

УДК 615.322+615.07

ИССЛЕДОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО ПРОФИЛЯ *ZINGIBER OFFICINALE* (ZINGIBERACEAE) МЕТОДАМИ ТОНКСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Н.И. Савицкий^{1*}, А.Б. Легостева¹

Резюме. Извлечения из корневищ имбиря (*Zingiber officinale*) широко применяются в производстве биологически активных добавок и в пищевой промышленности. В дополнение к эфирным маслам и фенольным соединениям имбирь также богат аминокислотами. Для идентификации аминокислотного профиля проведен качественный и количественный анализ корневищ имбиря. В результате проведенных экспериментов методом тонкослойной хроматографии идентифицированы следующие аминокислоты: аргинин, гистидин, глутаминовая кислота, изолейцин, валин, пролин, лейцин, метионин. Посредством спектрофотометрического анализа определено количество аминокислот – 10,22%. Относительная ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет 1,89%. Таким образом, можно сделать вывод о дальнейшем исследовании и совершенствовании подходов к стандартизации корневищ имбиря, а также созданию новых лекарственных форм на его основе.

Ключевые слова: корневище имбиря, аминокислоты, качественный анализ, тонкослойная хроматография, количественный анализ, спектрофотометрия.

INVESTIGATION OF AMINO ACID PROFILE *ZINGIBER OFFICINALE* (ZINGIBERACEAE) BY THE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY AND SPECTROPHOTOMETRIC METHODS

N.I. Savitskiy^{1*}, A.B. Legosteva¹

Abstract. Extracts from rhizomes of ginger (*Zingiber officinale*) are widely used in the production of biologically active additives and in the food industry. In addition to essential oils and phenolic compounds, ginger is also rich in amino acids. To identify the amino acid profile, a qualitative and quantitative analysis of the rhizomes of ginger was carried out. As a result of the experiments, the following amino acids were identified by thin-layer chromatography: arginine, histidine, glutamic acid, isoleucine, valine, proline, leucine, methionine. By means of spectrophotometric analysis, the number of amino acids was determined to be 10.22%. The relative error of the single definition with a confidence probability of 95% is 1.89%. Thus, we can conclude that further research and improvement of approaches to standardization of rhizomes of ginger, as well as the creation of new dosage forms based on it.

Keywords: ginger rhizome, amino acids, qualitative analysis, thin layer chromatography, quantitative analysis, spectrophotometry.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 14, лит. А

1 – Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, 14, Prof. Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: savizkiy.nikolay@pharminnotech.com

Тел.: 8 (911) 247 82 93

ВВЕДЕНИЕ

Имбирь (*Zingiber officinale*) – многолетнее травянистое растение с мощной корневой системой, широко культивируется в теплых климатических регионах мира, таких как Нигерия, Бангладеш, Тайвань, Индия, Ямайка и США. Корневище содержит комплекс биологически активных соединений, таких как куркумин, 6-гингерол, 6-шогаол, зингиберен, бисаболон и другие вещества, которые придают имбирю целебные свойства [1, 2].

Издrevле и до настоящих времен имбирь (рисунок 1) широко применяется как приправа к блюдам благодаря своему пряному аромату и острому вкусу, а также при консервировании пищевых продуктов. Его используют для лече-

ния нарушения обмена веществ, диабета, гипертонии, рака и многих других заболеваний [3]. Включение имбиря в рацион приводит к снижению уровня холестерина, уменьшению образования тромбов и сгустков в крови, а также служит противовоспалительным средством [4]. В медицинской практике имбирь применяют в качестве обезболивающего, противорвотного, противоязвенного, жаропонижающего средства и многих других [5–7].

Таким образом, исследование аминокислотного профиля корневищ имбиря является актуальным с точки зрения производства эффективных биологически активных добавок и лекарственных средств.

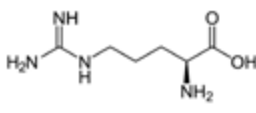
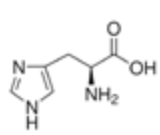


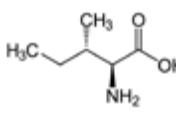
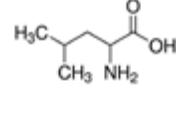
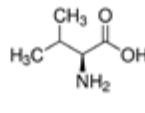
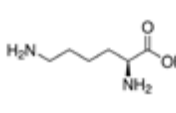
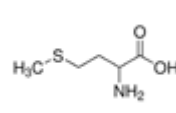
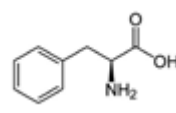
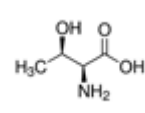
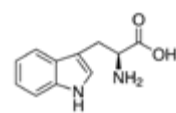
Рисунок 1. Корневище имбиря

В природе аминокислоты встречаются либо в свободной форме, либо в линейных цепях пептидов и белков. В общей сложности в природе встречаются 20 протеиногенных аминокислот, которые кодируются генетическим кодом и включаются в белки в процессе трансляции, а также являются строительными блоками и жизненно важными компонентами всех биологических систем [8, 9]. Человек способен синтезировать 12 из 20 аминокислот, кодируемых универсальным генетическим кодом, остальные 8, названные незаменимыми, должны быть получены с пищей: изолейцин, лизин, лейцин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан и валин. Они должны быть включены в дневной рацион для поддержания оптимальных клеточных и физиологических функций. Поэтому их прием способен оказывать благоприятное воздействие на организм человека. Аминокислоты оказывают большое влияние на людей и животных и обладают сильным терапевтическим потенциалом. В результате анализа научной литературы, а также консультации с фармакологами составлена таблица значения некоторых аминокислот для здоровья человека (таблица 1).

Таблица 1.

Значение ряда аминокислот для здоровья человека

Аминокислота	Действие на организм
<p>Аргинин</p> 	Устраняет токсическое воздействие аммиака в организме и помогает в производстве креатина – аминокислоты, которая преобразуется в аденозинтрифосфат и используется для получения энергии. Также обладает сосудорасширяющим свойством и может помочь в лечении атеросклероза, сосудистых заболеваний, сердечной недостаточности, головной боли [10].
<p>Гистидин</p> 	Необходим для производства гистамина – вещества, помогающего иммунной системе эффективно бороться с патогенами. Также помогает в синтезе клеток крови, лечении ревматоидного артрита и высокого кровяного давления [10].

<p>Изолейцин</p>  <p>Лейцин</p>  <p>Валин</p> 	Изолейцин, лейцин и валин – структурированные аминокислоты. Работая вместе, они обеспечивают мышцы энергией, увеличивают физическую выносливость и участвуют в процессах регенерации поврежденной мышечной и костной тканей. Изолейцин совместно с лейцином также контролирует уровень сахара в крови [10].
<p>Лизин</p> 	Необходим для общего роста и синтеза карнитина – питательного вещества, снижающего уровень холестерина и конвертирующего жирные кислоты в энергию. Помогает усвоению кальция и образованию коллагена, который играет важную роль в структуре костей и соединительной ткани организма [10].
<p>Метионин</p> 	Антиоксидант, помогает процессам детоксикации печени и защите толстой кишки. Разрушает жиры, помогает синтезировать нуклеиновые кислоты, белки и коллаген. Улучшает состояние пациентов с остеопорозом, аллергией, ревматизмом [10].
<p>Фенилаланин</p> 	Замедляет скорость расщепления эндорфинов в организме, тем самым способствует расширенному облегчению боли. Позволяет уменьшить боль от менструации, артрита, травм спины. Лечит депрессию, улучшает память, регулирует аппетит, способствует мозговой активности [10].
<p>Треонин</p> 	Участвует в регуляции настроения, предотвращении накопления жира в печени, а также в стимуляции иммунной системы. Обладает противовоспалительными свойствами. Необходим для формирования зубной эмали, коллагена и эластина [10].
<p>Триптофан</p> 	Помогает младенцам в период роста, поддерживает баланс азота у взрослых. Совместно с ниацином и серотонином стабилизирует настроение и способствует здоровому сну. Участвует в формировании коллагена, зубной эмали, эластина, а также стимулирует иммунную систему [10].

В качестве инструмента обнаружения и идентификации аминокислот выбран метод тонкослойной хроматографии (ТСХ), обладающий доступностью, наглядностью, информативностью и простотой проведения анализа. Для количественного определения

суммы α-аминокислот в лекарственном растительном сырье использован спектрофотометрический метод определения, основанный на исследовании спектральных характеристик продуктов нингидриновой реакции (реакция Руэмманна) (рисунки 2, 3).

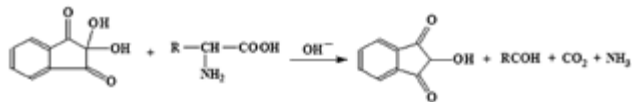


Рисунок 2. Первая стадия нингидриновой реакции

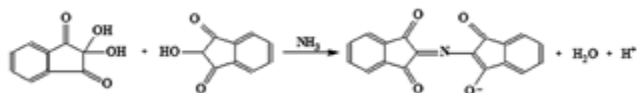


Рисунок 3. Вторая стадия нингидриновой реакции

α-Аминокислоты реагируют с нингидрином (гидрат 1,2,3-ин-дантриона), образуя окрашенный комплекс (пурпур Руэмманна), интенсивность окраски которого пропорциональна количеству аминокислоты.

Образующееся соединение имеет фиолетово-голубую окраску. Пролин и гидроксипролин, у которых нет α-аминогруппы, в реакции с нингидрином образуют производные желтого цвета. Реакция с нингидрином используется также для визуального обнаружения α-аминокислот на хроматограммах (на бумаге, в тонком слое).

Целью данной работы является установление качественного состава и количественного содержания аминокислот в ходе комплексного фитохимического исследования сырья – корневищ имбиря.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили 5 образцов корневищ имбиря, выращенных и собранных на плантациях Китая в 2016 году. Сушку производили при температуре 40 °С до остаточной влажности не более 12%.

Качественный состав аминокислот корневищ имбиря проводили методом ТСХ в восходящем токе растворителей (ОФС.1.2.1.2.0003.15 «Тонкослойная хроматография»). Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента».

По данным научной литературы (таблица 2) для наших исследований подобрана система растворителей с наибольшим значением полярности, позволяющая наиболее полно разделить и идентифицировать аминокислоты: н-бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4:1:1).

Время предварительного насыщения камеры – 60 мин. В качестве неподвижной фазы применяли пластинки марки Sorbfil (ПТСХ-П-А-УФ, 10×15 см) на полимерной основе (полиэтилентерефталат) с нанесенным рабочим слоем фракционированного широкопористого силикагеля. Детектирование проводили 0,1% раствором нингидрина в ацетоне (0,1 г нингидрина смешивали с 60 мл ацетона, добавляли 0,5 мл уксусной кислоты ледяной, перемешивали и доводили объем раствора до 100 мл) с последующим нагреванием пластинок при t=100 °С в течение 2–3 мин. Рабочими стандартными образцами (РСО) аминокислот служили: гистидин, аргинин, глутаминовая кислота, изолейцин, валин, пролин, метионин, лейцин (субстанция-порошок, ч.д.а., ЗАО «Вектон», Россия). 1% растворы аминокислот получали в 0,01 М фосфатном буфере (pH 8,0). Извлечения из исследуемого сырья наносили на стартовую линию микрошприцем в количествах 20 мкл и 10 мкл для рабочих стандартных образцов. Время хроматографирования при температуре 21±1 °С – около 50 мин.

Таблица 2.

Характеристика некоторых систем ТСХ для разделения аминокислот

№	Элюент	Соотношение растворителей	Полярность
1	н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода	8:2:1	4,79
2	н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода	4:1:1	5,13
3	н-бутанол – диэтиловый эфир – ледяная уксусная кислота – вода	18:12:6:2	4,22
4	96% этанол – концентрированный аммиак	32:5	4,54
5	хлороформ – метанол – 10% раствор аммиака	2:2:1	4,41

Для проведения количественного анализа аминокислот спектрофотометрическим методом получили извлечение из корневищ имбиря по предложенной методике: около 2,0 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм (ТУ 14-4-16-917), помещали в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл, добавляли 50 мл воды очищенной. Затем колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 3 ч, после чего содержимое колбы охлаждали до комнатной температуры и фильтровали сначала через вату, а затем через беззольный бумажный фильтр («красная лента») в мерную колбу вместимостью 50 мл. Раствор доводили водой до метки.

0,5 мл полученного извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 1 мл 0,25% раствора натрия карбоната, 2 мл 2% спиртового раствора нингидрина и нагревали 15 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения раствор доводили водой до метки.

Параллельно в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 0,5 мл раствора РСО кислоты глутаминовой и далее поступали, как описано выше. Оптическую плотность полученных растворов измеряли на однолучевом спектрофотометре UV-mini-1240 (Shimadzu, Япония) в максимуме поглощения при длине волны 568 нм.

Приготовление раствора РСО глутаминовой кислоты: 0,05 г кислоты глутаминовой (ВФС 42-2722-96) (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 30 мл воды и доводили водой до метки (раствор А). Раствор годен в течение 1 мес. при хранении в темном прохладном месте.

Приготовление 2% раствора нингидрина в 96% спирте этиловом: в мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 2,0 г нингидрина (ТУ 6-09-10-1384-79), растворяли в 30 мл 96% спирта этилового, затем доводили тем же растворителем до метки. Раствор годен в течение 1 мес. при хранении в темном месте.

Приготовление 0,25% раствора натрия карбоната: 0,25 г натрия карбоната безводного (ГОСТ 83-79) растворяли в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали. Срок годности раствора 2 месяца.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты ТСХ представлены на рисунке 4.

Для каждого вещества рассчитывали фактор удержания (R_f) и фиксировали цвет (таблица 3). Таким образом, по результатам ТСХ в восходящем токе растворителей обнаружено не менее 10 аминокислот, 8 из которых удалось идентифицировать: аргинин, гистидин, глутаминовую кислоту, изолейцин, валин, пролин, лейцин, метионин.

Для определения суммы аминокислот в сырье использовали методику, основанную на реакции взаимодействия аминокислот с раствором нингидрина и последующем спектрофотометрировании полученного окрашенного комплекса. Содержание суммы свободных аминокислот корневищ имбиря в процентах (X , %) в пересчете на абсолютно сухое сырье и кислоту глутаминовую рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot m_{CT} \cdot 50 \cdot 100}{A_{CT} \cdot m \cdot 0,5 \cdot (100 - W)},$$

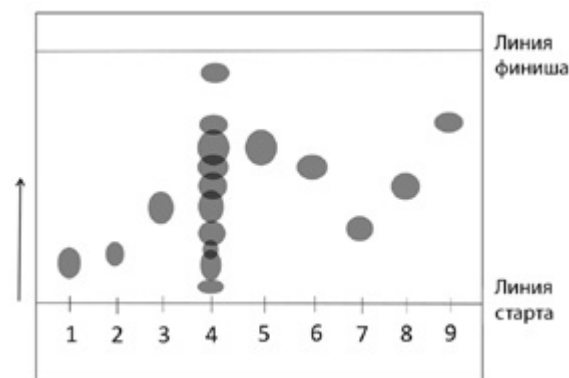


Рисунок 4. Хроматограмма качественного анализа аминокислот корневищ имбиря:

1 – гистидин; 2 – аргинин; 3 – глутаминовая кислота; 4 – извлечение корневищ имбиря; 5 – изолейцин; 6 – валин; 7 – пролин; 8 – метионин; 9 – лейцин

где A_x – оптическая плотность извлечения; A_{CT} – оптическая плотность раствора РСО глутаминовой кислоты; m_{CT} – навеска РСО кислоты глутаминовой, г; m – навеска корневищ имбиря, г; W – содержание влаги, %.

Таблица 3.

Параметры хроматографирования аминокислот методом ТСХ

№ п/п	Аминокислота	Окраска пятен	$R_f \pm 0,01$	Структурная формула
1	Аргинин	Красно-фиолетовая	0,16	
2	Валин	Розовая	0,44	
3	Гистидин	Бледно-коричневая	0,12	
4	Глутаминовая	Сиренево-розовая	0,31	
5	Изолейцин	Красно-коричневая	0,53	
6	Лейцин	Коричневая	0,61	
7	Метионин	Бледно-коричневая	0,51	
8	Пролин	Желтая	0,24	

Данные количественного анализа аминокислот представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Результаты количественного определения аминокислот корневищ имбиря спектрофотометрическим методом

№ исследуемого извлечения	Сумма аминокислот, %
1	10,31±0,26
2	10,22±0,26
3	10,25±0,25
4	10,20±0,26
5	10,12±0,28
Среднее	10,22±0,26

Изучение качественного и количественного состава сырья показывает, что корневище имбиря содержит значительное количество аминокислот, необходимых для жизнедеятельности организма. Данный растительный материал требует дальнейшего изучения его биологической активности с целью совершенствования подходов к стандартизации корневищ имбиря и возможного расширения показаний к применению лекарственных форм на его основе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые методом тонкослойной хроматографии в восходящем токе растворителей исследован аминокислотный профиль корневищ имбиря. Обнаружено не менее 10 аминокислот, 8 удалось идентифицировать: аргинин, гистидин, глутаминовую кислоту, изолейцин, валин, пролин, лейцин, метионин, 4 из которых незаменимы для взрослого человека, а выявленные аргинин и гистидин способствуют правильному развитию детского организма.
2. Предложена методика количественного определения аминокислот корневищ имбиря спектрофотометрическим методом, впервые установлена сумма последних – 10,22±0,26%.
3. Результаты исследования аминокислотного состава корневищ имбиря свидетельствуют о перспективе создания инновационных биологически активных добавок и лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. B. Tepe, M. Sokmen, H.A. Akpulat, A. Sokmen. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey // *Food Chemistry*. 2006. V. 95(2). P. 200–204.

2. M. Yoshikawa, S. Hatakeyama, N. Chatani, Y. Nishino, J. Yamahara. Qualitative and quantitative analysis of bioactive principles in *Zingiberis rhizoma* by means of high performance liquid chromatography and gas liquid chromatography. On the evaluation of *Zingiberis rhizoma* and chemical change of constituents during *Zingiberis rhizoma* processing // *Yakugaku Zasshi*. 1993. V. 113(4). P. 307–315.
3. H. Bliddal, A. Rosetzky, P. Schlichting et al. A randomized, placebo-controlled, cross-over study of ginger extracts and Ibuprofen in osteoarthritis // *Osteoarthritis and Cartilage*. 2000. V. 8(1). P. 9–12.
4. N. Mascolo, R. Jain, S.C. Jain, F. Capasso. Ethnopharmacologic investigation of ginger (*Zingiber officinale*) // *Journal of Ethnopharmacology*. 1989. V. 27(1–2). P. 129–140.
5. S. Phillips, R. Ruggier, S.E. Hutchinson. Forum. *Zingiber officinale* (Ginger) –an antiemetic for day case surgery // *Anaesthesia*. 1993. V. 48(8). P. 715–717.
6. U. Jana, R.N. Chattopadhyay, B.P. Shaw. Preliminary studies on anti-inflammatory activity of *Zingiber officinale* Rosc., *Vitex negundo* Linn. and *Tinospora cordifolia* (Willid) Miers in albino rats // *Indian Journal of Pharmacology*. 1999. V. 31(3). P. 232–233.
7. J.R. Okalebo, K.W. Gathua, P.L. Woomer. *Laboratory Methods of Soil and Plant Analysis: A Working Manual*. 2nd ed. – Nairobi, Kenya: TSBF-CIAT and SACRED Africa. 2002.
8. D. Bercovici, F. Fuller. Industrial amino acids in nonruminant animal nutrition // *Biotechnology in animal feeds and animal feeding* / Ed. by R.J. Wallace, A. Chesson. – Weinheim: VCH. 1995. P. 93–113.
9. A. Ambrogelly, S. Palioura, D. Söll. Natural expansion of the genetic code // *Nat Chem Biol*. 2007, V. 3. P. 29–35.
10. E.N. Marieb. *Essentials of Human Anatomy and Physiology*. 10th ed. – San Francisco: Benjamin Cummings, 2012.
11. О.Ю. Щепочкина, Н.Б. Демина, А.А. Жогова, М.Н. Анурова, О.Ю. Вальчихина, А. Надер. Определение биологически активных веществ в сухом экстракте имбиря лекарственного (*Zingiber officinale* Roscoe) // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015. № 2(11). С. 160–164.
12. О.Ю. Вальчихина, А. Надер, Н.Б. Демина. Корневище имбиря как перспективное растительное сырье для создания лекарственных средств // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015. № 4(13). С. 82–90.