

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОФИЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПЛОДОВ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

О. В. Тринеева^{1*}, М. А. Рудая¹, А. И. Сливкин¹

¹ – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская пл., 1

*Контактное лицо: Тринеева Ольга Валерьевна. E-mail: trineevaov@mail.ru

Статья получена: 26.10.2018. Статья принята к печати: 19.12.2018

Резюме

Введение. В настоящее время принято считать, что род облепихи насчитывает 15 видов и подвидов, но только 4 из них нашли широкое применение на практике: китайский подвид (*sinensis*), европейский (*rhamnoides*), среднеазиатский (*turkestanica*) и сибирский (*mongolica*). Плоды облепихи крушиновидной имеют сложный химический состав, представленный такими группами биологически активных веществ (БАВ), как флавоноиды, аминокислоты, органические кислоты, дубильные вещества, водо- и жирорастворимые витамины, полисахариды, легкоусвояемые сахара. Большинство сортов облепихи выведено в НИИ садоводства Сибири им. М. А. Лисавенко. Однако, биохимический состав сортов, адаптированных для произрастания в условиях средней полосы Европейской части России, изучены мало.

Цель. Задачей являлось исследование профиля БАВ плодов облепихи крушиновидной различных сортов, произрастающих в условиях средней полосы Европейской части России, методом капиллярного электрофореза.

Материалы и методы. Проведено исследование профиля БАВ (свободных органических кислот и сахаров, а также свободных и связанных аминокислот) плодов облепихи крушиновидной различных сортов методом капиллярного электрофореза. Проведено определение суммы свободных органических кислот, аминокислот, свободных и связанных сахаров.

Результаты и обсуждение. Различные сорта имеют свои фитохимические особенности. Сахарно-кислотный индекс плодов облепихи крушиновидной изучаемых сортов варьировал от 0,9 до 2,01, что свидетельствует об их принадлежности к группе кислых по существующей градации.

Заключение. В целом, качественный состав БАВ изучаемых сортов сходен между собой, но различается количественно. Выявлены сорта с максимальным и минимальным содержанием исследуемых групп БАВ.

Ключевые слова: плоды облепихи крушиновидной, капиллярный электрофорез, органические кислоты, аминокислоты, сахара.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Тринеева О. В., Рудая М. А., Сливкин А. И. Исследование профиля биологически активных веществ плодов облепихи крушиновидной различных сортов методом капиллярного электрофореза. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2019; 8(1): 38–42.

STUDY OF THE PROFILE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF FRUITS OF SEA BUCKTHORN OF DIFFERENT VARIETIES BY THE METHOD OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS

O. V. Trineeva^{1*}, M. A. Rudaya¹, A. I. Slivkin¹

¹ – Voronezh State University, 1, University Sq., Voronezh, 394006, Russia

*Corresponding author: Olga V. Trineeva. E-mail: trineevaov@mail.ru

Received: 26.10.2018. Accepted: 19.12.2018

Abstract

Introduction. Currently, it is considered that the sea buckthorn genus includes 15 species and subspecies, but only 4 of them have found wide application in practice: the Chinese subspecies (*sinensis*), the European (*rhamnoides*), Central Asian (*turkestanica*) and Siberian (*mongolica*). Fruits of sea buckthorn have a complex chemical composition, represented by such groups of biologically active substances (BAS), as flavonoids, amino acids, organic acids, tannins, water- and fat-soluble vitamins, polysaccharides, easily digestible sugars. Most varieties of sea buckthorn bred in the Institute of horticulture Siberia M. A. Lisavenko. However, the biochemical composition of varieties adapted for growing under the conditions of the middle zone of the European part of Russia is little studied.

Aim. The work was to study the BAS profile of the sea-buckthorn fruits of various varieties growing in the middle zone of the European part of Russia, by capillary electrophoresis.

Materials and methods. The study of the profile of biologically active substances (free organic acids and sugars, as well as free and related amino acids) of sea buckthorn fruits of various varieties was carried out by capillary electrophoresis. The determination of the amount of free organic acids, amino acids, free and related sugars.

Results and discussion. Different varieties have their phytochemical features. The sugar-acid index of the sea-buckthorn fruits of the studied varieties varied from 0.9 to 2.01, which indicates that they belong to the acidic group according to the existing gradation.

Conclusion. In general, the qualitative composition of the BAS of the studied varieties is similar to each other, but it differs quantitatively. Identified varieties with a maximum and minimum content of the studied groups of biologically active substances.

Keywords: buckthorn berries, capillary electrophoresis, organic acids, amino acids, sugars.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Trineeva O. V., Rudaya M. A., Slivkin A. I. Study of the profile of biologically active substances of fruits of sea buckthorn of different varieties by the method of capillary electrophoresis. *Drug development & registration.* 2019; 8(1): 38–42.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время принято считать, что род облепихи насчитывает 15 видов и подвидов, но только 4 из них нашли широкое применение на практике: китайский подвид (*sinensis*), европейский (*rhamnoides*),

среднеазиатский (*turkestanica*) и сибирский (*mongolica*). Большое внимание исторически уделяется биохимическому составу плодов облепихи [1, с. 13]. Плоды облепихи крушиновидной (ОК) имеют сложный химический состав, представленный такими группами биологичес-

ки активных веществ (БАВ), как флавоноиды, аминокислоты (АК), органические кислоты, дубильные вещества, водо- и жирорастворимые витамины, полисахариды. Согласно литературным данным, в плодах содержатся легкоусвояемые сахара. Из углеводов в облепихе найдены глюкоза, фруктоза, сахароза. Биохимический состав зависит от места произрастания, времени сбора, сортовых особенностей и других факторов [2, с. 183; 3, с. 11]. Большинство сортов облепихи выведено в НИИ садоводства Сибири им. М. А. Лисавенко. В настоящее время наиболее распространены следующие сорта: «Новость Алтая», «Витаминная», «Золотой початок», «Дар Катуня», «Масличная», «Чуйская», «Оранжевая», «Обильная», «Золотистая», «Превосходная», «Великан», «Самородок», «Янтарная», «Обская» и другие сорта, активно культивируемые в районах Сибири [3, с. 13]. Однако, биохимический состав сортов, адаптированных для произрастания в условиях средней полосы Европейской части России, изучены мало.

Капиллярный электрофорез (КЭ) в последнее время выходит на лидирующие позиции в фармацевтическом анализе в виду таких преимуществ как доступность, экспрессность, наличие отечественной приборной базы, простота определения и невысокая стоимость одного анализа. В случае растительных объектов исследования наиболее часто данный метод применяется при определении качественного и количественного состава таких групп БАВ, как АК, органические кислоты, сахара, макроэлементы, водорастворимые витамины группы В и флавоноиды [4, с. 77, 99, 100, 115].

Цель работы – исследование профиля БАВ плодов облепихи крушиновидной различных сортов, произрастающих в условиях средней полосы Европейской части России, методом капиллярного электрофореза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись высушенные плоды ОК различных сортов («Столичная», «Галерит», «Рябиновая», «Ботаническая любительская», «Ботаническая», «Трофимовская», «Студенческая», «Ботаническая ароматная», «Краснокарминовая», «Нивелена»), произрастающие на Европейской территории России, заготовленные на базе Ботанического сада биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, согласно правилам заготовки лекарственного растительного сырья (ЛРС) различных морфологических групп. Сушку плодов производили при температуре 60 °С до остаточной влажности не более 14%.

Сумму свободных аминокислот (АК) в пересчете на кислоту глутаминовую, а также полисахаридов и простых восстанавливающих сахаров в пересчете на глюкозу определяли методом дифференциальной спектрофотометрии в видимой области нингидриновым методом [5, с. 64–65] и пикриновым [6, с. 548; 7] способами соответственно. Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре Hitachi U1900 (Япония) в требуемом диапазоне длин волн в кварцевых кюветах толщиной 1 см относительно

но растворов сравнения. Сумму органических кислот в пересчете на кислоту яблочную определяли фармакопейным методом алкалиметрического титрования [7; 8, с. 8–9]. Полученные результаты обрабатывали в соответствии с требованиями ОФС ГФ XIII изд. [7] при использовании пакета прикладных программ обеспечения «Statistica 12.0» и «Microsoft EXCEL» 2016 г.

Для исследования специфического профиля БАВ изучаемые объекты анализировали методом КЭ на приборе «Капель-105/105М» («Люмэкс», Санкт-Петербург, Россия). Условия разделения при определении органических кислот: буфер фосфатный для анализа органических кислот. Капилляр: $L_{эф}/L_{общ} = 40/50$ см, $ID = 50$ мкм. Ввод пробы: 300 мбар·с. Напряжение: –17 кВ. Температура: +20 °С. Детектирование: 190 нм, косвенное [4, с. 100]. Вид полученных электрофореграмм представлен на рисунке 1. Для исследования полного аминокислотного состава (свободные и связанные АК) навески образцов гидролизвали 6 М соляной кислотой при температуре 110 ± 5 °С в течение 16–18 часов [4, с. 95, 102]. Метод основан на получении из свободных форм АК фенилизотиокарбамильных производных, дальнейшем их разделении и количест-

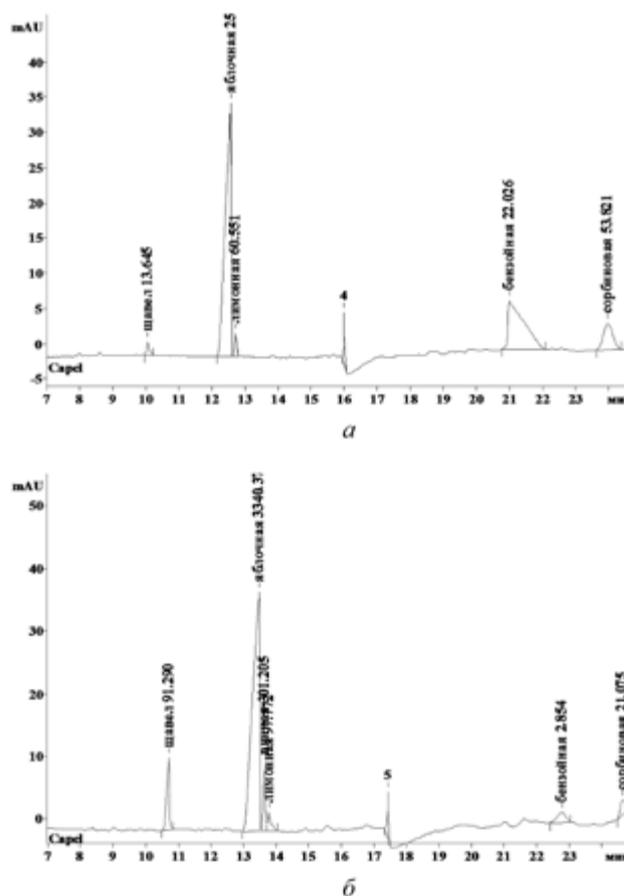


Рисунок 1. Электрофореграммы плодов ОК при определении суммы свободных органических кислот: а – сорт «Нивелена»; б – сорт «Рябиновая»

Figure 1. Electropherograms of fruits OK when determining the amount of free organic acids: a – the variety «Nivelena»; b – grade «Rowan»

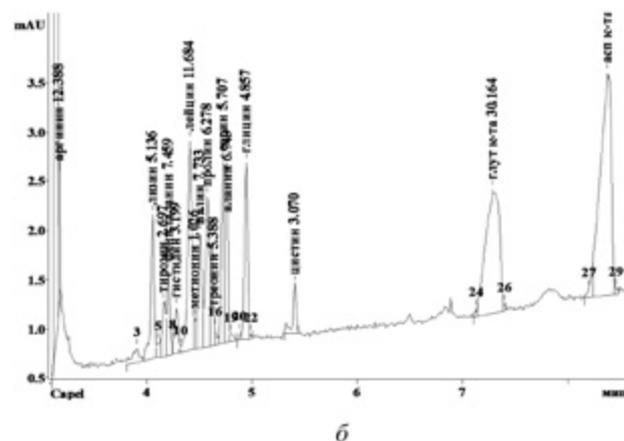
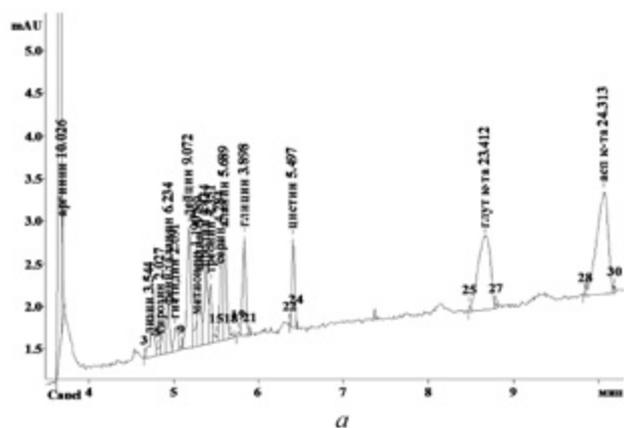


Рисунок 2. Электрофореграммы плодов ОК при определении суммы свободных и связанных АК: а – сорт «Трофимовская»; б – сорт «Нивелена»

Figure 2. Electrophoregrams of OK fruits in determining the amount of free and bound AK: a – variety «Trofimovskaya»; b – grade «Nivelena»

венном определении (рисунок 2). Условия разделения: буфер 30 мМ фосфатный, 4 мМ β-циклодекстрин (рН 7,4); капилляр ($L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID=50 мкм); ввод пробы 150 мбар·с; напряжение +25 кВ; УФ-детектирование, 254 нм; температура 30 °С [4, с. 95,102]. Метод КЭ при анализе свободных сахаров основан на экстракции дистиллированной водой из твердых проб с последующим разделением и количественным определением. Детектирование: косвенное, 254 нм. Фоновый электролит: на основе сорбата калия с добавкой ЦТАБ, рН=12,1. Капилляр: $L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID=50 мкм. Ввод пробы: 150 мбар·с. Напряжение: –25 кВ. Температура: 20 °С [4, 212 с.]. Вид электрофореграмм сахаров исследуемого ЛРС показан на рисунке 3. Сбор, обработку и вывод данных осуществляют с помощью персонального компьютера с операционной системой не ниже «Windows® 2000/XP», на котором установлено специализированное программное обеспечение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Так как сортовые особенности накопления БАВ в ЛРС в рамках одного вида имеют сходный характер, обусловленный генотипом, но различающийся

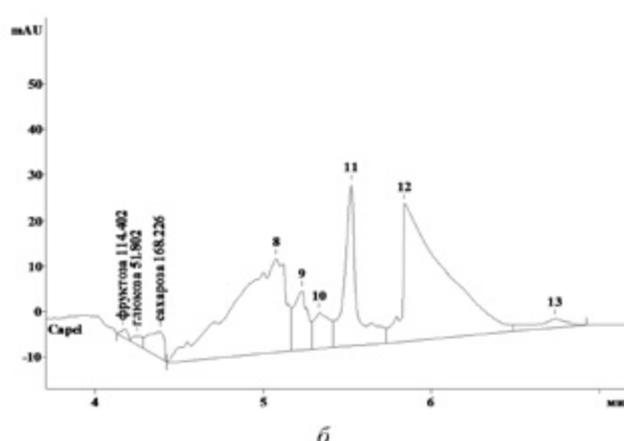
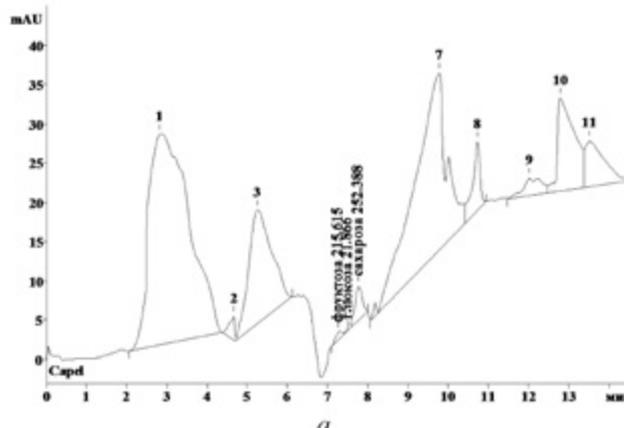


Рисунок 3. Электрофореграммы плодов ОК при определении суммы свободных сахаров: а – сорт «Трофимовская»; б – сорт «Галерит»

Figure 3. Electrophoregrams of OK fruits when determining the amount of free sugars: a – the variety «Trofimovskaya»; b – grade «Galerit»

количественно, на первом этапе работы проводили определение суммы БАВ исследуемых групп в плодах ОК изучаемых сортов в пересчете на абсолютно сухое сырье с целью выбора объектов с максимальным и минимальным содержанием. Результаты представлены в таблице 1. Метрологическая характеристика результатов исследования приведена в таблице 2.

Установлено, что наибольшее содержание суммы свободных АК наблюдается у сорта «Нивелена», а наименьшее – выявлено у сорта «Трофимовская». Данные таблицы 1 показывают, что наибольшее содержание суммы полисахаридов и сахаров выявлено для сорта «Трофимовская», а наименьшее – отмечено у сорта «Галерит». Наибольшее содержание суммы свободных органических кислот наблюдается у сорта «Нивелена», а наименьшее – у сорта «Рябиновая». Сахарно-кислотный индекс (СКИ) плодов ОК изучаемых сортов варьировал от 0,9 до 2,01, что свидетельствует об их принадлежности к группе кислых по существующей градации [1, с. 15].

Таблица 1. Содержание суммы БАВ в плодах ОК различных сортов в пересчёте на абсолютно сухое сырьё, %

Table 1. The content of the sum of BAS in fruits OK different varieties in terms of absolutely dry raw materials, %

№	Сорт	Сумма свободных АК	Сумма свободных и связанных сахаров	Сумма свободных органических кислот
1	«Столичная»	1,398±0,147	19,898±5,441	11,426±0,035
2	«Галерит»	1,900±0,217	12,372±1,156	11,441±0,074
3	«Рябиновая»	1,181±0,131	12,604±0,995	9,310±0,146
4	«Ботаническая любительская»	1,803±0,368	12,393±2,201	13,362±0,074
5	«Ботаническая»	1,511±0,032	21,116±0,623	11,620±0,038
6	«Трофимовская»	0,848±0,023	24,275±1,523	12,100±0,076
7	«Студенческая»	1,209±0,228	14,506±0,308	16,084±0,186
8	«Ботаническая ароматная»	1,457±0,017	21,844±1,987	12,375±0,075
9	«Краснокарминовая»	1,939±0,033	14,575±2,679	12,784±0,074
10	«Нивелена»	2,000±0,237	18,274±1,062	18,090±0,075

Полученные данные показали, что в целом качественный состав БАВ изучаемых сортов сходен между собой, что обусловлено принадлежностью растений к одному роду и виду *Hippohaes rhamnoides*, но различается количественно. Однако, следует отметить, что различные сорта имеют свои фитохимические особенности. Так, с ростом содержания суммы свободных органических кислот в плодах в профиле данных БАВ появляется винная кислота (сорт «Нивелена»), практически отсутствующая в менее кислых сортах (сорт «Рябиновая»). В то же время содержание таких кислот, как сорбиновая и бензойная, у сорта «Рябиновая» на порядок выше по сравнению с сортом «Нивелена», а содержание щавелевой кислоты наоборот. Аминокислотный профиль представлен сходным качественным и количественным набором АК, что объясняется общим генотипом объектов исследования. Свободные сахара (глюкоза, фруктоза и сахароза) представлены во всех изучаемых сортах в различном количественном содержании. Самым сладким сортом является «Трофимовская», что согласуется с данными определения суммы свободных и связанных сахаров и значением СКИ (таблица 3).

Таблица 2. Метрологическая характеристика результатов исследования (P=95%, n=5)

Table 2. Metrological characteristics of the research results (P=95%, n=5)

\bar{x}	s^2	s	$s_{\bar{x}}$	Δx	$\Delta \bar{x}$	$\bar{\epsilon}$
Сумма свободных АК, %						
2,056117	0,029255	0,17104	0,069827	0,439574	0,212653	10,34246
Сумма свободных органических кислот, %						
16,09176	0,02097	0,1448	0,06476	0,40256	0,18004	1,1188
Сумма свободных и связанных сахаров, %						
21,84405	19,28911	4,391936	1,793001	11,28728	5,047977	23,10916

Таблица 3. Показатели сахаро-кислотного индекса плодов ОК изучаемых сортов

Table 3. Indicators of the sugar-acid index of fruits OK studied varieties

№ п/п	Сорт	СКИ (среднее значение)
1	«Столичная»	1,74
2	«Галерит»	1,08
3	«Рябиновая»	1,35
4	«Ботаническая любительская»	0,93
5	«Ботаническая»	1,82
6	«Трофимовская»	2,01
7	«Студенческая»	0,90
8	«Ботаническая ароматная»	1,77
9	«Краснокарминовая»	1,14
10	«Нивелена»	1,01

Для детального изучения специфического профиля БАВ данных групп проведено исследование методом КЭ на отмеченных сортах. Результаты определения в пересчете на абсолютно сухое сырьё приведены в таблицах 4–6.

Таблица 4. Результаты исследования профиля органических кислот в плодах ОК методом КЭ

Table 4. The results of the study of the profile of organic acids in fruits OK method KE

№ п/п	Органическая кислота	Содержание кислоты, %	
		Сорт «Рябиновая»	Сорт «Нивелена»
1	Щавелевая	0,0646	0,4077
2	Фумаровая	Менее 0,005*	Менее 0,005
3	Янтарная	Менее 0,05	Менее 0,05
4	Яблочная	12,4116	14,7762
5	Лимонная	0,2906	0,4408
6	Пропионовая	Менее 0,1	Менее 0,1
7	Молочная	Менее 0,12	Менее 0,12
8	Бензойная	0,1076	0,0110
9	Сорбиновая	0,2584	0,0992
10	Винная	Менее 0,005	1,3333
11	Уксусная	Менее 0,1	Менее 0,1
12	Муравьиная	Менее 0,15	Менее 0,15
13	Масляная	Менее 0,05	Менее 0,05
14	Молочная	Менее 0,12	Менее 0,12
Всего		13,1328	17,0682

Примечание: * – предел обнаружения.

Note: * – detection limit.

Таблица 5. Результаты исследования профиля свободных сахаров в плодах ОК методом КЭ

Table 5. Profile Study Results free sugars in fruits OK method CE

№ п/п	Сахара	Содержание сахара, %	
		Сорт «Галерит»	Сорт «Трофимовская»
1	Глюкоза	0,1093	0,0450
2	Фруктоза	0,2513	0,4724
3	Сахароза	0,3606	0,5511
Всего		0,7212	1,0685

Таблица 6. Результаты исследования профиля АК в плодах ОК методом КЭ

Table 6. The results of the study of the profile of AK in fruits OK method CE

№ п/п	АК	Содержание АК, %	
		Сорт «Нивелена»	Сорт «Трофимовская»
1	Аргинин	1,0798	0,9785
2	Лизин*	0,4518	0,3487
3	Тирозин	0,2314	0,2024
4	Фенилаланин*	0,6501	0,6073
5	Гистидин	0,2755	0,2587
6	Лейцин* + Изолейцин*	1,0248	0,8885
7	Метионин*	0,0882	0,1125
8	Валин*	0,6721	0,5623
9	Пролин	0,5509	0,4386
10	Треонин*	0,4738	0,4274
11	Серин	0,4958	0,4161
12	Аланин	0,5950	0,5623
13	Глицин	0,4297	0,3824
14	Цистин	0,2645	0,5398
15	Глутаминовая кислота	2,6335	2,2944
16	Аспарагиновая кислота	3,0522	2,3843
Всего		12,9691	11,4042

Примечание: * – незаменимая АК.

Note: * - irreplaceable AK.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведено исследование профиля БАВ (свободных органических кислот и сахаров, а также свободных и связанных АК) плодов облепихи крушиновидной различных сортов методом капиллярно-электрофореза. В целом, качественный состав БАВ изучаемых сортов сходен между собой, но различается количественно. Проведено определение суммы свободных органических кислот, АК, свободных и связанных сахаров. Выявлены сорта с максимальным и минимальным содержанием исследуемых групп БАВ. По СКИ плоды ОК изучаемых сортов относятся к кислым.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зубарев Ю. А. Итоги и задачи селекции облепихи в Сибири на современном этапе. *Достижения науки и техники АПК*. 2008; 7: 12–16.
2. Букштынов А. Д., Трофимов Т. Т., Ермаков Б. С. и др. Облепиха. М.: Изд-во: *Лесная промышленность*. 1978: 192 с.
3. Тринева О. В. Комплексное исследование содержания и специфического профиля биологически активных веществ плодов облепихи крушиновидной. Воронеж: *Издательский дом ВГУ*. 2016: 224 с.
4. Комарова Н. В., Каменцев Я. С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель». СПб.: *ООО «Веда»*. 2006: 212 с.
5. Тринева О. В., Сливкин А. И., Дмитриева А. В. Определение аминокислот в плодах облепихи крушиновидной различных способов консервации. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2014; 4(9): 63–68.
6. Тринева О. В., Казьмина М. А., Сливкин А. И. Определение суммы полисахаридов и восстанавливающих моносахаридов в плодах облепихи крушиновидной различных способов консервации. *Материалы 6-й Международной научно-методической конференции «Фармообразование-2016»*. Воронеж, 21–23 апреля. 2016: 547–551.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд. М., 2015; 2: 1004. Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/
8. Тринева О. В., Сафонова И. И., Сливкин А. И., Сафонова Е. Ф. Органические кислоты в плодах облепихи крушиновидной. *Фармация*. 2013; 7: 7–10.

REFERENCES

1. Zubarev Yu. A. Results and objectives of the selection of sea buckthorn in Siberia at the present stage. *Achievements of science and technology of agriculture*. 2008; 7: 12–16 (In Russ.).
2. Buxhtynov A. D., Trofimov T. T., Ermakov B. S. et al. Oblepikha. M.: Publishing house: *Lesnaya promyshlennost' – Forest industry*. 1978: 192 p. (In Russ.).
3. Trineeva O. V. Comprehensive study of the content and specific profile of the biologically active substances of the sea-buckthorn fruits. *Voronezh: VSU Publishing House*. 2016: 224 p. (In Russ.).
4. Komarova N. V., Kamencev Ya. S. Practical guidance on the use of capillary electrophoresis systems «Capel». SPb.: *LLC Veda*. 2006: 212 p. (In Russ.).
5. Trineeva O. V., Slivkin A. I., Dmitrieva A. V. Determination of amino acids in the fruits of sea buckthorn buckwheat various methods of preservation. *Drug Development & Registration*. 2014; 4(9): 63–68 (In Russ.).
6. Trineeva O. V., Kaz'mina M. A., Slivkin A. I. Determination of the amount of polysaccharides and reducing monosaccharides in the fruits of sea buckthorn buckwheat various methods of preservation. *Proceedings of the 6th International Scientific and Methodological Conference «Pharmaceutical Education-2016»*. Voronezh, April 21–23. 2016: 547–551 (In Russ.).
7. Russian Federation State Pharmacopoeia XIII ed. M., 2015; 2: 1004. Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/ (in Russ.).
8. Trineeva O. V., Safonova I. I., Slivkin A. I., Safonova E. F. Organic acids in the fruits of sea buckthorn. *Pharmacy*. 2013; 7: 7–10 (In Russ.).