

БИОЛОГИЯ

МРНТИ 34.05.17

**Ж.Т. Нуртаева, Д.Е. Губайдуллина, А.Л. Кисметова,
И.И. Бибишева**

Западно-Казахстанский аграрно-технический университет
им. Жангир хана
г. Уральск, Казахстан

ИССЛЕДОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ВИТАМИНОВ И АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Аннотация. Разработаны методы анализа химического состава кормовых и лекарственных растений с использованием современных физико-химических методов капиллярного электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на примере степных растений, в частности, растений солодки голой и донника. Рекомендуется использовать методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза для исследования химического состава растений, имеющих кормовую и питательную ценность. Метрологическая аттестация разрабатываемых методик позволит применять их на предприятиях фармацевтической и пищевой отрасли.

Ключевые слова: донник белый, масс-спектрометрия, жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез, экстракция, фармацевтика.



Түйіндеме. Мақалада капиллярлы электрофорездің (КЭ) және жоғары эффективті сұйықтық хроматографиясының (ЖЭСХ) қазіргі заманғы физика-химиялық әдістерін қолдана отырып дала өсімдіктерінің мысалында азықтық және емдік өсімдіктерінің химиялық құрамын анықтаудың әдістерін қолданысқа енгізу қарастырылған.

Түйінді сөздер: ақ түйежапырақ, масс-спектрометрия, жоғарыэффективті сұйықтық хроматография әдісі, капиллярлы электрофорез, экстракция.



Abstract. The methods of analyzing of the chemical composition of fodder and medicinal plants with using modern physical and chemical methods of capillary electrophoresis (CE) and high effective liquid chromatography (HELIC) as an

example of steppe plants, in particular plants of licorice and sweet clover. According to the results of work there is reason to recommend using methods of high effective liquid chromatography and capillary electrophoresis for the study of the chemical composition of plants with feed and nutritional value. Metrological certification of developed techniques will allow to apply them in pharmaceutical and food industry.

Key words: white sweet clover, mass spectrometry, liquid chromatography, capillary electrophoresis, extraction, pharmaceuticals.

Введение. Казахстан располагает исключительно большим потенциалом природных кормовых угодий и стоит на 1-м месте среди стран СНГ по наличию естественных пастбищ и сенокосов. Лекарственный потенциал флоры степи также изучен недостаточно полно, и по этой причине не используется в той мере, в которой мог бы использоваться и приносить пользу. Степная флора Казахстана, представленная интересными лекарственными и кормовыми растениями как с научной, так и с прикладной точек зрения, изучена неполно. Это отчасти связано и с недостаточной развитостью современных физико-химических методов исследования, таких, как высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, капиллярный электрофорез, которые во всем мире являются инструментами фитохимических исследований и научных открытий, приносящих свой вклад в фундаментальную науку, медицину и сельское хозяйство [1].

Для эффективного использования растительного мира степи необходимо как можно более полно изучить химический состав растений и свойства выделенных активных веществ растений [2]. Подобные исследования нечасты не только в западном регионе, но и в республике, несмотря на то, что с их помощью можно показать перспективы изучения биологически активных веществ растений для повышения энергетической и питательной ценности кормовых растений, а также для изучения лекарственной ценности степных растений [3].

В условиях падения плодородия почв, засорения полей, болезней растений вопросы сохранения и воссоздания биоразнообразия степных растений являются наиболее актуальными не только для агропромышленного комплекса, но и для экологии.

Степная флора это, с одной стороны, устойчивая кормовая база, как неперемное условие развития высокопродуктивного и высокопроизводительного животноводства. С другой стороны, это кладезь лекарственных растений. Некоторые из них служат сырьем для получения лекарственных препаратов, в состав которых входят фармакологически активные вещества растительного происхождения. Кроме того, содержащиеся в лекарственных растениях вещества находят применение в химико-фармацевтической промышленности [2,4,5].

Флора Казахстана достаточно разнообразна. Для использования в качестве кормовых и лекарственных растений особое значение имеют бобовые, представленные клевером, люцерной, соломкой, донником, и лекарственные – шалфей, ромашка, цикорий и др. [5,6].

Воссоздание биоразнообразия степных растений, повышение их урожайности и энергетической ценности на современном этапе требуют не только решения практических задач, но и развития научной основы выращивания кормовых и лекарственных растений. Для того чтобы использовать природное растительное сырье в качестве кормовой базы или лекарственного средства, необходимо подробное изучение его химического состава, выделение и исследование активных соединений. Однако вначале следует провести химический анализ.

Цель исследования: проведение анализа химического состава кормовых и лекарственных растений с использованием современных физико-химических методов капиллярного электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии на примере степных растений. Определение конкретных видов растений для анализа методами ВЭЖХ и электрофореза. Проведение анализа растительных экстрактов на содержание активных компонентов методом ВЭЖХ.

Методы исследований. С практической точки зрения результаты данных исследований могут быть применены в производстве лекарственных растений на основе отечественного растительного сырья, а также создадут научную основу для подбора кормовой базы из растений степи для сельскохозяйственных

животных. Вместе с тем исследования могут стать весомым вкладом в развитие фитохимии и важнейших аналитических методов ВЭЖХ и КЭ в Казахстане.

Донник белый (Melilotus albus) – двулетнее растение. Корень стержневой, с хорошо развитыми боковыми корнями. Стебли прямые, реже приподнимающиеся, высотой 75-300 см. Ветвление стеблей начинается на высоте 25-30 см. В верхней части стебли короткоопушенные, внизу – голые. Нижние и средние листья округлые, верхние – линейные или узкоэллиптические, по краям зазубренные. Соцветие – пазушная кисть. Цветки белые. Бобы эллиптические, сетчато-морщинистые, с коротким острым носиком. Семена овальной формы, желтого и желтовато-зеленого цвета. Масса 1000 семян составляет 1,5 г. Распространен на территории от Кавказа и Крыма до Архангельска и Мурманска, в Сибири и Средней Азии. Донник белый ценится как кормовая культура, которая продуцирует высокие урожаи зеленой массы. Используется для скармливания животным или для изготовления травяной муки, силоса, кормовых добавок сена. В 1 кг зеленой массы содержится 0,18 корм. ед., тогда как в люцерне – 0,14, в клевере – 0,16 корм.ед. [4].

Солодка голая (Glycyrrhiza glabra l.) (солодка гладкая, солодка железистая, лакричник) – многолетнее корневищное травянистое растение, высотой до 150, реже до 200 см. Солодку используют более чем в 20 отраслях промышленности и сельского хозяйства. Корень и экстракты применяют в табачной (для соусирования табака) и пищевой промышленности (при производстве пива, кваса, кондитерских изделий). Солодковое сено отличается высокой питательностью и поедается многими домашними животными [5].

Для проведения аналитических работ по данной теме были выбраны объекты исследования, а именно степные растения: солодка голая (*Glycyrrhiza glabra*) и донник белый (*Melilotus officinalis*) и подготовлены следующие приборы: высокоэффективный жидкостной хроматограф LC-Varian ProStar (Varian), система капиллярного электрофореза Beckman Coulter P/ACETM MDQ с применением кварцевого капилляра.

Для исследования отобраны образцы корней с корневищами солодки голой (рис. 1а). Места сбора: пригородная зона г. Уральска, пос. Сулуколь Западно-Казахстанской области. В качестве кормового представителя выбран донник белый (рис. 1б). Образцы взяты в пригороде г. Уральска Западно-Казахстанской области, а также на опытных полях Западно-Казахстанского аграрно-технического университета им. Жангир хана в разные периоды вегетации: до цветения и после цветения.



Рис. 1. Солодка голая (а): (справа) очищенное сырье, (слева) неочищенное сырье; Донник белый (б): измельченные цветы, стебли и листья

Для установления соответствия нормативам качества густо-го экстракта проведено определение вкуса, цвета, запаха, влажности экстракта и содержания веществ, нерастворимых в горячей воде по ГОСТ 22840-77. Для обнаружения витаминов наибольшее распространение получили хроматографические, спектроскопические и иммунологические методы, а в последние годы и электрофоретические. Несмотря на значительное количество опубликованных работ в этом направлении, некоторые проблемы остаются нерешенными, а именно:

- определение водо- и жирорастворимых витаминов из одной пробы в одном аналитическом цикле;
- выяснение возможностей капиллярного зонного электрофореза;

- определение режимов процесса, поиск и характеристика сорбентов для капиллярной электрохроматографии при определении витаминов;

- установление возможности использования различных путей on-line концентрирования при их совместном определении.

Ответы на эти вопросы позволяют определить стратегию выбора аналитического метода при анализе витаминов в природных объектах в зависимости от конкретно решаемой задачи [6].

Результаты и обсуждение. Определение содержания витаминов и аминокислот проводилось с помощью системы капиллярного электрофореза (КЭ) Beckman Coulter P/ACETM MDQ. Условия анализа растительных экстрактов методом КЭ, найденные эмпирически, и определяемые компоненты приведены в табл. 1.

Таблица 1

Условия анализа растительных экстрактов методом капиллярного электрофореза

Показатель	Определяемые витамины в порядке выхода из капилляра: В ₂ , В ₆ , С
Условия инъекции градуировочного раствора:	
Давление, мбар	30
Время, с	20
Условия анализа:	
Длина волны, нм	200
Напряжение, кВ	+25
Давление, мбар	В начале анализа - 0 мбар, после появления пика создается давление 30 мбар до конца анализа
Температура, °С	30
Время, мин.	16-18
Концентрация ведущего электролита - тетрабората натрия, ммоль	30

Исследованию содержания витамина С и витаминов группы В в экстрактах солодкового корня и донника белого предшествова-

ла градуировка анализатора по стандартному веществу витамина С - L-аскорбиновой кислоте и соответствующим стандартным образцам витаминов В₂ и В₆. Для градуировки анализатора экспериментальным путем были подобраны буферные растворы и условия проведения электрофоретического разделения компонентов пробы. Электрофореграмма стандартного градуировочного раствора смеси витаминов в водном растворе (рис. 2) показывает, что при заданных условиях идет хорошее разделение

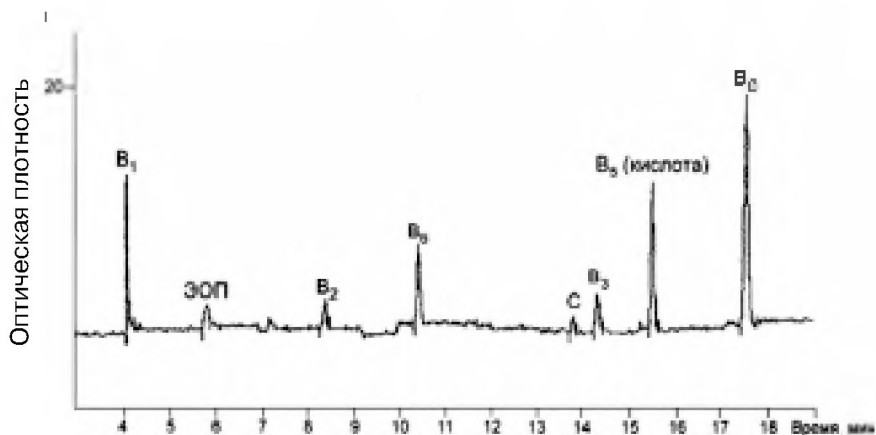


Рис. 2. Электрофореграмма градуировочного раствора

искомых витаминов С, В₂ и В₆. Время выхода данных компонентов различается достаточно сильно для полноты разделения, а высота и площадь пика достаточно велики для идентификации данных соединений в смеси.

Путем применения разработанной методики нами был проведен количественный анализ витамина С и витаминов группы В в растительных экстрактах (табл. 2).

Как показывают данные табл. 3, искомые витамины в разном количестве обнаружены в образцах обоих исследуемых растений. Наиболее богатыми витамином С оказались пробы экстракта солодки голой (образцы 1-4). В образцах этого растения осен-

Таблица 2

Нормативы контроля приемлемости расхождения результатов для двух последовательных вводов анализируемого экстракта методом КЭ

Витамин	Диапазон линейности градуировочной зависимости, мг/дм ³	δ , %
B ₂	4,0-200	1,2
B ₆	1,0-100	1,6
C	8,0-200	1,4

Таблица 3

Результаты определения витамина С и витаминов группы В в растительных экстрактах методом капиллярного электрофореза

Номер образца пробы	Среднее значение результатов определения витаминов в растительных экстрактах методом КЭ, г/кг		
	C	B ₂	B ₆
1	0,0790±10 ⁻⁴	0,0035±10 ⁻⁴	0,012±10 ⁻⁴
2	0,0830±10 ⁻⁴	0,0025±10 ⁻⁴	0,0084±10 ⁻⁴
3	0,0813±10 ⁻⁴	0,0014±10 ⁻⁴	0,0091±10 ⁻⁴
4	0,0822±10 ⁻⁴	0,0012±10 ⁻⁴	0,0084±10 ⁻⁴
5	0,0212±10 ⁻⁴	0,0522±10 ⁻⁴	0,0334±10 ⁻⁴
6	0,0255±10 ⁻⁴	0,0563±10 ⁻⁴	0,0341±10 ⁻⁴
7	0,0237±10 ⁻⁴	0,0512±10 ⁻⁴	0,0351±10 ⁻⁴
8	0,0257±10 ⁻⁴	0,0536±10 ⁻⁴	0,0362±10 ⁻⁴
9	0,0086±10 ⁻⁴	0,0465±10 ⁻⁴	0,0291±10 ⁻⁴
10	0,0096±10 ⁻⁴	0,0465±10 ⁻⁴	0,0303±10 ⁻⁴
11	0,0108±10 ⁻⁴	0,0475±10 ⁻⁴	0,0208±10 ⁻⁴
12	0,0161±10 ⁻⁴	0,0463±10 ⁻⁴	0,0271±10 ⁻⁴
13	0,0296±10 ⁻⁴	0,0653±10 ⁻⁴	0,0233±10 ⁻⁴
14	0,0315±10 ⁻⁴	0,0624±10 ⁻⁴	0,0250±10 ⁻⁴

него отбора (образцы 2 и 4) содержания витамина С несколько выше по сравнению с образцами весеннего отбора (образцы 1 и 3). Содержание витаминов группы В в образцах солодки голый

в целом невысокое. Однако содержание витамина В₆ несколько выше содержания витамина В₂.

В образцах растения донника белого (образцы 5-14) содержание витамина С несколько ниже по сравнению с растением солодки голой. Более высоким содержанием этого витамина характеризуются пробы 5-8 (листья донника) и 13, 14 (цветки донника). Содержание витаминов группы В в растении донника белого выше, чем в солодке голой. Содержанием витаминов этой группы богаты все части донника, а в особенности листья и цветки. Высокое содержание витаминов группы В в растении донника подтверждает кормовую ценность этого растения. В соответствии с результатами исследований установлено, что состав витаминов в доннике белом наиболее богат после цветения, т.е. в июне-сентябре (образцы 6, 8, 10, 12, 13, 14). Наибольшее скопление витаминов наблюдается в цветках и листьях этого растения.

Таблица 4

Результаты определения аминокислот в растительных экстрактах, %

Номер образца пробы	Лизин	Треонин	Цистин
1	0,50±10 ⁻²	отсутствует	0,40±10 ⁻²
2	0,44±10 ⁻²	отсутствует	0,40±10 ⁻²
3	0,42±10 ⁻²	отсутствует	0,42±10 ⁻²
4	0,40±10 ⁻²	отсутствует	0,44±10 ⁻²
5	0,58±10 ⁻²	0,50±10 ⁻²	0,66±10 ⁻²
6	0,62±10 ⁻²	0,48±10 ⁻²	0,64±10 ⁻²
7	0,56±10 ⁻²	0,48±10 ⁻²	0,70±10 ⁻²
8	0,60±10 ⁻²	0,46±10 ⁻²	0,66±10 ⁻²
9	0,39±10 ⁻²	0,39±10 ⁻²	0,40±10 ⁻²
10	0,39±10 ⁻²	0,38±10 ⁻²	0,40±10 ⁻²
11	0,40±10 ⁻²	0,40±10 ⁻²	0,42±10 ⁻²
12	0,40±10 ⁻²	0,38±10 ⁻²	0,42±10 ⁻²
13	0,64±10 ⁻²	0,68±10 ⁻²	1,20±10 ⁻²
14	0,66±10 ⁻²	0,64±10 ⁻²	1,18±10 ⁻²

По данным табл. 4 видно, что в доннике имеются все искомые аминокислоты. Наибольшим содержанием аминокислот отличаются листья (образцы 5-8) и цветки (образцы 13, 14) донника. В растении солодки голой (образцы 1-4) из искомых аминокислот обнаружены только лизин и цистин. Треонин в этом растении отсутствует.

Дискуссия. Полученные результаты подтверждают кормовую ценность донника белого по содержанию витаминов и аминокислот, особенно в листьях и цветках растения. Как и ожидалось, растение солодки голой характеризуется высоким содержанием витамина С. Полученные экспериментальные факты хорошо согласуются с литературными данными по исследуемым растениям.

Капиллярный электрофорез является очень удобным и экспрессным методом для изучения химического состава растительных образцов, который отличается высокой чувствительностью и доступностью. Качественной характеристикой вещества является время удерживания, а количественной – высота или площадь пика, пропорциональная величине концентрации вещества.

Выводы

Современными физико-химическими методами высокоэффективной жидкостной хроматографии, масс-спектрометрии и капиллярного электрофореза в составе исследуемых растений обнаружены витамины, аминокислоты и биологически активные вещества - глицирризиновая кислота в растении солодки голой. Проведена статистическая обработка результатов анализа и показана хорошая воспроизводимость и точность используемых методов. На основе целого ряда экспериментов были отработаны такие методы определения, как ВЭЖХ, МС и КЭ.

Полученные данные свидетельствуют о формировании теоретической и практической научной базы с целью изучения химического состава кормовых и лекарственных растений степи Западного Казахстана для дальнейшего их применения в качестве кормовой базы или лекарственных средств. На основании полученных результатов уже сегодня можно дать практические рекомендации по широкому использованию методов высокоэффек-

тивной жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза с целью исследования химического состава растений, имеющих кормовую и питательную ценность. Метрологическая аттестация разрабатываемых методик позволит применять их на предприятиях фармацевтической и пищевой отрасли, а также в исследовательских лабораториях Казахстана и способствовать их развитию.

Список литературы

- 1 *Прозорова Т.А., Черных И.Б.* Кормовые растения Казахстана. – Павлодар: "Книга", 2004. – 278 с.
- 2 *Гончарова Т.А.* Энциклопедия лекарственных растений / Лечение травами. – М.: Изд. дом МСП, 1998. – 560 с.
- 3 *Иванов В.В.* К изучению солодки лакричника в Западном Казахстане. – Уральск, 1955. – 61 с.
- 4 *Paiano V.* Alien seedling recruitment as a response to altitude and soil disturbance in the mountain grasslands of central Argentina / Valeria Paiano, Arnaldo Mangeaud, Eduardo Pucheta // Plant Ecology. – 2007. – № 193. – P. 279-291.
- 5 *Гоменюк Г.А.* и др. Практическое применение сборов лекарственных растений: справочник. – Киев: А.С.К., 2001. – 432 с.
- 6 *Литвиненко В.И., Аммосов А.С., Попова Т.П.* Солодка: применение в мировой практике (обзор по материалам охранных документов за период с 1901 по 2012 г.) // Фармаком. – 2004. – № 4. – С. 53-61.