

Изучение аминокислотного состава ряски малой (*Lemna minor* L.)

Никифоров Л.А.¹, Белоусов М.В.¹, Фурса Н.С.²

Study of amino-acid structure *Lemna minor* L.

Nikiforov L.A., Belousov M.V., Fursa N.S.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² Ярославская государственная медицинская академия, г. Ярославль

© Никифоров Л.А., Белоусов М.В., Фурса Н.С.

Впервые изучен качественный и количественный аминокислотный состав *Lemna minor* L. (ряска малая) с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлено наличие 18 протеиногенных аминокислот, в том числе 8 незаменимых. Сумма заменимых аминокислот ряски малой представлена моноаминомонокарбоновыми, моноаминодикарбоновыми, диаминомонокарбоновыми и гетероциклическими кислотами. Незаменимые аминокислоты представлены моноаминомонокарбоновыми и диаминомонокарбоновыми кислотами.

Ключевые слова: *Lemna minor* L., ряска малая, аминокислоты, аминокислотный состав.

For the first time qualitative and quantitative amino-acid structure *Lemna minor* L. is studied with use of a highly effective liquid chromatography. Presence 18 proteinogenic amino acids, including 8 irreplaceable is established. The sum of replaceable amino acids of a duckweed small is presented monoaminocarboxylic, monoaminodicarboxylic, diaminomono-carboxylic and heterocyclic acids. Irreplaceable amino acids are presented monoaminomonocarboxylic and diaminomono-carboxylic acids.

Key words: *Lemna minor* L., amino acids, amino-acid structure.

УДК 615.322.074:547.466:582.521.43

Введение

Основной структурной единицей белка являются аминокислоты. Так как незаменимые аминокислоты не синтезируются клетками животных и человека, они поступают в организм из внешних источников в составе белков пищи. Характерной особенностью растений является способность к биосинтезу всех протеиногенных аминокислот. Данные аминокислоты можно разделить на две группы [3]:

1) *заменимые*, представленные моноаминомонокарбоновыми (аланин, глицин, серин, тирозин, цистеин), моноаминодикарбоновыми (аспарагиновая и глутаминовая кислоты), диаминомонокарбоновыми (аргинин, арнитин), гетероциклическими (гистидин, пролин, оксипролин);

2) *незаменимые*, представленные моноаминомонокарбоновыми (валин, изолейцин, лейцин, метионин, треонин, фенилаланин), диаминомонокарбоновыми (лизин, оксализин) кислотами, гетероциклическими (триптофан).

В то же время растения отличаются также синтезом необычайного разнообразия аминокислот, не входящих в состав белков, но содержащихся в растительных клетках и тканях в свободном виде. Все они являются высокоактивными веществами и принимают участие во многих жизненно важных процессах [2, 3].

Аминокислотный состав *Lemna minor* L. (ряска малая) практически не изучен, что и послужило основанием для данной работы.

Материал и методы

Исследование выполнено на базе кафедры фармакогнозии и фармацевтической технологии Ярославской государственной медицинской академии (г. Ярославль) и лаборатории инновационных фармацевтических технологий Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск).

В работе использовали воздушно-сухое сырье *L. minor*, представляющее собой биомассу цельного растения, собранного в местах естественного произрастания

на территории Томской области в 2009 г. После сбора растительное сырье высушивали на воздухе, под навесом, при температуре 15—25 °С в течение 30 сут.

Подготовка образцов: 10 г измельченного сырья заливали 80%-м спиртом этиловым и экстрагировали на водяной бане при 70 °С в течение 1 ч. Полученное извлечение фильтровали, промывали сырье 80%-м спиртом этиловым, полученные элюаты объединяли, деалкоголизовали на роторном испарителе до водного остатка и трижды обрабатывали хлороформом. Водный слой, содержащий аминокислоты, отделяли и стужали под вакуумом до небольшого объема. Качественная реакция: при проведении нингидриновой реакции с частью водного извлечения ряски малой наблюдали появление красно-фиолетового окрашивания, которое свидетельствовало о наличии аминокислот [1, 6].

Обнаружение аминокислот: использовали метод восходящей хроматографии на бумаге Filtrak FH-4 (Германия) в сравнении со стандартными образцами в 0,1-м растворе кислоты хлористоводородной при температуре 20—22 °С в затемненной хроматографической камере при трехкратном пропускании раствора в системе растворителей (БУВ 4 : 1 : 2 или 4 : 1 : 5). Проявление аминокислот на хроматограмме осуществляли обработкой 0,1%-м водным раствором нингидрина, затем хроматограмму нагревали до появления окрашенных пятен [1, 6]. Аминокислоты на хроматограмме приобретали сине-фиолетовое окрашивание с различными оттенками. Аминокислоты, имеющие большее значение R_f, окрашивались с розовым, а имеющие меньшее значение R_f — с синим оттенком.

Определение качественного состава и количественного содержания аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проводилось на аминокислотном анализаторе Hitachi 835 (Япония) на колонке 0,26 × 15 см. Калибровку прибора проводили с использованием стандартной смеси аминокислот, содержащей по 3 нмоля каждой кислоты. Анализируемый раствор после подготовительной дериватизации поступал в колонку с сульфированным сополимером стирола в смеси с 8% дивинилбензола при постоянной во время эксперимента температуре, равной 53 °С. Для элюирования аминокислот использовали ступенчатый градиент из буферных растворов с разными значениями рН (от 3,3 до 4,9). Последовательность элюирования аминокислот зависела от их заряда в кислой среде буфера, степени гидратации, молекулярной массы и гидрофобности. Детекцию осуществляли по

сле взаимодействия элюатов с нингидриновым реагентом фотометрически при длине волны 570 нм для всех аминокислот, содержание которых определяли при 440 нм. Количественная оценка содержания аминокислот велась автоматически с измерением площади пиков идентифицированного компонента. Расчет каждого из них проводили в наномолях в аликвоте, непосредственно использованной для анализа, и в дальнейшем пересчитывали на процентное содержание [4, 5, 7].

Результаты и обсуждение

Скрининговое разделение аминокислот методом восходящей хроматографии на бумаге позволило получить предварительные данные об их качественном составе. В результате в водном извлечении ряски малой обнаружены пять веществ, которые по величинам R_f и окраске проявленных пятен в сравнении с достоверными образцами были отнесены к аспарагину, аспарагиновой кислоте, тирозину, изолейцину и триптофану (табл. 1).

Таблица 1

Результаты скринингового обнаружения аминокислот в ряске малой методом восходящей хроматографии на бумаге

Вещество	Значение R _f	Окраска пятен после проявления	Достоверный образец	Значение R _f
Вещество I	0,28	Сине-фиолетовая	Аспарагин	0,29
Вещество II	0,41	Сине-фиолетовая	Аспарагиновая кислота	0,40
Вещество III	0,71	Сине-фиолетовая	Тирозин	0,70
Вещество IV	0,81	Сине-фиолетовая	Изолейцин	0,80
Вещество V	0,84	Сине-фиолетовая	Триптофан	0,82

Для уточнения данных о качественном составе и количественном содержании аминокислот в ряске малой провели исследование полученных из ряски проб на аминокислотном анализаторе Hitachi (Япония). Это позволило обнаружить и идентифицировать в них 10 заменимых и 8 незаменимых аминокислот. Сумма заменимых аминокислот ряски малой представлена моноаминомонокарбоновыми, моноаминодикарбоновыми, диаминомонокарбоновыми и гетероциклическими аминокислотами (табл. 2). Незаменимые аминокислоты состоят из моноаминомонокарбоновых и диаминомонокарбоновых кислот (табл. 3).

Таблица 2

Содержание заменимых аминокислот в ряске малой, определенных методом ВЭЖХ

Аминокислота	мг/г анализируемой пробы	Аминокислота	мг/г анализируемой пробы
<i>Моноаминомонокарбоновые</i>		<i>Диаминомонокарбоновые</i>	
Ala	9,73	Arg	11,60
Gly	7,60	<i>Гетероциклические</i>	
Ser	5,86	His	2,39
Tyr	2,15	Oh-Pro	1,40
Сумма кислот	25,34	Pro	4,59
		Сумма кислот	8,38
<i>Моноаминодикарбоновые</i>		Сумма всех заменимых аминокислот 77,75	
Asp	16,72		
Glu	15,71		
Сумма кислот	32,43		

Таблица 3

Содержание незаменимых аминокислот в ряске малой, определенных методом ВЭЖХ

Аминокислота	мг/г анализируемой пробы	Аминокислота	мг/г анализируемой пробы
<i>Моноаминомонокарбоновые</i>		<i>Диаминомонокарбоновые</i>	
Val	8,12	Lys	7,98
Ile	5,75	Oh-Lys	2,46
Leu	11,01	Сумма кислот	10,44
Met	1,49	Сумма незаменимых кислот	50,15
Thr	6,24	Общая сумма	127,90
Phe	7,11		
Сумма кислот	39,71		

В ряду идентифицированных аминокислот в анализируемых образцах из сырья ряски малой по суммарному количественному содержанию лидируют незаменимые моноаминомонокарбоновые кислоты (39,71 мг/г). Заменимые моноаминодикарбоновые кислоты содержатся в несколько меньшем количестве (32,43 мг/г). Далее расположены в порядке убывания: заменимые моноаминомонокарбоновые (25,34 мг/г), заменимые диаминомонокарбоновые (11,60 мг/г), незаменимые диаминомонокарбоновые (10,44 мг/г) и гетероциклические (8,38 мг/г) аминокислоты.

Из отдельных аминокислот в общей сумме идентифицированных преобладали аспарагиновая и глутаминовая кислоты, аргинин, лейцин, аланин, валин, лизин (табл. 4, 5).

Таблица 4

Содержание отдельных заменимых аминокислот в ряске малой, определенных методом ВЭЖХ (% от общей суммы идентифицированных аминокислот)

Аминокислота	%	Аминокислота	%
<i>Моноаминомонокарбоновые</i>		<i>Диаминомонокарбоновые</i>	
Ala	7,61	Arg	9,11
Gly	6,21	<i>Гетероциклические</i>	
Ser	4,60	His	1,80
Tyr	1,69	Oh-Pro	1,18
Сумма кислот	20,11	Pro	3,60
<i>Моноаминодикарбоновые</i>		Сумма кислот	6,58
Asp	13,07	Общая сумма заменимых аминокислот 60,49	
Glu	12,28		
Сумма кислот	25,38		

Общая сумма идентифицированных аминокислот 100%

Таблица 5

Содержание отдельных незаменимых аминокислот в ряске малой, определенных методом ВЭЖХ (% от общей суммы идентифицированных аминокислот)

Аминокислота	%	Аминокислота	%
<i>Моноаминомонокарбоновые</i>		<i>Диаминомонокарбоновые</i>	
Val	6,39	Lys	6,28
Ile	4,52	Oh-Lys	1,93
Leu	8,73	Сумма кислот	8,21

Общая сумма идентифицированных аминокислот 100%

Заключение

Впервые проведен качественный и количественный анализ аминокислот ряски малой на аминокислотном анализаторе Hitachi, в результате которого установлено наличие и содержание 18 протеиногенных аминокислот, в том числе 8 незаменимых, представленных моноаминомонокарбоновыми, моноаминодикарбоновыми, диаминомонокарбоновыми и гетероциклическими кислотами (заменимые) и моноаминомонокарбоновыми и диаминомонокарбоновыми кислотами (незаменимые).

Полученные данные позволяют характеризовать ряску малую как полноценный источник комплекса протеиногенных аминокислот.

Литература

1. *Зенкова Е.А., Дегтярев Е.В.* 1,2,3,4-тетрагидро-1,4-диоксо-2,2,3,3-тетрагидроксиафталин как реагент для обнаружения биогенных аминов методом ТСХ и источник получения нингидринового реактива // Хим.-фарм. журн. 2000. Т. 34, № 2. С. 46—48.
2. *Кольман Я, Рём К.-Г.* Наглядная биохимия: Пер. с нем. М.: Мир, 2000. 469 с.
3. *Кретович В.А.* Основы биохимии растений. М.: Изд-во «Высшая школа». 1964. 586 с.
4. *Симонян А.В., Саламатов А.А., Покровская Ю.С., Аванесян А.А.* Использование нингидриновой реакции для количественного определения α -аминокислот в различных объектах: методические рекомендации. Волгоград, 2007. 106 с.
5. *Dimova N.* RP-HPLC analysis of amino acids with UV-detection // Докл. Болг. АН. 2003. Т. 56, № 12. С. 75—78.
6. *Khan A.A.* Studies of the kinetics and mechanism of interaction of α -aminoacids with ninhydrin // J. Indian Chem. Soc. 1989. V. 66, № 7. P. 454—456.
7. *Tsugita A., Scheffler J.* // Eur. J. Biochem. 1982. V. 124. P. 585.

Поступила в редакцию 01.04.2011 г.

Утверждена к печати 01.06.2011 г.

Сведения об авторах

А.А. Никифоров — соискатель кафедры фармации ФПК и ППС СибГМУ (г. Томск).

М.В. Белоусов — д-р фарм. наук, зав. кафедрой фармации ФПК и ППС СибГМУ (г. Томск).

Н.С. Фурса — д-р фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармакогнозии и фармацевтической технологии ЯГМА (г. Ярославль).

Для корреспонденции

Никифоров Леонид Анатольевич, тел. 8-913-882-9604; e-mail: nla83@mail.ru

Уважаемые читатели!

Предлагаем вам подписаться на наш журнал с любого номера

В 2011 году стоимость подписки на полугодие — 1500 рублей, на год — 3000 рублей.

Как оформить подписку на журнал «Бюллетень сибирской медицины»

На почте во всех отделениях связи

Подписной индекс **46319** в каталоге агентства Роспечати «Газеты и журналы 2011, 1-е и 2-е полугодие».

В редакции

- Без почтовых наценок.
- С любого месяца.
- Со своего рабочего места.

По телефону (382-2) 51-41-53; факс (382-2) 51-53-15.

На сайте <http://bulletin.tomsk.ru>

Если вы являетесь автором публикаций или хотите приобрести наш журнал, он будет выслан вам наложенным платежом при заполнении заявки. Стоимость приобретения одного номера 400 рублей.

Заявку на приобретение журнала нужно выслать по адресу редакции:

634050, г. Томск, пр. Ленина, 107,

Научно-медицинская библиотека Сибирского государственного медицинского университета,

редакция журнала «Бюллетень сибирской медицины»,

тел. (8-3822) 51-41-53. E-mail: bulletin@bulletin.tomsk.ru