

ИЗУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ЭКСТРАКТА БОЛЬШОЙ ВОСКОВОЙ МОЛИ И ГОМОГЕНАТА ТРУТНЕВОГО РАСПЛОДА

Ю. В. Шикова¹, В. А. Лиходед¹, Е. В. Симонян², А. В. Епифанова¹,
В. В. Петрова¹, Е. А. Евсельева², О. Н. Меренкова²

¹ ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет»
Минздравсоцразвития России

² Южно – Уральский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 20.02.2014

Аннотация. В статье отражены результаты исследований по определению аминокислотного состава продуктов пчеловодства (экстракта личинок большой восковой моли и трутневого гомогената) методом тонкослойной хроматографии. Изучены спектральные характеристики взаимодействия глутаминовой кислоты с нингидрином, определена зависимость оптическая плотность – концентрация. Разработана методика и проведена количественная оценка содержания аминокислот в исследуемых образцах в пересчете на глутаминовую кислоту.

Ключевые слова: Экстракт личинок большой восковой моли, трутневый гомогенат, аминокислота, глутамат, тонкослойная хроматография, спектрофотометрия.

Abstract. The paper describes the results of studies to determine the amino acid composition of bee products (extract large wax moth larvae and drone homogenate) by thin layer chromatography. The spectral characteristics of the interaction of glutamic acid with ninhydrin defined optical density - concentration. The technique and performed quantitative evaluation of the amino acid in the samples in terms of glutamic acid.

Keywords: Extract large wax moth larvae, drone homogenate, an amino acid, glutamate, thin layer chromatography, spectrophotometry.

В последнее время большой интерес в производстве лекарственных средств представляют природные компоненты, обладающие широким спектром фармакологического действия и высоким индексом безопасности. К таким природным веществам относятся продукты пчеловодства – экстракт личинок большой восковой моли и гомогенат трутневого расплода, обладающие высокой фармакологической активностью, обусловленной присутствием в их составе природных биологически активных соединений. К компонентам экстракта личинок большой восковой моли, способным оказывать терапевтическое действие, можно отнести нуклеотидные основания и нуклеозиды, глутамат, аспартат, пролин, лизин, гистидин и другие аминокислоты, влияющие на тканевой

обмен, гамма-аминомасляную кислоту, обладающую тормозным и антистрессорным действием, а также содержащиеся в экстракте биологически важные микроэлементы [1]. Трутневый расплод также очень богат биологически активными соединениями. В его составе содержатся белки, аминокислоты, ферменты, способствующие ренозаживляющему действию препарата при его местном применении, кортизол, фосфолипиды, альфа-токоферол, позволяют предположить о возможном противовоспалительном действии. Среди указанных активных веществ интерес представляют свободные аминокислоты, содержащиеся в сухом экстракте личинок большой восковой моли и трутневом расплоде (в пересчете на сухое вещество) в количестве 50-60% и 37-40% соответственно [2].

В связи с этим исследование биологически активных веществ, содержащихся в экстракте

© Шикова Ю. В., Лиходед В. А., Симонян Е. В., Епифанова А. В., Петрова В. В., Евсельева Е. А., Меренкова О. Н., 2014

личинки большой восковой моли и трутневом гомогенате, является актуальной задачей. Цель настоящего исследования - разработка методик идентификации и количественной оценки аминокислотного состава экстракта личинок большой восковой моли и гомогената трутневого расплода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали 10% экстракт личинок большой восковой моли (*Galleria mellonella* L.) и трутневый гомогенат.

Первым этапом нашего исследования было изучение аминокислотного состава методом тонкослойной хроматографии. Определение проводили восходящим способом на пластинках Сорбфил в различных системах растворителей. Система 1 – дихлорэтан – ледяная уксусная кислота (45:8); система 2 – трихлорметан – спирт этиловый 95% – ледяная уксусная кислота (20:10:3); система 3 – толуол – н – гептан – ледяная уксусная кислота (12:6:5); система 4 – метанол – вода (95:5); система 5 – бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:5:1) Параллельно в тех же условиях проводили определение для растворов РСО некоторых аминокислот. Детектирование осуществляли обработкой 1% раствором нингидрина в ацетоне с последующим нагреванием пластинок.

На втором этапе для оценки количественного содержания нами был использован спектрофотометрический метод на основе реакции с нингидрином [3]. В качестве стандартного образца нами была использована кислота глутаминовая, соответствующая требованиям ФС 42 – 0229 – 07, поскольку при хроматографировании во всех системах она была обнаружена в экстракте.

Построение калибровочного графика зависимости оптической плотности от концентрации РСО кислоты глутаминовой. Около 0.1 г (точная навеска) кислоты глутаминовой помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 30 мл воды при нагревании, охлаждали, доводили водой до метки и перемешивали (раствор А). В мерную колбу вместимостью 25 мл вносили последовательно от 1 до 10 мл раствора А, прибавляли по 1 мл 1% раствора нингидрина в ацетоне, нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 – 3 минут, охлаждали и доводили водой до метки. Перемешивали и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре СФ – 56 в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм.

Методика определения аминокислот в изучаемых объектах. 1 мл экстракта или гомогената

(точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили водой до метки и перемешивали. В мерную колбу вместимостью 25 мл переносили 1 мл полученного раствора, прибавляли 1 мл 1% раствора нингидрина в ацетоне, нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 – 3 минут, охлаждали и доводили водой до метки. Перемешивали и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре СФ – 56 в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты по определению аминокислотного состава экстракта большой восковой моли и трутневого гомогената представлены в таблице 1.

Таблица 1

Идентификация аминокислот в экстракте личинок большой восковой моли и гомогенате трутневого расплода методом тонкослойной хроматографии

Исследуемые растворы	Значение Rf				
	Система растворителей				
	1	2	3	4	5
Кислота глутаминовая	0.12	0.68	0.05	0.70	0.59
Триптофан	0.33	0.66	0.08	0.62	0.76
Лизин	0.86	0.87	0.09	0.64	0.32
Цистеин	0.75	0.51	0.40	0.76	0.67
Метионин	0.64	0.85	0.32	0.76	0.58
Аланин	0.58	0.76	0.30	0.65	0.51
Глицин	0.37	0.65	0.34	0.47	0.59
Лейцин	0.86	0.91	0.65	0.68	0.77
Аргинин	0.21	0.81	0.06	0.96	0.56
Треонин	0.40	0.77	0.25	0.58	0.53
Валин	0.77	0.88	0.56	0.17	0.48
Гистидин	0.18	0.75	0.04	0.50	0.43
Изолейцин	0.75	0.86	0.48	0.67	0.69
Тирозин	0.81	0.6	0.01	0.56	0.59
Серин	0.45	0.87	0.27	0.54	0.43
Аспарагин	0.63	0.49	0.01	0.55	0.59
Фенилаланин	0.83	0.84	0.51	0.70	0.52
Экстракт личинок большой восковой моли	0.12; 0.58	0.68	0.05; 0.34	0.70; 0.47	0.51; 0.59; 0.77; 0.69
Гомогенат трутневого расплода	0.12	0.84	-	0.70	0.51; 0.52 0.58;

Было установлено, что наилучшее разделение наблюдается в системе 5. Таким образом, в экстракте большой восковой моли нами были идентифицированы аланин, кислота глутаминовая, лейцин, изолейцин и глицин, а в трутневом

расплode – кислота глутаминовая, фенилаланин и метионин.

В ходе определения количественных характеристик исследуемых объектов установлено, что продукт взаимодействия кислоты глутаминовой с нингидрином характеризуется максимумами светопоглощения при 310 ± 2 и 354 ± 2 нм. Для установления линейности рассчитывали коэффициент корреляции. Было установлено, что при 354 ± 2 нм в интервале концентраций $8 \cdot 10^{-5} - 6.4 \cdot 10^{-4}$ г/мл наблюдается линейная зависимость оптической плотности от концентрации ($R^2 = 0.997$), в то время как в области 310 нм подчиняемость закону светопоглощения наблюдается только при $8 \cdot 10^{-5} - 2.4 \cdot 10^{-4}$ г/мл.

Также определено, что спектр поглощения полученных комплексов аминокислот экстракта и гомогената имеет максимумы при 318 ± 2 и 354 ± 2 нм. В связи с этим целесообразно использовать в качестве аналитической длину волны 354 нм. По полученным данным рассчитали содержание аминокислот в пересчете на кислоту глутаминовую. Результаты представлены в таблице 2.

Полученные результаты свидетельствуют о воспроизводимости методики и незначительной погрешности определения.

ВЫВОДЫ

Методом тонкослойной хроматографии идентифицированы основные заменимые и незамени-

Таблица 2

Результаты количественного определения содержания аминокислот в пересчете на кислоту глутаминовую

№ п/п	Экстракт личинок большой восковой моли		Гомогенат трутневого расплода	
	Найдено аминокислот (в пересчете на кислоту глутаминовую), %	Валидационная оценка	Найдено аминокислот (в пересчете на кислоту глутаминовую), %	Валидационная оценка
1.	0.528	SD = 0.003847	10.34	SD = 0.2914
2.	0.523	RSD = 0.00157	10.81	RSD = 0.1189
3.	0.531	$\Delta X = 0.004$	10.87	$\Delta X = 0.306$
4.	0.522	$\varepsilon = 0.77\%$	10.21	$\varepsilon = 2.89\%$
5.	0.531		10.24	
6.	0.527		10.65	
Хср	0.527		10.57	

мые аминокислоты в экстракте личинок большой восковой моли и гомогенате трутневого расплода.

Изучены спектральные характеристики продукта взаимодействия нингидрина с кислотой глутаминовой, определена зависимость оптической плотности от концентрации и подобраны оптимальные условия проведения анализа.

Разработаны методики идентификации и количественной оценки аминокислотного состава экстракта личинок большой восковой моли и трутневого гомогената (написала т.к. есть в целях)

Содержание аминокислот в экстракте личинок большой восковой моли и трутневого гомогената в пересчете на глутаминовую кислоту 0.527 ± 0.004 и $10.57 \pm 0.306\%$ соответственно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рачков, А.К. Апитерапия [Текст]: Пособие для врачей / А.К. Рачков, М.А. Рачкова. — Рязань, 2003. — С. 25-30
2. Лазарян, Д.С. Исследование химического состава, оценка биологической активности пчелиного расплода и получение на его основе лекарственных препаратов [Текст]: дис. ... д-ра фарм. Наук: 14.04.01: утв. 15.07.2002 — Пятигорск, 2002. — 288 с.
3. Духанина, И.В. Количественное определение аминокислот в пыльце (обножке) [текст] / И.В. Духанина, А.Ю. Айрапетова, Г.Д. Лазарян. и др. // Хим.-фарм. журн. — 2006. — № 2. — С. 22–23.

Шикова Юлия Витальевна — д.ф.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической технологии с курсом биотехнологии Башкирского государственного медицинского университета; e-mail: shikmann@mail.ru

Лиходед Виталий Алексеевич — д.ф.н., профессор кафедры фармацевтической технологии с курсом биотехнологии Башкирского государственного медицинского университета; e-mail: shikmann@mail.ru

Симомян Елена Владимировна — к.ф.н., доцент, зав. кафедрой химии фармацевтического факультета Южно – Уральского государственного медицинского университета; тел. 8(919)358 -14-36; e-mail: elenasimonian@yandex.ru

Епифанова Алина Валерьяновна — аспирант кафедры фармацевтической технологии с курсом биотехнологии Башкирского государственного медицинского университета; e-mail: epifanova-av@mail.ru

Петрова Виктория Витальевна — аспирант кафедры фармацевтической технологии с курсом биотехнологии Башкирского государственного медицинского университета; e-mail: petrovaviki@yandex.ru

Евселева Екатерина Александровна — преподаватель кафедры химии фармацевтического факультета Южно – Уральского государственного медицинского университета; e-mail: evaevsell@yandex.ru

Меренкова Ольга Николаевна — фармацевтического факультета Южно – Уральского государственного медицинского университета; e-mail: olmera74@mail.ru

Shikova Yulia V. — doctor of Philology, Professor, head of the Department of pharmaceutical technology with the course of biotechnology of the Bashkir state medical University; e-mail: shikmann@mail.ru

Likhoded Vitaly A. — PhD., Professor, Department of pharmaceutical technology with the course of biotechnology of the Bashkir state medical University; e-mail: shikmann@mail.ru

Simonyan Elena V. — Associate Professor, Head. Department of Chemistry, Faculty of Pharmacy of the South Ural state medical University; e-mail: elenasimonian@yandex.ru

Epifanova Alina V. — postgraduate student of the Department of pharmaceutical technology with the course of biotechnology of the Bashkir state medical University; e-mail: epifanova-av@mail.ru

Petrova Victoria V. — postgraduate student of the Department of pharmaceutical technology with the course of biotechnology of the Bashkir state medical University; e-mail: petrovaviki@yandex.ru

Evseleva Ekaterina A. — teacher of the Department of pharmaceutical chemistry, faculty of South Ural state medical University; e-mail: evaevsell@yandex.ru

Merenkova Olga Nikolaevna — pharmaceutical faculty of South Ural state medical University; e-mail: olmera74@mail.ru