

УДК 615.322:582.736

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПЛОДОВ СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ

Ковалева Л.Г., Никифорова Е.Б.

ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России»,
Краснодар, e-mail: farmdep@mail.ru

Целью исследования являлось изучение качественного состава и количественного содержания свободных аминокислот плодов софоры японской. Объектом исследования служили образцы плодов софоры японской собственной и промышленной заготовки. Качественное обнаружение аминокислот проводили в водных извлечениях с помощью нингидриновой реакции, а также методом бумажной хроматографии. Детальное исследование аминокислот проводили методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель-103Р», основываясь на разделении анионных форм N-фенилтиокарбамил-производных аминокислот под действием электрического поля вследствие их различной электрофоретической подвижности. Электрофорез проводили под напряжением в 10 кВольт. Для идентификации и количественного определения анализируемых компонентов регистрировали ультрафиолетовое поглощение при длине волны 254 нм. Градуировку прибора осуществляли при помощи калибровочных растворов стандартных образцов аминокислот. Найдено, что в плодах софоры японской присутствуют: аргинин, лейцин, метионин, валин, пролин, треонин, триптофан, серин, α-аланин, глицин, пять из которых (лейцин, метионин, валин, треонин, триптофан) относятся к разряду незаменимых. Общее количество свободных аминокислот в изученных образцах сырья колебалось от 658,04 до 756,45 мг/кг, в среднем же оно составило 712,49 мг/кг с преобладающим содержанием пролина и глицина.

Ключевые слова: плоды софоры японской, свободные аминокислоты, капиллярный электрофорез

THE STUDY OF FREE AMINO ACID FRUIT SOPHORA JAPONICA

Kovaleva L.G., Nikiforova E.B.

Kuban State Medical University, Krasnodar, e-mail: farmdep@mail.ru

The aim of the study was to investigate the qualitative and quantitative composition of the contents of free amino acids of Sophora japonica fruit. We studied samples of fruits and Sophora japonica own industrial harvesting. Qualitative detection of amino acids in aqueous extracts was performed by then in hydrine action, as well as by paper chromatography. A more detailed study of amino acids was carried out by capillary electrophoresis device «Capel-103P», based on the division of anionic forms feniltiokarbamil – N-amino acid derivative under an electric field because of their different electrophoretic mobilities. Electrophoresis was performed at a voltage of 10 kV. For identification and quantification of analytes recorded ultraviolet absorption at 254 nm. Instrument calibration was performed using calibration solutions of standard samples of amino acids. It was found that the fruit Sophora japonica contains arginine, leucine, methionine, valine, proline, threonine, tryptophan, serine, α-alanine, glycine, five of which (leucine, methionine, valine, threonine, tryptophan) are essential to the category. Total free amino acids in the samples studied materials ranged from 658,04 to 756,45 mg/kg, in average, it was 712,49 mg/kg, with a predominant content of proline and glycine.

Keywords: fruits of Sophora japonica, amino acid, capillary electrophoresis

Плоды софоры японской и получаемая из них настойка используются в медицинской практике в качестве антисептического средства. Установлено, что плоды софоры являются носителем и других видов фармакотерапевтической активности, в частности они обладают противовоспалительным и иммуномодулирующим действием, ускоряют регенерацию тканей, влияют на липогенез, способны оказывать регулирующее воздействие на гемостаз [2, 6]. Вышеперечисленные лечебные эффекты, безусловно, связаны с химическим составом данного лекарственного растительного сырья (ЛРС), отличающимся заметным разнообразием биологически активных веществ (БАВ). Плоды софоры японской хорошо известны как богатый источник флавоноидов, в частности рутина, гликозидов кемпферола, генистеина и др. [1, 10]. Кроме того, они содержат кумаронохромоны, полисахариды,

тритерпеновые сапонины, лектины, жирное масло и др. [6, 8, 9, 11]. Среди БАВ плодов софоры японской, способных определять медицинское применение этого ЛРС, на наш взгляд, заслуживают внимания свободные аминокислоты, играющие в организме человека чрезвычайно важную роль, участвуя в белковом обмене, синтезе биогенных аминов и других процессах [3, 4].

Целью исследования являлось изучение качественного состава и количественного содержания свободных аминокислот плодов софоры японской.

Материал и методы исследования

Объектом исследования служили образцы плодов софоры японской как собственной, так и промышленной заготовки.

Качественное обнаружение аминокислот проводили в водных извлечениях с помощью нингидриновой реакции, а также методом бумажной

хроматографии. Для хроматографического анализа 0,03–0,05 мл полученных извлечений наносили на подготовленную хроматографическую бумагу «Filtrak» № 1 и хроматографировали в системе н.бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:2) с достоверными образцами аминокислот. Хроматограммы высушивали на воздухе, обрабатывали их 0,2 % спиртовым раствором нингидрина и нагревали в сушильном шкафу при 100–105 °С в течение нескольких минут [3].

Более детальное исследование аминокислотного состава плодов софоры японской проводили методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель-103Р» (ОАО «НПФ Льюэкс», Россия) с кварцевым капилляром $L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм. Метод основан на разделении анионных форм N-фенилтиокарбамил-производных аминокислот под действием электрического поля вследствие их различной электрофоретической подвижности. Пробоподготовку осуществляли путем СВЧ-экстракции плодов софоры японской 10 % спиртом этиловым на СВЧ-минерализаторе «Миновтавр-1». Пробу сырья в количестве 1,0 г помещали во фторопластовый контейнер СВЧ-минерализатора, добавляли 25 мл 10 % спирта этилового, устанавливали контейнер в магнетрон минерализатора. Минерализацию проводили, используя режим «разложение без давления», в течение 10 мин. По истечении указанного времени контейнер извлекали из СВЧ-минерализатора, охлаждали в естественных условиях в течение 3–5 мин. Полученное извлечение количественно переносили в мерную колбу объемом 25 мл.

К пробе полученного извлечения прибавляли 10 % водный раствор карбоната натрия и раствор фенилизотиоцианата в изопропиловом спирте. Реакционную смесь перемешивали, выдерживали в течение 35 минут при комнатной температуре для прохождения реакции между фенилизотиоцианатом и свободными аминокислотами плодов софоры японской, а затем высушивали в потоке теплого воздуха. К сухому остатку прибавляли воду очищенную, тщательно перемешивали и центрифугировали при 6000 об⁻¹ в течение 5 минут, полученную пробу (фугат) переносили в систему капиллярного электрофореза и пневматическим методом под давлением 30 миллибар в течение 5 секунд дозировали пробу в капилляр. Капилляр перед измерением подготавливали к работе, промывая его последовательно 3,5 % раствором соляной кислоты, водой очищенной, 4 % раствором гидроксида натрия и рабочим буферным раствором. Электрофорез проводили под напряжением в 10 кВольт. Анализируемую пробу дозировали в прибор не менее двух раз. Градуировку прибора осуществляли при помощи калибровочных растворов стандартных образцов аминокислот. Градуировочную смесь готовили путем смешения исходных растворов аминокислот, 10 % водного раствора карбоната натрия и раствора фенилизотиоцианата в изопропиловом спирте. Для идентификации и количественного определения анализируемых компонентов регистрировали ультрафиолетовое поглощение при длине волны 254 нм. По электрофореграмме определяли качественную характеристику вещества – время миграции и количественную (после построения градуировочной зависимости) – высоту или площадь пика, пропорциональную концентрации вещества [5, 7].

Результаты исследования и их обсуждение

Извлечения из плодов софоры японской давали положительную нингидриновую реакцию: аминокислоты проявлялись в виде красно-фиолетовых пятен. О наличии аминокислот в данном ЛРС свидетельствовали также данные хроматографического анализа. С достоверными образцами аминокислот в плодах софоры идентифицировали: аргинин, лейцин, метионин, валин, пролин, треонин, триптофан, серин, α-аланин, глицин.

Дальнейшее исследование аминокислотного состава плодов софоры японской проводили методом капиллярного электрофореза. Электрофореграмма свободных аминокислот плодов софоры японской представлена на рисунке. На основании полученных электрофореграмм при помощи программного обеспечения к прибору рассчитывали количественное содержание отдельных свободных аминокислот в пяти образцах плодов софоры японской по установленным градуировочным характеристикам. Результаты исследований приведены в таблице.

Как показывают результаты исследования, с использованием бумажной хроматографии и методом капиллярного электрофореза в плодах софоры японской обнаружены разнообразные аминокислоты: аргинин, лейцин, метионин, валин, пролин, треонин, триптофан, серин, α-аланин, глицин. Следует отметить, что пять из найденных аминокислот (лейцин, метионин, валин, треонин, триптофан) относятся к разряду незаменимых.

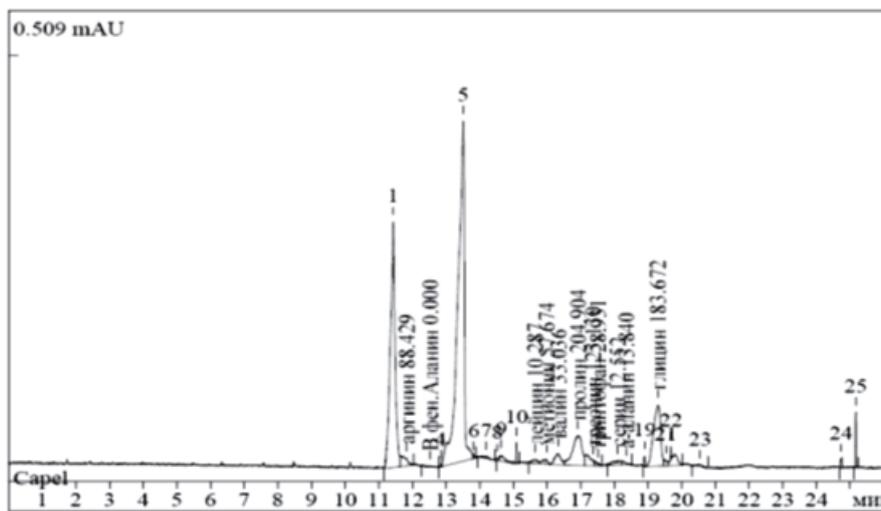
Общее количество свободных аминокислот в изученных образцах сырья колебалось от 658,04 до 756,45 мг/кг, в среднем же оно составило 712,49 мг/кг. В плане количественного содержания среди всех свободных аминокислот наибольшая концентрация установлена для пролина и глицина, их содержание составило примерно половину от суммарного количества всех свободных аминокислот. Около 30 % аминокислотной фракции приходится на треонин и аргинин, все остальные обнаруженные в плодах софоры аминокислоты занимают примерно 20 % от общего содержания данных БАВ в изученных объектах.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований изучен качественный состав и количественное содержание свободных аминокислот плодов софоры японской. Полученные данные свидетельствуют о том, что плоды софоры японской характеризуются существенной широтой

и уровнем содержания свободных аминокислот. Установленное разнообразие и достаточно высокое количественное содержание данной группы БАВ могут стать

основанием для рассмотрения свободных аминокислот как одних из фармакологически активных компонентов плодов софоры японской.



Электрофореграмма свободных аминокислот плодов софоры японской

Содержание свободных аминокислот в плодах софоры японской

Наименование свободных аминокислот	Содержание свободных аминокислот, мг/кг				
	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3	Образец № 4	Образец № 5
Аргинин	77,37 ± 15,47	52,15 ± 10,43	88,43 ± 17,69	82,90 ± 16,58	71,80 ± 14,36
Лейцин	8,13 ± 1,63	12,41 ± 2,48	10,29 ± 2,06	10,83 ± 2,17	11,53 ± 2,31
Метионин	49,12 ± 9,82	51,33 ± 10,27	57,67 ± 11,53	52,18 ± 10,44	50,61 ± 10,12
Валин	41,13 ± 8,23	38,17 ± 7,63	33,04 ± 6,61	36,71 ± 7,34	39,26 ± 7,85
Пролин	221,30 ± 44,26	197,40 ± 39,48	204,90 ± 40,98	218,20 ± 43,64	213,50 ± 64,05
Треонин	95,09 ± 19,02	107,10 ± 21,42	123,10 ± 24,62	112,60 ± 22,52	119,40 ± 23,88
Триптофан	30,37 ± 6,07	27,44 ± 5,49	28,93 ± 5,79	28,67 ± 5,73	29,51 ± 5,90
Серин	10,85 ± 2,17	13,54 ± 2,71	12,55 ± 2,51	13,18 ± 2,64	12,83 ± 2,57
α-Аланин	14,15 ± 2,83	11,86 ± 2,37	13,84 ± 2,77	11,57 ± 2,31	12,92 ± 2,58
Глицин	167,30 ± 33,46	179,80 ± 35,96	183,70 ± 36,74	174,10 ± 34,82	180,60 ± 36,12
Сумма аминокислот	714,81 ± 142,96	691,2 ± 138,24	756,45 ± 151,29	658,04 ± 131,61	741,96 ± 148,39

Примечания:

- Образец 1 – ООО «СОИК», г. Москва;
- Образец 2 – ООО «Сила природы», Краснодарский край, Отрадненский район;
- Образец 3 – Краснодарский край, ст. Динская;
- Образец 4 – Краснодарский край, г. Краснодар;
- Образец 5 – Краснодарский край, ст. Васюринская.

Список литературы

1. Ахмедходжаева Н.М. К вопросу определения флавоновых соединений в плодах софоры японской // Фармация. – 1986. – Т.35. – № 5. – С. 61–62.
2. Дрозд Г.А., Горбачева Л.А. Фармакогностическо-иммунологическое изучение плодов софоры японской (Sophora japonica L.) // Фармация. – 1994. – № 1. – С. 34–37.
3. Дроздова И.Л., Денисова Н.Н. Изучение аминокислотного состава травы короставника полевого // Традиционная медицина. – 2012. – № 29. – С. 49–51.
4. Исследование аминокислотного состава водорастворимых комплексов цветков ноготков и кукурузных рылец / А.М. Сампиев, Е.Б. Никифорова, М.Р. Хочава, М.М. Дзаурова // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения:

материалы IX Международного съезда «Фитофарм 2005» и конференции молодых ученых Европейского фитохимического общества «Растения и здоровье» (Санкт-Петербург, 22–25 июня, 2005 г.). – Санкт-Петербург: НИИХ СПбГУ, 2005. – С. 764–766.

5. Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ». – СПб.: ВЕДА, 2006. – С. 50–51.

6. Ковалева Л.Г., Сампиев А.М., Хочава М.Р., Никифорова Е.Б. Современное состояние и перспективы дальнейшего исследования плодов софоры японской // Научные ведомости Белгородского университета. – 2012. – № 22 (141), вып. 20. – С. 163–170.

7. Методическое и аналитическое обеспечение исследований по садоводству / под ред. Э.В. Макаровой. – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСИВ, 2010. – 300 с.

8. Kooiman P. Structures of the galactomannans from seeds of *Annonamuricata*, *Arengasaccharifera*, *Cocosnucifera*, *Convolvulus tricolor* and *Sophorajaponica* // Carbohydrate research. – 1971. – № 20. – P. 329–337.

9. Hankins C.N., Kindinger J., Shannon L.N. The lectins of *Sophora japonica*. II. Purification, properties and N-terminal amino acid sequences of five lectins from bark // Plant Physiol. – 1988. – Vol. 86. – P. 67–70.

10. Sun A., Sun Q., Liu R. Preparative isolation and purification of flavone compounds from *Sophora japonica* L. by high-speed counter-current chromatography combined with macroporous resin column separation // J. Sep. Sci. – 2007. – Vol. 30, № 7. – P. 1013–1018.

11. Tang Y.J., Hu J., Wang J. A new coumaronochromone from *Sophorajaponica* // J. Asian Nat. Prod. Res. – 2002. – Vol. 4. – P. 1–5.

References

1. Ahmedhodzhaeva N.M. *Farmacija*, 1986, vol.35, no. 5, pp. 61–62.
2. Drozd G.A., Gorbacheva L.A. *Farmacija*, 1994, no. 1, pp. 34–37.
3. Drozdova I.L., Denisova N.N. *Tradicionnaja medicina*, 2012, vol. 29, no. 29, pp. 49–51.
4. Sampiev A.M., Nikiforova E.B., Hochava M.R., Dzaurava M.M. *Aktualnye problem sozdaniya novyh lekarstvennykh*

preparatov pri rodnogoproishozhdenija: Materialy IX Mezhdunarodnogosezda «Fitofarm 2005» i konferencii molodyh uchenyh Evropejskogo fitohimicheskogo obshhestva «Rastenija izdorove» (Actual problems of creation of new medicinal preparation of natural origin: Proceedings of the IX International congress «Phytofarm 2005» and the conference of Young Scientists of the European Society of phytochemical «Plants and Health»). St. Petersburg, 2005, pp. 764–766.

5. Komarova N.V., Kamentsev YA.S. *Prakticheskoe rukovodstvo po ispolzovaniyu sistem kapillyarnogoelektroforeza «KAPEL»* [Practical guidance on the use of capillary electrophoresis systems «KAPEL»]. St. Peterburg, Veda, 2006, pp. 50–51.

6. Kovaleva L.G., Sampiev A.M., Hochava M.R., Nikiforova E.B., Belgorod State University Scientific bulletin, 2012, no. 22 (141), issue 20, pp. 163–170.

7. Makarova JE.V. *Metodicheskoe i analiticheskoe obespechenie issledovaniy posadovodstvu* [Methodological and analytical support for research on gardening]. Krasnodar, GNU SKZNIISiV, 2010, 300 p.

8. Kooiman P. *Carbohydrate research*, 1971, no. 20, pp. 329–337.

9. Hankins C.N., Kindinger J., Shannon L.N. *Plant Physiology*, 1988, vol. 86, pp. 67–70.

10. Sun A., Sun Q., Liu R. *J. Sep. Sci.*, 2007, vol. 30, no. 7, pp. 1013–1018.

11. Tang Y., J. Hu, J. Wang. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 2002, vol. 4, pp. 1–5.

Рецензенты:

Коновалов Д.А., д.фарм.н., заведующий кафедрой фармакогнозии Пятигорского филиала ГБОУ ВПО «Волгоградского государственного медицинского университета» Минздрава России, г. Пятигорск;

Шевченко А.М., д.фарм.н., доцент кафедры технологии лекарств Пятигорского филиала ГБОУ ВПО «Волгоградского государственного медицинского университета» Минздрава России, г. Пятигорск.

Работа поступила в редакцию 08.11.2013.