

УДК 543.2:582.521.41

DOI 10.20538/1682-0363-2017-1-59-64

Для цитирования: Никифоров Л.А., Фурса Н.С., Кривошеков С.В., Куркин В.А., Белоусов М.В. Сравнительное исследование веществ первичного обмена ряски малой (*Lemna minor* L.), ряски тройчатой (*Lemna trisulca* L.) и многокоренника обыкновенного (*Spirodella polyrrhiza* L. Schleid.). *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (1): 59–64

Сравнительное исследование веществ первичного обмена ряски малой (*Lemna minor* L.), ряски тройчатой (*Lemna trisulca* L.) и многокоренника обыкновенного (*Spirodella polyrrhiza* L. Schleid.)

Никифоров Л.А.¹, Фурса Н.С.², Кривошеков С.В.^{3,5}, Куркин В.А.⁴, Белоусов М.В.³

¹ НП «Центр фармацевтической информации»
Россия, 630099, г. Новосибирск, Красный пр., 31

² Ярославская государственная медицинская академия
Россия, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

³ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

⁴ Самарский государственный медицинский университет
Россия, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89

⁵ Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Изучение качественного состава и количественного содержания веществ первичного обмена трех видов ряски: ряски малой (*Lemna minor* L.), ряски тройчатой (*Lemna trisulca* L.) и многокоренника обыкновенного, или ряски многокорневой (*Spirodella polyrrhiza* L. Schleid., синоним – *Lemna polyrrhiza* L.).

Материал и методы. Объектами исследования служили воздушно-сухие образцы травы, собранные в период их вегетации в 2010–2011 гг. в малопроточных и стоячих водоемах Кожевниковского и Томского районов Томской области. Определение содержания свободных моносахаридов проводили методом прямофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Содержание связанных сахаров определяли методом капиллярного электрофореза, используя прибор Applied Biosystem 273T (Термофишер Лтд., США). Для получения данных о качественном составе и количественном содержании аминокислот применяли аминокислотный анализатор Hitachi 835 (Япония).

Результаты. Наименьшее количество аминокислот содержится в водном извлечении ряски тройчатой – 59,70 мг, что в два раза меньше, чем в извлечениях из ряски малой и ряски многокорневой (127,9 и 131,55 мг соответственно). Минимальное содержание свободных и связанных моносахаридов определено в ряске малой – 10,54%, в то время как в ряске тройчатой и ряске многокорневой их содержание составляет 14,30 и 15,35% соответственно. Показано качественное и количественное видовое отличие свободных и связанных моносахаридов и аминокислотного состава.

Ключевые слова: род Ряска, *Lemna* L., первичные метаболиты, аминокислотный состав, углеводный состав.

✉ Кривошеков Сергей Владимирович, e-mail: chrom@tpu.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Растения являются первичными источниками протеиногенных аминокислот, свободных и связанных углеводов, обладающих незаменимой метаболической ценностью для живых систем [1, 2]. Продукты их биосинтеза являются биотропными для человека и животных и обладают различными системными биологически активными свойствами, в частности антигипоксическими, противовоспалительными, иммуностропными, общеукрепляющим и др. [3, 4]. Ряска является представителем семейства Ароидные (*Araceae*) и относится к числу ценных кормовых, пищевых и лечебных растений. Препараты ряски применяются в народной медицине для лечения витилиго, воспаления верхних дыхательных путей, крапивницы, заболеваний печени и щитовидной железы [5, 6]. В то же время в литературе мало сведений о химическом составе ряски, недостаточно изучен состав веществ первичного обмена, в частности углеводов и аминокислот [7], являющихся прометаболитами многих биологически активных веществ, что послужило основанием для настоящего исследования.

Цель исследования – изучить качественный состав и количественное содержание веществ первичного обмена трех видов ряски: ряска малой (*Lemna minor* L.), ряска тройчатой (*Lemna trisulca* L.) и многокоренника обыкновенного, или ряска многокорневой (*Spirodella polyrrhiza* L. Schleid., синоним – *Lemna polyrrhiza* L.).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили воздушно-сухие образцы травы ряска малой (*Lemna minor* L.), ряска тройчатой (*Lemna trisulca* L.) и многокоренника обыкновенного (*Spirodella polyrrhiza* L. Schleid), собранные в период их вегетации в 2010–2011 гг. в малопроточных и стоячих водоемах Кожевниковского (окр. села Десятова) и Томского (окр. села Коларова) районов Томской области.

Определение содержания свободных моносахаридов проводили методом прямофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для этого 100 мг измельченного сырья ряски заливали 1 мл воды очищенной в пробирке с завинчивающейся пробкой, нагревали до 90 °С до набухания сырья и затем экстрагировали углеводы в течение 1 ч при температуре 25 °С при встряхивании. Полученное извлечение центрифугировали 10 мин при 14 000 об./мин. После этого добавляли активированный уголь, встряхивали и снова центрифугировали 10 мин при 14 000 об./мин. Аликвоту

20 мкл супернатанта анализировали на колонке Luna NH₂ 4,6 × 250 мм, подвижная фаза: ацетонитрил – вода в соотношении 70 : 30, скорость потока 1 мл/мин при комнатной температуре с рефрактометрическим детектированием. Сбор и обработку данных осуществляли при помощи программы «Экохром», отнесение пиков и расчет концентраций углеводов проводили по внешнему стандарту, содержащему смесь анализируемых углеводов (фруктозы, глюкозы) и глицерина в концентрации 10 мг/мл.

Для анализа связанных сахаров водное извлечение ряска малой гидролизовали раствором 1 М кислоты хлористоводородной при 100 °С в течение 2,5 ч. После гидролиза раствор центрифугировали 10 мин при 14 000 об./мин. К 0,8 мл супернатанта добавляли 7,2 мл воды и 5 мл полученного раствора пропускали через поверхностный концентрирующий патрон (Диасорб С₁₆). При этом первые 3 мл отбрасывали и собирали следующий 1 мл. К 20 мкл смеси стандартов и исследуемого раствора добавляли 20 мкл раствора внутреннего стандарта (раствор глюкозамина) и упаривали на вакуумированном центрифужном испарителе типа Sreevad с подогревом в полипропиленовой пробирке. К высушенной пробе добавляли 20 мкл 0,5 мкл раствора 1-фенил-3-метил-5-пиразолон (РМР) в метаноле (1 : 1) и 20 мкл раствора натрия гидроксида, тщательно встряхивали на Vortex и термостатировали при 70 °С в течение 2 ч. Пробу нейтрализовали 20 мкл 0,3 М раствором кислоты хлористоводородной и экстрагировали избыток реагента РМР бензолом дважды по 50 мкл. Остаток упаривали на Sreevad с подогревом и растворяли в 500 мкл смеси ацетонитрил – вода в соотношении 1 : 9.

Содержание связанных сахаров определяли методом капиллярного электрофореза, используя прибор Applied Biosystem 273Т (Термофишер ЛТД., США). Отношение и расчет концентрации углеводов проводили по внутреннему (глюкозамин) и внешнему стандарту, содержащему смесь четырех анализированных углеводов в концентрации 1 мг/мл.

Для получения данных о качественном составе и количественном содержании аминокислот в рясках использован аминокислотный анализатор Hitachi 835 (Япония) на колонке 0,26 × 15 см. Калибровку прибора проводили с использованием стандартной смеси, содержащей по 3 нМ каждой аминокислоты. Анализ проводили на колонке с сульфированным сополимером стирола в смеси с 8% дивинилбензола при постоянной во время эксперимента температуре 53 °С. Для

элюирования аминокислот использовали ступенчатый градиент из буферных растворов с разными значениями pH (3,3–4,9). Последовательность элюирования аминокислот зависела от заряда молекул аминокислот в кислой среде буфера, степени гидратации, молекулярной массы и гидрофобности. Детектирование осуществляли после взаимодействия элюатов с нингидриновым реагентом фотометрически при длине волны 570 нм для всех аминокислот, количественное содержание определяли при детектировании на длине волны 440 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Репрезентативная хроматограмма стандартного раствора сахаров представлена на рис. 1, а результаты расчета содержания отражены в табл. 1.

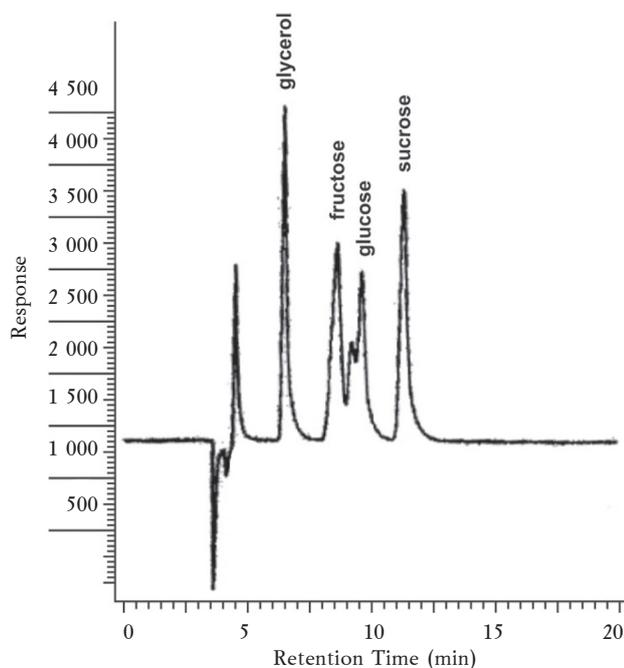


Рис. 1. Хроматограмма раствора свободных сахаров стандартных образцов

Т а б л и ц а 1

Содержание свободных углеводов в рясках, $M \pm m$, %			
Растение	Фруктоза	Глюкоза	Всего
<i>L. minor</i>	$2,34 \pm 0,12$	$1,29 \pm 0,05$	3,67 3,63
<i>L. trisulca</i>	ниже ПКО	ниже ПКО	–
<i>S. polyrrbiza</i>	$0,51 \pm 0,03$	ниже ПКО	0,51

В исследуемых образцах обнаружены и количественно определены в свободном виде два моносахарида – глюкоза и фруктоза. Содержание обоих моносахаридов определено в образцах *L. minor* ($(2,34 \pm 0,12)$ и $(1,29 \pm 0,05)$ %) соответ-

ственно), в образцах *S. polyrrbiza* содержание фруктозы, а в *L. trisulca* содержание обоих моносахаров ниже предела количественного определения (ПКО) метода.

При определении связанных сахаров установлено, что в *L. minor* содержание связанных гексоз наименьшее (5,3%), в то время как *S. polyrrbiza* содержит 12,1% связанных гексоз. Наибольшее содержание пентоз отмечено в *L. trisulca* (6,8%) (табл. 2). Репрезентативная электрофореграмма стандартного раствора РМР-производных сахаров представлена на рис. 2.

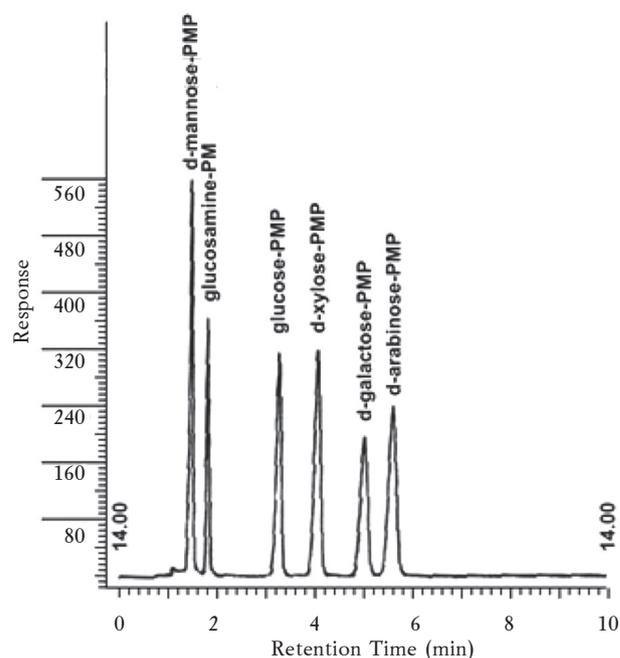


Рис. 2. Электрофореграмма раствора сахаров стандартных образцов

Т а б л и ц а 2

Растение	Содержание связанных углеводов в рясках, $M \pm m$, %			
	Пентозы		Гексозы	
	Арабиноза	Ксилоза	Галактоза	Глюкоза
<i>L. minor</i>	$0,38 \pm 0,02$	$1,24 \pm 0,06$	$1,05 \pm 0,06$	$4,20 \pm 0,21$
	Сумма			
	1,62		5,25	
<i>L. trisulca</i>	$0,73 \pm 0,04$	$6,1 \pm 0,3$	$1,17 \pm 0,06$	$6,3 \pm 0,3$
	Сумма			
	6,83		7,47	
<i>S. polyrrbiza</i>	$0,90 \pm 0,04$	$1,82 \pm 0,09$	$1,42 \pm 0,07$	$10,7 \pm 0,5$
	Сумма			
	2,72		12,12	

Репрезентативная хроматограмма качественного и количественного определения аминокислот представлена на рис. 3. Результаты сравнительного анализа аминокислот [8] приведены в табл. 3, 4.

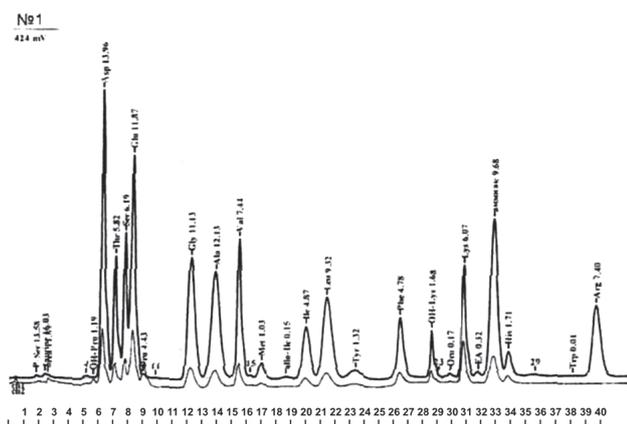


Рис. 3. Репрезентативная хроматограмма при определении аминокислот

Т а б л и ц а 3

Содержание заменимых аминокислот в рясках, мг в 1 г сухого порошка			
Аминокислота	<i>L. minor</i>	<i>L. trisulca</i>	<i>S. polyrrhiza</i>
<i>Моноаминомонокарбоновые</i>			
Ala	9,7 ± 0,5	4,64 ± 0,23	8,9 ± 0,4
Gly	7,6 ± 0,4	4,0 ± 0,2	6,9 ± 0,3
Ser	5,9 ± 0,3	2,13 ± 0,11	4,3 ± 0,2
Tyr	2,15±0,11	1,24	3,38 ± 0,17
Cys	-	0,21±0,03	0,22 ± 0,03
<i>Моноаминодикарбоновые</i>			
Asp	16,7 ± 0,8	7,0 ± 0,4	18,4 ± 0,7
Glu	15,7 ± 0,7	7,8 ± 0,3	14,4 ± 0,5
<i>Диаминомонокарбоновые</i>			
Arg	11,6 ± 0,6	3,8 ± 0,2	7,8 ± 0,4
<i>Гетероциклические</i>			
His	2,4 ± 0,1	1,04 ± 0,05	2,4 ± 0,1
OH-Pro	1,40 ± 0,07	1,10 ± 0,06	1,00 ± 0,05
Pro	4,6 ± 0,2	3,4 ± 0,2	8,3 ± 0,4
Сумма заменимых аминокислот	77,75	36,44	76,83

Т а б л и ц а 4

Содержание незаменимых аминокислот в рясках, мг в 1 г сухого порошка			
Аминокислота	<i>L. minor</i>	<i>L. trisulca</i>	<i>S. polyrrhiza</i>
<i>Моноаминомонокарбоновые</i>			
Val	8,1 ± 0,4	4,0 ± 0,1	8,9 ± 0,4
Ile	5,8 ± 0,2	3,3 ± 0,1	7,0 ± 0,4
Leu	11,0 ± 0,5	6,1 ± 0,3	13,5 ± 0,6
Met	1,49 ± 0,09	0,64 ± 0,03	1,69 ± 0,08
Thr	6,2 ± 0,3	2,8 ± 0,1	5,20 ± 0,26
Phe	7,1 ± 0,4	3,4 ± 0,2	7,2 ± 0,3
<i>Диаминомонокарбоновые</i>			
Lys	7,9 ± 0,4	3,10 ± 0,16	8,0 ± 0,3
OH-Lys	2,5 ± 0,1	0,090 ± 0,004	3,3 ± 0,2
Сумма незаменимых кислот	50,15	23,26	54,72
Общая сумма	127,90	59,70	131,55

Полученные данные свидетельствуют о том, что в траве *L. trisulca* содержится наименьшее количество как заменимых, так и незаменимых аминокислот по сравнению с другими образцами. В ее химическом составе преобладают (содержание более 3 мг/1 г сырья) глицин, аланин, пролин и лейцин. В то время как в составе *L. minor* преобладающими аминокислотами (содержание более 5 мг/1 г сырья) являются аланин, глицин, серин, аргинин, глутаминовая кислота, валин, лейцин, изолейцин, триптофан, фенилаланин и лизин. Состав преобладающих аминокислот *S. polyrrhiza* сходен с составом *L. minor*, но отличается наличием большого количества (более 18 мг/1 г сырья) аспарагиновой кислоты. Качественное и количественное содержание незаменимых аминокислот также схоже у *L. minor* и *S. polyrrhiza* (127,90 и 131,55 мг на 1 г сырья соответственно).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведено сравнительное исследование веществ первичного обмена (свободные и связанные сахара, аминокислоты) трех видов рясок – ряска малой (*Lemna minor* L.), ряска тройчатой (*Lemna trisulca* L.) и многокоренника обыкновенного (*Spirodella polyrrhiza* L. Schleid.), или ряска многокорневой (*Lemna polyrrhiza* L.). В анализируемом сырье обнаружены два свободных моносахарида (фруктоза и глюкоза). Содержание связанных сахаров (*L. minor*) в два раза превышает количество свободных. Установлено наличие 18 аминокислот, в том числе восемь незаменимых, среди которых преобладали аспарагиновая и глутаминовая кислоты, аргинин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кольман Я., Рём К.-Г. Наглядная биохимия : пер. с нем. М.: Мир, 2000: 469.
2. Хороненкова С.В., Тишков В.И. Окситаза D-аминокислот: физиологическая роль и применение // *Успехи биологической химии*. 2008; 48: 359–376.
3. Сафонова Е.А., Гурьев А.М., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Ефимова Л.А., Лопатина К.А. Повышение эффективности химиотерапии с помощью фармакологически активных фракций, выделенных из полисахаридного комплекса аира болотного (*Acorus calamus* L.) // *Российский биотерапевтический журнал*. 2012; 11 (4): 55–58.
4. Хотимченко Ю.С. Ковалев В.В., Савченко О.В., Зиганшина О.А. Физико-химические свойства, физиологическая активность и применение альгинатов полисахаридов бурых водорослей // *Биология моря*. 2001; 3: 151–162.

5. Маркова А. Травник. Золотые рецепты народной медицины. М.: Эксмо-Форум, 2007: 928.
6. Махлаюк В.П. Лекарственные растения в народной медицине. М.: Нива России, 1992: 478.
7. Никифоров Л.А., Белоусов М.В., Фурса Н.С. Изучение аминокислотного состава ряски малой (*Lemna minor* L.) // *Бюллетень сибирской медицины*. 2011; 10 (5): 74–77.
8. Dimova N. RP-HPLC analysis of amino acids with UV-detection // *Докал. Болг. АН*. 2003; 56 (12): 75–78.

Поступила в редакцию 22.11.2016

Утверждена к печати 19.12.2016

Никифоров Леонид Анатольевич, зам. директора НП «Центр фармацевтической информации», г. Новосибирск.

Фурса Николай Сергеевич, д-р фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармакогнозии и фармацевтической технологии, Ярославская государственная медицинская академия, г. Ярославль.

Кривощек Сергей Владимирович, мл. научный сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск; инженер каф. ТОВПМ, НИ ТПУ, г. Томск.

Куркин Владимир Александрович, д-р фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, Самарский государственный медицинский университет, г. Самара.

Белоусов Михаил Валерьевич, д-р фарм. наук, зав. кафедрой фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск.

(✉) Кривощек Сергей Владимирович, e-mail: chrom@tpu.ru

УДК 543.2:582.521.41

DOI 10.20538/1682-0363-2017-1-59–64

For citation: Nikiforov L.A., Fursa N.S., Krivoshchekov S.V., Kurkin V.A., Belousov M.V. Comparative study of compounds of primary exchange duckweed (*Lemna minor* L.), trisulki duckweed (*Lemna trisulca* L.) and spirodela (*Spirodella polyrrhiza* L. Schleid.). *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (1): 59–64

Comparative study of compounds of primary exchange duckweed (*Lemna minor* L.), trisulki duckweed (*Lemna trisulca* L.) and spirodela (*Spirodella polyrrhiza* L. Schleid.).

Nikiforov L.A.¹, Fursa N.S.², Krivoshchekov S.V.^{3,4}, Kurkin V.A.⁵, Belousov M.V.³

¹ NP “Center for Pharmaceutical Information”
31, Krasnuy Ave., Novosibirsk, 630099, Russian Federation

² Yaroslavl State Medical Academy
5, Revoluzionnaiy Str., Yaroslavl, 150000, Russian Federation

³ Siberian State Medical University
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

⁴ National Research Tomsk Polytechnic University
30, Lenina Ave., Tomsk, 634050, Russian Federation

⁵ Samara State Medical University
89, Chapaevskaiy Str., Samara, 443099, Russian Federation

ABSTRACT

The purpose of the paper is to study qualitative composition and quantitative content of primary exchange compounds in duckweed (*Lemna minor* L.), trisulki duckweed (*Lemna trisulca* L.) and spirodela (*Spirodella polyrrhiza* L.) Schleid).

Materials and methods. The subject of the study was air-dried samples of grass collected during their 2010–2011 growing season in low-flow and stagnant water bodies of Kozhevnikovskiy and Tomsk districts of the Tomsk region. The concentration of free monosaccharides was determined by direct-phase high-performance liquid chromatography. The concentration of the bound sugars was determined by capillary electrophoresis using Applied Biosystem 273T (Thermofischer Ltd., USA). To obtain data on the qualitative composition and quantitative content of amino acids, the amino acid analyzer Hitachi 835 (Japan) was used.

Results. It was found out that the least amount of amino acids contained in the water extract from duckweed trifoliolate – 96,14 mg, which is 2 times less than in extracts of *Lemna minor* and *Lemna multirooted* (205,65 and 208,38 mg, respectively). In duckweed the minimum content of free and bound monosaccharides was determined to be 10,54%, while in the *Lemna trifoliolate* and *Lemna multirooted* their content was 14,30% and 15,35%, respectively. This study showed the qualitative and quantitative differences of free and bound monosaccharide and amino acid composition between previously mentioned species.

Key words: primary metabolites, amino acids composition, carbohydrates composition.

REFERENCES

1. Coleman J., Rem K.-G. Nagladnaya biohomia [Transparent biochemistry]; per. s nem. M.: Mir Publ., 2000: 469 (in Russian)
2. Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. Oksidaza D-aminokislot: fiziologicheskaya rol' I primeneniye [D-amino acid oxidase: physiological role and application] // *Uspehi biologicheskoy himii – Biological chemistry reviews*. 2008; 48: 359–376 (in Russian).
3. Safonova E.A., Guryev A.M., Razina T.G., Zueva E.P., Efimova L.A., Lopatina K.A. Povysheniye effektivnosti himioterapii s pomoshchyu farmakologicheskiiaktivnykh fraktsiy, vydelennykh iz polisaharidnogo kompleksa aira bolotnogo (*Acorus Calamus L.*) [Increased effectiveness of chemotherapy using pharmacologically active fractions isolated from the complex polysaccharide calamus (*Acorus Calamus L.*)] // *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal – Russian Journal of Biotherapy*. 2012, 11 (4): 55–58 (in Russian).
4. Khotimchenko Y.S., Kovalev V.V., Savchenko O.V., Ziganshin O.A. Fiziko-himicheskie svoystva, fiziologicheskaya aktivnost' I primeneniye al'ginatov polisaharidov burykh vodorosley [Physico-chemical properties, physiological activity and application of alginates polysaccharides of brown algae] // *Biologiya moray – Russian Journal of Marine Biology*. 2001, 3: 151–162 (in Russian).
5. A. Markov. Travniki. Zolotyie recepty narodnoy mediciny [Herbalist. Golden recipes of traditional medicine]. M.: Eksmo-Forum Publ., 2007: 928 (in Russian).
6. Makhlayuk V.P. Lekarstvennye rasteniya v narodnoy mediciny [Medicinal plants in folk medicine]. M.: Niva Rossii Publ., 1992: 478 (in Russian).
7. Nikiforov L.A., Belousov M.V., Fursa N.S., Izuchenie aminokislотного состава ryaski maloy (*Lemna minor L.*) [Study of amino-acid structure (*Lemna minor L.*)] // *Byulleten' sibirskoy mediciny – Bulletin of Siberian Medicine*. 2011; 10 (5): 74–77 (in Russian).
8. Dimova N. RP-HPLC analysis of amino acids UV-detection // *Dokl. Bolg.AN*. 2003; 56 (12): 75–78.

Received November 22.2016

Accepted December 19.2016

Nikiforov Leonid A., Deputy Director of NP “Center for Pharmaceutical Information”, Novosibirsk, Russian Federation.

Fursa Nikolay S., DPhs, Professor, Head of the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Technology, Yaroslavl State Medical Academy, Yaroslavl, Russian Federation.

Krivoshchekov Sergey V., Junior Researcher, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Tomsk; Engineer, National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation.

Kurkin Vladimir A., DPhs, Professor, Head of the Department of Pharmacognosy and Botany Basics of Herbal Medicine, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation.

Belousov Mikhail V., DPhs, Head of the Department of Pharmaceutical Analysis, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Krivoshchekov Sergey V.**, e-mail: chrom@tpu.ru