

О.А. Андрущенко, Е.В. Криворучко

АМИНОКИСЛОТЫ ЛИСТЬЕВ SORBUS ARIA

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с помощью хроматографа фирмы Agilent Technologies (модель 1100) в листьях рябины арии (Sorbus aria) определено количественное содержание 20 свободных аминокислот, из которых преобладают глутаминовая кислота, глутамин, аланин и треонин, а также 18 связанных, из которых преобладают глутаминовая и аспарагиновая кислоты, аргинин, лейцин и лизин. 7 аминокислот являются незаменимыми, их содержание от суммы общих аминокислот составляет 33,22%. Также методом Кьельдаля определено содержание общего белка в листьях рябины арии, оно составляет 13,89%.

Ключевые слова: аминокислоты, рябина ария (Sorbus aria).

ВВЕДЕНИЕ

Аминокислоты относятся к органическим соединениям, в молекулах которых одновременно содержатся амино- и карбоксильные группы. Важной особенностью аминокислот есть их способность к поликонденсации, в результате которой образуются полиамиды, белки (протеины) и др. Всего известно приблизительно 1000 аминокислот, в организме человека существует более 60, но в состав белков из них входит только 20 протеиногенных аминокислот. В медицине они применяются для лечения заболеваний печени, язвы желудка, малокровия, ожогов, нервно-психических заболеваний и др. В последние годы значительно вырос интерес ученых к изучению содержания аминокислот в лекарственном растительном сырье, так как они имеют определенное влияние на биологическое действие фитопрепаратов и БАДов, в состав которых они входят [1-2]. Аминокислотный состав растений рода рябина (*Sorbus L.*) семейства розоцветные (*Rosaceae*) остается малоизученным.

Род рябина (*Sorbus L.*) включает 84 вида и значительное число гибридов. В странах СНГ естественно растет 34 вида, на территории Украины – 3. Все виды распространены исключительно в умеренном поясе Северного полушария. Рябина – ценное плодородное, лекарственное и декоративное растение. В официальной медицине используют плоды рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia*), основными действующими веществами которых являются терпеноиды, фенольные соединения, органи-

ческие кислоты, углеводы, обуславливающие их поливитаминное, диуретическое, желчегонное и слабительное действие. Другие виды рябин, произрастающих в Украине, изучены недостаточно. Так, например, рябина ария или круглолистная (*Sorbus aria (L.) Grantz.*) – это дерево до 15 м высотой с яйцевидной густой кроной; зеленоватыми, клейкими почками; цельными, округло-эллиптическими, 6 - 14 см длиной, кожистыми, сверху темно-зелеными, снизу войлочно-опушенными, осенью бронзовыми листьями; белыми цветками до 1,5 см в диаметре, собранными в щитки; оранжево-красными шаровидными плодами, до 1,5 см в диаметре. Ее родина – Западная Европа [3-8]. Ранее авторами проводилось определение содержания душистых веществ, карбоновых кислот, макро- и микроэлементов в листьях рябины арии [9-11].

Целью данной работы было определение свободных, связанных аминокислот и белка в листьях *Sorbus aria*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования листья рябины арии заготавливали в мае 2012 г. в Ботаническом саду Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина. Определение свободных и связанных аминокислот проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы Agilent Technologies (модель 1100) [12-13].

Для определения свободных аминокислот на аналитических весах в виале на 10 мл взвешивали 0,3 г мелкоизмельченно-

го растительного сырья. Затем в виалу добавляли 3 мл 0,1 N водного раствора кислоты хлористоводородной, содержащего 0,2% β-меркаптоэтанола. Виалу герметично закрывали и помещали на 2 часа в ультразвуковую баню при температуре 50°C, после чего центрифугировали и фильтровали. В реакционную виалу объемом 2 мл отбирали 100 мкл фильтрата и помещали в вакуумный эксикатор при температуре 40 - 45°C и давлении 1,5 мм рт. ст. до полного удаления кислоты хлористоводородной. Затем в виалу для анализа последовательно добавляли автоматическим дозатором 200 мкл 0,8 M боратного буфера pH 9,0, 200 мкл 20 mM раствора 9-флуоренилметоксикарбонил хлорида в ацетонитриле, после 10 минутной выдержки в реакционную виалу добавляли 20 мкл 150 mM раствора амантадина гидрохлорида в 50% водном ацетонитриле.

Для определения общего содержания аминокислот (связанных и свободных) к 0,2 г измельченного сырья в виалу добавляли 3 мл 6 N водного раствора кислоты хлористоводородной, содержащего 0,4% β-меркаптоэтанола. Виалу герметично закрывали и выдерживали 24 часа при темпе-

ратуре 110°C, после чего центрифугировали и отфильтровывали. В реакционную виалу объемом 2 мл отбирали 20 мкл фильтрата, помещали в вакуумный эксикатор и дальше проводили анализ так, как описано выше.

Дальнейшее определение аминокислот проводили на хроматографе фирмы Agilent Technologies (модель 1100), укомплектованном проточным вакуумным дегазатором G1379A, 4-х канальным насосом градиента низкого давления G1311A, автоматическим инжектором G1313A, термостатом колонок G13116A, диодно-матричным детектором G1316A. Для проведения анализа использовали хроматографическую колонку размером 4,6×50 мм, заполненную октадецилсилильным сорбентом, зернением 1,8 мкм, «ZORBAX-XDB-C18». Устанавливали следующий режим хроматографирования: рабочее давление элюента 220-275 кПа; температура термостата колонки 50°C; объем пробы 2 мкл и др. (табл. 1). Параметры детектирования: масштаб измерений 1,0; время сканирования 0,5 сек; длина волны детектирования 265 нм. Идентификацию аминокислот производили по временам удерживания стандартов.

Таблица 1 – Режим хроматографирования на хроматографе фирмы Agilent Technologies

Время, мин	0,05 M водный раствор ацетата натрия, % (pH 6,5)	0,10 M водный раствор ацетата натрия, % ACN= (23:22, v/v) (pH 6,5)	Вода, %	Ацетонитрил, %	Скорость подачи подвижной фазы, мл/мин
0	70	30	0	0	1,5
3,87	27	73	0	0	1,5
5,73	0	100	0	0	1,5
7,83	0	100	0	0	1,5
8,17	0	0	15	85	1,5
10,00	0	0	2	98	2,0
10,10	70	30	0	0	2,0
11,00	70	30	0	0	2,0

Содержание общего белка в листьях рябины арии определяли методом Кьельдаля [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из результатов исследований, представленных в таблице 2 и на рисунках 1 и 2, в листьях рябины арии определено количественное содержание 20 свободных аминокислот, из которых преобладают глутаминовая кислота,

глутамин, аланин, треонин, а также 18 связанных, из которых преобладают глутаминовая и аспарагиновая кислоты, аргинин, лейцин и лизин. Это совпадает с данными литературы о том, что основная масса азота большинства аминокислот проходит в реакциях обмена через стадии превращения в аспарагиновую и глутаминовую кислоты или в α-аланин. 7 аминокислот являются незаменимыми. Так, например, преобладающий в сырье лизин обеспечивает должное усвоение кальция,

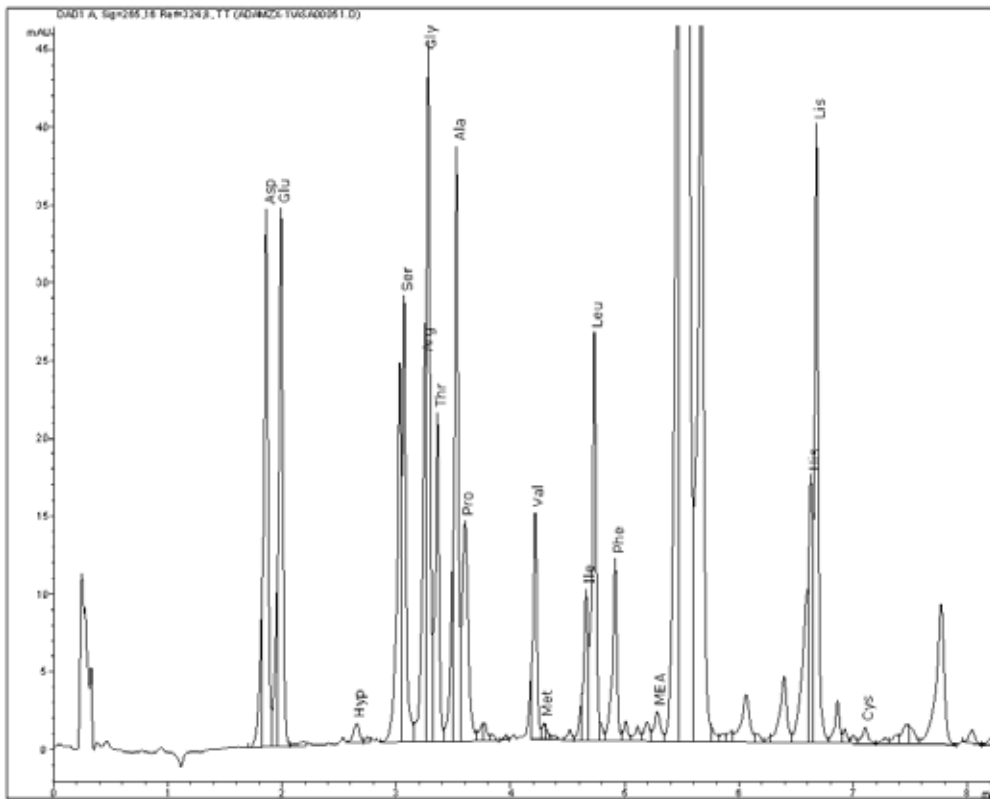


Рисунок 1 – Хроматограмма общих аминокислот листьев Sorbus aria

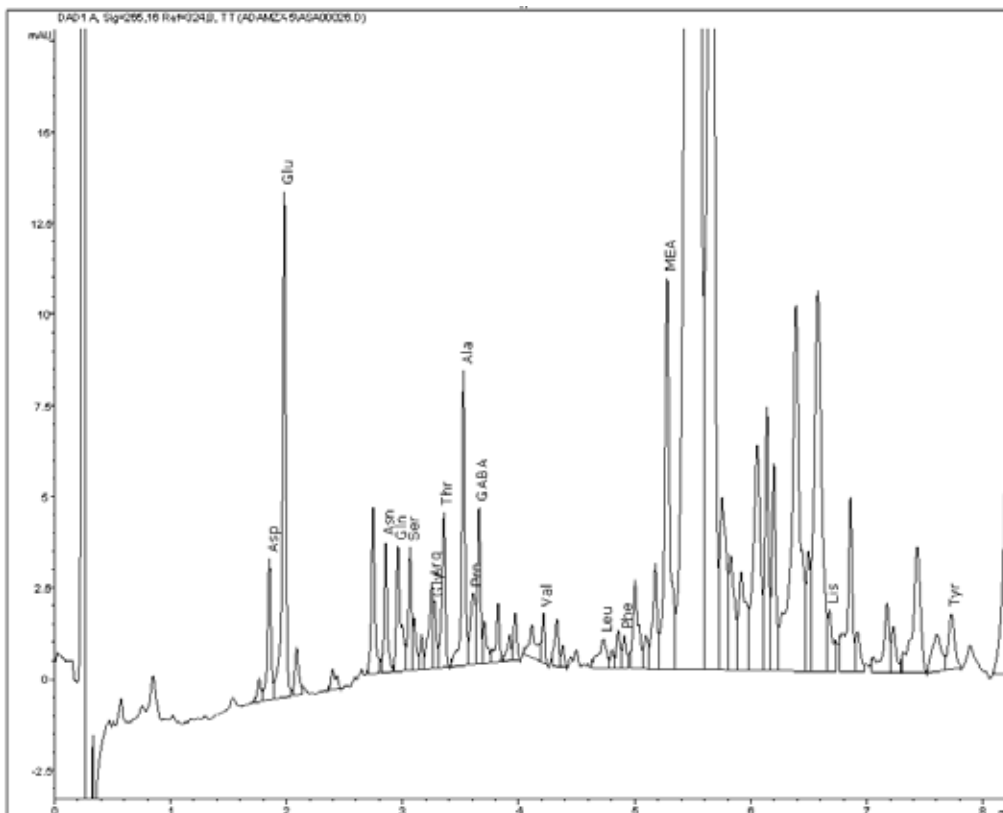


Рисунок 2 – Хроматограмма свободных аминокислот листьев Sorbus aria

участвует в образовании коллагена, в выработке антител, гормонов и ферментов, синтезе карнитина. Лейцин понижает содержание сахара в крови, необходим для построения и развития мышечной ткани, синтеза протеина, укрепления иммунной системы [15].

Содержание незаменимых аминокислот от суммы общих аминокислот в листьях рябины арии составляет 33,22%, от суммы связанных аминокислот – 33,42%, от суммы свободных аминокислот – 15,48%. Содержание общего белка в сырье составляет 13,89% (на сухой вес).

Таблица 2 – Содержание аминокислот в листьях *Sorbus aria*

№	Аминокислота	Содержание общих аминокислот, мг/100 г	Содержание связанных аминокислот, мг/100 г	Содержание свободных аминокислот, мг/100 г
1.	Аспарагиновая	510,8	504,9	5,9
2.	Глутаминовая	564,7	541,2	23,5
3.	4-Гидроксипролин	30,1	29,6	0,5
4.	Аспарагин	0,0	0,0	6,0
5.	Глутамин	0,0	0,0	8,1
6.	Серин	262,2	258,2	4,0
7.	Аргинин	453,3	448,1	5,3
8.	Глицин	262,3	261,0	1,3
9.	Треонин*	236,7	230,4	6,3
10.	Аланин	305,2	297,6	7,6
11.	Пролин	278,5	274,3	4,2
12.	γ-аминомасляная кислота	0,0	0,0	4,8
13.	Валин*	165,2	163,3	1,9
14.	Метионин*	18,0	18,0	0,0
15.	Изолейцин*	162,7	162,1	0,6
16.	Лейцин*	380,0	378,3	1,7
17.	Фенилаланин*	230,1	228,3	1,8
18.	Цистин	0,0	0,0	2,8
19.	Гистидин	139,2	139,2	0,0
20.	Лизин*	292,8	291,0	1,8
21.	Цистеин	13,5	13,3	0,2
22.	Тирозин	166,4	163,6	2,8
	Сумма всех аминокислот	4471,6	4402,4	91,1
	Сумма незаменимых* аминокислот	1485,5	1471,4	14,1
	Содержание незаменимых аминокислот от суммы аминокислот, %	33,22	33,42	15,48

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с помощью хроматографа фирмы Agilent Technologies в листьях рябины арии (*Sorbus aria*) определено количественное содержание 20 свободных аминокислот, из которых преобладают глутаминовая кислота, глутамин, аланин, треонин, а также 18 связанных, из которых преобладают глутаминовая и аспарагиновая кислоты, аргинин, лейцин и лизин. 7 аминокислот являются незаменимыми, их содержание от суммы общих

аминокислот составляет 33,22%. Содержание общего белка в листьях рябины арии составляет 13,89%.

Листья рябины арии являются перспективным сырьем для дальнейшего фармакогностического исследования.

SUMMARY

O. A. Andrushchenko, E. V. Kryvoruchko
SORBUS ARIA LEAVES' AMINO ACIDS

The method of high-performance liquid chromatography was applied to analyse the content of Whitebeam (*Sorbus aria*)

leaves' amino acids in the Agilent Technologies (model 1100) chromatograph. In the result of our research 20 free amino acids were detected, among of which Glutamic acid, Glutamine, Alanine and Threonine predominate. Glutamic and Aspartic acids, Arginine, Leucine and Lysine predominate among 18 bound amino acids. 7 amino acids are essential. Their content in total amount of amino acids is 33,22%. The total protein content in the leaves of *Sorbus aria* was detected by the Kjeldahl method. The leaf protein content is 13,89%.

Keywords: amino acids, Whitebeam (*Sorbus aria*).

ЛИТЕРАТУРА

1. Гонський, Я.І. Біохімія людини / Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук, М.І. Калінський. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2002. – 744 с.
2. Ластухін, Ю.О. Хімія природних органічних сполук: Навч. посібник. – Львів: Національний університет «Львівська політехніка», «Інтелект-Захід». – 2005. – 560 с.
3. Витковский, В.Л. Плодовые растения мира / В.Л. Витковский. – СПб.: Изд-во «Лань», 2003. – 592 с.
4. Дендрофлора України. Дикорослі й культивовані дерева і кущі. Покритонасінні. Частина II. Довідник / М.А. Кохно [та ін.]; За ред. М.А. Кохна та Н.М. Трофименко. – Київ: Фітосоціоцентр, 2005. – 716 с.
5. Каротиноиды, хлорогеновые кислоты и другие природные соединения плодов рябины / И.А. Гостищев [и др.] // Научные ведомости. Серия «Естественные науки». – 2010. – Выпуск 10. – №3 (74). – С. 83–92.
6. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 2. Семейства Actinidiaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae / Отв. ред. А.Л. Буданцев. – СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2009. – 513 с.
7. Флора Восточной Европы, том X. Коллектив авторов. Отв. ред. и ред. тома Н.Н. Цвелев. СПб.: Мир и семья; Изд-во СПХФА, 2001. – 670 с.
8. Olszewska, M.A. Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from various leaves extracts of *Sorbus aria* (L.) Crantz / M.A. Olszewska, P. Michel // Nat. Prod. Res. – 2012. – V. 26. – P. 243–254.
9. Криворучко, О.В. Елементний склад листя деяких видів роду *Sorbus* / О.В. Криворучко, А.В. Кононенко, В.І. Шатровська // Фітотерапія. Часопис. – 2010. – № 1. – С. 104–107.
10. Криворучко, Е.В. Карбоновые кислоты *Sorbus aucuparia* и *S. aria* / Е.В. Криворучко, О.А. Андрущенко, А.В. Кононенко // Химия природных соединений. – 2013. – № 4. – С. 635–636.
11. Криворучко, О.В. Хромато-маспектрометричний аналіз запашних речовин листя *Sorbus aucuparia*, *Sorbus aria* та *Sorbus torminalis* / О.В. Криворучко // Медична хімія. – 2010. – Т. 12. – № 2. – С. 102–106.
12. Jámbor, A. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. Literature overview and further study / A. Jámbor, I. Molnár-Perl // Journal of Chromatography A. – 2009. – V. 1216. – P. 3064–3077.
13. Jámbor, A. Quantitation of amino acids in plasma by high-performance liquid chromatography: Simultaneous deproteinization and derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride / A. Jámbor, I. Molnár-Perl // Journal of Chromatography A. – 2009. – V. 1216. – P. 6218–6223.
14. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.
15. Чиркин, А.А. Биохимия / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – М.: Медицинская литература, 2010. – 605 с.

Адрес для корреспонденции:

61002, Украина,
г. Харьков, ул. Пушкинская, 53,
Національний фармацевтичний
університет,
кафедра фармакогнози,
раб. тел.: 38 (057) 706-22-53,
e-mail: oakharkov@gmail.com,
Андрущенко О.А.

Поступила 12.11.2013 г.