

Рекомендована д.ф.н., професором А.Г.Сербіним

УДК 615.322:577.112.3:581.8:581.43:582.998

ВИВЧЕННЯ АМІНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ ТА АНАТОМІЧНОЇ БУДОВИ КОРЕНІВ І ТРАВИ РОЗТОРОПШІ ПЛЯМИСТОЇ

Г.С.Болоховець, І.І.Тернінко, В.С.Кисличенко, В.П.Руденко

Національний фармацевтичний університет
Державний луганський медичний університет

Вивчено якісний склад та кількісний вміст вільних та зв'язаних амінокислот у траві та коренях розторопші. Крім того, у сировині, що вивчалася, було встановлено кількісний вміст загального білка. Визначили анатомічні діагностичні ознаки трави та коренів розторопші.

Незважаючи на те, що генетичним кодом живих істот маркуються лише 20 амінокислот, у природі їх знайдено близько ста. В організмі людини здійснюється синтез лише замінних протеїногенних амінокислот, а в тканинах рослин синтезуються також незамінні амінокислоти. Деякі з амінокислот також знайдені і в метеоритах, особливо в тих з них, що називаються карбогенхондритами. Бактерії та рослини можуть виробляти досить незвичайні амінокислоти, які можуть долучатись до складу пептидних антибіотиків (нізін, аламетицин); лантіонін, зв'язаний дисульфідним хімічним зв'язком димераланіну, спільно з ненасиченими амінокислотами входить до складу лантібіотиків (пептидні антибіотики бактеріального походження). 1-Аміноциклопропан-1-карбоксильна кислота (АСС) — широко розповсюджена циклічна амінокислота, що виступає проміжним продуктом у синтезі рослинних гормонів [4, 8].

На додаток до синтезу протеїнів амінокислоти в тваринному організмі виконують багато інших важливих біологічних функцій. Гліцин та глутамат (аніон глутамінової кислоти), окрім входження до складу протеїнів, використовуються також як нейромедіатори при нервовій передачі через хімічні синапси. Велика кількість амінокислот є проміжними продуктами при синтезі інших важливих речовин: так, триптофан є прекурсором нейромедіатора серотоніну, а гліцин є одним з реагентів у синтезі порфіринів (дихальний пігмент — гем). Також біологічно важливими є і нестандартні амінокислоти: ГАМК (ще один нейромедіатор), карнітин (використовується для транспорту ліпідів у клі-

тині), орнітин, цитрулін, гомоцистеїн, гідроксипролін, гідроксилізін, саркозин і т. ін. [6, 7].

Тому метою нашої роботи було встановлення амінокислотного складу трави та коренів розторопші, а також вивчення анатомічної будови трави та коренів розторопші плямистої.

Експериментальна частина

Об'єктом дослідження була трава та корені розторопші, зібрані у Донецькій області у 2006-2007 рр.

Вільні амінокислоти визначали методом ПХ водного і водно-спиртового екстрактів, отриманих з трави та коренів розторопші, в системі розчинників н-бутанол — оцтова кислота — вода БОВ (4:1:2); методом багатократного розвинення хроматограми, що дає змогу фронту розчинника пройти більшу відстань при тій же самій довжині листа паперу. Хроматограму з нанесеними речовинами вміщували в камеру з розчинниками. Після проходження розчинником 1/3 довжини листа паперу хроматограму виймали і ретельно висушували. Наступного разу поступали аналогічно, з тією різницею, що розчинник проходив 1/2 довжини листа паперу, а третій раз розчинник проходив повністю весь лист до лінії фронту. Для проявлення амінокислот використовували неспецифічний реагент — 0,1% розчин нінгідрину в етанолі, хроматограму нагрівали в сушильній шафі при 96°C до появи плям амінокислот. При цьому амінокислоти забарвлювались у фіолетовий або рожево-фіолетовий колір. При визначенні кількісного вмісту амінокислот у траві та коренях розторопші плямистої сировину попередньо витримували у сушильній шафі при температурі 100°C протягом 2-3 год до постійної ваги [1, 2].

Потім біля 0,1 г (точна наважка) висушеної сировини вносили в ампулу (скло Пірекс), заливали 200-кратним надлишком 6 М розчину кислоти хлористоводневої, відкачували повітря, запаявали, поміщали у термостат при температурі 80°C і гідролізували протягом 20 год. Після цього ампулу розкривали, надлишок кислоти хлористо-

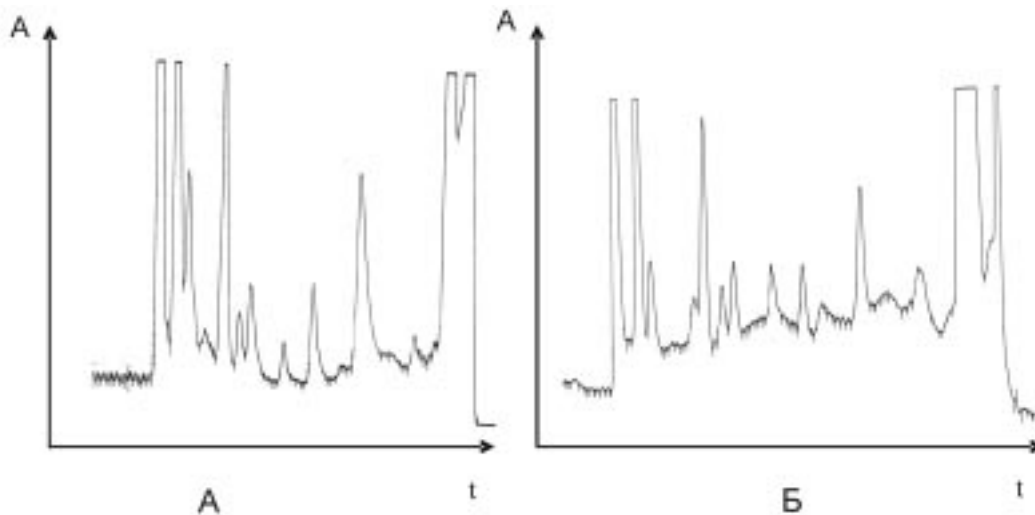


Рис. 1. Хроматограми визначення вмісту зв'язаних амінокислот у траві (А) та коренях (Б) розторопші плямистої.

водневої відганяли і проводили нейтралізацію проб в ексикаторі над натрію гідроксидом протягом 2 діб. Потім пробу розбавляли 10 мл цитратного буферного розчину рН 2,2, ретельно перемішували і фільтрували. Одержаний фільтрат вносили на колонку, заповнену іонообмінною смолою, і крізь неї, за допомогою насосу, пропускали цитратні буферні розчини від 2,2-7,8 рН з різною іонною силою, що сприяло розділенню амінокислот.

Елюат, який виходив із колонки, змішувався з нінгідриновим реагентом у реакторі при темпера-

турі 135°C, де проходила реакція між нінгідрином і амінокислотами з утворенням забарвлених сполук. Забарвлення прямо пропорційне кількості амінокислоти в елюаті. Потім суміш надходила до спектрофотометра, і вимірювалася інтенсивність поглинання забарвленої сполуки. УФ-спектр поглинання отримували при довжині хвилі 440 нм для проліну та при довжині хвилі 570 нм для інших амінокислот.

Вихідний сигнал фотометра надходив на двоканальний самописець, який реєстрував концентрації амінокислот на хроматограмі у вигляді серії піків. Час утримування піку, який визначали за хроматограмою, характеризує кожну індивідуальну амінокислоту. Площа піку відповідає кількості присутньої амінокислоти. Електричний сигнал самописця також поступав на інтегратор, який автоматично обчислював площу кожного піку. Для калібровки амінокислотного аналізатора крізь катіоніт пропускали стандартну суміш амінокислот.

Мікропрепарати для вивчення анатомічної будови трави та коренів розторопші плямистої готували із свіжозібраної, фіксованої в суміші спирт — гліцерин — вода (1:1:1) сировини; вивчали під мікроскопом "Біолам" при збільшенні в 160, 400 і 800 разів. Діагностичні ознаки фотографували за допомогою фотокамери "Olympus FE-140".

Результати та їх обговорення

У результаті проведеного аналізу в траві розторопші у вільному стані виявили серин, триптофан, аланін, цистеїн, аспарагінову кислоту, треонін, лізин, аргінін, гістидин, глютамінову кислоту, в коренях розторопші — гістидин, аргінін, треонін, цистеїн, валін, метіонін, фенілаланін.

Було також встановлено кількісний вміст не менше 15 зв'язаних амінокислот у траві та коренях розторопші.

Хроматограми визначення вмісту зв'язаних амінокислот у траві та коренях розторопші плямистої наведені на рис. 1.

Таблиця

Кількісний вміст зв'язаних амінокислот у траві та коренях розторопші плямистої

Назва амінокислоти	Вміст зв'язаної амінокислоти, % на суху вагу	
	траву розторопші	корені розторопші
Аспарагінова кислота	0,708	0,372
Треонін	0,386	0,111
Серин	0,487	0,218
Глутамінова кислота	2,827	0,805
Гліцин	0,473	0,024
Аланін	0,863	0,095
Валін	0,665	0,197
Метіонін	0,365	0,028
Ізолейцин	0,265	0,237
Лейцин	0,941	0,349
Тирозин	0,385	0,113
Фенілаланін	0,487	0,229
Гістидин	0,169	0,090
Лізин	0,442	0,198
Аргінін	0,666	0,175
Загальний білок	12,75	3,75



Рис. 2. Поперечний зріз кореня розторопші плямистої.

Вміст білка встановлювали за методом Лоурі. Отримані результати кількісного вмісту зв'язаних амінокислот наведені у таблиці.

У результаті визначення анатомічної будови коренів і трави розторопші були зроблені наступні висновки.

Корінь вторинної будови вкритий перидермою, яка межує з залишками первинної кори — корою паренхімою і дрібноклітинною ендодермою. Над ендодермою розташовані секреторні канали з коричневими контурами (рис. 2). У більш товстих коренях канали розташовані майже під перидермою. Осьовий циліндр має безпучкову будову. Флоема широко- або вузькопроменева. Іноді по периферії флоєми зустрічаються невеликі ділянки склеренхімних волокон. У ксилемі більш тонких коренів переважають провідні і механічні елементи. Серцевинні промені нечисленні.

Судини розташовані безладно, більш великі сконцентровані в центральній частині органу. Ксилема товстих коренів променева або кільчато-променева.

Стебло хвилясто-ребристе, голе або опушене. Клітини епідерми між ребрами містять окремі



Рис. 4. Простий волосок першого типу на епідермі листа.



Рис. 3. Поперечний зріз стебла розторопші плямистої.

пластиди, ребер — часто включення у вигляді жовтих грудок. Продихи з 4-5 (3,6) біляпродиховими клітинами. Тип продихового комплексу — аномоцитний. Опушення незначне, під суцвіттям більш щільне. Волоски прості, дво- або багатоклітинні, з більшості тонкостінних клітин, двох основних типів, відрізняються довжиною, шириною та кількістю клітин, їх формою та розмірами. У ребрах стебла, іноді між ребрами, розташовані тяжі субепідермальної кутової або кутово-пучкової коленхіми. Ендодерма, яка більш або менш помітна, крохмалоносна. Осьовий циліндр перехідного типу. У верхній частині стебла спостерігається зовнішнє кільце з округлих пучків. До флоєми і ксилемі пучків примикають тяжі механічної тканини, над якою збоку флоєми розташовані ланцюжки, невеликі групи або секреторні канали (рис. 3).

Лист. Листкова пластинка має дорсивентральну будову. Клітини верхньої епідерми з поверхні, як правило, прямостінні, у крупних листків мають опуклу зовнішню оболонку. Продихи з 4, рідше 3, 5 біляпродиховими клітинами. Тип продихового апарату — аномоцитний. Опушення незначне, у

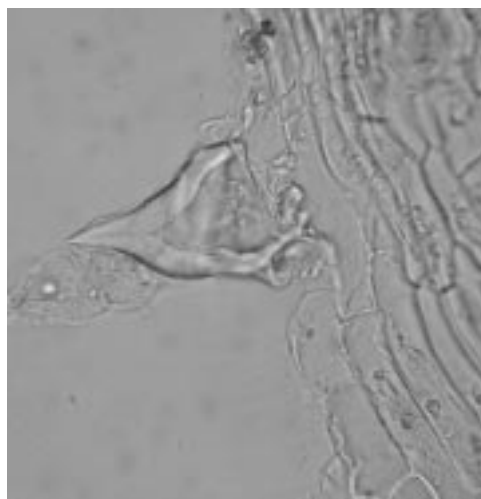


Рис. 5. Дзьобоподібний волосок суцвіття розторопші плямистої.

листіків верхньої частини стебла майже відсутнє або розріджене. Волоски листка за будовою аналогічні волоскам стебла першого типу (рис. 4). У верхніх листків зустрічаються нечисленні волоски другого типу. Іноді в опушенні жилок присутні крупні прості волоски, більшість клітин яких видовжені, часто здавлюються, верхівка, як правило, обломлюється (третій тип).

Клітини нижньої епідерми листків нижньої частини стебла звивисті, верхньої — з незначно хвилястими або зігнутими оболонками. Продихи більш чисельні, деякі з них парнозближені. Опушення рідке, верхні листки менш опушені, характерні волоски першого типу. Вздовж краю листка розташовані колючки та волоски першого, рідше другого типу. Пучки головної жилки мають обкладинку, клітини якої збоку флоєми крупніші і містять крохмаль, під обкладинкою іноді спостерігаються секреторні канали.

Суцвіття. Зовнішні і серединні листочки обгортки знизу жорстко-шкірясті, з більш плівчастим краєм зверху з листковидним, м'яко-шкірястим придатком. Верхівки головної та бічних жилок придатка перетворюються на колючки. Внутрішні листочки шкірясті, з маленьким придатком або звуженим неколючим кінчиком.

Зовнішня епідерма перших рядків листочків обгортки в основі утворена клітинами з окремими пластидами і тонкими або незначно потовщеними оболонками. Клітини епідерми краю товстостінні.

Продихи часті, вздовж краю відсутні. Край і поверхня опушені дзьобоподібними волосками (рис. 5). Внутрішня епідерма нижньої частини листочків обгортки утворена товстостінно-пористими клітинами, з прямими або незначно звивистими оболонками. Клітини епідерми придатку мають потовщені пористі оболонки, можуть містити кристалопоподібні включення; продихи — від розріджених у основі до чисельних у верхівки; в опушенні зустрічаються волоски першого та другого типів.

Листочки обгортки без придатків мають епідерму з прозенхімних товстостінних пористих клітин, у основі — більш коротких. Для зовнішньої поверхні і краю характерне часте опушення дзьобоподібними волосками.

Загальне ложе суцвіття опушене залозистими волосками з багатоклітинною довгою ніжкою і короткою або видовженою голівкою [3, 9, 10].

ВИСНОВКИ

1. Вивчено якісний склад та кількісний вміст вільних та зв'язаних амінокислот у траві та коренях розторопші. Також був визначений кількісний вміст загального білка у сировини, що вивчалася.

2. Вперше проведено ретельне морфолого-анатомічне вивчення трави та коренів розторопші плямистої. Для досліджуваної сировини встановлені загальні анатомічні ознаки.

3. Отримані результати будуть використані при розробці проектів АНД на траву та корені розторопші плямистої.

ЛІТЕРАТУРА

1. Духанина И.В., Айрапетова А.Ю. // *Хим.-фарм. журн.* — 2006. — Т. 40, №2. — С. 22-23.
2. Кисличенко В.С. // *Вестник проблем биологии и медицины.* — 1997. — №18. — С. 153-160.
3. *Фитохимическое исследование по созданию гепатопротекторных лекарственных средств на основе плодов расторопши пятнистой: Автореф. дис. ... канд. фармац. наук / А.В.Волоцьева.* — Пермь: Перм. гос. фармац. акад., 2004. — 25 с.
4. Blumenthal M., Busse W., Goldberg A. *The Complete German Commission E Monographs.* — Boston: Integrative Medical Communications, 1998. — 342 p.
5. Brosnan J., Brosnan M. // *J. Nutr.* — 2006. — Vol. 136 (6 Suppl). — P. 1636-1640.
6. Furst P., Stehle P. // *J. Nutr.* — 2004. — Vol. 134 (6 Suppl). — P. 1558-1565.
7. Hitmore L., Wallace B. // *Eur. Biophys. J.* — 2004. — Vol. 33. — P. 233.
8. Imura K., Okada A. // *J. Nutr.* — 1998. — Vol. 14 (1 Suppl). — P. 143.
9. Schulz V., Hansel R., Tyler V.E. *Rational phytotherapy: A physician's guide to herbal medicine.* — Berlin: Springer-Verlag, 1998. — P. 256.
10. Pepping J. // *Am. J. Health Syst. Pharm.* — 1999. — Vol. 56. — P. 1195.

УДК 615.322:577.112.3:581.8:581.43:582.998

ИЗУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА И АНАТОМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ КОРНЕЙ И ТРАВЫ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ

А.С.Болоховец, И.И.Тернинко, В.С.Кисличенко, В.П.Руденко

Изучен качественный состав и количественное содержание свободных и связанных аминокислот в траве и корнях расторопши. Кроме того, в исследуемом сырье было определено количественное содержание общего белка. Были установлены анатомические диагностические признаки травы и корней расторопши.

UDC 615.322:577.112.3:581.8:581.43:582.998

THE STUDY OF AMINO ACIDIC COMPOSITION AND ANATOMIC STRUCTURE OF MILK THISTLE ROOTS AND HERB

A.S.Bolokhovets, I.I.Terninko, V.S.Kyslychenko, V.P.Rudenko

The qualitative composition and quantitative content of free and fixed amino acids have been studied in roots and herb of Milk Thistle. Besides, the quantitative content of the total protein in the raw material studied has been determined. The anatomic diagnostic features of herb and roots of Milk Thistle have been found.