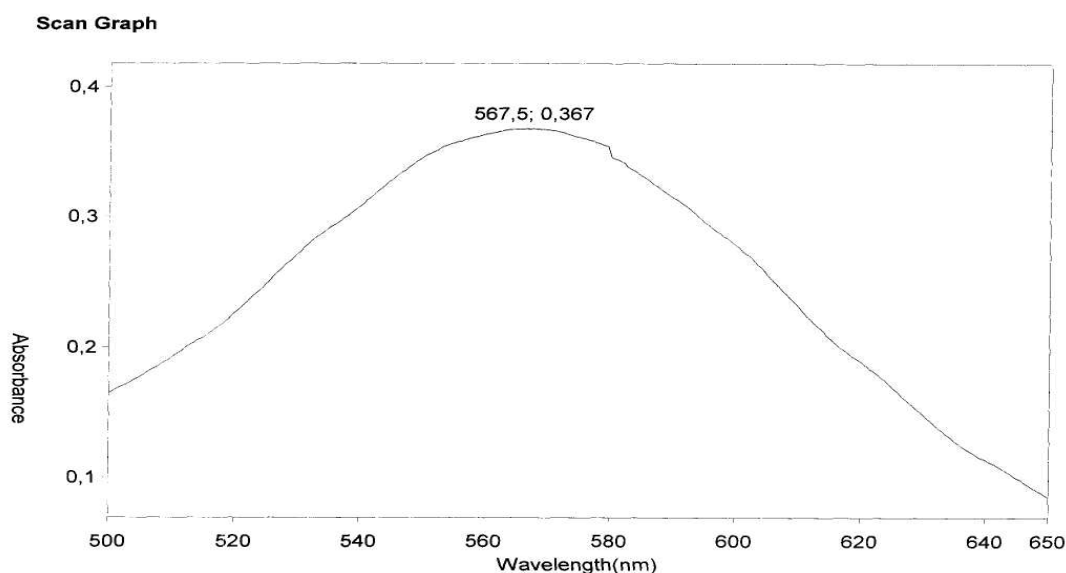
Таблица 2. Содержание свободных аминокислот

№	Аминокислоты	Крыжовник отклоненный
		С, г/%
1	Аспарагиновая кислота	0,77
2	Треонин	0,65
3	Серин	0,39
4	Глутаминовая кислота	1,98

5	Глицин	0,91
6	Аланин	0,62
7	Валин	1,07
8	Метионин	1,38
9	Изолейцин	0,27
10	Лейцин	0,47
11	Тирозин	1,55
12	Фенилаланин	0,51
13	Гистидин	0,14
14	Лизин	0,42
15	Аргинин	1,01
	Всего:	12,14

Как видно из представленных данных, экстракт из листьев крыжовника отклоненного содержит 15 аминокислот, в том числе 7 незаменимых. В наибольшем количестве в сумме присутствуют глутаминовая кислота, тирозин, глицин и метионин.

Разработана методика спектрофотометрического определения суммы аминокислот по реакции с нингидрином. Установлено содержание аминокислот в экстракте из листьев крыжовника, которое составляет $16,20 \pm 0,69$ % (в пересчете на глутаминовую кислоту).



Results Table - scan006,Sample001,Cycle01

nm	A	Peak Pick Method
567,50	0,367	Find 8 Peaks Above -3,0000 A
		Start Lambda 500,0 nm
		Stop Lambda 650,0 nm
		Sort By Wavelength

Рисунок 1. Комплекс водного раствора экстракта крыжовника отклоненного с раствором нингидрина

Выводы:

- Впервые на аминокислотном анализаторе АА-33 исследован качественный и количественный состав аминокислот в листьях крыжовника отклоненного.
- Обнаружено 15 свободных аминокислот, в том числе 7 незаменимых (валин, метионин, изолейцин, лейцин, гистидин, триптофан, фенилаланин); в значительном количестве (от общей суммы аминокислот) содержатся глутаминовая кислота, тирозин, глицин и метионин.
- Разработана методика спектрофотометрического определения суммы аминокислот по реакции с нингидрином. Установлено содержание аминокислот в листьях крыжовника, которое составляет 16,20 % (в пересчете на глутаминовую кислоту).

Список литературы

1. Аджахметова, С.Л. Антиоксидантная активность экстрактов из листьев, плодов и стеблей крыжовника отклоненного (*Grossularia reclinata* (L) Mill) / С.Л. Аджахметова, О.А. Андреева, Э.Т. Оганесян // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10-6. – С. 1297-1301.
2. Аналитическая хроматография / К.И. Сакодинский, В.В. Бражников, С.А. Волков [и др.]. – М.: Химия, 1993. – 464 с.
3. Исследование сорбционной способности пектинов и водорастворимых полисахаридов крыжовника отклоненного (*Grossularia reclinata* (L) Mill), листьев шелковицы черной (*Morus nigra* L.) и шелковицы белой (*Morus alba* L.) / С.Л. Аджахметова, Э.Т. Оганесян, И.И. Селина и др. // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. – 2013. – № 11 (154). – Вып. 22. – С. 277-282.
4. Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ (Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации). – М., 2004. – 36 с.
5. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков, И.А. Востров, С.В. Федоров [и др.]. – Воронеж: Водолей, 2004. – 528 с.
6. Химический анализ лекарственных растений: учеб. пособие для фармац. вузов / Под ред. Н.И. Гринкевич, Л. Н. Сафпониц. – М.: Высш.шк., 1983. – 176 с.
7. Якубке, Х.-Д. Аминокислоты, пептиды, белки: пер. с нем. / Х.-Д. Якубке, Х. Ешкайт. – М.: Мир, 1985. – 455 с.

Рецензенты:

Кодониди И.П., д.фарм.н., доцент кафедры органической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.

Компанцев В.А., д.фарм.н., профессор кафедры неорганической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт-филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.