

УДК 615.322:582.635.3:543.544.943.3

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ЛИСТЬЕВ ШЕЛКОВИЦЫ ЧЕРНОЙ (*MORUS NIGRA L.*), ШЕЛКОВИЦЫ БЕЛОЙ (*MORUS ALBA L.*) И ШЕЛКОВИЦЫ КРАСНОЙ (*MORUS RUBRA L.*)

Селина И.И.

*Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск, e-mail: irinselina@yandex.ru*

Изучен качественный и количественный состав аминокислот листьев шелковицы черной (*Morus nigra L.*), шелковицы белой (*Morus alba L.*) и шелковицы красной (*Morus rubra L.*). Методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием стандартных образцов аминокислот осуществлен предварительный анализ содержания свободных аминокислот. Установлено, что в исследуемых образцах идентифицированы глицин, глутаминовая кислота, метионин, тирозин. Дальнейшее определение суммы аминокислот определяли на аминокислотном анализаторе АА-33. В результате исследования получены точные сведения о качественном и количественном содержании. Наибольшее содержание аминокислот выявлено в экстракте листьев шелковицы белой (13,12 С, г/%). Все три объекта исследования содержат в своем составе 15 аминокислот, из которых доминируют глутаминовая кислота, глицин, метионин и тирозин.

**Ключевые слова:** аминокислоты, листья шелковицы черной, белой и красной, тонкослойная хроматография (ТСХ)

## COMPARATIVE STUDY OF AMINO ACID COMPOSITION OF BLACK MULBERRY LEAVES (*MORUS NIGRA L.*), WHITE MULBERRY (*MORUS ALBA L.*) AND MULBERRY RED (*MORUS RUBRA L.*)

Selina I.I.

*Piatigorsky Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of the Ministry of Health Medical University VolgGMU Russia, Pyatigorsk, e-mail: irinselina@yandex.ru*

The qualitative and quantitative composition of amino acids of the black mulberry leaves (*Morus nigra L.*), white mulberry (*Morus alba L.*) and red mulberry (*Morus rubra L.*). By thin layer chromatography (TLC) using standard samples amino preliminary analysis was done free amino acids. It was established that in the samples identified: glycine, glutamic acid, methionine, tyrosine. Further determination of the amount of aminoacids was determined by aminoacid analyzer AA-33. The study obtained accurate information on the qualitative and quantitative content. The highest content of the aminoacids found in the white mulberry leaves extract (13,12 C, g/%). All three objects contain in the study consisting of 15 amino acids, which are dominated by glutamic acid, glycine, methionine and tyrosine.

**Keywords:** amino acids, mulberry leaves black, white and red, thin layer chromatography (TLC)

В настоящее время уделяется большое внимание изучению различных видов пищевых растений, с точки зрения их использования в качестве сырьевых источников для получения фармакологически активных субстанций.

В этом отношении большой интерес представляет широко распространенная культура – тут, или шелковица, наземная часть которой в настоящее время изучена очень мало.

Нами проведены химические исследования листьев шелковицы черной (*Morus nigra L.*). Установлено, что в спиртовом экстракте, полученном экстракцией 40% водным этанолом присутствуют танин, галловая, хлорогеновая, кофейная кислоты, рутин, оксиметоксикумарин. Количественное содержание хлорогеновой кислоты – 0,14% и рутин – 0,058%.

В ходе работы были определены такие физико-химические характеристики водорастворимых полисахаридов и пектинов, выделенные по методу Кочеткова, как мо-

лекулярная масса, константа Хаггинса, степень набухания. Результаты показали, что значения средних М.м. исследуемых полисахаридов лежат в пределах от 2700 до 19000. Проведено фракционирование углеводов из листьев шелковицы черной и шелковицы белой и ягод шелковицы черной. Содержание водорастворимых полисахаридов (ВРПС) – 3,59%, 4,29% соответственно, пектинов (ПВ) – 0,87%, 0,575% соответственно в листьях, в ягодах содержание ВРПС составляет 8,92%, пектинов – 10,23%. У всех водорастворимых полисахаридов и пектинов с увеличением молярной массы возрастала степень набухания, но уменьшалась величина константы Хаггинса. Выявлена также корреляционная зависимость между величинами средней молекулярной массы ВРПС и ПВ, константами Хаггинса и степенью набухания всех полисахаридов выделенных из изучаемых видов [3, 4, 5].

Изучена сорбционная активность водорастворимых полисахаридов листьев

шелковицы черной (*Morus nigra* L.) и шелковицы белой (*Morus alba* L.), а также водорастворимых полисахаридов и пектинов, полученных из ягод шелковицы черной (*Morus nigra* L.) по отношению к ионам свинца. В течение одного часа максимальное извлечение ионов свинца водорастворимыми полисахаридами шелковицы черной составило 43,8%, шелковицы белой – 52,1%, водорастворимыми полисахаридами из ягод – 22,1%, а пектинами – 67,7% от равновесной концентрации. Характер полученных изотерм доказывает, что функциональная зависимость величины адсорбции от равновесной концентрации к ионам  $Pb^{2+}$  во всех случаях подчиняется уравнению Ленгмюра [3, 5].

Проведен спектральный анализ микро- и макроэлементного состава; наибольшее содержание калия, кальция, магния и фосфора [2, 3, 5].

Целью настоящей работы явилось изучение качественного и количественного состава аминокислот, содержащихся в листьях шелковицы черной, шелковицы белой и шелковицы красной.

#### Материал и методика исследования

При изучении растительного сырья анализ качественного и количественного состава аминокислот является одной из обязательных и важных задач. Объектом наших исследований явилась широко распространенная древесная культура – шелковица. Предварительный анализ аминокислот осуществляли в трех образцах экстрактов листьев шелковицы белой (*Morus alba* L.) (образец № 1), листьев шелковицы черной (*Morus nigra* L.) (образец № 2) и листьев шелковицы красной (*Morus rubra* L.) (образец № 3).

*Идентификация свободных аминокислот.* Изучение состава свободных аминокислот в образцах проводили с применением в качестве «свидетелей» индивидуальных аминокислот. В качестве неподвижной фазы использовали хроматографические пластины «Kieselgel» размером 15×20 см; в качестве подвижной фазы смесь растворителей: н-пропанол-ледяная уксусная кислота–вода в соотношении 80:20:20. Смесь растворителей помещали в стеклянную камеру для хроматографии, которую насыщали в течение 2-х часов [1, 2].

Для анализа использовали растворы экстрактов в разведенной хлористоводородной кислоте: к 0,05 г каждого образца прибавляли по 3 мл исходной кислоты, перемешивали (исследуемый раствор) и далее подвергали определению.

В качестве растворов сравнения использовали 0,05% растворы рабочих стандартных образцов аминокислот: аргинина, аспарагиновой кислоты, глицина, серина, глутаминовой кислоты, треонина, валина, метионина, триптофана, фенилаланина, тирозина, пролина, лейцина, гистидина.

Для приготовления рабочих стандартных растворов аминокислот 0,05 г (точная навеска) каждой из них помещали в мерные колбы объемом 100 мл, прибавляли по 50 мл воды дистиллированной, помещали в ультразвуковую баню, перемешивали до растворе-

ния при температуре 50°C и доводили до метки тем же растворителем.

На линию старта хроматографической пластины наносили 5 мкл образца № 1, 20 мкл образца № 2 и 10 мкл образца № 3 исследуемых растворов и по 5 мкл рабочих стандартных образцов аминокислот. Длина пробега растворителей составила 15 см. Хроматограмму высушивали при комнатной температуре до полного улетучивания растворителей, опрыскивали 0,2% раствором нингидрина в 95% этаноле (1,0 г нингидрина, 2,5 г ацетата кадмия, 10 мл уксусной кислоты ледяной растворяют в 500 мл спирта этилового) и нагревали в сушильном шкафу при температуре 100–105 градусов в течение 5 минут. На хроматограммах после проявления 0,2% раствором нингидрина обнаружены окрашенные зоны (табл. 1) [4, 7].

*Подготовка проб для изучения свободных аминокислот* осуществляют следующим образом: 50,0 г (точная навеска) сырья исчерпывающе экстрагируют смесью хлороформ-бензол (1:1) в аппарате Сокслета (в течение 28 часов).

После удаления растворителя сырье количественно переносят в круглодонную колбу, добавляют 300 мл горячей воды (80–90°C) и кипятят с обратным холодильником в течение 1 часа. Данную операцию проводят трехкратно, используя каждый раз свежий экстрагент. Объединенные извлечения упаривают до сиропообразной консистенции и добавляют пятикратное количество метанола для осаждения высокомолекулярных соединений. Осадок центрифугируют, и полученный фильтрат упаривают досуха (порошок).

12 мг порошка растворяют в 2,2 мл натрий-цитратного раствора и вводят в колонку аминокислотного анализатора. Качественный состав аминокислот в образце определяют по времени удерживания. В качестве стандарта используют стандартную смесь, состоящую из 18 аминокислот.

Для определения суммы аминокислот в экстрактах исследуемых видов была использована методика, основанная на реакции взаимодействия аминокислот с раствором нингидрина и последующем спектрофотометрировании полученного окрашенного комплекса при длине волны около 570 нм. В ходе эксперимента нами была уточнена длина волны максимума поглощения окрашенного комплекса с нингидрином глютаминовой кислоты и водного извлечения из экстрактов. Комплекс и раствор для исследования получали по приведенной ниже методике (рисунок).

Для исследования около 0,0500 (точная навеска) экстрактов помещали в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 150 мл воды очищенной и перемешивали до растворения с использованием ультразвуковой бани. Охлаждали, объем доводили до метки водой очищенной, перемешивали и извлечение фильтровали через обеззоленный фильтр. Далее анализировали фильтрат.

Около 0,0500 г (точная навеска) кислоты глютаминовой (ВФС 42-2722-96) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20–30 мл воды и доводят раствор водой до метки (PCO).

2 мл исследуемого раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл прибавляли 1 мл 0,25% раствора натрия карбоната. 2 мл спиртового раствора нингидрина и нагревали 10 минут на кипящей водяной бане. После охлаждения раствор доводили водой до метки. Параллельно в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 2 мл раствора PCO кислоты глютаминовой и далее поступали, как указано выше.

Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре при длине волны 568 нм в кювете с толщиной слоя жидкости 10 мм относительно воды. Содержание суммы аминокислот в сырье в %  $X$ , в пересчёте на кислоту глютаминовую, рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D^* \cdot 250 \cdot M \cdot 50 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{D \cdot m \cdot 2 \cdot 100 \cdot 50 \cdot (100 - W)},$$

где  $D^*$  – оптическая плотность испытуемого раствора;  $D$  – оптическая плотность РСО глютаминовой кислоты;  $M$  – масса РСО глютаминовой кислоты в граммах;  $m$  – масса экстракта в г;  $W$  – потеря массы при высушивании сырья в % [2, 6].

Результаты исследования приведены в табл. 2.

### Результаты исследования и их обсуждение

На основании данных ТСХ установлено, что в исследуемых образцах № 1 и № 2 проявляется 6 окрашенных зон, из которых идентифицировано 4, в образце № 3 обнаружены 5 зон, из которых идентифицированы 4. Испытание проводилось в нескольких системах растворителей, наилучшее разделение достигается в системе н-пропанол-уксусная кислота-вода (80:20:20)

Таблица 1

Результаты хроматографического исследования аминокислотного состава экстрактов листьев шелковицы белой, черной и красной

Образцы № 1 и № 2		Образец № 3	
Номер зоны, значения Rf около	Идентифицировано	Номер зоны, значения Rf около	Идентифицировано
1) 0,35 (розовая)	Глицин	1) 0,35 (розовая)	Глицин
2) 0,40 (фиолетовая)	Неидентифицировано	2) 0,40 (фиолетовая)	Неидентифицирован
3) 0,48 (розовая)	Глутаминовая кислота	3) 0,48 (розовая)	Глутаминовая кислота
4) 0,56 (розовая)	Неидентифицировано	4) 0,60 (розовая)	Метионин
5) 0,60 (розовая)	Метионин	5) 0,69 (розовая)	Тирозин
6) 0,69 (розовая)	Тирозин		

Дальнейшее определение проводили на аминокислотном анализаторе АА-33. Наибольшее содержание аминокислот наблюдается в экстракте листьев шелковицы белой (13,12 С, г/%). Все три

объекта исследования содержат в своем составе 15 аминокислот, из которых, в наибольшем количестве содержатся: глютаминовая кислота, глицин, метионин и тирозин.

Таблица 2

Аминокислотный состав экстрактов листьев шелковицы белой, черной и красной

№ п/п	Аминокислоты	Шелковица черная	Шелковица белая	Шелковица красная
		С, г/%	С, г/%	С, г/%
1.	Аспарагиновая кислота	1,02	0,97	0,98
2.	Треонин	0,45	0,38	0,34
3.	Серин	0,28	0,19	0,12
4.	Глутаминовая кислота	2,88	2,26	2,01
5.	Глицин	1,31	1,02	1,12
6.	Аланин	0,61	0,48	0,43
7.	Валин	0,74	0,54	0,52
8.	Метионин	1,57	1,34	1,18
9.	Изолейцин	0,40	0,26	0,18
10.	Лейцин	0,68	0,57	0,19
11.	Тирозин	1,11	0,96	0,84
12.	Фенилаланин	0,57	0,41	0,37
13.	Гистидин	0,27	0,24	0,21
14.	Лизин	0,36	0,21	0,17
15.	Аргинин	0,87	0,75	0,68
	Всего:	13,12	10,58	9,34

Спектрофотометрическим методом проводили определение суммы аминокислот по реакции с нингидрином:

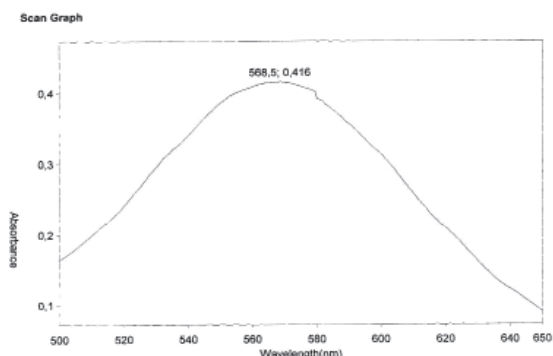
Установлено, что содержание аминокислот в листьях шелковицы черной составляет 11,8; шелковицы белой – 11,7% и шел-

ковицы красной – 11,3% (в пересчете на глутаминовую кислоту).

**Выводы**

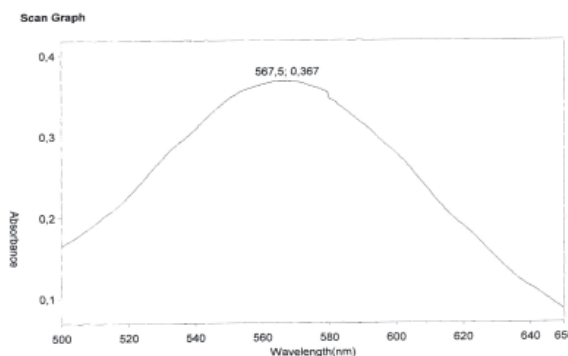
На аминокислотном анализаторе АА-33 исследован качественный и количественный аминокислотный состав в экстрактах листьев шелковицы черной, шелковицы белой и шелковицы красной. В значительном количестве в экстрактах листьев (от

общей суммы аминокислот) содержится аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, глицин, метионин, тирозин. Всего обнаружено 15 свободных аминокислот. По реакции с нингидрином разработана методика спектрофотометрического определения аминокислот. Наибольшее содержание аминокислот наблюдается в экстракте листьев шелковицы белой, которое составляет 13,12 С, г/ %.



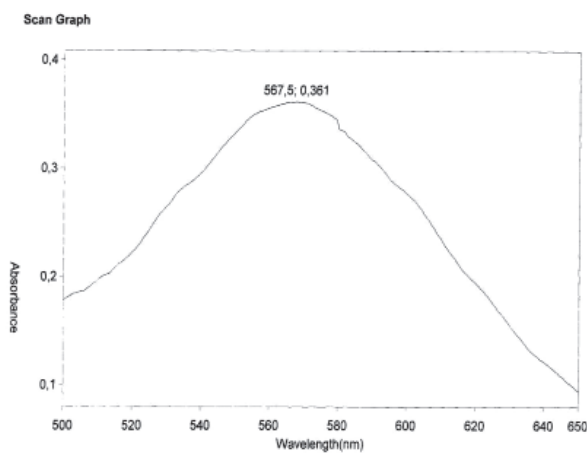
Results Table - scan005,Sample001,Cycle01		
nm	A	Peak Pick Method
568,50	0,416	Find 8 Peaks Above -3,0000 A
Start Lambda 500,0 nm		
Stop Lambda 650,0 nm		
Sort By Wavelength		

а



Results Table - scan006,Sample001,Cycle01		
nm	A	Peak Pick Method
567,50	0,367	Find 8 Peaks Above -3,0000 A
Start Lambda 500,0 nm		
Stop Lambda 650,0 nm		
Sort By Wavelength		

б



Results Table - scan007,Sample001,Cycle01		
nm	A	Peak Pick Method
567,50	0,361	Find 8 Peaks Above -3,0000 A
Start Lambda 500,0 nm		
Stop Lambda 650,0 nm		
Sort By Wavelength		

в

*Спектр поглощения комплекса водного раствора экстракта шелковицы черной (а), шелковицы белой (б), шелковицы красной (в) с раствором нингидрина*

**Список литературы**

1. Выделение и анализ природных биологически активных веществ / Е.А. Краснов [и др.]. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1987. – 184 с.  
 2. Дроздова И.Л. Аминокислотный и микроэлементный состав листьев лопуха // Фармация. – 2004. – № 3. – С. 18–19.

3. Исследование сорбционной способности пектинов и водорастворимых полисахаридов крыжовника отклоненного (*Grossularia reclinata* L.), листьев шелковицы черной (*Morus nigra* L.) и шелковицы белой (*Morus alba* L.) / С.Л. Аджихметова, Э.Т. Оганесян, И.И. Селина и др. // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. – 2013. – № 11 (154). – Вып. 22. – С. 277–282.

4. Маджидов С.Р. Фармакогностическое изучение некоторых сортов шелковицы, культивируемой в Узбекистане: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. – Баку, 1971. – 27 с.

5. Селина И.И. Физико-химические характеристики пектинов и водорастворимых полисахаридов крыжовника отклоненного (*Grossularia reclinata* L.), листьев шелковицы черной (*Morus nigra* L.) и шелковицы белой (*Morus alba* L.) / И.И. Селина, С.Л. Пеливанова, Э.Т. Оганесян и др. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 10. – С. 20–26.

6. Химический анализ лекарственных растений: учеб. пособие для фарм. вузов / Ладыгина Е.Я. [и др.]. – М.: Высш. шк., 1983. – 176 с.

7. Химический анализ лекарственных растений: учеб. пособие для фармац. вузов / под ред. Н.И. Гринкевич, Л.Н. Сафронич. – М.: Высш. шк., 1983. – 176 с.

### References

1. Vydelenie i analiz prirodnyh biologicheski aktivnyh veshhestv / E.A. Krasnov [i dr.]. Tomsk: Izd-vo Tom. un-ta, 1987. 184 p.

2. Drozdova I.L. Aminokislotnyj i mikrojelementnyj sostav list'ev lopuha / I.L. Drozdova // Farmacija. 2004. no. 3. pp. 18–19.

3. Issledovanie sorbcionnoj sposobnosti pektinov i vodorastvorimyh polisaharidov kryzhovnika otklonennogo (*Grossularia reclinata* L.), list'ev shelkovicy chernoj (*Morus nigra* L.) i shelkovicy beloј (*Morus alba* L.) / S.L. Adzhiahmetova, Je.T. Oganеsjan, I.I. Selina i dr. // Nauchnye vedomosti BelgGU. Serija: Medicina. Farmacija. 2013. no. 11 (154). Vyp. 22. pp. 277–282.

4. Madzhidov S.R. Farmakognosticheskoe izuchenie nekotoryh sortov shelkovicy, kul'tiviruemoј v Uzbekistane: Avtoref. dis. ... kand.farm.nauk. Baku. 1971. 27 p.

5. Selina I.I. Fiziko-himicheskie harakteristiki pektinov i vodorastvorimyh polisaharidov kryzhovnika otklonennogo (*Grossularia reclinata* L.), list'ev shelkovicy chernoј (*Morus nigra* L.) i shelkovicy beloј (*Morus alba* L.) / I.I. Selina, S.L. Pelivanova, Je.T. Oganеsjan i dr. // Voprosy biologicheskој, medicinskoј i farmaceuticheskој himii. 2013. no. 10. pp. 20–26.

6. Himicheskij analiz lekarstvennyh rastenij: Ucheb.posobie dlja farm. vuzov / Ladygina E.Ja. [i dr.]. M.: Vyssh. shk., 1983. 176 p.

7. Himicheskij analiz lekarstvennyh rastenij: Ucheb.posobie dlja farmac. vuzov / Pod red. N.I. Grinkevich, L.N. Safronich. M.: Vyssh.shk., 1983. 176 p.

### Рецензенты:

Кодониди И.П., д.фарм.н., доцент кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск;

Попова О.И., д.фарм.н., профессор кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.

Работа поступила в редакцию 06.03.2014.