ISSN-1682-0533

# ИЗВЕСТИЯ

## НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОГО ОБЩЕСТВА "КАХАК"

ҒЫЛЫМИ - ТЕХНИКАЛЫҚ ҚОҒАМЫНЫҢ
ASSOCIATION OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
KAK REVIEW

№ 4 (28)

...тел, 2012

УДК-547.972

# СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КИСЛОТ РАСТЕНИЯ РОДА *CLIMACOPTERA SUBCRASSA* ПО ФАЗАМ ВЕГЕТАЦИИ

**Утешова К.Н., Ныкмуканова М.М., Кипчакбаева А.К., Ескалиева Б.К., Бурашева Г.Ш.**

*Казахский национальный университет им. аль-Фараби*

Проведен сравнительный анализ амино-, жирно- и фенолокислотного состава надземных масс растения рода Climacoptera subcrassa (К.толстоватой) по двум фазам вегетации (бутонизация и цветение).

Для Казахстана, практически не имеющего современных фармацевтических производств, и в то же время обладающего богатейшими источниками растительного сырья для выделения биологически активных соединений, проведение комплексных химических исследований различных видов растений особенно важно. На этом пути следует ожидать создание новых оригинальных отечественных лекарственных препаратов [1].

Поэтому изучение отечественных дикорастущих растений, и внедрение новых фитопрепаратов из них в промышленность является своевременной задачей.

Одним из наиболее продуктивных путей получения новых биологически активных веществ является выделение соединений из растений. На этом пути необходимо решить сложные задачи выделения и глубокой очистки из сложных многокомпонентных биологических объектов достаточно лабильных целевых веществ, однозначной идентификации структур [2].

Химическое исследование растений – галофитов, представляет значительный научный и практический интерес. К ним относятся растения рода *Climacoptera (Климакоптера)*, семейства *Chenopodiaceae* широко произрастающие на территории РК.

**Объекты исследования** - надземные массы растений *Климакоптера (Climacoptera) К.толстоватой (C.subcrassa)* заготовленные по двум фазам вегетации в 2012 году из Шелекского района Алматинской области.

Для выделения биологически активных соединений из вида растений рода *Климакоптера (Climacoptera)* проведен подбор растворителей, оптимизирован технологический режим [3,4].

С целью оптимизации процесса экстракции биологически активных веществ, изучено влияния соотношений сырье-растворитель, времени экстракции, температуры. Наиболее подходящий 50%- ный этиловый спирт (в соотношении сырье: экстрагент 1:8, 3 суток, комнатная температура) в этих условиях экстрагируются до 60 % БАВ.

**Цель работы** – провести сравнительный анализ амино-, жирно- и фенолокислотного состава растений рода *Climacoptera subcrassa (К.толстоватой)* по двум фазам вегетации (бутонизация и цветение).

Жирные кислоты являются структурными компонентами липопротеидов клеточных мембран и участвуют в осуществлении ряда важнейших биохимических процессов в клетке. Треонин играет большую роль в процессах синтеза жирных кислот, липидов, углеводов. Цистеин, цистин и метионин являются источниками органической серы в тканях и органах. При недостатке триптофана замедляется функция половых желез.

Наибольшая биологическая активность отмечается у жирных кислот с двумя и более двойными связями. Именно к таким ненасыщенным жирным кислотами относятся линолевая, линоленовая, арахидоновая кислоты.

Например, при ферментативном окислении арахидоновой кислоты происходит образование целого ряда биологически важных метаболитов – простогландинов, тромбоксанов, лейкотриенов. Простогланидины, известные как

внутриклеточные биорегуляторы многих физиологически важных процессов, оказывают влияние на сердечно- сосудистую, дыхательную, репродуктивную и другие системы. Их используют для лечения гипертонии, бронхиальной астмы, тромбозов сосудов, язвы желудка и в гинекологии. Тромбоксаны тесно взаимосвязаны с процессами тромбообразования и кроветворении, лейкотриены участвуют в аллергических (анафилактических) реакциях организма [5].

Ненасыщенные жирные кислоты предупреждают развитие атеросклероза, понижают свертываемость крови и уменьшают возможность тромбообразования. Они повышают защитные свойства организма и устойчивость его к инфекциям, предупреждают развитие многих кожных заболеваний. Имеются данные о способности данных кислот предупреждать действие веществ, вызывающих развития опухолей [4].

Исследования химического состава и фармакологических свойств лекарственного растительного сырья, суммарных фитопрепаратов и индивидуальных веществ, выделенных из растений, приводят к созданию новых высокоэффективных лекарственных средств и открывают новые источники их получения. Вызывают определенный интерес растения рода Климакоптера, которые характеризуются богатым химическим составом, а потому широким биологическим спектром действия [6].

В растениях, как показали последние исследования, содержится в свободном или связанном состоянии около 30 % аминокислот (в пересчете на белок). Широкое распространение аминокислот в растениях и их высокая биологическая активность способствуют эффективному действию на организм лекарственного сырья и полученных из него препаратов. Так, метионин применяется в качестве гепатопротекторного средства, соли аспарагиновой кислоты — для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы, глутаминовая кислота — в терапии болезней ЦНС и др.

Поэтому изучение качественного и количественного состава аминокислот в лекарственном растительном сырье имеет практическое значение и вызывает научный интерес [7].

**Эксперименты и результаты их обсуждения.**

В надземной части растения рода *Climacoptera subcrassa* (*К.толстоватой*) в двух фазах вегетации (бутонизация и цветение) используя метод бумажной хроматографий обнаружены аминокислоты, для углубленного исследования аминокислот нами использован аминокислотный анализатор.

**Анализ аминокислот.** 1 г исследуемого материала гидролизуют в 5 мл. 6Н HCl при 105°С в ампулах, запаянных под аргоном, в течение 24 часов, полученный гидролизат выпаривают досуха на роторном испарителе при 40 °С. Затем полученный осадок растворяют 5 мл. 5%- сульфосалициловой кислоты, после центрифугирования при 2,5 тысяч оборотов в мин. В течение 15 мин берут над осадочную жидкость, затем жидкость и пропускают через ионообменную колонку с Дауск 50 4-8, 200-4000 меш, со скоростью 1 капля в секунду. Вначале смолу промывают 1-2 мл деионизированной водой и 2 мл. 0,5Н уксусной кислотой, а затем снова деионизированной водой, до нейтральной pH. Для элюирования аминокислот через колонку пропускают 3 мл. 6Н раствора $NH_4OH$ со скоростью 2 капли в секунду, элюат собирают в круглодонную колбу вместе с деионизированной водой, которую используют для отмывания колонки до нейтральной pH. Содержимое колбы досуха выпаривают на роторном испарителе под давлением 1 атмосфере и температуре 50-60 °С.

Потом в колбу добавляют 1 каплю свежеприготовленного $SnCl_2$, 1 каплю 2,2-диметоксипропана и 1-2 мл. насыщенного HCl, пропанола, нагревают до 110 °С, выдерживая эту температуру в течение 20 мин, содержимое колбы вновь выпаривают на роторном испарителе.

Следующим этапом было внесение в колбу 1 мл свежеприготовленного ацилирующего реактива (1 объем уксусного ангидрида, 2 обьема триэтиламина, 5 обьемов ацетона), нагревание при температуре 60 °С в течение 1,5-2 мин. и выпаривание образца досуха, добавление в нее 2 мл. этилацетата и 1 мл. насыщенного раствора NaCl. Содержимое колбы тщательно перемешивают и по мере того, как образуется, два слоя жидкостей – берут верхний (этилацетатный) для газохроматографического анализа, который проводят на газовом хроматографе «Карло Эрба». При достижении температуры колонки 250 °С она должна сохраняется до полного выхода всех аминокислот. Данные анализа аминокислотного состава приведены в таблице 1[8.9].

Результаты таблицы 1 свидетельствует о

том, что в надземной массе исследуемых видов растений качественный состав аминокислот идентичен, определены около 20 свободных аминокислот. Различия наблюдались в их времени цветения. В растений собранном во время бутонизации обнаружены аланин, серин, метионин, глютамат в достаточным количестве, а в растениях собранных во время цветения количество этих аминокислот резко уменьшились. А количество метионина, валина, лейцина, треонина, цистеина, тирозина, аргинина, триптофана увеличились во время цветения. Следует отметить, что количественный состав аминокислот значительно зависит от фазы вегетации.

Таблица 1 - Аминокислотный состав растений рода Климакоптера (*Climacoptera*)

| Аминокислоты | Содержание, мг/г | |
|---|---|---|
| | *C.subcrassa (бутони-зация)* | *C.subcrassa (цветение)* |
| Аланин | 1253 | 882 |
| Глицин | 482 | 296 |
| Валин | 256 | 405 |
| Лейцин | 315 | 612 |
| Изолейцин | 286 | 415 |
| Треонин | 244 | 438 |
| Серин | 715 | 494 |
| Пролин | 956 | 915 |
| Метионин | 74 | 206 |
| Аспаратат | 1246 | 1120 |
| Цистейн | 24 | 72 |
| Гидроксипролин | 4 | 4 |
| Фенилаланин | 318 | 425 |
| Глютамат | 3892 | 2654 |
| Орнитин | 5 | 3 |
| Тирозин | 285 | 514 |
| Гистидин | 302 | 305 |
| Аргинин | 448 | 612 |
| Лизин | 310 | 313 |
| Триптофан | 182 | 205 |

Кроме того, нами проведены работы по сравнительном анализу жирных кислот растения рода *Climacoptera subcrassa* по двум фазам вегетации [10, 11].

**Анализ жирных кислот**. Высушенное, измельченное сырье растений рода *Climacoptera subcrassa* двух фаз вегетации экстрагируют смесью хлороформ-метанол (2:1) в течение 5 минут, экстракты отфильтровают через бумажный фильтр и концентрируют досуха. Затем к полученным экстрактам добавляют 10 мл метанола и 2-3 капли хлористого ацетила и далее проводят метилирование при 60-70 С в специальной системе в течение 30 минут. Метанол удаляют с помощью ротационного испарителя, а образцы экстрагируют 5 мл. гексана и анализируют используя газовый хроматограф «CARLO-ERBA-420» в течение 1 часа.

Для установления содержания компонентов используют метод внутренней нормировки, определение концентрации компонентов расчитывают по формуле:

$$Ci = \frac{Si}{\sum_{i=1}^{n} Si} \cdot 100$$

В результате полученых хроматограмм метиловых эфиров соединений, идентифицированы 9 жирных кислот, которые представлены в таблице 2.

Из данных таблицы 2 следует, что все исследованные виды растений рода *Климакоптера (Climacoptera)* имеют идентичный количественный состав жирных кислот, в которых идентифицированы 9 компонентов. Различия наблюдались только в количественном содержании отдельных жирных кислот. Насыщенные жирные кислоты были представлены пальмитиновой ($C_{16/0}$), стеариновой ($C_{18:0}$) кислотами, при чем содержание этих кислот в растений рода *Climacoptera subcrassa* во время цветения количество этих жирных кислот увеличивалось. Главными компонентами ненасыщенных кислот являются олеиновая ($C_{18:1}$) и линолевая ($C_{18:2}$) кислоты. Большое количество содержания ненасыщенных жирных кислот в растении рода Климакоптера *(Climacoptera)* обнаружены во время цветения.

**Анализ фенолокислот.** 50 г измельченного растительного сырья настаивают в течение 24 часов с 70%-ным водным раствором этанола, экстракт сливают, сырье повторно настаивают в тех же условиях. Объеденные экстракты концентрируют до минимального объема, в мягких условиях, добавляет равный объем 5%-ного водного раствора бикарбаната натрия. При этом фенолокислоты образуют хорошо растворимые в воде соли. Фенолы экстрагируют этилацетатом. Водную часть подкисляют до кислой реакции по конго и этилацетатом экстрагируют свободные фенолокислоты. Этилацетатный экстракт промывают несколько раз в делительной воронке водой для удаления минеральной кислоты. Полученный этилацетатный экстракт концентрируют до минимального объема, а остаток исследуют

методом бумажной хроматографии (БХ) в системах растворителей: I-Бензол- уксусная кислота – вода (6:7:3); II-Формиат натрия – муравьиная кислота – вода (10:1:100). В качестве проявителя используют диазотированный п-нитроанилин ДзПНА в присутствии карбоната натрия (ДзПНА/Na2CO3) [6, 7].

Таблица 2 - Жирнокислотный состав растения рода *Climacoptera subcrassa* по двум фазам вегетации

| № | Название кислот | Индекс кислоты | Содержание | |
|---|---|---|---|---|
| | | | *C. subcrassa (бутонизация)* | *C.subcrassa (цветение)* |
| 1 | Миристиновая | $C_{14:0}$ | 0,6 | 1,2 |
| 2 | Пендакеновая | $C_{15:0}$ | 0,8 | 2,1 |
| 3 | Пальмитиновая | $C_{16:0}$ | 11,2 | 6,2 |
| 4 | Пальмитолеиновая | $C_{16:1}$ | 1,1 | 1,9 |
| 5 | Стеариновая | $C_{18:0}$ | 3,2 | 3,5 |
| 6 | Олеиновая | $C_{18:1}$ | 5,6 | 3,6 |
| 7 | Линолевая | $C_{18:2}$ | 32,5 | 48,8 |
| 8 | Линоленовая | $C_{18:3}$ | 0,4 | 0,3 |
| 9 | Арахиновая | $C_{20:0}$ | - | - |

Таблица 3 – Хроматография фенолокислот растения рода *Climacoptera subcrassa* по двум фазам вегетации

| № | R, в системах | | Проявители | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | I | II | УФ- свете | ДзПНА | ДзПНА/$Na_2CO_3$ |
| 1 | 0.65 | 0.40 | Фиолетовое | Коричневое | Фиолетовое |
| 2 | 0.45 | 0.55 | - | - | |
| 3 | 0.15 | 0.35 | Голубое | Синее | Синее |
| 4 | 0.40 | 0.45 | - | - | |
| 5 | 0.07 | 0.75 | Фиолетовое | Коричневое | Фиолетовое |
| 6 | 0.28 | 0.72 | Фиолетовое | Розовое | - |
| | | | | | |

Таким образом, обнаружены более 6 различных фенолокислот (таблица 3), из них четыре вещества идентицированы с достоверными образцами как ванилиновая, изованилиновая, п-оксибензойная, п-кумаровая кислоты.

**Выводы**

1. Проведен сравнительный анализ амино-, фенолo- и жирнокислотный состава вида растений рода *Климакоптера* (*Climacoptera)* по двум фазам вегетации.

2. В растений собранном во время бутонизации обнаружены аланин, серин, метионин, глютамат в достаточным количестве, а в растениях собранных во время цветения количество этих аминокислот резко уменьшились. А количество метионина, валина, лейцина, треонина, цистеина, тирозина, аргинина, триптофана увеличились во время цветения. Следует отметить, что количественный состав аминокислот значительно зависит от фазы вегетации.

3. Определен и проведен сравнительный анализ качественного и количественного содержания жирных кислот в растений рода Климакоптера(*Climacoptera)*. Насыщенные жирные кислоты были представлены пальмитиновой ($C_{16/0}$), стеариновой ($C_{18:0}$) кислотами, при чем содержание этих кислот в растений рода *Climacoptera subcrassa* выше, чем в остальных видах растений рода Климакоптера.

4. Растения рода Климакоптера (*Climacoptera)* обнаружены фенолокислоты,

используют
олин ДзПНА в
та натрия

по двум фазам

| ание |
|---|
| *C.subcrassa* (цветение) |
| 1,2 |
| 2,1 |
| 6,2 |
| 1,9 |
| 3,5 |
| 3,6 |
| 48,8 |
| 0,3 |
| - |

по двум фазам

| |
|---|
| ПНА/$Na_2CO_3$ |
| Фиолетовое |
| |
| Синее |
| |
| Фиолетовое |
| - |
| |

стионина, валина,
ина, тирозина.
лись во время
тметить, что
аминокислот
тетации.
сравнительный
количественного
з растений рода
Насыщенные
представлены
риновой ($C_{18:0}$)
ие этих кислот в
*crassa* выше, чем
растений рода

Климакоптера
фенолокислоты,



который представлены, как ванилиновая, изованилиновая, п-кумаровая, протокатеховая кислоты.

**Литература:**


1. Флора Казахстана. - Алма-Ата: АН Каз ССР. 1958. - Т.3. - С. 274-281.
2. Флора СССР под ред. Коморова. - М-Л., 1936. - Т.6. - С. 2-6.
3. Соколов Л.Д. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. – Л.: Наука, 1985. - С. 237.
4. Баева Р.Т., Запесочная Г.Г. Флавоноиды *Climacoptera transoxana* // Химия природ. соед. - 1980. - №5. - С. 839.
5. Туртаева Г.О., Каржаубекова Ж.Ж., Ескалиева Б.К., Бурашева Г.Ш., Абилов Ж.А., Достанова Р.Х. Полифенолы некоторых видов растений семейства Маревых доновая кислота// Матер. межд. науч. конф. «Химия, технология и медицинские аспекты природных соединений». – Алматы, 2003. – С. 149.
6. Аминокислоты в медицине / В. И. Западнюк, Л. П. Купраш, М. И. Заика и др.— К.: Здоров'я, 1982 — 200 с.
7. Dey P.M., Harborne J.B. Methods in Plant Chemistry. – London: Academic Press ltd, 1989. - 552p.
8. Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А. Качественный и количественный анализ основных групп БАВ в лекарственном растительном сырье и фитопрепаратов. – Алматы: Қазақ университеті, 2004. – 288 с.
9. Ескалиева Б.К., Бурашева Г.Ш., Султанова Н.А., Абилов Ж.А. Исследование амино-, фенолокислотного и микроэлементного состава растений рода *Климакоптера* // Вестник КазНУ. Серия хим. - 2005. - №4. - С. 56-59.
10. Ескалиева Б.К., Ахмед А., Бурашева Г.Ш., Абилов Ж.А., Ахмад В.У. Биологически активные соединения из *Climacoptera* // Хим. природ. соед. - 2004. - №1. - С. 76-77.
11. Поляков В.В. Масло тополя – новый природный биологически активный препарат для медицины и сельского хозяйства // Республ. Научно-метод.конф. - Петропавловск, 1997. – Т. 2. – С. 80-81.


*Поступила 9 октября 2012*