

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИСТЬЕВ И ПЛОДОВ ЛИМОННИКА КИТАЙСКОГО, ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ

Ю.В. Добрин^{1*}, А.А. Мальцева¹, кандидат фармацевтических наук,
А.А. Сорокина², доктор фармацевтических наук, профессор,
А.И. Сливкин¹, доктор фармацевтических наук, профессор

¹Воронежский государственный университет;

Российская Федерация, 394006, Воронеж, Университетская пл., д. 1

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова;
Российская Федерация, 119991, Москва, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2

Введение. Лекарственные растения – перспективный источник доступных для усвоения организмом человека аминокислот (АК), которые могут накапливаться в разных морфологических органах растений в свободном и связанном виде. Лимонник китайский широко применяется в медицинской практике. Однако достоверной информации об аминокислотном составе морфологических органов растения пока недостаточно.

Цель исследования – сравнительное изучение состава аминокислот листьев и плодов лимонника китайского, заготовленных в Воронежской области.

Материал и методы. Объектами исследования служили заготовленные в 2015 г. от культивируемых в Воронежской обл. растений высушенные листья и плоды лимонника китайского. Для предварительного исследования состава аминокислот использовали тонкослойную хроматографию (ТСХ) на пластинках Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ 10х10 см в системе бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2), детектирующий реагент – 0,2% спиртовой раствор нингидрина. Подробное изучение аминокислотного профиля сырья лимонника проводили методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель – 105/105 М». Содержание свободных аминокислот устанавливали спектрофотометрически на приборе СФ 2000-01 при длине волны 568 нм.

Результаты. ТСХ-анализ показал, что состав свободных аминокислот в листьях лимонника китайского меняется в зависимости от фазы вегетации растения. Содержание суммы свободных аминокислот в пересчете на глутаминовую кислоту в листьях колеблется от 0,41% (цветение) до 0,48% (формирование плодов). Установлено, что листья (в фазу плодоношения) и плоды лимонника имеют одинаковый качественный состав аминокислот, но отличаются по количественному содержанию. В листьях содержится аминокислот почти в 2 раза больше, чем в плодах.

Заключение. Выявлен специфический набор аминокислот, характерный для плодов лимонника и листьев лимонника в разные фазы вегетации растения. Плоды лимонника и листья (в фазу плодоношения) содержат одинаковый набор аминокислот, установлено наличие 17 аминокислот, 7 из которых относятся к незаменимым.

Ключевые слова: лимонник китайский, *Schizandra chinensis* (Turcz.) Baill., плоды, листья, аминокислоты, содержание, тонкослойная хроматография, капиллярный электрофорез.

*E-mail: yahooolj88@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

В растениях синтезируются различные классы биологически активных веществ (БАВ), комплекс которых оказывает разносторонний и сочетанный эффект на организм человека. Одним из важнейших компонентов состава растительных объектов являются аминокислоты (АК), принимающие участие в биосинтезе белков, ферментов, гормонов и других активных соединений, необходимых человеку для нормального функционирования организма [1–3].

20 протеиногенных АК входят в состав белков, из них 8 АК – незаменимые для человека. Непро-

теиногенные АК (свыше 200 индивидуальных соединений) не входят в состав белков и обеспечивают уникальную особенность аминокислотного обмена у растений. Они обеспечивают азотный фонд (запас); транспортную форму азота по растению; легко подвергаются метаболизму и при необходимости снабжают растение NH_4^+ для синтеза белков [4].

Аминокислотный состав растительных объектов изучен пока недостаточно, что связано с особенностями анализа данной группы БАВ. Растения – перспективный источник доступных для усвоения организмом АК, которые могут накапливаться в разных морфологических органах растений в свободном и связанном виде [5].

Лимонник китайский - *Schizandra chinensis* (Turcz.) Baill. – многолетняя травянистая лиана, широко применяемая в медицинской практике. Плоды и семена лимонника являются фармакопейными видами сырья, главным действующим компонентом которых принято считать лигнаны. Однако недостаточно информации, касающейся изучения АК в морфологических органах данного растения.

Для анализа АК в лекарственных препаратах и растительных объектах многие исследователи используют современные экспрессные и легко воспроизводимые физико-химические методы (метод бумажной и тонкослойной хроматографии, ВЭЖХ, капиллярный электрофорез, спектрофотометрия и др.) [6].

Цель работы – сравнительное изучение состава аминокислот листьев и плодов лимонника китайского, заготовленных в Воронежской области.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были выбраны листья лимонника китайского, заготовленные в 2015 г. в 3 срока: во время цветения (май), в период формирования плодов (июль), во время активного плодоношения (сентябрь). Кроме того, были заготовлены плоды данного растения (фаза активного плодоношения, сентябрь 2015), которые использовали для сравнительного анализа аминокислотного состава.

Присутствие АК в листьях лимонника китайского устанавливали с помощью хроматографии в тонком слое сорбента на пластинках Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ 10×10 см. Подвижной фазой была выбрана система растворителей, рекомендуемая большинством литературных источников: бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2), детектирующий реагент – 0,2% спиртовой раствор нингидрина [6]. Основной качественной реакцией, подтверждающей наличие в том или ином объекте АК, является нингидриновая проба, с помощью которой оценивали присутствие АК в листьях лимонника китайского. В качестве стандарта использовали водный раствор глутаминовой кислоты в концентрации 0,1%, а также величины Rf аминокислот, представленные в литературе [6].

Так как АК относятся к группе гидрофильных соединений, для проведения анализа получали во-

дное извлечение из листьев лимонника в соотношении 1:10, которое наносили на пластинки Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ 10×10 см в количестве 5 мкл.

Количественное содержание свободных аминокислот в листьях лимонника определяли по методике Г.И. Олешко и соавт. [7, 8]. Для этого навеску измельченного растительного сырья экстрагировали водой очищенной с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 2 мл фильтрата, прибавляли 4 мл фосфатного буфера с рН 6,4; а также 2 мл 1% раствора нингидрина в 95% спирте этиловом и 2 мл 0,05% водного раствора аскорбиновой кислоты. В контрольном опыте использовали РСО глутаминовой кислоты, который подвергали аналогичной подготовке. Измерение оптической плотности проводили на приборе СФ 2000–01 в аналитическом максимуме при длине волны 568 нм.

Сравнительное изучение качественного и количественного аминокислотного состава листьев и плодов лимонника проводили методом капиллярного электрофореза на базе испытательной лаборатории ООО «Комбикорм» на приборе «Капель–105/105 М». Метод основан на получении из свободных форм АК фенилизотиокарбамильных производных, дальнейшем их разделении и количественном определении [9]. Для выполнения анализа методом капиллярного электрофореза точные навески образцов сырья подвергали кислотному гидролизу 6 М раствором кислоты хлор-

ристоводородной при температуре $110 \pm 5^\circ\text{C}$ в течение 16–18 ч. Условия разделения: буфер 30 мМ фосфатный, 4 мМ β -циклодекстрин (рН 7,4); капилляр ($L_{\text{эфф}}/L_{\text{общ}} = 65/75$ см, ID=50 мкм); ввод пробы 150 мбар·с; напряжение +25 кВ; УФ-детектирование – 254 нм; температура – 30°C .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ТСХ-анализ показал наличие в листьях лимонника китайского свободных АК, которые проявлялись на хроматограмме в виде розовых и малиновых пятен на белом фоне пластинки (рис. 1). В извлечениях из листьев лимонника китайского, заготовленных до цветения, обнаружено 4 зоны, идентифицированные как аргинин, глицин, глутаминовая кислота и лейцин. Листья, собранные во время формирования плодов, характеризовались 5 зонами АК, которые были идентифицированы по величинам

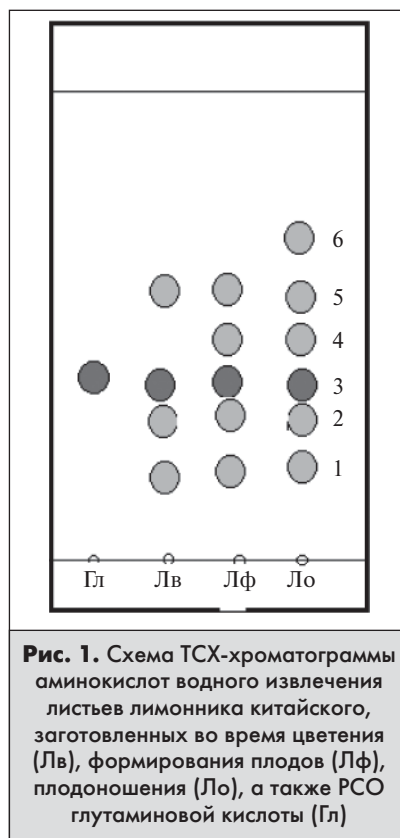


Рис. 1. Схема ТСХ-хроматограммы аминокислот водного извлечения листьев лимонника китайского, заготовленных во время цветения (Лв), формирования плодов (Лф), плодоношения (Ло), а также РСО глутаминовой кислоты (Гл)

Rf как аргинин, глицин, глутаминовая кислота, метионин и лейцин. В извлечении из листьев, заготовленных в период плодоношения, отмечены 6 зон АК, помимо перечисленных выше, установлено присутствие фенилаланина. Значения Rf зон АК листьев лимонника, заготовленных в Воронежской обл. в разные сроки вегетации (табл. 1), совпадают с данными литературы [6].

Методом дифференциальной спектроскопии осуществляли количественное определение суммы

свободных АК в листьях лимонника, заготовленных в разные сроки. Анализ полученных спектров поглощения показал, что все анализируемые объекты имели максимумы поглощения при длине волны 568 нм (рис. 2), соответствующие картине спектра поглощения продуктов взаимодействия глутаминовой кислоты с раствором нингидрина.

Согласно результатам проведенного анализа, содержание суммы АК в пересчете на глутаминовую кислоту во всех объектах примерно одинаковое и составляет соответственно для листьев, заготовленных во время цветения, формирования плодов и плодоношения 0,41, 0,48, и 0,44%.

Предварительное исследование показало, что в листьях лимонника, заготовленных в фазу формирования плодов, присутствует наибольшее количество АК. Поэтому для дальнейшего углубленного изучения полного аминокислотного профиля листьев лимонника методом капиллярного электрофореза было

ЗНАЧЕНИЯ Rf ЗОН АМИНОКИСЛОТ ЛИСТЬЕВ ЛИМОННИКА КИТАЙСКОГО, ЗАГОТОВЛЕННЫХ В ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ

№ пятна	Время заготовки листьев			Идентифицированное вещество
	цветение	формирование плодов	плодоношение	
1	0,18	0,21	0,20	Аргинин
2	0,26	0,26	0,27	Глицин
3	0,32	0,30	0,32	Глутаминовая кислота
4	—	0,50	0,47	Метионин
5	0,56	0,56	0,58	Лейцин
6	—	—	0,66	Фенилаланин

Таблица 1

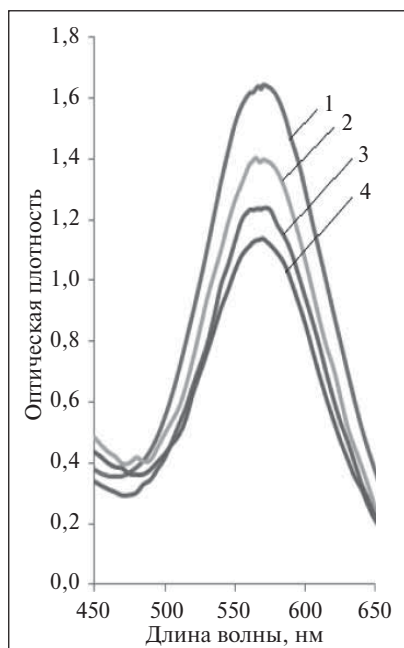


Рис. 2. Фрагмент спектра поглощения продуктов взаимодействия аминокислот листьев лимонника китайского с 0,2% спиртовым раствором нингидрина: 1 – РСО глутаминовой кислоты; 2 – водное извлечение из листьев лимонника китайского, заготовленных во время формирования плодов; 3 – во время цветения; 4 – плодоношения

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИСТЬЕВ И ПЛОДОВ ЛИМОННИКА КИТАЙСКОГО (МЕТОД КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА)

Таблица 2

Идентифицированная аминокислота, %	Содержание аминокислот, %			
	Листья лимонника китайского	Процент от суммы АК, %	Плоды лимонника китайского	Процент от суммы АК, %
Аргинин	1,16	12,17	0,72	12,04
Лизин*	0,32	3,35	0,25	4,18
Тирозин	0,46	4,82	0,19	3,17
Фенилаланин*	0,76	7,97	0,24	4,01
Гистидин	0,28	2,93	0,14	2,34
Лейцин*	0,91	9,54	0,36	6,02
Изолейцин*	0,29	3,04	0,20	3,34
Метионин*	0,15	1,57	0,09	1,50
Валин*	0,51	5,35	0,21	3,51
Пролин	0,72	7,55	0,28	4,68
Треонин*	0,60	6,29	0,39	6,52
Серин	0,56	5,87	0,38	6,35
Аланин	0,45	4,72	0,28	4,68
Глицин	0,64	6,71	0,29	4,84
Цистеин	0,10	1,04	0,06	1,00
Глутаминовая кислота	1,02	10,70	1,16	19,39
Аспарагиновая кислота	0,60	6,29	0,74	12,37

Примечание. * – незаменимые аминокислоты.

выбрано сырье, заготовленное в эту фазу вегетации. Проводилось сравнительное исследование содержания аминокислот также в плодах лимонника китайского.

Анализ показал количественные различия аминокислотного состава листьев и плодов лимонника (табл. 2, рис. 3, 4). Согласно полученным данным, в листьях и плодах лимонника китайского, заготовленных во время формирования плодов, присутствуют 17 АК, среди которых 7 АК (лизин, фенилаланин, лейцин, изолейцин, метионин, валин, треонин) относятся к незаменимым. АК, преобладающие в листьях лимонника, – аргинин, лейцин, глутаминовая кислота, а в плодах – аргинин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты (рис. 5).

Полученные данные свидетельствуют, что в листьях лимонника китайского содержание практически каждой АК превышает таковое в плодах. Исключение составляют глутаминовая и аспарагиновая кислоты, количество которых в плодах выше, чем в листьях лимонника китайского.

Проводя анализ суммарного содержания АК в листьях и плодах лимонника, необходимо отметить, что оно составило 9,53% и 5,98% соответственно. Следовательно, АК преимущественно накапливаются в листьях изучаемого растения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе исследования выявлен специфический набор аминокислот, характерный для плодов и листьев лимонника в разные фазы вегетации растения. Показано, что в листьях состав аминокислот меняется в зависимости от фазы вегетации растения. Плоды лимонника и листья (в фазу плодоношения) содержат одинаковый набор аминокислот,

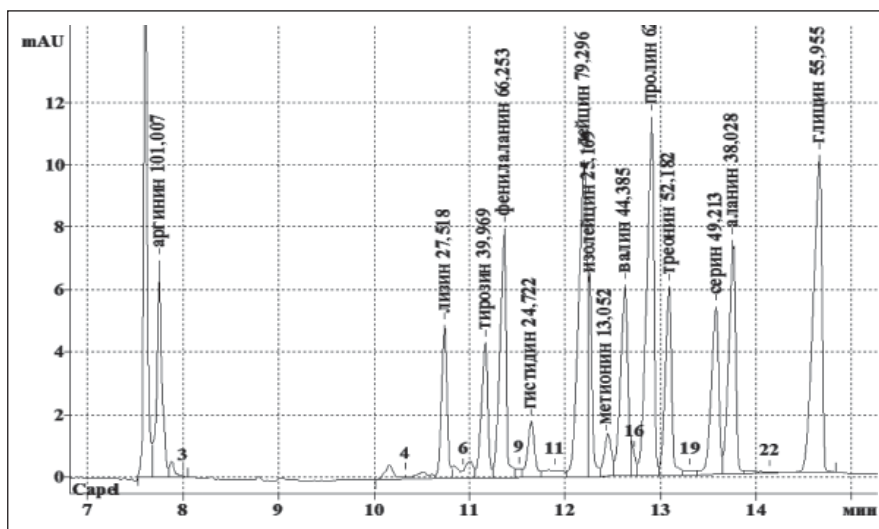


Рис. 3. Электрофореграмма аминокислот листьев лимонника китайского

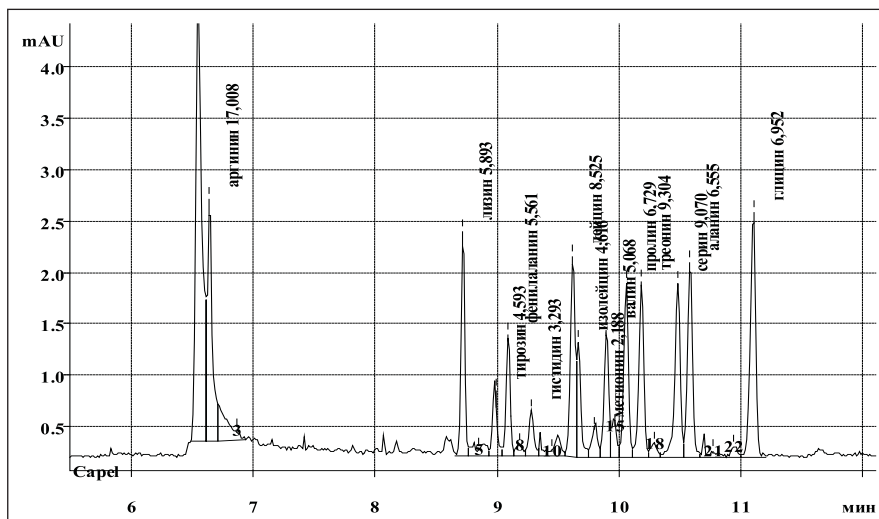


Рис. 4. Электрофореграмма аминокислот плодов лимонника китайского

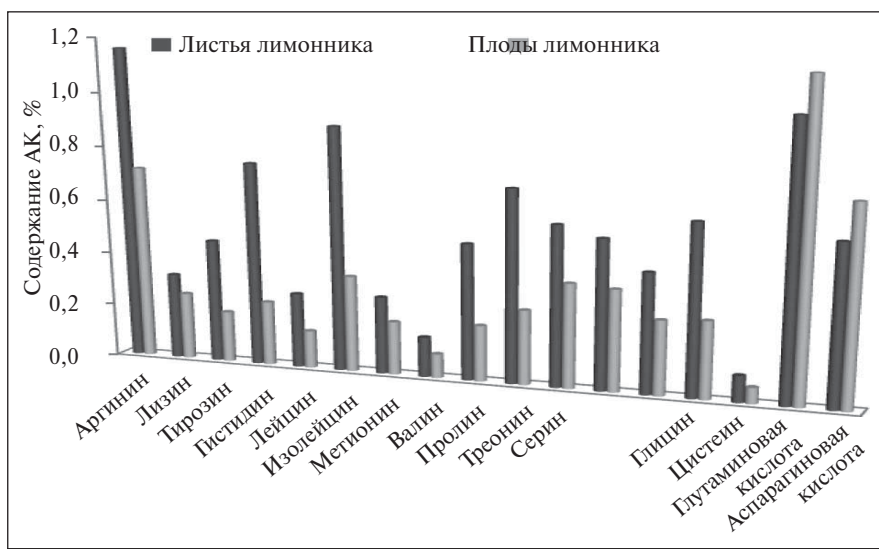


Рис. 5. Содержание аминокислот в плодах и листьях лимонника китайского

установлено наличие 17 аминокислот, 7 из которых относятся к незаменимым. Преобладающими аминокислотами в листьях лимонника являются аргинин, лейцин, глутаминовая кислота, а в плодах — аргинин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты. По количественному содержанию аминокислот листья богаче плодов. Для листьев лимонника в разные фазы вегетации определено содержание суммы свободных аминокислот в пересчете на глутаминовую кислоту.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бубенчиков Р.А. Аминокислотный и минеральный состав травы фиалки удивительной. Вест. Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация., 2006; 1: 186–8.
2. Туртуева Т.А. и др. Аминокислотный состав корней *Astragalus membranaceus* (Fish.) Bunge. Вест. Бурятского государственного университета, 2013; 12: 75–7.

3. Осипова С.К., Горохова Т.А., Фурса Н.С. Аминокислотный состав сырья и шрота валерианы лекарственной. Фармация, 2016; 65 (1): 13–5.
4. Филипова Г.Г., Смолич И.И. Основы биохимии растений. Минск.: БГУ, 2004;136.
5. Агаджанян А.С., Сорокина А.А. Аминокислоты седативного сбора. «II Гаммермановские чтения». Сборник научных трудов. СПб., 2014: 18–9.
6. Тринева О.В., Синкевич А.В., Сливкин А.И. Исследование аминокислотного состава извлечений из растительных объектов. Химия растительного сырья, 2015; 2: 141–8.
7. Олешко Г.П. и др. Разработка унифицированной методики количественного определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах. Фармация, 2011; 60 (3): 14–7.
8. Ярыгина Т.Н., Захаров А.В., Дубовик В.А. Способ количественного определения алифатических аминокислот. Патент РФ №2167410, 2001.
9. Комарова Н.В., Камениев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель». СПб., 2006; 212.

Поступила 26 мая 2016 г.

AMINO ACID COMPOSITION OF THE LEAVES AND FRUITS OF CHINESE MAGNOLIA VINE (*SCHIZANDRA CHINENSIS*) GROWING IN THE VORONEZH REGION

Yu.V. Dobrina¹; A.A. Maltseva¹, PhD; Professor A.A. Sorokina², PhD; Professor A.I. Slivkin¹, PhD

¹Voronezh State University; 1, Universitetskaya Sq., Voronezh 394006, Russian Federation

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119991, Russian Federation

SUMMARY

Introduction. Medicinal plants are a promising source available for human absorption of amino acids (AA) that can accumulate in free and bound forms in different morphological parts of plants. Chinese magnolia vine is widely used in medical practice. However, reliable information about the AA composition of the morphological parts of the plant is still scarce.

Objective: to comparatively investigate the composition of AAs in the Chinese magnolia vine leaves and fruits harvested in the Voronezh Region.

Material and methods. The objects of the investigation were dried Chinese magnolia vine leaves and fruits harvested in 2015 from the plants cultivated in the Voronezh Region. The composition of AAs had been previously examined using thin layer chromatography (TLC) on 10x10-cm Sorbfil PTCC-AF-B-UF plates in the butanol-acetic acid-water (4:1:2) system; the detecting reagent was 0.2% alcohol solution of ninhydrin. The amino acid profile of raw Chinese magnolia vine material was investigated in detail by capillary electrophoresis using a Capel – 1055/105 M device. The content of free AAs was measured spectrophotometrically, by applying a SF 2000-01 device at a wavelength of 568 nm.

Results. TLC analysis showed that the composition of free AAs in the Chinese magnolia vine leaves varied with the stage of plant growth. The sum of free AAs in the leaves, calculated with reference to glutamic acid, ranged from 0.41% (flowering) to 0.48% (fruiting). The leaves (at the fruiting stage) and fruits of magnolia vine were established to have an equal composition of AAs, but to differ in their quantitative content. The leaves contained almost twice as much as AAs than the fruits.

Conclusion. The investigators have identified a specific set of AAs, which is characteristic of the fruits and leaves of magnolia vine at different stages of plant growth. The fruits of magnolia vine and its leaves (during fruiting) contain an equal set of AAs; 17 AAs have been found to be present; 7 of which are essential.

Key words: Chinese magnolia vine, *Schizandra chinensis* (Turcz.) Baill., fruits, leaves, amino acids, content, thin layer chromatography, capillary electrophoresis.

REFERENCES

1. Bubenchikov R.A. The amino acid and mineral composition of grass violet amazing. Bulletin of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy., 2006; 1: 186–8 (in Russian).
2. Turtueva T.A. et al. The amino acid composition of the roots of *Astragalus membranaceus* (Fish.) Bunge. Bulletin of the Buryat State University, 2013; 12: 75–7 (in Russian).
3. Osipova S.K., Gorokhova T.A., Fursa N.S. The amino acid composition of roots and meal of *Valeriana officinalis*. Farvatsiya, 2016; 65 (1): 13–5 (in Russian).
4. Filiptsova G.G., Smolich I.I. Fundamentals of biochemistry of plants. Minsk: BGU, 2004;136 (in Russian).
5. Agadjanjan A.S., Sorokina A.A. Amino acids sedative collection. «II Gammermanovskie reading.» Collection of scientific papers. СПб., 2014: 18–9. (in Russian).
6. Trineeva O.V., Sinkevich A.V., Slivkin A.I. Study on amino acid composition of extracts from plant facilities. The chemistry of plant material, 2015; 2: 141–8 (in Russian).
7. Oleshko G.P. et al. Development of standardized methods of quantitative determination of the amount of free amino acids in medicinal plant raw materials extraction and preparations. Farvatsija, 2011; 60 (3): 14–7 (in Russian).
8. Jarygina T.N., Zakharov A.V., Dubovik V.A. Method of quantitative determination of aliphatic amino acids. Patent RF №2167410, 2001 (in Russian).
9. Komarova N.V., Kameniev Ja.S. Practical guidance on the use of capillary electrophoresis systems «Kapel». S-Pb., 2006; 212 (in Russian).