

O‘ZBEKISTON RESPUBLIKASI SOG‘LIQNI SAQLASH VAZIRLIGI

TOSHKENT FARMATSEVTIKA INSTITUTI

FARMATSEVTIKA JURNALI

Jurnalga 1992 yilda asos solingan

Yilda 6 marta chiqadi

PARMACETICAL JOURNAL

Founded in 1992

Published 6 times a year

№ 2. 2022

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1992 г.

Выходит 6 раза в год

Toshkent 2022

Икрамова Машкура Шухратовна¹, Рахимова Гулрух Куркмасовна¹,
Комилов Хожиасроп Масудович¹.

БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫЙ И АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ СТВОРОК ПЛОДОВ ФАСОЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ

¹Ташкентский фармацевтический институт
*e-mail: mashkura.ikramova@g.mail.com

Из створок плодов фасоли обыкновенной кислотной экстракцией получен тотальный экстракт. Проведено аналитическое разделение экстракта методом ОФ-ВЭЖХ и выделены белково-пептидные фракции методом ионообменной хроматографии. Определены молекулярные массы полученных фракций электрофоретическим методом. Помимо этого, определен аминокислотный состав створок плодов фасоли обыкновенной, включающий 20 компонентов, в т.ч. 10 незаменимых аминокислот.

Ключевые слова: *Valvae fructuum Phaseoli vulgaris L.*, белки, пептиды, аминокислотный состав.

Фасоль обыкновенная (*Phaseoli vulgaris L.*) – одна из самых распространенных сельскохозяйственных культур по всему миру. Являясь пищевым растением, с глубокой древности используется и как лечебное средство. Так в древней медицине считали, что фасоль увеличивает количество молока и диурез, болтушка из ее муки широко использовалась девушками для очищения кожу лица, отбеливания веснушек и удаления шрамов. С тем же успехом широко используется фасоль в народной медицине. Муку фасоли смешивая со сливками, применяют при ожогах, с медом - при лечении рожистого воспаления. Лепешкой из муки фасоли лечат нарывы, не заживающие раны, экзему. Отвар фасоли с листьями черники используют как гипогликемическое средство и для лечений воспалений поджелудочной железы [1,2].

В научной медицине фасоль рекомендуется как продукт, богатый аминокислотами, белками и микроэлементами, при заболеваниях сердца, почек и печени. При длительном потреблении фасоли можно предупредить развитие сахарного диабета, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Отмечены ее антиоксидантные, противовоспалительные, гипогликемические, противораковые, мочегонные и другие свойства [3,4].

С лекарственной целью используются створки плодов фасоли обыкновенной (*Valvae fructuum Phaseoli vulgaris L.*). Не-

смотря на широкое возделывание этого растения на территории Узбекистана, из-за малой изученности оно до последнего времени не имело должного научного обоснования своего применения. Принимая во внимание отмеченные обстоятельства, нами проводится всестороннее исследование створок плодов фасоли обыкновенной, направленное на внедрение их в медицинскую практику.

Цель настоящей работы состояла в выделении и изучении белково-пептидных фракций и аминокислотного состава створок плодов фасоли обыкновенной, заготовленной в период созревания плодов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение белково-пептидной фракции из створок плодов фасоли обыкновенной [5,6]. Сухой материал измельчали и экстрагировали 10% раствором уксусной кислоты в деионизованной воде из расчета 10 мл раствора на 1 г биологического материала в присутствии ингибиторов протеаз (сериновых протеаз – трипсина, хемотрипсина, плазмина, калликреина, тромбина; цистеиновых протеаз – калпаина, папаина, катепсина В, катепсина, аминопептидаз – лейцина аминопептидазы, аланила аминопептидазы; сериновых и цистеиновых пептидаз – плазмина, трипсина, папаина, катепсина В; кислотных протеаз – пепсина, ренина, катепсина D; металлопротеаз). Для этого в раствор 10% кислоты предварительно добавляли 30 мкл смеси ингибиторов протеаз из расчета 1 мл

УДК 547.96: 577.15

ингибиторов на 100 мл экстракта из 30 г материала. Экстракцию проводили 1 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Гомогенат центрифугировали при 12000 об/мин, осадок отбрасывали, а в супернатант добавляли ацетон в соотношении 1:5 и оставляли на ночь при температуре 4 °С. Ацетон декантировали и осадок подсушивали на воздухе.

Затем осадок растворяли в 0,1 % ТФУ (трифторуксусная кислота), с помощью центрифугирования удаляли не растворившиеся соединения. Для предотвращения возможной деградации белков сухой экстракт хранили при температуре 20 °С.

Экстракты обессоливали на картридже с обращенной фазой, лиофильно высушивали и после растворения в соответствующем буфере аналитически разделяли методом ОФ-ВЭЖХ (*обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография*).

Ионообменная хроматография [7]. Диализованный экстракт доводили до pH 9 0.05M аммония ацетатом и пропускали через колонку Servacel DEAE-23SN (2.0x 10cm, Reanal), уравновешенную 0.05 M аммония ацетатом (pH 9) при скорости потока 0.5 мл/мин. Фракции, не связывающиеся с сорбентом белков, представляют собой основные термостабильные белки створок фасоли. Полученный элюат доводили до pH 6 уксус-

ной кислотой и наносили на колонку CM-TSK- 650M (2.0x5 см Tosoh Bioscience), уравновешенную 0.05 M аммония ацетатом (pH 6). Связанные с сорбентом белки элюировали 200 мл линейного градиента от 0.05 M до 1.5 M NaCl в 0.05 M аммония ацетате (pH 6) при скорости потока 0.5 мл/мин. Детекция белков осуществлялась при 280 нм. Полученные пептидные фракции после диализа лиофильно высушивали и использовали для дальнейшей очистки.

Обращенно-фазовая ВЭЖХ. Очистку компонентов проводили методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке, уравновешенной 5% ацетонитрилом в 0.1%ТФУ. Элюирование проводилось в течение 60 мин при скорости потока 0.75 мл/мин линейным градиентом от 5 до 40% ацетонитрила в 0.1% ТФУ. Определение белков и пептидов вели при 214 нм.

Количественное содержание белка. Содержание белка в исследуемых образцах определяли по методу Лоури [8] с использованием реактива Фолина – Чикольте и по методу Варбурга-Христиана, описанному в [8] путем сравнения поглощения исследуемых растворов при 235 и 280 нм.

Содержание белка рассчитывали по формуле:

$$C(\text{мг/мл}) = (A_{235} - A_{280}) / 2.51,$$

где A_{235} и A_{280} – оптическая плотность раствора при 235 и 280 нм соответственно.

В качестве стандарта использовали растворы овальбумина и инсулина.

Качественное обнаружение аминокислот проводили в водных извлечениях с помощью нингидриновой реакции и хроматографически [9, 10]. 5,0 воздушно-сухого измельченного сырья заливали 50 мл очищенной воды и нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 ч. Извлечение фильтровали, сырьё заливали снова 50 мл и операцию повторяли. Водные

Результаты и обсуждение. Для выделения белково–пептидной фракции была использована кислотная экстракция створок плодов. Полученный экстракт после обессо-

извлечения, полученные после трёхкратной экстракции, объединяли, упаривали под вакуумом до 25 мл и использовали для проведения качественных реакций и хроматографического анализа.

При качественном анализе смешивали равные объёмы исследуемого извлечения и 0,1% свежеприготовленного раствора нингидрина и осторожно нагревали. После охлаждения полученный раствор приобретал красно-фиолетовый цвет, что указывало на присутствие аминокислот в исследуемом сырье.

При качественном анализе смешивали равные объёмы исследуемого извлечения и 0,1% свежеприготовленного раствора нингидрина и осторожно нагревали. После охлаждения полученный раствор приобретал красно-фиолетовый цвет, что указывало на присутствие аминокислот в исследуемом сырье.

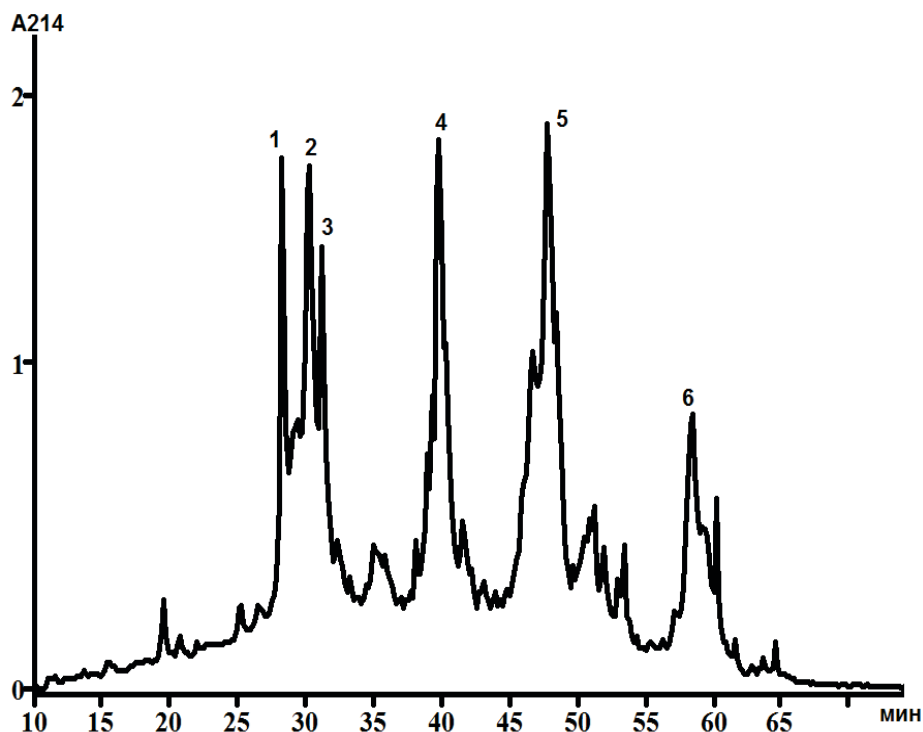


Рис.1 ВЭЖХ экстракта створок плодов фасоли обыкновенной

Суммарный белковый экстракт анализировали методом электрофореза в ПААГ. Результаты показали, что неочищенные экстракты содержат большое количество низкомолекулярных пептидов с молекулярным весом в пределах 2.5 – 8 кДа.

Экстракт, против буфера трис-НСl (рН 9) был последовательно разделен методом ионообменной хроматографии на колонках DEAE-Servacel и CM-TSK в ступенчатом градиенте NaCl в аммоний ацетатном буфере (рН 6.0) (0-0.5M).

Получено два компонента, один из которых содержит в своем составе комплекс белков и пептидов. Данный компонент был исследован методами: ВЭЖХ и электрофоретическим. При этом обнаружено, что изучаемый компонент содержит в своем составе несколько молярных пиков с массами 9.3, 9.4 и 9.5 кДа, являющихся так называемыми липидпереносящими белками типа 1, и минорный пик с массой 7.6 кДа, предположительно относящийся к классу липидпереносящих белков типа 2.

Выделение свободных аминокислот. Воздушно сухое сырье фасоли обыкновенной экстрагировали очищенной водой. Для осаждения белков и пептидов водного экс-

тракта в центрифужных стаканах: к 1 мл исследуемого образца добавляли по 1 мл (точный объем) 20% ТХУК (трихлоруксусная кислота). Через 10 мин осадок отделяли центрифугированием при 8000 об/мин в течение 15 минут. Отделив 0,1 мл надосадочной жидкости, лиофильно высушивали. Гидролизат упаривали, сухой остаток растворяли в смеси триэтиламин -ацетонитрил -вода (1:7:1) и высушивали. Эту операцию повторяли дважды для нейтрализации кислоты. Реакцией с фенилтиоизоцианатом получили фенилтиокарбомил-производные (ФТК) аминокислот по методу Steven A., Cohen Daviel [11]. Идентификацию производных аминокислот проводили методом ВЭЖХ. Условия ВЭЖХ: хроматограф Agilent Technologies с DAD детектором 1200. Колонка 75 x4.6 mm Discovery HS C 18. Раствор А: 0,1 M CH₃COONa + 0,05% ТЭА рН 6,4 В:CH₃CN. Скорость потока - 1,2 мл/мин, поглощение - 269 нм. Градиент % В/мин: 1-6%/0-2.5мин; 6-30%/2.51-40мин; 30-60%/40,1-45мин; 60-60%/45,1-50мин; 60-0%/50,1-55мин. Результаты представлены в таблице 1.

Содержание аминокислот в створках плодов фасоли обыкновенной

№	Аминокислоты	Содержание, (мг/гр)	Содержание в %
1.	Аспарагиновая к-та	0,550627	25,8
2.	Глутаминовая к-та	0,467837	22
3.	Серин	0,036207	1,7
4.	Глицин	0,03928	1,8
5.	Аспарагин	0,040561	1,9
6.	Глутамин	0,054572	2,5
7.	Цистеин	0,270833	12,7
8.	Треонин*	0,065921	3,1
9.	Аргинин**	0,030498	1,4
10.	Аланин	0,06149	2,9
11.	Пролин	0,057265	2,7
12.	Тирозин	0,063626	3
13.	Валин*	0,042669	2
14.	Метионин*	0,026531	1,2
15.	Изолейцин*	0,050197	2,3
16.	Лейцин*	0,057973	2,7
17.	Гистидин**	0,055315	2,6
18.	Триптофан*	0,117661	5,5
19.	Фенилаланин*	0,010934	0,5
20.	Лизин HCl*	0,033971	1,6
Сумма		2,133968	100%

Примечание: * незаменимые аминокислоты, ** условно незаменимые аминокислоты

Выводы

Из створок плодов фасоли обыкновенной, культивируемой на территории Узбекистана, проведено выделение белков, пептидов, а также установлен их аминокислотный состав. Показано, что данное растение содержит в своем составе комплекс белков и пептидов. С использованием хроматографических методов проведено разделение белково-пептидного комплекса и методом электрофореза выявлено наличие ряда пептидов с молекулярной массой порядка 9 кДа и минорный пик с молекулярной массой 7.6 кДа. На основании литературных данных можно

предположить, что пептиды с молекулярной массой порядка 9 кДа относятся к классу липид-переносящих 1 типа, а с молекулярной массой около 7.6 кДа – к классу липид-переносящих 2 типа.

Установлен также аминокислотный состав створок плодов фасоли обыкновенной, включающий 20 компонентов, в т.ч. 10 незаменимых аминокислот. Среди обнаруженных аминокислот в количественном отношении преобладают аспарагиновая и глутаминовая кислоты, цистеин, триптофан и треонин.

Литература:

1. Абу Али ибн Сино. Канон врачебной науки III том.- Ташкент, 1996.- С.-50.
2. Кароматов И.Д. Простые лекарственные средства.- Бухара, 2012.-С. 508.
3. Н.Н.Сафонов. Полный атлас лекарственных растений. – М.: Эксмо, 2009. -С.204-205.
4. Н.Мазнев. Новейшая энциклопедия лекарственных растений. -М.: ООО «Дом. XXI век», 2009.- С.524-525.
5. Ю.И.Ощепкова, Е.А.Рогожин, Э.М.Султанова, М.Ж.Орипова, О.Н.Вешкурова, Ц.А.Егоров, Ш.И.Салихов. Катионные пептиды и белки из семян растений семейства Malvaceae // Химия природных соединений: 2012.- №2, с.257-259.
6. Икрамова М.Ш.. Белково-пептидный состав надземной части *Karelinia caspia* // Фармация. Сборник материалов конференции “Молодая фармация-потенциал будущего.- Санкт Петербург, 2017. Спец.выпуск. –С. 672-673.
7. Yu.I.Oshepkova, E.A.Rogozhin, T.I.Odintsova, N.V.Khadeeva, O.N.Veshkurova, Ts.A.Egorov, E.V.Grishin, Sh.I.Salikhov. Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. Seeds // Plant Physiology and Biochemistry, 2011. v.49, - P.131-137.
8. Практическая химия белка: Пер. с англ./Под ред. А. Дарбре.-М.: Мир, 1989 – 623с.
9. М.Ш.Икрамова, Х.М.Комилов. Изучение аминокислотного состава карелинии каспийской // Фармацевтический вестник Узбекистана. – Ташкент, 2012. - № 1.-С.29-31.
10. Икрамова М.Ш. Изучение аминокислотного состава сухого экстракта “Диакар ” Фармация. Сборник материалов конференции “Молодая фармация-потенциал будущего.- Санкт Петербург, 2016. Спец.выпуск. –С. 598-601.
11. Steven A., Cohen Daviel J. amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanata derivatives // Jour. Analytical Biochemistry, 1988.V.17. - №1.P.1-16.

Икрамова Машкура Шухратовна, Рахимова Гулрух Куркмасовна, Комилов Хожиасрор Масудович

ЛОВИЯ МЕВАСИ ДУККАГИ ТАРКИБИДАГИ ОҚСИЛ-ПЕПТИД ВА АМИНОКИСЛОТАЛАР ТАРКИБИ

Ловия мевасини дуккагидан кислотали мухитда экстракция қилиб, экстрактив моддалар йиғиндисини ажратиб олинди. ЮССХ усули ёрдамида экстракция моддаларини қисмларга ажратилди ва оксил-пептидларни қисмини ион-алмасув хроматографияси усулида ажратиб олинди. Олинган қисмлардаги моддаларни молекуляр массаси электрофоретик усулда аниқланди. Бундан ташқари ловия мевасини дуккагини аминокислота таркиби 10 алмашилмайдиған, жами 20 аминокислоталардан ташкил топганлиги аниқланди.

Таянч иборалар: *Valvae fructuum Phaseoli vulgaris* L., оксиллар, пептидлар, аминокислотали таркиб.

Ikramova Mashkura Shuxratovna, Raximova Gulrux Kurkmasovna, Komilov Khojiasror Masudovich

PROTEIN-PEPTIDE AND AMINO ACID COMPOSITION OF VALVAE FRUCTUUM PHASEOLI VULGARIS L.

A total extract was obtained from the valves of the bean fruit ordinary by acid extraction. Analytical separation of the extract was carried out by RP-HPLC and protein-peptide fractions were isolated by ion exchange chromatography. The molecular weights of the obtained fractions were determined by the electrophoretic method. In addition, the amino acid composition of fruit bean valves is determined, including 20 components, i.e. 10 essential amino acids.

Key words: *Valvae fructuum Phaseoli vulgaris* L., proteins, peptides, amino acid composition.