

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

УДК 615.322:582.272.74:577.112.3:577.115.3

АМІНО- ТА ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД FUCUS VESICULOSUS L.

Х.М.Канаан, О.В.Криворучко, Х.Я.Маклауф

Ліванський університет
Національний фармацевтичний університет

Вивчено якісний і кількісний амінокислотний та білковий склад сланів *Fucus vesiculosus* і полісахаридного комплексу, отриманого з цього виду сировини. Визначено жирнокислотний склад водорості. В досліджуваних зразках виявлено 15 амінокислот (9 з яких є незамінними) та 9 жирних кислот.

Водорості є досить численною фотосинтезуючою групою нижчих рослин (до 30000 видів). У світовому океані щорічно продукується понад 550 мільярдів тонн сировини водоростей і трав [4]. Фукус пухирчастий (*Fucus vesiculosus*, Fucaceae) — позповсюджена бура морська водорість, яка містить вуглеводи, ліпіди, білкові речовини, поліфеноли, вітаміни, каротиноїди, хлорофіли, мінеральні речовини та інші сполуки. Найбільший інтерес становлять полісахариди фукусу (альгінова кислота, фукоїдани і фукани). Альгінова кислота складає до 40% від маси сухої речовини. Це лінійний глікан, який складається із залишків β -D-мануранової та L-гулуранової кислот, з'єднаних 1→4 зв'язком. Завдяки наявності гідроксильних та карбоксильних груп альгінова кислота здатна утворювати велику кількість похідних — солей, ефірів, амідів тощо. Можна виділити три основні напрямки використання альгінової кислоти та її похідних: 1) у якості допоміжних матеріалів для виробництва твердих і м'яких лікарських форм (таблеток, драже, капсул, мазей, паст, емульсій, кремів та інше); 2) у якості гемостатичних препаратів, які розсмоктуються безпосередньо у тканинах організму (у вигляді марлі, вати, порошку); 3) як лікарські засоби різноманітної направленості дії. Похідні альгінової кислоти виводять радіонукліди з організму, стимулюють реакції імунітету, мають протипухлинну, антимікробну, протизапальну і спазмолітичну активність [4, 7, 14].

Фукоїдани у водоростях виявляють, в основному, за вмістом у гідролізатах L-фукози, яка є головним моносахаридом сульфатованих полісахаридів. Вони містяться у великій кількості у фукусових водоростях і мають антибактеріальну,

імуномодулюючу, антитромботичну, антикоагулянтну і фібринолітичну активність. Деякі препарати фукоїдану (з *Laminaria religiosa*, *Sargassum linifolium* тощо) за антикоагулянтною активністю не поступаються або перевищують гепарин [3, 4, 12, 16]. Заслужують на увагу дослідження, які стосуються противірусних і протипухлинних властивостей фукоїданів, виділених з *Fucus vesiculosus*, *Sargassum fulvellum*, *Laminaria angustata* та інших бурих водоростей. Додаткове сульфатування фукоїдану з *Sargassum kjellmanianum* приводить до посилення його протипухлинної активності [4, 15]. Фукоїдани як природні поліелектроліти мають високий ступінь спорідненості з двовалентними катіонами важких металів. Ця властивість знайшла своє відображення в дослідженнях, які стосуються проблеми виведення свинцю з організму [4]. Низькомолекулярні полісахариди фукани, виділені з фукусових водоростей, мають протизапальну, антикоагулянтну, антитромботичну, протипухлинну та антипроліферативну активність [11, 17, 18].

Полісахариди і поліфеноли *Fucus vesiculosus* активні у відношенні вірусу СНІДу [8]. Поліненасичені жирні кислоти омега-3-типу мають протипухлинну активність. Насичення організму такими кислотами нормалізує ліпідний обмін та перешкоджає розвитку атеросклерозу судин [9, 10].

На основі біологічно активних сполук зі сланів *Fucus vesiculosus* створено засіб для профілактики раку "Фукус", біологічно активні харчові добавки з різними показаннями до застосування, а також добавки до парфумерно-косметичних виробів [4, 5].

Значна сировинна база вивчаємої водорості, вміст речовин, які мають різносторонню фармакологічну активність, стали підставою для подальшого вивчення фукусу пухирчастого.

Метою даної роботи є визначення аміно- та жирнокислотного складу сланів *Fucus vesiculosus*, отримання з цього виду сировини полісахаридного комплексу (ПСК) і подальше його вивчення.

Експериментальна частина

Для вивчення білково-амінокислотного складу було вибрано два зразки — слані фукусу пухирчастого і полісахаридний комплекс, отриманий

Таблиця 1

Вміст амінокислот у сланях фукусу пухирчастого та у полісахаридному комплексі (ПСК), отриманому з цього виду сировини

Речовина	Загальна формула	Rf БОВ (4:1:2)	Вміст, % на суху вагу	
			слані фукусу пухирчастого	ПСК
Аспарагінова кислота	$C_4H_7O_4N$	0,16	1,334	0,614
Треонін	$C_4H_9O_3N$	0,18	0,613	0,063
Серин	$C_3H_7O_3N$	0,15	0,909	0,075
Глутамінова кислота	$C_5H_9O_4N$	0,17	1,500	0,498
Гліцин	$C_2H_5O_2N$	0,21	0,493	0,116
Аланін	$C_3H_7O_2N$	0,20	0,764	0,185
Валін	$C_5H_{11}O_2N$	0,43	0,709	0,201
Метіонін	$C_5H_{11}O_2NS$	0,39	0,123	0,025
Ізолейцин	$C_6H_{13}O_2N$	0,72	0,701	0,092
Лейцин	$C_6H_{13}O_2N$	0,64	0,881	0,237
Тирозин	$C_9H_{11}O_3N$	—	0,401	0,096
Фенілаланін	$C_9H_{11}O_2N$	0,32	0,475	0,124
Гістидин	$C_6H_9O_2N_3$	0,10	0,174	0,106
Лізин	$C_6H_{14}O_2N_2$	0,05	0,496	0,141
Аргінін	$C_6H_{14}O_2N_4$	0,04	0,350	0,223

відомими методами [2] з цього виду сировини. Визначення жирнокислотного складу проводили у сланях фукусу. Сировину заготовлювали у серпні 2002 року у прибережній смузі Середземного моря біля населеного пункту Ель-Барбара (Ліван) (умови: довгота — $35^{\circ}39,413'$; широта — $34^{\circ}15,090'$; t повітря $+24,3^{\circ}C$; t води $+22,5^{\circ}C$; рН — 7,45; PO_4^{3-} — 1,75 мг/л; NO_3^- — 0,40 мг/л; NH_4^+ — 2,60 мг/л). У значній кількості фукус пухирчастий також скупчується біля населених пунктів: Анфа, Кафар Абід, Жесер, Ель-Маджун, Ель-Мунсеф, Ель-Хельуа та Амшит.

Слані фукусу пухирчастого ідентифікували згідно з вимогами Європейської фармакопеї [13].

Для виявлення амінокислот близько 10 г (точну наважку) сировини, заздалегідь подрібненої до розміру часток 0,5 мм, екстрагували 70% етиловим спиртом порціями по 100 мл 3 рази на киплячому водяному огрівнику. Спирт відганяли до залишку 15-20 мл, кількісно переносили в ділительну лійку і обробляли хлороформом 3 рази по 50 мл. Очищену витяжку нагрівали до видалення слідів хлороформу, переносили в мірну колбу місткістю 25 мл і доводили об'єм до мітки 70% етиловим спиртом.

Для очищення екстракт пропускали крізь іонообмінник. Для цього 10 г катіоніту КУ-2 обробляли 200 мл 1 N розчину хлористоводневої кислоти, після чого осад на фільтрі відмивали від кислоти водою до нейтральної реакції і вміщували на колонку (довжина — 20-25 см, діаметр — 1,5-2 см). До 10 мл екстракту додавали 40 мл води і пропус-

кали крізь колонку зі швидкістю 1 мл/хв. Колонку промивали 50 мл 6 N розчину аміаку та 20 мл води. Розчин амінокислот упарювали на водяному огрівнику до сухого залишку. Залишок розчиняли при нагріванні у 50% етиловому спирті. Очищений екстракт (0,05 мл) наносили на хроматографічний папір Filtrak FN-3 і вміщували в систему розчинників: н-бутанол-оцтова кислота-вода (БОВ — 4:1:2). Після висушування хроматограму проявляли 0,2% розчином нінгідрину в ацетоні з подальшим нагріванням. Амінокислоти ідентифікували за забарвленням плям і визначенням їх Rf.

Кількісний вміст амінокислот у досліджуваних зразках визначали за допомогою амінокислотного аналізатора LKB 4151 "Альфа Плюс" (Швеція) на колонці, заповненій катіонообмінною смолою "Ultgorac 8" у відповідності до інструкції.

Для проведення дослідження зразки попередньо витримували у сушарці при температурі $100^{\circ}C$ протягом 2-3 годин. Потім близько 0,1 г (точну наважку) повітряно сухої сировини вносили в ампулу (скло Пірекс), заливали 200-кратним надлишком 6 N розчину хлористоводневої кислоти, відкачували повітря, запаювали, вміщували в термостат на 20 годин при температурі $80^{\circ}C$ і гідролізували. Після цього ампулу розкривали, надлишок хлористоводневої кислоти відганяли при температурі $100^{\circ}C$ і подальшу нейтралізацію проб проводили в ексікаторі над гідроксидом натрію протягом 2-х діб. Пробу розбавляли 10 мл цитратного буферного розчину з рН 2,2, перемішували і відфільтровували. Фільтрат вносили в колонку,

Таблиця 2

Вміст жирних кислот у сланях
фукусу пухирчастого

Назва кислоти	Загальна формула	Вміст, % від суми
Лауролейнова	C _{12:1}	2,23
Міристинова	C _{14:0}	9,13
Пальмітинова	C _{16:0}	23,65
Олейнова	C _{18:1}	21,72
Лінолева	C _{18:2}	8,29
α-Ліноленова	C _{18:3}	14,58
Октадекатетраєнова	C _{18:4}	6,11
11-Ейкозенова	C _{20:1}	8,09
11,14-Ейкозадієнова	C _{20:2}	6,20

заповнену іонообмінною смолою, і крізь колонку за допомогою насоса пропускали цитратні буферні розчини з різними значеннями рН і різною іонною силою, що сприяло розділенню амінокислот. Елюат, який виходив із колонки, змішувався з нінгідриним реагентом у реакторі при температурі 135°C. У реакторі проходила реакція між нінгідрином і амінокислотами з утворенням кольорових сполук. Кількість утворених кольорових сполук прямо пропорційна кількості амінокислоти в елюаті. Потім суміш надходила до фотометра, де вимірювалась інтенсивність поглинання кольорової сполуки. УФ-спектр поглинання отримували при довжині хвилі 570 нм. Вихідний сигнал фотометра надходив на двоканальний самописець, який реєстрував концентрації амінокислот на діаграмі у вигляді серії піків. Час утримання піку, який визначали за діаграмою, характеризує кожну індивідуальну амінокислоту. Площа піку відповідає кількості присутньої амінокислоти. Електричний сигнал самописця також поступав на інтегратор, який автоматично вираховував площу кожного піку. Для калібровки амінокислотного аналізатора крізь катіоніт пропускали стандартну суміш амінокислот.

Вміст загального білка у сланях фукусу пухирчастого та ПСК визначали методом К'ельдаля [1].

Для виявлення жирних кислот близько 1,2 г (точна наважка) сировини, заздалегідь подрібненої до розміру часток 0,5 мм, екстрагували сумішшю метанол-хлороформ порціями по 10 мл 3 рази протягом 3 год. Об'єднаний екстракт відфільтровували крізь паперовий фільтр з 1 г сульфату натрію в попередньо зважену колбу. Екстракт випарювали при температурі 60°C у струмі азоту (залишок приблизно 40 мг). До залишку додавали 1 мл діетилового ефіру, 5 мл метанолу і 0,2 мл ацетилхлориду. Суміш нагрівали на гліцериновому огрівнику зі зворотним холодильником при температурі 70°C в атмосфері азоту протягом 45 хв.

Потім розчин випарювали до об'єму біля 0,3 мл, добавляли 2 мл циклогексану і збовтували протягом 1 хв. Верхній циклогексановий шар відбирали, відфільтровували крізь фільтр з 0,2 г сульфату натрію. Отриманий розчин хроматографували на хроматографі Shimadzu GC-14B, FID за наступних умов: колонка капілярна (розмір 0,32 мм · 60 м HP-23; 0,25 мкм); температура колонки — 175°C; процес тривав протягом 2 хв, потім температура підвищувалась до 225°C зі швидкістю 3° С/хв; температура інжектора — 240°C, температура детектора — 250°C; швидкість газу-носія (азоту) — 1,0 мл/хв, розподіл потоку — 1:60. Вміст кожної жирної кислоти вираховували методом "внутрішнього нормування".

Результати та їх обговорення

Проведені дослідження свідчать про те, що слані фукусу пухирчастого відповідають вимогам Європейської фармакопеї.

За допомогою паперової хроматографії та амінокислотного аналізатора LKB 4151 Альфа Плюс (Швеція) у сланях фукусу пухирчастого та ПСК, отриманого з цього виду сировини, було виявлено 15 амінокислот (аспарагінова кислота, треонін, серин, глутамінова кислота, гліцин, аланін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, тирозин, фенілаланін, гістидин, лізин, аргінін), у тому числі 9 незамінних (треонін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, фенілаланін, гістидин, лізин і аргінін). Вміст амінокислот у досліджуваних зразках наведено у табл. 1. У сланях водорості у значній кількості містяться глутамінова, аспарагінова кислоти, серин і лейцин, в ПСК — аспарагінова і глутамінова кислоти.

Вміст білка у сланях фукусу складає 11,32% (на суху вагу), в ПСК — 1,79%.

У сланях фукусу за допомогою хроматографа Shimadzu GC-14B, FID виявлено 9 жирних кислот (лауролейнова, міристинова, пальмітинова, олейнова, лінолева, α-ліноленова, (?)-октадекатетраєнова, 11-ейкозенова, 11,14-ейкозадієнова). Як видно з табл. 2, в кількісному відношенні серед насичених жирних кислот у сировині переважає пальмітинова, а серед ненасичених — олейнова і α-ліноленова кислоти.

ВИСНОВКИ

1. Слані фукусу пухирчастого є перспективною сировиною для подальшого вивчення та створення на їх основі різних харчових добавок, фармакологічних і парфумерно-косметичних засобів.

2. Вивчено якісний і кількісний амінокислотний склад сланів фукусу пухирчастого та ПСК, отриманого з цього виду сировини. У зразках виявлено 15 амінокислот, у тому числі 9 незамінних.

3. Встановлено вміст білка у сланях фукусу і ПСК, який складає 11,32% (на суху вагу) та 1,79% відповідно.

4. Визначено жирнокислотний склад водорості. У сланях фукусу виявлено 9 жирних кислот.

ЛІТЕРАТУРА

1. Василенко И.И., Комаров В.И. Оценка качества зерна: Справочник. — М.: Агропромиздат, 1987. — 208 с.
2. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1989. — 400 с.
3. Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н., Лоенко Ю.Н. // Антибиот. химиотер. — 1995. — Т. 40, №2. — С. 9-13.
4. Лоенко Ю.Н., Лямкин Г.П., Артюков А.А. и др. // Растит. ресурсы. — 1991. — Т. 27, Вып. 1. — С. 150-160.
5. Пат. 2116798 (РФ). — Заявл.: 25.10.95, №95118321. Оpubл. в Б.И. — 1998. — №22.
6. Черонис Н.Д., Ма Т.С. Микро- и полумикрометоды органического анализа / Под ред. В.А.Климова. — М.: Химия, 1973. — 576 с.
7. Ясницкий Б.Г., Безуглая Л.П., Дольберг Е.Б. // Фармация. — 1979. — Т. 28, №6. — С. 58-62.
8. Beress A., Wassermann O., Bruhn T. et al. // J. Nat. Prod. — 1993. — Vol. 56. — P. 478-488.
9. Carpentier Y.A. // Rev. Med. Brux. — 1997. — Vol. 18. — P. 32-36.
10. Cave W.T. // Nutrition. — 1996. — Vol. 12 (1 Suppl). — P. 39-42.
11. Charreau B., Blondin C., Boisson-Vidal C. et al. // Transplant. Proc. — 1997. — Vol. 29. — P. 889-890.
12. Durig J., Bruhn T., Zurborn K.H. et al. // Thromb. Res. — 1997. — Vol. 85. — P. 479-491.
13. European Pharmacopoeia 2002. — 4th Ed. — Strasbourg, 2001. — 2416 p.
14. Fujihara M., Nagumo T. // Carbohydr. Res. — 1993. — Vol. 243. — P. 211-216.
15. Itoh H., Noda H., Amano H. et al. // Anticancer. Res. — 1995. — Vol. 15. — P. 1943-1947.
16. Mauray S., Sternberg C., Theveniaux J. et al. // Thromb. Haemost. — 1995. — Vol. 74. — P. 1280-1285.
17. Nishino T., Nagumo T. // Carbohydr. Res. — 1992. — Vol. 229. — P. 355-362.
18. Riou D., Collic-Jouault S., Pinczon-du-Sel D. et al. // Anticancer. Res. — 1996. — Vol. 16. — P. 1213-1218.

УДК 615.322:582.272.74:577.112.3:577.115.3

АМИНО- И ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ FUCUS VESICULOSUS L.

Х.М.Канаан, Е.В.Криворучко, Х.Я.Маклауф

Изучен качественный и количественный аминокислотный и белковый состав слоевищ *Fucus vesiculosus* и полисахаридного комплекса, полученного из этого вида сырья. Определен жирнокислотный состав водорослей. В исследуемых образцах обнаружено 15 аминокислот (9 из которых являются незаменимыми) и 9 жирных кислот.

UDC 615.322:582.272.74:577.112.3:577.115.3

AMINO- AND FATTY ACIDS COMPOSITION OF FUCUS VESICULOSUS L.

Kh.M.Kanaan, O.V.Krivoruchko, Kh.Ya.Mclouf

Qualitative and quantitative determinations of amino acids and proteins of raw material and polysaccharide complex of *Fucus vesiculosus* have been carried out. 15 amino acids have been found in polysaccharide complex and raw materials of *Fucus vesiculosus*; 9 of them are essential amino acids.