ФАРМАКОГНОЗИЯ И БОТАНИКА

В.В. Бойник, Х.П. Акритиду

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ТРАВЫ, СЕМЯН И КОРНЕЙ ЛЮПИНА МНОГОЛИСТНОГО

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Целью настоящего исследования было провести сравнительный анализ аминокислотного состава травы, семян и корней люпина многолистного.

Объектами изучения служили трава, семена и корни Lupinus polyphyllus, которые заготавливали на протяжении 2012 – 2013 годов в различных районах Харьковской области. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) изучен качественный аминокислотный состав и определено количественное содержание свободных и связанных аминокислот в исследуемых видах сырья. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что люпин многолистный по содержанию незаменимых аминокислот (57,59–62,64%) значительно превышает другие виды, в которых этот показатель находится в пределах 35–50%. Доказано значительное содержание аминокислот не только в семенах и траве растения, но и в его корнях.

Ключевые слова: люпин многолистный, аминокислоты, алкалоиды, высокоэффективная жидкостная хроматография.

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении столетий люпин использовался как источник протеина и энергии. Семена люпина содержат в % на сухое вещество: белка – 27,8–61,2; жира – 3,7–21,5; экстрактивных веществ – 17,6–38,7; клетчатки – 10,6–18,2; золы – 2,9–4,2 [1, 2].

Аминокислоты – это сырьё для построения всех белков живого организма, без них невозможен его рост и развитие. В состав белков входят 20 различных аминокислот, которые делят на заменимые и незаменимые.

Заменимые аминокислоты могут поступать в организм с белковой пищей или образуются в организме из других аминокислот. К ним относятся: аргинин, глютаминовая кислота, глицин, аспарагиновая кислота, гистидин, серин, цистеин, тирозин, аланин и пролин.

Незаменимые аминокислоты поступают в организм с продуктами питания. К ним относятся: валин, метионин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, лизин, триптофан, треонин.

Характерной особенностью белкового комплекса семян люпина является наличие в нем белков – ингибиторов протеолитических ферментов: протеаз, инвертаз и др. Они имеют наименьшее количество ингибиторов протеиназ по сравнению с другими бобовыми культурами, что характеризует их как более ценное сырье для производства продуктов питания.

Наряду с ценными питательными веществами в семенах и зелёной массе люпина накапливаются алкалоиды. Они принадлежат к группе хинолизидиновых алкалоидов, которые образуют многочисленные производные. Данные алкалоиды синтезируются из лизина или соответствующего амина кадаверина. Суммарное их содержание в различных органах в зависимости от вида составляет: в семенах – до 4%, в цветках – до 2,5%, в листьях – до 1,5%, в корнях они отсутствуют или находятся в виде следов. В различных видах люпина содержатся люпинин, люпанин, спартеин, пахикарпин, гидроксилюпанин, анагирин, ангустифолин и др., среди которых в количественном отношении преобладают люпинин, люпанин и спартеин [3].

С введением в культуру сортов с низким содержанием алкалоидов (0,001 – 0,02%) люпин превратился в ценное пищевое и кормовое растение. При современном

уровне развития технологии переработки люпин является прекрасным сырьём для пищевого белка. Пищевые белки люпина с успехом используются в хлебобулочной, макаронной, кондитерской, колбасной и мясоконсервной промышленности, в производстве диетических и лечебно-профилактических продуктов. Сегодня на основе люпина создается альтернативное питание для лиц, страдающих сахарным диабетом, аллергическими заболеваниями, вегетарианцев и приверженцев здорового питания [4].

Целью данных исследований является сравнительный анализ аминокислотного состава травы, семян и корней люпина многолистного.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами изучения служили трава, семена и корни *L.polyphyllus*, которые заготавливались на протяжении 2012 – 2013 годов в различных районах Харьковской области. Заготовку травы проводили во время цветения, семян – в период плодоношения, корней – во время отмирания надземной части.

Аминокислотный состав исследуемых видов сырья изучали на автоматическом анализаторе ААА 339М (Чехия). Определение и количественное содержание свободных и связанных аминокислот проводили методом ВЭЖХ по известным методикам [5 – 7].

Для определения общего содержания аминокислот навеску сырья массой 0,3 г помещали в пробирку с притертой пробкой, заливали 10 мл воды и 10 мл кислоты хлористоводородной концентрированной. Пробирку плотно укупоривали и помещали в шкаф с температурой 130ºС на 8 часов. Полученный гидролизат фильтровали через фильтр и промывали 3-мя объемами воды.

Для определения связанных аминокислот навеску сырья массой 0,3 г помещали в пробирку с притертой пробкой, заливали 10 мл 80% этилового спирта, нагревали до кипения и экстрагировали в течение 12 часов. Надосадочный спиртовой экстракт аминокислот аккуратно отбирали пипеткой. Пробу заливали 10 мл воды и 10 мл кислоты хлористоводородной концентрированной. Пробирку плотно укупоривали и помещали в шкаф с температурой 130ºС на 8 часов. Полученный гидролизат фильтровали через фильтр и промывали 3-мя объемами воды. Полученные растворы переносили в фарфоровые чашки и выпаривали до 1,0 мл. Затем фильтровали в пробирки на 50 мл и промывали до объёма 35-40 мл. Если pH полученных проб не был равен 2,2 ± 0,02, то его корректировали с помощью 0,1 Н растворов HCl или NaOH до требуемого значения.

Для количественного определения общего содержания аминокислот и содержания связанных аминокислот из подготовленных проб отбирали по 1 мл, добавляли по 1 мл буферного раствора с pH = 2,2. Полученные пробы пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Отбирали 50 мкл очищенных проб и вводили в хроматографическую ионообменную колонку анализатора. Анализ проводили автоматически по заданной программе. Расшифровку полученной хроматограммы и расчёт площади пиков каждой аминокислоты проводили по методу внешнего стандарта.

Концентрацию свободных аминокислот рассчитывали по формуле (1):

$$C = C_1 - C_2, \qquad (1)$$

где C – концентрация свободных аминокислот;

C_1 – концентрация общих аминокислот;

C_2 – концентрация связанных аминокислот.

Непосредственным детектированием под колонкой аминокислоты определить нельзя, поэтому элюент необходимо было смешать с реагентом, чтобы образовался цветной комплекс, который можно детектировать и измерять. Аминокислоты, выходящие из колонки, смешивали с нингидриновым реагентом.

Аминокислота превращается в ближайший низший альдегид с выделением углерода диоксида. Нингидрин и образующийся аммиак соединяются в синий комплекс. При температуре 100ºС время реакции около 4 минут. Смесь нингидрина и аминокислоты в течение этого времени проходит через капиллярный реактор, обогреваемый кипящей водой. Результирующую синюю окраску измеряли с помощью спектрофотометра.

Нингидрин с первичными аминокислотами образует комплекс, имеющий максимум относительной доли поглощенного света при длине волны 570 нм. Комплекс, образованный вторичными аминокислотами, имеет свой максимум относительной доли поглощенного света при длине волны 440 нм. Результат, полученный на спектрофотометре, пропорционален коэффициенту пропускания света.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен сравнительный аминокислотный анализ и определено количественное содержание свободных и связанных аминокислот в траве, семенах и корнях люпина многолистного.

Результаты сравнительного аминокислотного состава различных органов люпина многолистного представлены в таблице.

Установлено наличие в исследуемых видах сырья 15 аминокислот, 8 из которых являются незаменимыми.

В растении преобладали заменимые аминокислоты: аланин и тирозин и незаменимые − лейцин, валин, лизин, изолейцин и фенилаланин.

Лейцин, изолейцин, валин и тирозин стимулируют синтез белка в мышцах, способствуют развитию мышечной массы и уменьшению объёма жировых отложений. Лейцин участвует в восстановлении костей, мышц и кожи, снижает уровень сахара в крови и стимулирует выделение гормона роста. Изолейцин, валин и тирозин снижают вредное воздействие стресса на организм.

Таблица – Сравнительный аминокислотный состав различных органов люпина многолистного

№ п/п	Название аминокислот	Концентрация свободных аминокислот, мкМ/100 г			Концентрация свободных аминокислот, мг/100 мг (вес. %)			Концентрация связанных аминокислот, мкМ/100 г			Концентрация связанных аминокислот, мг/100 мг (вес. %)		
		трава	семена	корни	трава	семена	корни	трава	семена	корни	трава	семена	корни
1	Аспарагиновая кислота	0,08	1,2	0,45	0,01	0,16	0,06	0,53	0,75	0,3	0,07	0,1	0,04
2	Треонин	008	0,42	0,17	0,01	0,05	0,02	1,85	3,02	0,92	0,22	0,36	0,11
3	Серин	0,29	1,05	0,38	0,03	0,11	0,04	2	2,57	1,71	0,21	0,27	0,18
4	Цистин	0,67	2,67	1	0,04	0,16	0,06	9,5	16	7,33	0,57	0,96	0,44
5	Глицин	0,27	0,4	0,13	0,02	0,03	0,01	4,79	6,79	3,6	0,36	0,51	0,27
6	Аланин	1,23	3,7	1,8	0,11	0,33	0,16	16,84	47,92	17,62	1,5	4,27	1,57
7	Валин	0,34	1,37	0,68	0,04	0,16	0,08	4,1	5,73	3,42	0,48	0,67	0,4
8	Метионин	0,27	1,07	0,4	0,04	0,16	0,06	1,94	2,75	1,47	0,29	0,41	0,22
9	Изолейцин	0,46	1,22	0,46	0,06	0,16	0,06	2,59	3,89	2,21	0,34	0,51	0,29
10	Лейцин	0,99	3,28	1,22	0,13	0,43	0,16	22,33	39,1	17	2,93	5,13	2,23
11	Тирозин	0,06	0,17	0,06	0,01	0,03	0,01	14,79	19,81	7,78	2,68	3,59	1,41
12	Фенилаланин	0,42	1,63	0,61	0,07	0,27	0,1	16,83	19,43	7,2	2,78	3,21	1,19
13	Гистидин	0,13	0,9	0,45	0,02	0,14	0,07	11,86	13,79	5,41	1,84	2,14	0,84
14	Лизин	0,27	0,75	0,41	0,04	0,11	0,06	19,9	31,46	12,24	2,91	4,6	1,79
15	Аргинин	0,33	1,29	0,48	0,07	0,27	0,1	9,9	10,1	3,05	2,08	2,12	0,64
∑	5,89	21,12	8,7	0,7	2,57	1,05	139,75	223,11	91,26	19,26	28,85	11,62	

Содержание свободных и связанных аминокислот составило (вес, %): в семенах 2,57 и 28,85; в траве 0,7 и 19,26; в корнях 1,05 и 11,62, соответственно.

По содержанию незаменимых аминокислот (57,59 – 62,64%) люпин многолистный значительно превышает другие виды люпина, где этот показатель находится в пределах 35 – 50%.

Достаточно хорошо изучен аминокислотный состав семян и зеленой массы люпина, а аминокислотный состав корней изучен впервые. Полученные данные показывают значительное содержание аминокислот не только в семенах и траве растения, но и в его корнях. По количеству незаменимых аминокислот корни, хотя и незначительно, превосходят надземную часть растения. Поэтому они могут быть дополнительным источником белка и дру-

гих биологически активных веществ, так как имеют ряд преимуществ, а именно значительную фитомассу и отсутствие алкалоидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведено сравнительное изучение аминокислотного состава и определено количественное содержание аминокислот в траве, семенах и корнях люпина многолистного.

Установлено наличие 15 аминокислот, 8 из которых являются незаменимыми.

Определено содержание свободных и связанных аминокислот (вес, %): в семенах 2,57 и 28,85; в траве 0,7 и 19,26; в корнях 1,05 и 11,62, соответственно.

По содержанию незаменимых аминокислот (57,59 – 62,64%) люпин многолистный значительно превышает другие виды люпина, где этот показатель находится в пределах 35 – 50%.

Доказано значительное содержание аминокислот не только в семенах и траве растения, но и в его корнях.

Данные исследования свидетельствуют о том, что люпин многолистный – перспективный источник белка и других биологически активных веществ для создания продуктов питания и лечебно-профилактических средств различной направленности фармакологического действия.

SUMMARY

V.V. Boynik, Ch.P. Akritidou

COMPARATIVE ANALYSIS OF AMINO ACID COMPOSITION OF HERB, SEEDS AND ROOTS OF LUPINE MULTILEAFED

In the article the comparative analysis of amino acid composition of herb, seeds and roots of lupine multileafed is considered. The objects of the study were herb, seeds and roots of *Lupinus polyphyllus*, which were gathered during 2012 – 2013 years in various parts of Kharkov region. There has been made the comparative analysis of free and bonded amino acids by HPLC in different herbal samples. There has been established 15 amino acids, 8 of which belong to essential. In quantitative terms dominate nonessential amino acids alanine, tyrosine and essential - leucine, valine, lysine, isoleucine and phenylalanine. Experimental evidence suggests that the lupine multileafed content of essential amino acids (57,59 – 62,64%) is significantly higher than other, where this ratio is in the range of 35 – 50%. It has been proven the substantial content of amino acid not only in seeds and the herb of plant but also in its roots.

Keywords: Lupine multileafed (*Lupinus polyphyllus*), amino acids, alkaloids, high-performance liquid chromatography.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антипова, Л.В. Люпин – источник полноценных белков для мясной промышленности / Л.В. Антипова, Ж.И. Богатырева // Фундаментальные исследования. - 2008. – № 6 – С. 132–133.

2. Перспективы использования белков из семян люпина узколистного / В.Н. Красильников [и др.] / Пищевая промышленность. – 2010. – №2. – С. 40–43.

3. Lupin alkaloids from Lupinus polyphyllus / G. Veena [et al.] // Phytochemistry. – 1992. – Vol. 31. № 12. – P. 4343–4345.

4. Пащенко, Л.П. Перспективы применения люпина в технологии продуктов питания / Л.П. Пащенко, И.П. Черных, В.Л. Пащенко / Фундаментальные исследования. – 2006. – № 6. – С. 101–102.

5. High-performance liquid chromatography of phenylthiocarbamyl-amino acids. Application to carboxyl-terminal sequencing of proteins / G. Gimenez-Gallego, K.A. Thomas // J. Chromatogr. – 1987. – № 409**.** – P**.** 299 – 304.

6. Ebert, R.F. Amino acids analysis by HPLC: optimized conditions for chromatography of phenylthiocarbamyl derivatives / R.F. Ebert // Analytical Biochemistry. – 1986. – № 154. – P. 431–435.

7. High-performance liquid chromatography of phenylthiocarbamyl derivatives of amino acids and side-chain derivatived amino acids / M.M.T. O'Hare [et al.] // J.Chromatogr. 1987. – №389. – P. 379–388.

***Адрес для корреспонденции**:*

61168, Украина,
г. Харьков, ул. Блюхера, 4,
Национальный фармацевтический университет,
e-mail: josya2005@mail.ru,
Бойник В.В.

Поступила 26.11.2013 г.