

ИЗУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ТРАВЫ КОЛОКОЛЬЧИКА КРУГЛОЛИСТНОГО (*CAMPANULA ROTUNDIFOLIA L.*)

В. Н. Бубенчикова, Л.Е. Сипливая, Е.А. Никитин

ГБОУ ВПО Курский Государственный Медицинский Университет Минздрава России (г. Курск)

Study of amino acid composition of herba *Campanula rotundifolia L.*

V.N. Bubenchikova, L.E. Siplivaya, E.A. Nikitin

Kursk State Medical University (Kursk, Russia)

РЕЗЮМЕ

Изучен качественный и количественный аминокислотный состав травы колокольчика круглолистного (*Campanula rotundifolia L.*). Достоверно методом ВЭЖХ установлено наличие 16 аминокислот, среди которых 7 незаменимых: треонин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, лизин, 3 полузаменимых: тирозин, гистидин, аргинин и 6 заменимых: аспарагиновая кислота, серин, глютаминовая кислота, пролин, глицин, аланин. Сумма аминокислот составила 7,49 мг на 100 мг в пересчете на абсолютно сухое сырьё. Все аминокислоты в данном растении идентифицированы впервые.

Ключевые слова: аминокислотный анализатор, аминокислотный состав, колокольчик круглолистный.

RESUME

The qualitative and quantitative amino acid composition of herb (*Campanula rotundifolia L.*) was studied. Authentically by HPLC revealed the presence of 16 amino acids, including 7 essential: threonine, valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine and lysine, 3 semi-essentials: tyrosine, histidine and arginine and 6 interchangeable: aspartic acid, serine, glutamic acid, proline, glycine and alanine. 100 mg of absolutely dry raw material contain 7.49 mg of amino acids. All amino acids were identified in this plant for the first time.

Keywords: amino acid analyzer amino acid composition, *Campanula rotundifolia*.

В настоящее время поиск новых отечественных источников биологически активных веществ является одной из актуальных проблем современной медицины. Значение аминокислот для организма определяется прежде всего тем, что они используются для синтеза белков и пептидов. Кроме того, из аминокислот образуется большое количество веществ непептидной природы (специальных тканевых белков, ферментов, гормонов, нуклеиновых кислот и т.д.), выполняющих специальные функции. Аминокислоты являются естественным универсальным регулятором обмена веществ в организме человека.

Кроме аминокислот, входящих в состав белков, живые организмы обладают постоянным резервом «свободных» аминокислот, содержащихся в тканях и клеточном соке. Они находятся в динамическом равновесии при многочисленных обменных реакциях. Свободные аминокислоты в живом организме выполняют и специфические задачи; так, для кислоты аспарагиновой характерно наличие

иммуноактивных свойств. Пролин способствует заживлению ран, он относится к важнейшим компонентам коллагена, что является важным для нормального функционирования тканей организма человека. Аргинин и глицин обладают выраженной гипополипидемической активностью, аргинин способен усиливать высвобождение различных гормонов из тканей желез (инсулин), ускорять фильтрацию через почки и оказывать антиоксидантное действие. Изолейцин необходим для синтеза гемоглобина [1, 2, 3]. На основе аминокислот существует целый ряд препаратов: глицин, метионин, гептрал, церебролизин и другие [3].

Растительное сырьё, содержащее аминокислоты, может являться их источником, ввиду того, что растения содержат комплекс биологически активных веществ в доступных концентрациях и с высокой биологической доступностью. Аминокислоты способны потенцировать действие других биологически активных веществ и обеспечивать лучшее их усвоение [4]. Все вышесказанное является сви-

детельством практической значимости и актуальности изучения аминокислот.

В связи с этим, целью нашего исследования являлось изучение качественного и количественного состава аминокислот в наземной части колокольчика круглолистного.

Колокольчик круглолистный – многолетнее травянистое растение высотой 15–60 см, с тонким ползущим корневищем. Стебли многочисленные и густо облиственные. Прикорневые листья и листья укороченных нецветущих побегов почковидные или округло-сердцевидные. Стеблевые листья – от ланцетных до узколинейных. Цветки собраны в верхушечное раскидистое метельчатое соцветие. Плод – коробочка [6].

Колокольчик круглолистный распространен в средней полосе России во всех областях, как обыкновенное растение. Произрастает в светлых лесах, сухих лугах, в зарослях кустарников, на обнажении известняка и мела [6]. В народной медицине колокольчик круглолистный применяется при болезнях нервной системы, дыхательной недостаточности, болевом синдроме, ангине, новообразованиях, а также как гемостатическое. Свежие листья колокольчика круглолистного перетертые в кашицу применяются для лечения кожных заболеваний, что, возможно, связано с участием пролина в синтезе коллагена кожи. В литературе содержатся данные о применении колокольчика круглолистного в качестве противозипелептического средства, что, возможно, указывает на содержание суммы аспарагиновой и глутаминовой кислот, которые известны своим применением при заболеваниях центральной нервной системы [7, 8].

Ранее были изучены азотсодержащие соединения травы колокольчика круглолистного Хидашели В.Д. с соавторами. Ими было установлено наличие холина и бетаина в траве растения [9]. Однако сведения об аминокислотном составе колокольчика круглолистного в литературе отсутствуют.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служила измельченная, воздушно-сухая трава колокольчика круглолистного (*Campanula rotundifolia* L.), заготовленная в Курской области в период массового цветения в 2015 году.

Качественный анализ аминокислот проводили в водном извлечении с помощью нин-

гидриновой пробы и методом тонкослойной хроматографии.

Для качественного определения и хроматографического исследования аминокислот, навеску 5,0 г измельченного воздушно-сухого сырья заливали 50 мл воды очищенной и нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 1 часа. Полученное извлечение отфильтровывали, и сырье повторно заливали 50 мл воды и операцию повторяли. Проводили трехкратную экстракцию и полученные извлечения объединяли, упаривали под вакуумом до 25 мл и использовали для качественных реакций и хроматографического анализа.

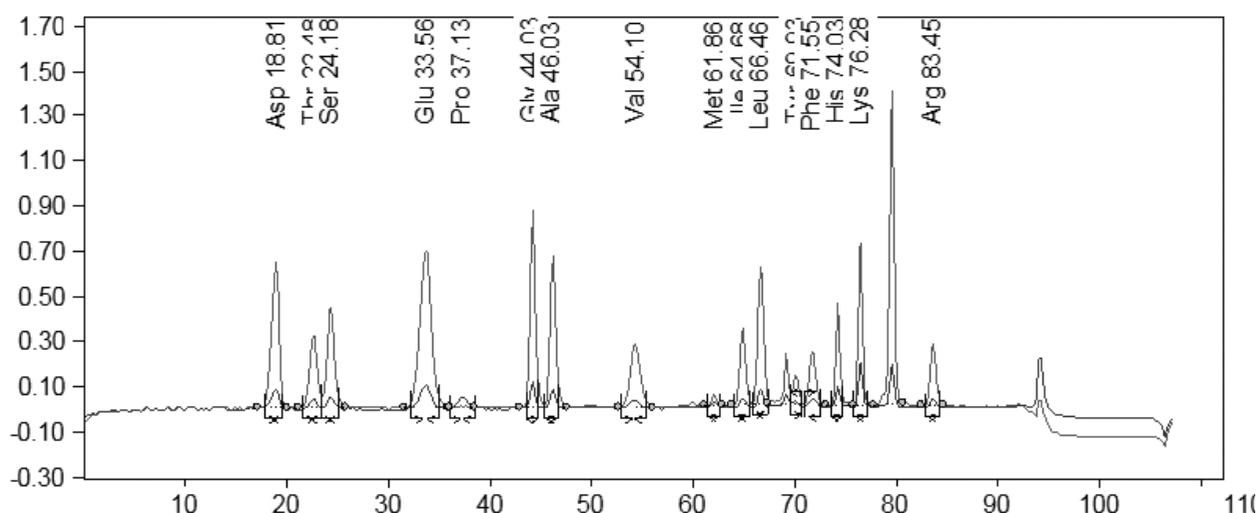
Качественную реакцию с нингидрином проводили смешиванием равных объемов исследуемого раствора и 0,1% свежеприготовленного раствора нингидрина и осторожно нагревали. При наличии аминокислот должно появиться красно-фиолетовое окрашивание [4, 5, 10].

Хроматографию проводили в тонких слоях сорбента. 0,03–0,05 мл извлечения наносили на подготовленную пластинку «Sorbfil» ПТСХ-П-А 10Х20 и хроматографию проводили в системе растворителей: 96 % спирт этиловый, концентрированный аммиак в соотношении (16:4,5), параллельно с известными образцами аминокислот. После прохождения хроматограмму высушивали на воздухе, обрабатывали 0,2 % спиртовым раствором нингидрина и нагревали в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С в течение нескольких минут. Аминокислоты проявлялись в виде красно – фиолетовых пятен [4].

Далее для определения суммарного аминокислотного состава использовали аминокислотный анализатор – автоматизированный жидкостный хроматограф (ААА 400) следующим образом: точную навеску сырья (0,2 г), вносили в колбу со шлифом, прибавляли 20 мл раствора 6 М кислоты хлористоводородной, плотно закрывали и термостатировали при температуре 110 °С в течение 23 часов. По окончании гидролиза колбу охлаждали до комнатной температуры, фильтровали кислое извлечение и при использовании роторного испарителя выпаривали досуха. К сухому остатку добавляли 5 мл воды и процедуру повторяли дважды для удаления остатков кислоты хлористоводородной.

К выпаренному досуха остатку приливали 50 мл загрузочного буфера (рН – 2,2), который готовили следующим образом: в мерную колбу на 1 литр вносили отвешенные 14 г лимонной

Аминокислотный спектр после кислотного гидролиза надземной части колокольчика круглолистного



кислоты, 11,5 г хлорида натрия, 0,1 г азидата натрия, 5 мл тиодигликоля, дистиллированной водой объем довели до метки. В подготовленную ионообменную колонку вносили полученный и отфильтрованный раствор.

Проведение аминокислотного анализа осуществляли при следующих условиях: поток буферных растворов 0,3 мл/мин., скорость потока нингидринового реактива 0,2 мл/мин., детектирование проводили в УФ областях 440 и 570 нм, температура термостата реактора 121 °С [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Качественными реакциями и методом тонкослойной хроматографии в сравнении с известными образцами было установлено наличие 11 свободных аминокислот в траве колокольчика круглолистного, из которых 4 относятся к незаменимым (лизин, фенилаланин, треонин, лейцин) и 7 к заменимым (аспарагиновая кислота, серин, глутаминовая кислота, глицин, аргинин, пролин, аланин).

Далее нами был использован более сложный и современный метод анализа, метод ВЭЖХ, который был выполнен на автоматизированном жидкостном хроматографе ААА 400 компании INGOS – Laboratory Instruments (Чехия), для определения качественного и количественного суммарного содержания аминокислот. Полученный спектр аминокислот представлен в табл. 1.

В результате определения аминокислот методом ВЭЖХ в пробе после гидролиза кис-

лотой хлористоводородной установлено наличие 16 аминокислот, которые представлены 7 незаменимыми (треонин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, лизин) и 9 заменимыми аминокислотами (аспарагиновая кислота, серин, глутаминовая кислота,

Таблица 2

Содержание аминокислот после гидролиза в надземной части колокольчика круглолистного

№	Наименование аминокислоты	Содержание аминокислот %, по отношению к сумме аминокислот
1	Аспарагиновая кислота	11,34
2	Треонин*	4,93
3	Серин	5,34
4	Глутаминовая кислота	20,56
5	Пролин	5,20
6	Глицин	5,07
7	Аланин	4,54
8	Валин*	5,74
9	Метионин*	0,53
10	Изолейцин*	4,54
11	Лейцин*	7,61
12	Тирозин	2,40
13	Фенилаланин*	4,80
14	Гистидин	4,40
15	Лизин*	6,94
16	Аргинин	6,00
	Сумма аминокислот в мг в пересчете на 100 мг абсолютно сухого сырья	7,49

Примечание: * - незаменимые аминокислоты

пролин, глицин, аланин, тирозин, гистидин, аргинин). Результаты анализа аминокислотного состава травы колокольчика круглолистного после гидролиза представлены в табл. 2.

В результате исследования установлено, что в траве колокольчика круглолистного методом ТСХ определено 11 аминокислот, методом ВЭЖХ 16 аминокислот, из которых 7 – незаменимых. Суммарное содержание аминокислот в траве колокольчика круглолистного составляет 7,49 мг на 100 мг в пересчете на абсолютно сухое сырьё. Преобладающими аминокислотами являются: глутаминовая кислота (20,56 %), аспарагиновая кислота (11,34 %), лейцин (7,61 %), лизин (6,94 %).

ОБСУЖДЕНИЯ И ВЫВОДЫ

1. Изучен качественный состав свободных аминокислот травы колокольчика круглолистного методом ТСХ, при этом идентифицировано 11 аминокислот, среди которых 4 незаменимые.

2. В траве колокольчика круглолистного методом высокоэффективной жидкостной хроматографии после проведенного гидролиза кислотой хлористоводородной идентифицированы 16 аминокислот, среди которых 7 незаменимых, среди которых преобладают глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, лейцин, лизин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гараева С.Н., Гараева С.Н., Редкозубова Г.В., Пошлати Г.В. Аминокислоты в живом организме. – Кичнев, 2009. – 550 с.

2. Якубке Х.Д., Ешкайт Х. Аминокислоты. Пептиды. Белки / Х.Д Якубке., // Под ред. Ю.В. Митина. – М.: Мир, 1985. – 438 с.2.

3. Ісюк М.В., Бензель І.Л., Бензель Л.В. Дослідження амінокислотного складу герані сибірської // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2012. – №3. – С.4–6.

4. Бубенчикова В. Н., Левченко В. Н. аминокислотный и минеральный состав травы хондриллы ситниковидной // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №. 5. – С.614.

5. Киселёва Т.Л., Люй Г., Чаузова А.В. Аминокислотный состав травы черныбыльника (*Artemisia vulgaris* L.) флоры России и Китая // Традиционная медицина. – 2014. – №1 (36). – С.49–52.

6. Губанов И.А., Киселева К.В., Новиков В.С., Тихомиров В.Н. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Том 3: Покрывосеменные (двудольные: раздельнолепестные). – М., 2004. – 288 с.

7. Дикорастущие полезные растения России / Под ред. А.Л. Буданцева, С.П. Лесиовской. – СПб., 2001. – 663 с.

8. Дроздова И.Л., Лупилина Т.И. Аминокислотный состав травы икотника серого // Вестник Воронежского государственного университета, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2015. – №. 1. – С.125–128.

9. Хидашели В.Д., Теслов С.В., Теслов Л.С. К вопросу об алкалоидности некоторых растений семейства колокольчиковых // Науч. тр. Перм. Фармац. Ин-та. Вып. 8. – 1975. – С.13–106.

10. 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.

11. Олешко Г.И., Ярыгина Т.И., Зорина Е.В., Решетникова М.Д. Разработка унифицированной методики количественного определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах // Фармация. – 2011. – №. 3. – С.14–17.

Адрес автора

Никитин Е.А., аспирант кафедры фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО КГМУ
evgeniy_nikitin_92@mail.ru