

УДК 582.573.16:547.466:543.544.5.068.7
DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2017.v0.i3.8193

А. І. Федосов, В. С. Кисличенко, О. М. Новосел
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

ВИЗНАЧЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ ТА КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ АМІНОКИСЛОТ У ЧАСНИКУ ЦИБУЛИНАХ І ЛИСТІ

Вступ. Рослинні амінокислоти мають великий вплив на функціонування різноманітних систем і органів людського організму. Крім того, вони проявляють широкі фармакотерапевтичні властивості, сприяють більш швидкому засвоєнню та потенціюють дію біологічно активних речовин, які містяться в рослинах. Тому актуальним є пошук видів рослин, що накопичують у значній кількості амінокислоти і широко використовуються в їжу. До таких рослин належить часник посівний (*Allium sativum* L.) родини цибулеві (*Alliaceae*), який здавна застосовують для лікування різних захворювань.

Мета дослідження – визначити якісний склад та кількісний вміст вільних і зв'язаних амінокислот у часнику цибулинах та листі.

Методи дослідження. Амінокислотний склад визначали методом високоефективної рідинної хроматографії.

Результати й обговорення. У результаті проведеного хроматографічного дослідження в часнику цибулинах визначено вміст 16 амінокислот. У вільному стані у великій кількості накопичуються аргінін (3,04 %) і пролін (1,56 %), у зв'язаному – глутамінова кислота (10,59 %), аспарагінова кислота (6,06 %) та аргінін (5,94 %). У часнику листі ідентифіковано та визначено вміст 15 вільних і 16 зв'язаних амінокислот. Серед вільних амінокислот у великій кількості накопичуються глутамінова кислота (2,11 %), лейцин (1,79 %), валін (1,77 %), ізолейцин (1,52 %), треонін і фенілаланін (1,44 %), у зв'язаному – глутамінова кислота (28,49 %), аспарагінова кислота (12,90 %) та лейцин (7,61 %). Метіонін у часнику листі міститься тільки у зв'язаному стані.

Висновки. Методом високоефективної рідинної хроматографії визначено амінокислотний склад у часнику цибулинах і листі. У часнику цибулинах у вільному та зв'язаному стані виявлено і визначено вміст 16 амінокислот, а в часнику листі – 15 вільних та 16 зв'язаних амінокислот. Результати досліджень показали, що метіонін у часнику листі міститься тільки у зв'язаному стані.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: часник посівний; амінокислотний склад; високоефективна рідинна хроматографія.

ВСТУП. У живих організмах амінокислоти виконують ряд важливих функцій, найважливішими з яких є: структурні елементи білків; структурні елементи інших природних сполук; вихідні сполуки для утворення в організмах біогенних амінів і споріднених сполук; нейромедіатори та медіатори; метаболіти. Відомо, що до складу білків входять 20 протейногенних амінокислот, послідовність яких кодується генетичним кодом і які постійно виявляють у білках. Амінокислоти та їх похідні входять до складу різних азотистих сполук, коферментів, антибіотиків, пептидів тощо [1].

Основними джерелами надходження амінокислот до організму людини є продукти харчування тваринного та рослинного походження.

© А. І. Федосов, В. С. Кисличенко, О. М. Новосел, 2017.

Нині відомо майже 300 рослинних амінокислот, які впливають на функціонування різноманітних систем і органів людського організму. Крім того, вони проявляють широкі фармакотерапевтичні властивості, сприяють більш швидкому засвоєнню та потенціюють дію біологічно активних речовин, які містяться в рослинах [2]. Тому актуальним є пошук видів рослин, що накопичують у значній кількості амінокислоти і широко використовуються в їжу. До таких рослин належить часник посівний (*Allium sativum* L.) родини цибулеві (*Alliaceae*), який здавна застосовують для лікування різних захворювань. Часнику цибулини мають антимікробні, антисептичні, відхаркувальні, протизапальні, антисклеротичні, діуретичні, протиглистні, протипухлинні властивості, стимулюють апетит, виділення шлункового соку

і жовчі, сприяють нормалізації флори кишечника, розширюють кровоносні судини і знижують тиск, уповільнюють ритм серця, підвищують статеву активність тощо [3].

Мета дослідження – визначити якісний склад та кількісний вміст вільних і зв'язаних амінокислот у часнику цибулинах та листі.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктами дослідження були часнику цибулини та листя, заготовлені в Інституті овочівництва і баштництва НАН України у 2016–2017 рр.

Вільні та зв'язані амінокислоти визначали в сировині, яку досліджували, методом високо-ефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), основаним на екстракції вільних амінокислот із рослинної сировини і кислотному гідролізі рослинних препаратів з наступним аналізом гідролізатів методом ВЕРХ із передколунковою дериватизацією 9-флуоренілметоксикарбоніл хлоридом (FMOC) та *o*-фталевим альдегідом (OPA) з наступною детекцією флуоресцентним детектором.

Хроматографічне розділення проводили на рідинному хроматографі Agilent 1200 ("Agilent technologies", США). Довжина колонки Zorbax AAA – 150 мм, внутрішній діаметр – 4,6 мм, діаметр зерна сорбенту – 3 мкм. Мобільна фаза А – 40 mM Na₂HPO₄, pH 7.8; В – ACN:MeOH:water (45:45:10, v/v/v). Режим розділення градієнтний із постійною швидкістю потоку 1,5 мл/хв. Температура термостата колонки – 40 °С.

Вільні амінокислоти з наважки сировини екстрагували у віалі з додаванням водного розчину 0,1N кислоти хлористоводневої та витримували на ультразвуковій бані при 50 °С протягом 3 год. Суму вільних і зв'язаних амінокислот

з наважки сировини екстрагували у віалі з додаванням водного розчину 6N кислоти хлористоводневої та поміщали в термостат при 110 °С. Гідроліз проводили протягом 24 год.

0,5 мл відцентрифугованого екстракту/гідролізату упарювали на роторному випаровувачі, тричі промиваючи водою очищеною для видалення кислоти хлористоводневої. Ресуспендували в 0,5 мл води очищеної та фільтрували крізь мембранні фільтри з регенованої целюлози з порами 0,2 мкм.

Одержували флуоресцентні похідні в автоматичному програмованому режимі перед введенням проби в хроматографічну колонку.

Ідентифікацію амінокислот проводили шляхом порівняння часу утримання із сумішшю стандартів амінокислот. Вміст зв'язаних амінокислот визначали шляхом віднімання вмісту вільних амінокислот від їх загального вмісту.

Вміст амінокислот (X, мкг/мг) розраховували за формулою:

$$X = \frac{C \times V_{\text{розч}}}{m_{\text{преп}}} [\text{mkg/mg}],$$

де С – концентрація за даними хроматографічної системи, мкг/мл; V_{розч} – об'єм розчинника для екстракції, мл; m_{преп} – наважка препарату, мг [4–9].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати визначення якісного складу та кількісного вмісту амінокислот у часнику цибулинах і листі наведено на рисунках 1–4 та в таблицях 1, 2.

Як видно на рисунках 1, 2 та в таблиці 1, у результаті проведеного хроматографічного дослідження в часнику цибулинах у вільному і зв'язаному стані виявлено та визначено вміст

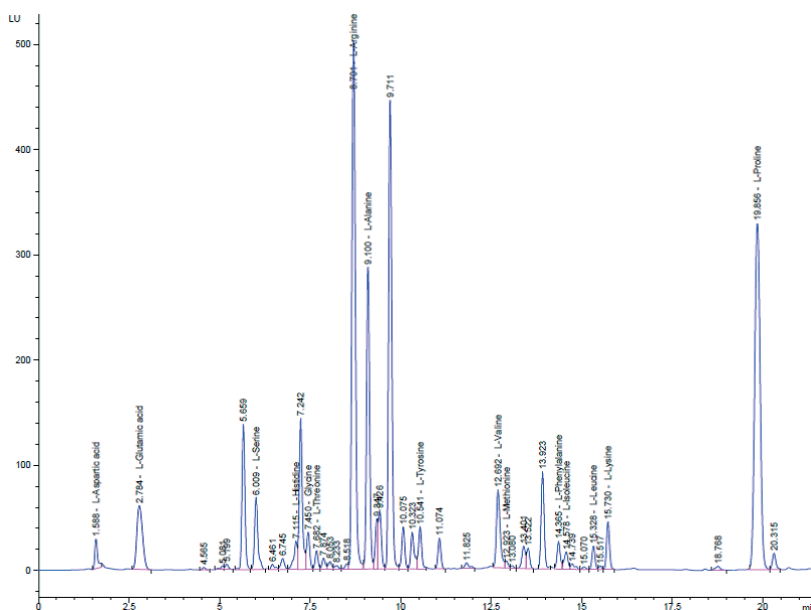


Рис. 1. ВЕРХ-хроматограма визначення вільних амінокислот у часнику цибулинах.

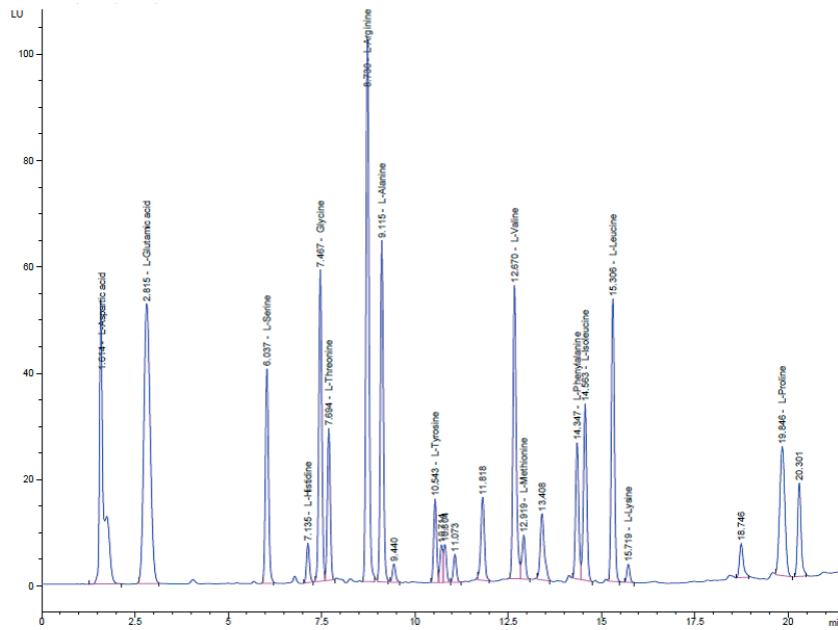


Рис. 2. ВЕРХ-хроматограма визначення суми вільних і зв'язаних амінокислот у часнику цибулинах.

Таблиця 1 – Результати визначення вмісту вільних і зв'язаних амінокислот у часнику цибулинах

№ з/п	Час утримання, хв	Назва амінокислоти	Вміст амінокислоти, %		
			сума	вільні	зв'язані
1	1,59	Аспарагінова кислота	6,19	0,13	6,06
2	2,78	Глутамінова кислота	11,28	0,69	10,59
3	6,01	Серин	2,42	0,26	2,15
4	7,12	Гістидин	1,44	0,35	1,09
5	7,45	Гліцин	2,55	0,10	2,45
6	7,68	Треонін	1,83	0,07	1,76
7	8,70	Аргінін	8,97	3,04	5,94
8	9,10	Аланін	3,20	0,85	2,36
9	10,54	Тирозин	1,49	0,25	1,24
10	12,69	Валін	2,91	0,26	2,65
11	12,92	Метіонін	0,63	0,03	0,61
12	14,37	Фенілаланін	2,15	0,14	2,02
13	14,58	Ізолейцин	2,17	0,07	2,10
14	15,33	Лейцин	3,38	0,08	3,30
15	15,73	Лізін	0,90	0,73	0,17
16	19,86	Пролін	1,84	1,56	0,28

Таблиця 2 – Результати визначення вмісту вільних і зв'язаних амінокислот у часнику листі

№ з/п	Час утримання, хв	Назва амінокислоти	Вміст амінокислоти, %		
			сума	вільні	зв'язані
1	1,62	Аспарагінова кислота	13,84	0,93	12,90
2	2,78	Глутамінова кислота	30,60	2,11	28,49
3	6,01	Серин	4,87	0,95	3,92
4	7,11	Гістидин	2,81	0,99	1,81
5	7,45	Гліцин	5,34	0,13	5,21
6	7,67	Треонін	5,46	1,44	4,02
7	8,71	Аргінін	5,55	0,77	4,79
8	9,10	Аланін	7,00	1,37	5,63
9	10,54	Тирозин	2,91	0,76	2,16
10	12,67	Валін	6,93	1,77	5,16
11	12,92	Метіонін	1,20	–	1,20
12	14,34	Фенілаланін	6,41	1,44	4,97
13	14,55	Ізолейцин	6,48	1,52	4,95
14	15,30	Лейцин	9,40	1,79	7,61
15	15,73	Лізін	1,52	0,87	0,65
16	19,86	Пролін	2,06	1,28	0,79

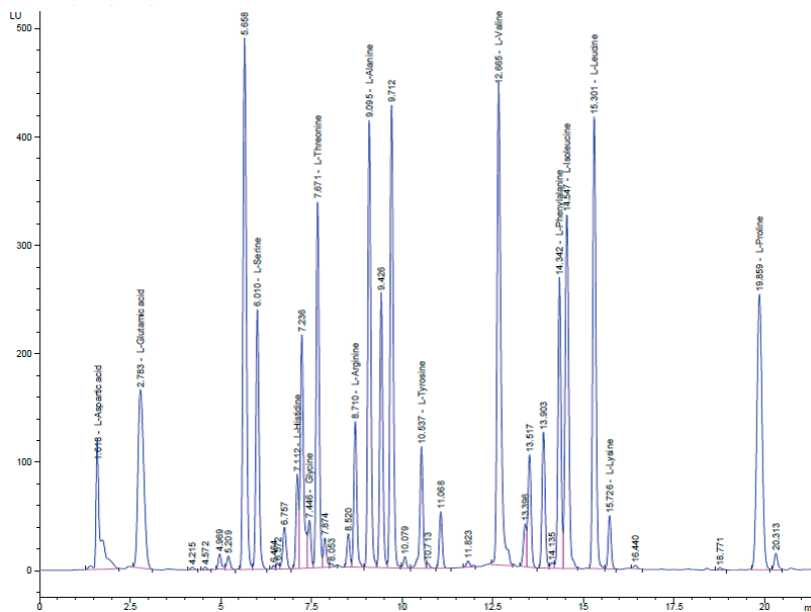


Рис. 3. ВЕРХ-хроматограма визначення вільних амінокислот у часнику листі.

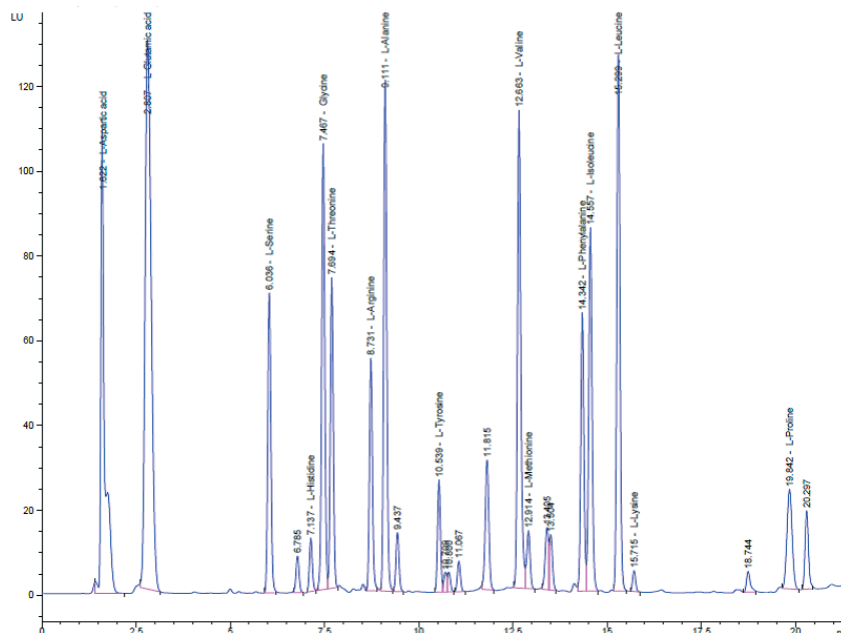


Рис. 4. ВЕРХ-хроматограма визначення суми вільних і зв'язаних амінокислот у часнику листі.

16 амінокислот. У вільному стані у великій кількості накопичуються аргінін (3,04 %) і пролін (1,56 %), у зв'язаному – глютамінова кислота (10,59 %), аспарагінова кислота (6,06 %) та аргінін (5,94 %).

Результати досліджень часнику листя, наведені на рисунках 3, 4 й у таблиці 2, показали, що в сировині, яку вивчали, ідентифіковано та визначено вміст 15 вільних і 16 зв'язаних амінокислот. Серед вільних амінокислот у великій кількості в часнику листі накопичуються глютамінова кислота (2,11 %), лейцин (1,79 %), валін (1,77 %), ізолейцин (1,52 %), треонін і фенілаланін (1,44 %). Серед зв'язаних амінокислот за кількісним вмістом переважають глютамінова

кислота (28,49 %), аспарагінова кислота (12,90 %) та лейцин (7,61 %). Як показали результати досліджень, метіонін у часнику листі міститься тільки у зв'язаному стані.

ВИСНОВКИ. 1. Методом вискоєфективної рідинної хроматографії визначено амінокислотний склад у часнику цибулинах і листі.

2. У часнику цибулинах у вільному та зв'язаному стані виявлено і визначено вміст 16 амінокислот, а в часнику листі – 15 вільних та 16 зв'язаних амінокислот.

3. Результати досліджень показали, що метіонін у часнику листі міститься тільки у зв'язаному стані.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Смирнов В. А. Аминокислоты и полипептиды : учеб. пособие. / В. А. Смирнов, Ю. Н. Климошкин. – Самара : Самар. гос. техн. ун-т, 2007. – Ч. 1. – 110 с.
2. Делян Є. П. Амінокислотний склад надземних органів рослин роду *Sonchus* / Є. П. Делян // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2016. – № 1 (47). – С. 102–106.
3. Лекарева А. Ф. Современный травник. Лекарственные растения и их применение / А. Ф. Лекарева. – М. : Этерна, 2006. – 384 с.
4. Rapid, accurate, sensitive, and reproducible HPLC analysis of amino acids. Amino acid analysis using Zorbax Eclipse-AAA columns and the Agilent 1100 HPLC / J. W. Henderson, R. D. Ricker, B. A. Bidlingmeyer, C. Woodward // Agilent Technical Note. – 1999. – 5980. – P. 1193E.
5. Jámbor A. Quantitation of amino acids in plasma by high performance liquid chromatography: Simultaneous deproteinization and derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride / A. Jámbor, I. Molnár-Perl // Journal of Chromatography A. – 2009. – 1216. – P. 6218–6223.
6. Jámbor A. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride. Literature overview and further study / A. Jámbor, I. Molnár-Perl // Journal of Chromatography A. – 2009. – 1216. – P. 3064–3077.
7. The carbohydrates and aminoacids study in common lilac of Charles Joile variety flowers and leaves / A. Popyk, V. Kyslychenko, V. Korol [et al.] // American Journal of Science and Technologies. – 2015. – № 2 (20). – P. 779–785.
8. Вивчення амінокислотного складу трави десмодіуму канадського сорту *Persei* / Д. О. Мезенцев, В. С. Кисличенко, Н. Є. Бурда [та ін.] // ScienceRise : Pharmaceutical Science. – 2016. – № 3 (3). – С. 13–15.
9. Порівняльне вивчення амінокислотного та мінерального складу листя *Prunus persica*, заготовленого в Таджикистані та Україні / Г. Ф. Наврузова, Л. В. Ленчик, В. С. Кисличенко [та ін.] // Фармац. часоп. – 2016. – № 1. – С. 30–33.

REFERENCES

1. Smirnov, V.A., & Klimochkin, Yu.N. (2007). *Aminokisloty i polipeptidy: ucheb. posob. Ch. I.* [Amino acids and polypeptides: a study guide. Part I.] Samara: Samara State Technical University [in Russian].
2. Delian, Ye.P. (2016). *Aminokyslotnyi sklad nadzemnykh orhaniv roslyn rodu Sonchus* [Amino acid composition of above-ground organs of the genus *Sonchus*]. *Farmakol. ta lik. toksykol. – Pharmacology and Drug Toxicology*, 1 (47), 102-106 [in Ukrainian].
3. Lekareva, A.F. (2006) *Sovremennyyi travnik: Lekarstvennyye rasteniya i ikh primenenie* [Modern herbalist: Medicinal plants and their use]. Moscow: Izd-vo "Eterna" [in Russian].
4. Henderson, J.W., Ricker, R.D., Bidlingmeyer, B.A., & Woodward, C. (1999). Rapid, accurate, sensitive, and reproducible HPLC analysis of amino acids. Amino acid analysis Using Zorbax Eclipse-AAA Columns and the Agilent 1100 HPLC. *Agilent Technical Note*, 5980–1193E.
5. Jámbor, A., & Molnár-Perl, I. (2009). Quantitation of aminoacids in plasma by high performance liquid chromatography: Simultaneous deproteinization and derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride. *J. Chromatogr. A*, 6218-6223.
6. Jámbor, A., & Molnár-Perl, I. (2009). Aminoacid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride. Literature overview and further study. *J. Chromatogr. A*, 3064-3077.
7. Popyk, A., Kyslychenko, V., Korol, V., & Gurieva, I. (2015). The carbohydrates and aminoacids study in common lilac of Charles Joile variety flowers and leaves. *American Journal of Science and Technologies*, 2 (20), 779-785.
8. Mezentsev, D.O., Kyslychenko, V.S., Burda, N.Ye., & Diakonova, Ya.V. (2016). Vyvchennia aminokyslotnoho skladu travy desmodiumu kanadskoho sortu *Persei* [Study of the amino acid composition of *Perseid* grass *desmodium*]. *ScienceRise. Farmatsevtichni nauky – ScienceRise. Pharmaceutical studies*, 3 (3), 13-15 [in Ukrainian].
9. Navruzova, H.F., Lenchik, L.V., Kyslychenko, V.S., Sharyfov, Kh.Sh., & Diakonova, Ya.V. (2016). Porivnialne vyvchennia aminokyslotnoho ta mineralnoho skladu lystia *Prunus persica*, zahotovlenoho v Tadzhykystani ta Ukraini [Comparative study of the amino acid and mineral composition of *Prunus persica* leaves prepared in Tajikistan and Ukraine]. *Farmatsevt. Chasop. – Pharmaceutical Journal*, (1), 30-33 [in Ukrainian].

А. И. Федосов, В. С. Кисличенко, Е. Н. Новосел
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ АМИНОКИСЛОТ В ЧЕСНОКА ЛУКОВИЦАХ И ЛИСТЬЯХ

Резюме

Вступлення. Растительные аминокислоты имеют большое влияние на функционирование различных систем и органов человеческого организма. Кроме этого, они проявляют широкие фармакотерапев-

тические свойства, способствуют более быстрому усвоению и потенцируют действие биологически активных веществ, содержащихся в растениях. Поэтому актуальным является поиск видов растений, которые накапливают в значительном количестве аминокислоты и широко используются в пищу. К таким растениям принадлежит чеснок посевной (*Allium sativum* L.) семейства луковые (*Alliaceae*), который издавна применяют для лечения разных заболеваний.

Цель исследования – определить качественный состав и количественное содержание свободных и связанных аминокислот в чесноке луковицах и листьях.

Методы исследования. Аминокислотный состав определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты и обсуждение. В результате проведенного хроматографического исследования в чесноке луковицах определено содержание 16 аминокислот. В свободном состоянии в большом количестве накапливаются аргинин (3,04 %) и пролин (1,56 %), в связанном – глутаминовая кислота (10,59 %), аспарагиновая кислота (6,06 %) и аргинин (5,94 %). В чесноке листьях идентифицировано и определено содержание 15 свободных и 16 связанных аминокислот. Среди свободных аминокислот в большом количестве накапливаются глутаминовая кислота (2,11 %), лейцин (1,79 %), валин (1,77 %), изолейцин (1,52 %), треонин и фенилаланин (1,44 %), в связанном – глутаминовая кислота (28,49 %), аспарагиновая кислота (12,90 %) и лейцин (7,61 %). Метионин в чесноке листьях содержится только в связанном состоянии.

Выводы. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определен аминокислотный состав в чесноке луковицах и листьях. В чесноке луковицах в свободном и связанном состоянии обнаружено и определено содержание 16 аминокислот, а в чесноке листьях – 15 свободных и 16 связанных аминокислот. Результаты исследований показали, что метионин в чесноке листьях содержится только в связанном состоянии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: чеснок посевной; аминокислотный состав; высокоэффективная жидкостная хроматография.

A. I. Fedosov, V. S. Kyslychenko, O. M. Novosel
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

DETERMINATION OF QUALITATIVE COMPOSITION AND QUANTITATIVE CONTENT OF AMINO ACIDS IN GARLIC BULBS AND LEAVES

Summary

Introduction. Plant amino acids have an important impact on functioning of various systems and organs of human body. In addition, they possess a wide range of pharmacotherapeutic properties, improve the digestion and potentiate the activity of biologically active compounds present in plants. Thus, the search of plant species that contain a large complex of plant amino acids and are used as food is of current interest. Garlic (*Allium sativum* L.) from *Alliaceae* family is one of such plants, and has been used since ancient times for the treatment of various disorders.

The aim of the study – to determine the composition and quantitative content of free and bound amino acids of garlic bulbs and leaves.

Research Methods. The amino acid composition was determined using the high-performance liquid chromatography (HPLC) method.

Results and Discussion. 16 amino acids were detected in garlic bulbs as a result of the experiment. Arginine (3.04 %) and proline (1.56 %) were found to be accumulated in free state, while glutamic acid (10.59 %), aspartic acid (6.06 %) and arginine (5.94 %) prevailed in bound state. 15 free and 16 bound amino acids were identified and quantified in garlic leaves. Glutamic acid (2.11 %), leucine (1.79 %), valine (1.77 %), isoleucine (1.52 %), treonine and phenylalanine (1.44 %) dominated in free state, and glutamic acid (28.49 %), aspartic acid (12.90 %) and leucine (7.61 %) prevailed in bound state. Methionine was found only in bound state in garlic leaves.

Conclusions. The amino acid composition of garlic bulbs and leaves was studied using the HPLC method. 16 amino acids in both free and bound state were detected and their content was determined in garlic bulbs, while in garlic leaves – 15 free and 16 bound amino acids. The results of the experiment showed that methionine is present only in bound state in garlic leaves.

KEY WORDS: garlic; amino acid composition; high-performance liquid chromatography.

Отримано 12.07.17

Адреса для листування: А. І. Федосов, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, e-mail: fedosov.a@ukr.net.