

Аминокислотный состав надземной части *Geranium pratense* L., *Geranium sylvaticum* L., *Geranium palustre* L.

© Разаренова⁺ Ксения Николаевна, Захарова Анна Михайловна,
Протасова Инна Дмитриевна и Жохова* Елена Владимировна

Кафедра фармакогнозии. Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия. Ул. проф. Попова, 14. г. Санкт-Петербург, 197376. Россия.

Тел.: (812) 234-43-62. E-mail: ksundrik_kot@mail.ru

ООО «Аналит Продактс». Большой пр. В.О., 31. г. Санкт-Петербург, 199004. Россия.

Тел.: (812) 325-55-02. E-mail: za@analit-spb.ru

*Ведущий направление; ⁺Поддерживающий переписку

Ключевые слова: аминокислоты, ВЭЖХ, *Geranium pratense*, *Geranium sylvaticum*, *Geranium palustre*, фенилизотиоцианат.

Аннотация

Методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием предварительной модификации аминокислот раствором фенилизотиоцианата в изопропиловом спирте исследован аминокислотный состав сырья *G. pratense*, *G. sylvaticum*, *G. palustre*.

Введение

Род герань (*Geranium* L.) насчитывает около 400 видов, распространенных по всему миру [1]. На территории России и сопредельных государств СНГ произрастает порядка 70 видов рода герань [11]. Почти повсеместно в России произрастают герань луговая – *Geranium pratense* L. и герань лесная – *Geranium sylvaticum* L. На Северо-Западе России помимо *G. pratense* и *G. sylvaticum* часто встречаемый вид – герань болотная – *Geranium palustre* L. [4].

Указанные виды находят применение в народной медицине в качестве вяжущих, гемостатических, противовоспалительных и антимикробных средств при болезнях пищеварительной системы (диарея, гастриты, колиты, энтероколиты), при воспалительных заболеваниях ротовой полости, кровотечениях различного генеза, при подагре, ревматизме [9].

В надземной части данных видов обнаружены фенольные соединения (дубильные вещества, флавоноиды, фенольные кислоты), углеводы, витамины, органические кислоты [9].

Актуальной задачей современной фармацевтической науки является поиск растительных источников биологически активных веществ для создания на их основе препаратов различного фармакологического действия. Указанные представители рода герань являются перспективными объектами для введения в фармацевтическую практику ввиду богатства химического состава, широкого спектра биологической активности и достаточной ресурсоведческой базы.

Аминокислоты, являясь частью сложного комплекса биологически активных соединений в растении, самостоятельно оказывают фармакологический эффект, а также способствуют синтезу, усвоению и потенцированию действия других растительных компонентов [2].

Среди указанных представителей рода *Geranium* аминокислотный состав был изучен ранее только у *G. pratense*. В надземной части *G. pratense*, заготовленной в республике Башкортостан, было идентифицировано 20 аминокислот и определено их количественное содержание [7]. Литературные данные по аминокислотному составу *G. sylvaticum* и *G. palustre* отсутствуют.

Целью данной работы является исследование аминокислотного состава надземной части *G. pratense*, *G. sylvaticum*, *G. palustre*.

Наибольшее распространение для разделения и количественного определения аминокислот получил метод жидкостной хроматографии [3]. Отсутствие хромофорных групп в

Полная исследовательская публикация Разаренова К.Н., Захарова А.М., Протасова И.Д. и Жохова Е.В. Большинство молекул аминокислот требует стадии дериватизации для их определения при использовании оптических детекторов. Нами был использован фенилизотиоцианат в качестве дериватирующего агента. Получение предколонных дериватов аминокислот с фенилизотиоцианатом (ФИТЦ) имеет ряд преимуществ перед другими производными: в реакцию вступают все важнейшие аминокислоты; реакция проходит количественно и за короткое время с получением стабильных производных; побочные продукты, мешающие определению фенилтиокарбаматных производных аминокислот, не образуются.

Экспериментальная часть

Объектами исследования служили образцы сырья *G. pratense*, *G. sylvaticum*, *G. palustre*, заготовленные в фазу цветения-начала плодоношения в июле-августе 2011 года в Ленинградской области. Надземная часть *G. pratense* и *G. palustre* была собрана в п. Пудость Гатчинского района. Сырье *G. sylvaticum* было заготовлено в окрестностях п. Стекланный Всеволожского района. При заготовке осуществляли сбор как розеточных вегетативных побегов (срезали листья с остатком черешка не длиннее 3 см), так и полурозеточных генеративных побегов (срезали облиственные верхушки побегов длиной до 20-25 см) [8].

Сушку осуществляли воздушно-теневым способом, разложив сырье тонким слоем и периодически перемешивая.

Для исследования хроматографическими методами из высушенного измельченного до размера частиц 2 мм сырья *G. pratense*, *G. sylvaticum*, *G. palustre* были получены сухие извлечения на спирте этиловом 40%. Извлечения готовили методом 3-кратной мацерации при соотношении сырья и экстрагента 1:10 в режиме нагревания на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 1 часа.

Объединенные отфильтрованные через бумажный фильтр экстракты концентрировали с использованием роторно-пленочного испарителя до густого остатка, а затем сушили над безводным кальция хлоридом при пониженном давлении и температуре 50-60 °С. Полученный сухой остаток измельчали до получения сыпучего порошка коричневого, зеленовато-коричневого или темно-желтого цвета.

Предварительное обнаружение аминокислот проводили методом восходящей одномерной бумажной хроматографии (БХ) в системе растворителей *n*-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (4:1:2) с использованием приема двойного разгона растворителей. Проявитель – раствор нингидрина в ацетоне 2% [10].

Перед нанесением на хроматографическую бумагу около 0.5 г сухого извлечения, полученного вышеописанным способом, растворяли в 2 мл спирта этилового 40%. Полученный раствор наносили на линию старта в количестве 10 мкл и хроматографировали в вышеописанных условиях.

Качественный и количественный состав аминокислот устанавливали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Анализ дериватов аминокислот и триптофана проводили на жидкостном хроматографе *LC-20 Prominence* производства фирмы *Shimadzu* со спектрофотометрическим детектором (254 нм); колонка с обращенной неподвижной фазой C18 (*Supelco* 250x4.6 мм, 5 мкм, производства фирмы *Supelco*) и соответствующей предколонкой; подвижная фаза – смесь раствора натрия ацетата 0.06 моль/л, pH = 5.5 (компонент А), раствор спирта изопропилового 1% в ацетонитриле (компонент В) и раствор натрия ацетата 0.06 моль/л, pH = 4.05 (компонент С). Хроматографический анализ проводили в режиме градиентного элюирования. Скорость потока подвижной фазы – 1.2 мл/мин [6].

Использовали стандартные образцы следующих аминокислот (Sigma): аспарагин (асп), глутамин (глу), гидроксипролин (о-про), серин (сер), глицин (гли), гистидин (гис), аргинин (арг), треонин (тре), аланин (ала), пролин (про), тирозин (тир), валин (вал), лизин (лиз), изолейцин (илей), лейцин (лей), фенилаланин (фен), метионин (мет), цистин (цис), цистеин (цис-цис), триптофан (три), а также фенилизотиоцианат (*Fluka*), ацетонитрил (о.с.ч., *Криохром*), изопропиловый спирт (о.с.ч.), ацетат натрия (х.ч.), соляная кислота (х.ч.), гидроксид натрия (о.с.ч.).

Для построения градуировочной зависимости навески стандартных образцов растворяли в растворе кислоты хлористоводородной 1 моль/л. Аликвоты стандартного раствора 5, 10, и 15 мкл помещали в три пробирки.

Для удаления кислоты хлористоводородной аликвоты высушивали досуха на водяной бане при температуре 60 °С в токе воздуха. К высушенным аминокислотам добавляли 0.10 мл раствора натрия гидроксида 0.15 моль/л, перемешивали, а затем добавляли 0.35 мл раствора фенилизотиоцианата в изопропиловом спирте и 0.05 мл бидистиллированной воды.

Раствор оставляли на 20 мин при комнатной температуре, после чего высушивали досуха при температуре 60 °С. Сухой остаток растворяли в 1 мл бидистиллированной воды. Полученные растворы подвергали хроматографическому анализу (рис. 1).

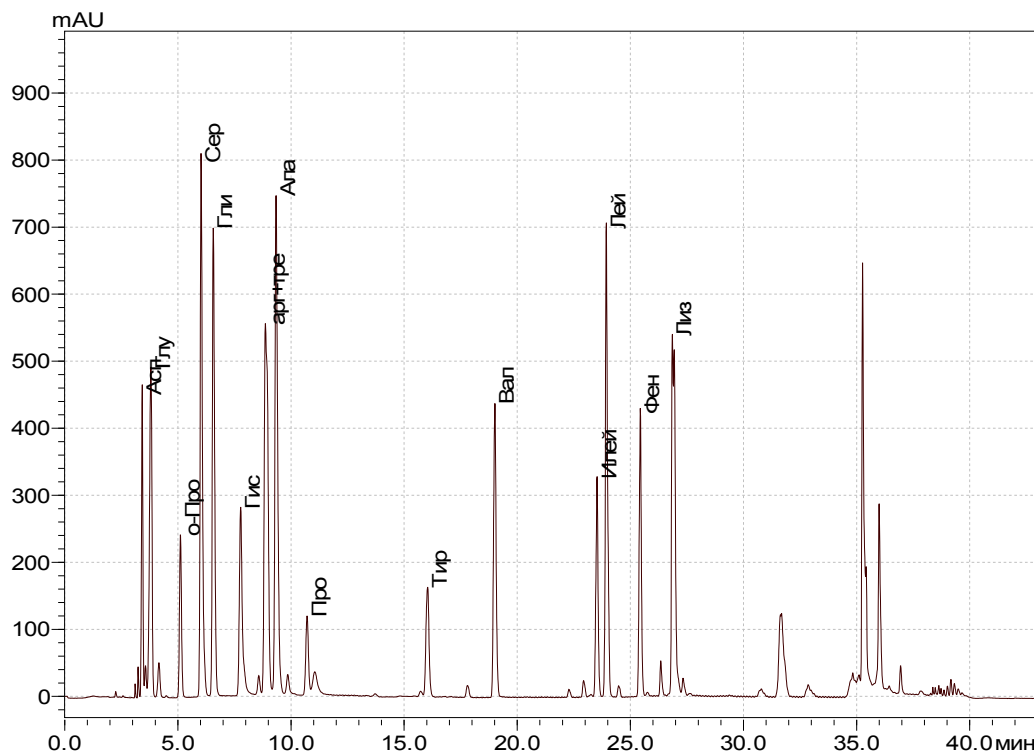


Рис. 1. Хроматограмма стандартной смеси аминокислот после дериватизации ФИТЦ. Прибор: Shimadzu LC-20 AD Prominence, детектор диодная матрица. Колонка: Supelco Discovery™ LC-18, 4.6x250мм, 5 мкм. Элюент: ацетатный буфер – смесь ацетонитрила с изопропиловым спиртом, режим градиентного элюирования, λ : 254 нм.

Для анализа образцов на общий состав аминокислот методом ВЭЖХ точную навеску сухого извлечения (~100 мг) растворяли в 5 мл спирта этилового 40% и выдерживали в ультразвуковой ванне 10 минут. Отбирали аликвоты (0.1-0.2 мл) и помещали их в пробирку. Высушивали досуха на водяной бане при температуре 60 °С в токе воздуха аналогично стандартным растворам. К высушенным аликвотам добавляли 0.10 мл раствора натрия гидроксида 0.15 моль/л, перемешивали.

Затем прибавляли 0.35 мл раствора фенилизотиоцианата в изопропиловом спирте и 0.05 мл бидистиллированной воды. Раствор вновь тщательно перемешивали и оставляли на 20 мин при комнатной температуре, после чего высушивали досуха при температуре 65 °С. Сухой остаток растворяли в 1 мл бидистиллированной воды.

Полученные растворы подвергали хроматографическому анализу. Все аминокислоты, кроме триптофана и суммы цистин-цистеин определяли описанным способом.

Определение триптофана проводили без дериватизации фенилизотиоцианатом путем хроматографического анализа приготовленного ранее раствора навески сухого извлечения в спирте этиловом 40%.

Для определения суммы цистеина и цистина, пробу предварительно окисляли надмуравьиной кислотой, затем определяли цистеиновую кислоту в виде фенилтиокарбаматного производного. Для получения надмуравьиной кислоты, в пробирке вместимостью 10 см³ смешивали одну часть пероксида водорода и 9 частей муравьиной кислоты, тщательно перемешивали.

Навеску сухого извлечения помещали в выпарительную чашку, добавляли 5 см³ окислительной смеси и полностью высушивали на водяной бане при температуре 60 °С, периодически помешивая. Сухой остаток растворяли в 5 мл спирта этилового 40%. Аликвоту полученного раствора переносили в пробирку.

Проводили дериватизацию фенилизотиоцианатом, отфильтровывали и образец вводили в хроматографическую колонку.

Результаты и их обсуждение

В результате предварительного исследования сухих извлечений из сырья *G. pratense*, *G. sylvaticum*, *G. palustre* методом БХ после проявления раствором нингидрина в ацетоне 2% на хроматограммах в видимом свете были обнаружены пятна с характерным фиолетовым, крас-

Полная исследовательская публикация Разаренова К.Н., Захарова А.М., Протасова И.Д. и Жохова Е.В. но-фиолетовым и желтым окрашиванием, что свидетельствует о наличии свободных аминокислот в надземной части исследуемых видов рода *Geranium*.

Результаты исследования методом ВЭЖХ представлены в таблица. На рис. 2-4 приведены полученные в вышеописанных условиях хроматограммы сухих экстрактов *G. pratense*, *G. sylvaticum*, *G. palustre*.

Таблица. Содержание свободных аминокислот в *G. pratense*, *G. sylvaticum*, *G. palustre* (мг/г воздушно-сухого сырья)

Аминокислота	<i>G. pratense</i>	<i>G. sylvaticum</i>	<i>G. palustre</i>
Аспарагин	1.17	0.36	0.05
Глутамин	0.93	0.58	0.23
<i>o</i> -Пролин	0.43	0.09	0.05
Серин	1.10	0.21	2.65
Глицин	0.16	0.17	0.22
Гистидин	0.08	0.18	0.12
Аргинин	1.60	1.32	1.84
Треонин	0.31	не обнаружен	не обнаружен
Аланин	0.11	1.21	0.32
Пролин	0.87	4.00	1.40
Тирозин	0.12	0.22	0.39
Валин	0.06	0.36	0.27
<i>изо</i> -Лейцин	0.16	0.48	4.15
Лейцин	0.22	0.07	0.40
Фенилаланин	0.09	0.08	0.04
Лизин	0.30	0.16	0.04
Сумма Цистин-Цистеин	0.84	0.16	0.11
Метионин	0.19	3.48	1.15
Триптофан	0.016	0.037	0.03
Суммарное содержание	8.76	13.17	13.46

В результате анализа качественного состава и количественного содержания аминокислот в траве *G. pratense* выявлено 20 аминокислот (таблица, рис. 2), из которых доминируют аргинин, серин, аспарагин. В надземной части *G. sylvaticum* обнаружены 19 аминокислот, из них по количественному содержанию преобладают аргинин, пролин, метионин, аланин (рис. 3). Трава *G. palustre* из 19 идентифицированных аминокислот в значительном количестве накапливает аргинин, пролин, метионин, серин, изолейцин (рис. 4).

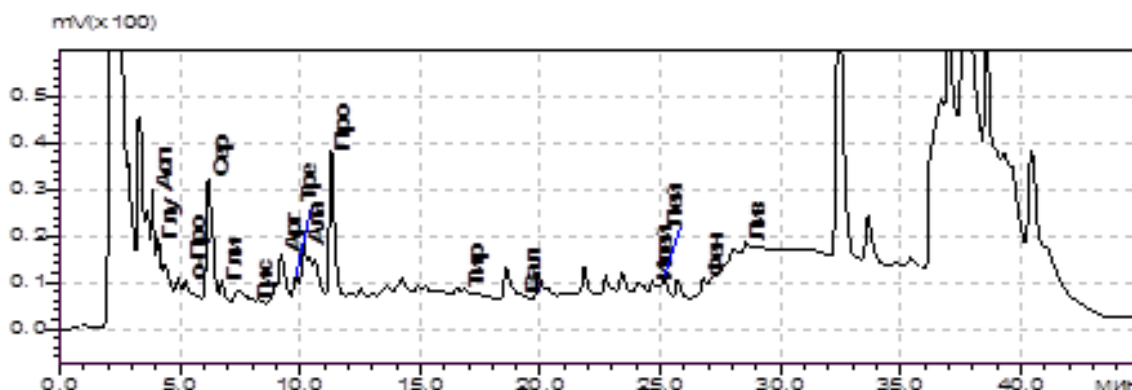


Рис. 2. Хроматограмма сухого экстракта *G. pratense* после модификации ФИТЦ. Прибор: Shimadzu LC-20 AD Prominence, детектор диодная матрица. Условия: см. рис.1.

Среди обнаруженных свободных аминокислот *G. pratense* – 10 незаменимых (гистидин, аргинин, треонин, валин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, лизин, метионин, триптофан).

Эти же незаменимые аминокислоты (за исключением треонина) идентифицированы и в надземной части *G. sylvaticum* и *G. palustre*.

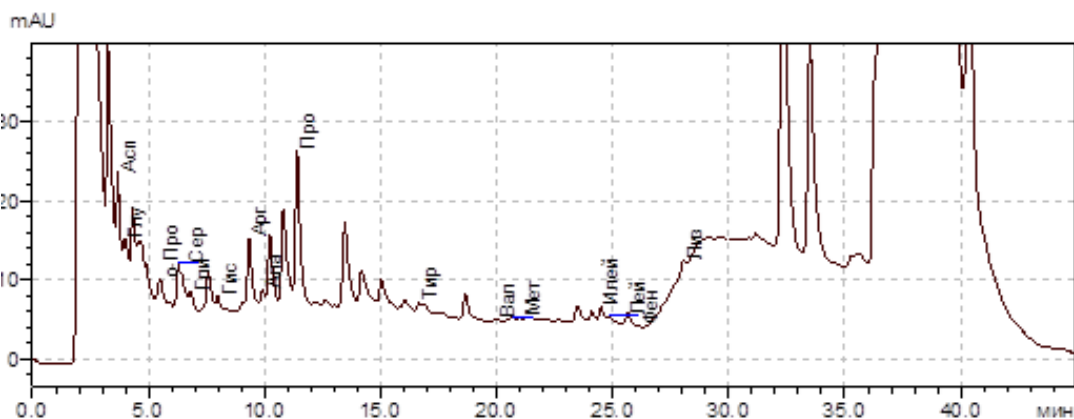


Рис. 3. Хроматограмма сухого экстракта *G. sylvaticum* после модификации ФИТЦ. Прибор *Shimadzu LC-20 AD Prominence*, детектор диодная матрица. Условия: см. рис. 1.

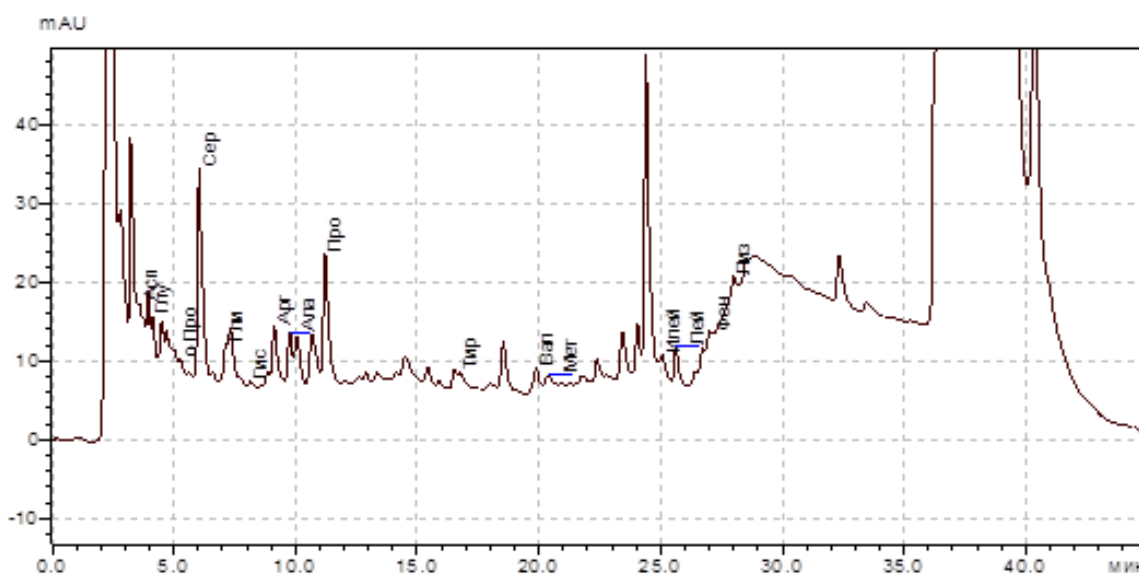


Рис. 4. Хроматограмма сухого экстракта *G. palustre* после модификации ФИТЦ. Прибор *Shimadzu LC-20 AD Prominence*, детектор диодная матрица. Условия: см. рис. 1.

Общее содержание аминокислот составило 8.76, 13.17 и 13.46 мг/г воздушно-сухого сырья для *G. pratense*, *G. sylvaticum* и *G. palustre* соответственно.

Следует отметить значительное количество метионина в надземной части *G. sylvaticum* и *G. palustre*, а также изолейцина в сырье *G. palustre*. Рекомендуемая в литературе лечебная доза травы *G. sylvaticum* и травы *G. palustre* – 10 г в день в форме настоя [5].

Эта доза травы *G. sylvaticum* способна удовлетворить 15% суточной потребности организма взрослого человека в метионине [12]. 5% суточной потребности взрослого человека в метионине и изолейцине [12] будут удовлетворены при приеме настоя травы *G. palustre* в рекомендуемой дозе.

Полученные результаты являются основой для более глубокого изучения растений рода *Geranium* как источников природных биологически активных веществ.

Выводы

1. Проведен качественный и количественный анализ свободных аминокислот надземной части *G. pratense*, *G. sylvaticum*, *G. palustre* методом обращенно-фазовой ВЭЖХ фенилтиокарбаматных производных.
2. В траве *G. pratense* выявлено 20 аминокислот, из которых 10 незаменимых. В надземной части *G. sylvaticum* и *G. palustre* обнаружены 19 аминокислот, среди них 9 незаменимых.

Литература

- [1] C. Aedo, F. Muñoz Garmendia, F. Pando. World checklist of *Geranium* L. (*Geraniaceae*). *Anales Jard. Bot. Madrid*. **1998**. Vol.56. No.2. P.211-252.
- [2] Plant amino acids: biochemistry and biotechnology. Ed. by Bijay K. Singh. *New York*. **1999**. 621p.
- [3] The Japanese Pharmacopea. 15th edition. *Shibuya, Tokyo, Japan*. **2006**. P.1814-1822.
- [4] Бобров Е.Г. Род *Geranium* – герань. *Флора СССР. М.; Л.* **1949**. Т.24. 742с.
- [5] Брезгин Н.Н. Лекарственные растения Верхневолжья. *Ярославль*. **1973**. 224с.
- [6] Методика выполнения измерений массовой доли аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. М-02-902-142-07.
- [7] Никитина В.С., Шендель Г.В. Содержание фенольных соединений и аминокислот в надземной части *Geranium pratense* и *G. sibiricum* (*Geraniaceae*). *Раст. ресурсы*. **2008**. Т.44. Вып.2. С.74-81.
- [8] Разаренова К.Н, Жохова Е.В. Определение содержания экстрактивных веществ и динамика их накопления в надземной и подземной частях герани лесной, г. луговой и г. болотной. *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. Сб. научных трудов. Пятигорск*. **2011**. Вып.66. С.167-171.
- [9] Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства *Rutaceae-Elaeagnaceae*. *Л.: Наука*. **1988**. 357с.
- [10] Хроматография на бумаге. Под ред. И.М. Хайса, К. Мацека. *М.* **1962**. 851с.
- [11] Черепанов С.А. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). *СПб.* **1995**. 992с.
- [12] Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты. Пептиды. Белки. *М.: Мир*. **1985**. 82с.