

УДК 582.475:577.112.385.2:57.088.3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ L-АРГИНИНА В ХВОЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА САКАГУЧИ

© *Н.П. Чернобровкина**, *Е.В. Робонен*, *К.М. Никерова*, *Н.А. Галибина*, *Т.Н. Макарова*, *А.В. Репин*

*Институт леса КарНЦ РАН, ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185910
(Россия), e-mail: chernobrovkina50@bk.ru*

Аргинин может накапливаться в значительных количествах у хвойных растений при регуляции минерального питания. Для совершенствования технологий повышения уровня аргинина у хвойных растений и получения из них обогащенных аргинином хвойных препаратов необходим простой, быстрый, точный и дешевый метод определения аминокислоты в их органах. Цель данного исследования состояла в том, чтобы модифицировать спектрофотометрический метод определения аргинина, в основе которого используется реакция Сакагучи, для анализа образцов хвои *Pinus sylvestris* L. с низким и аномально высоким его содержанием. В результате исследований выявлены экстрагенты, обеспечивающие максимальное извлечение аргинина из хвои, испытаны способы очистки экстракта от органических соединений, хромогенные реактивы для цветной реакции Сакагучи и определены длины волн максимальных значений оптического поглощения растворов при анализе аргинина в хвое спектрофотометрическим методом. Метод прост, воспроизводим, точен и может быть применен для быстрого анализа аргинина в хвое сосны, в частности при отработке технологий повышения его содержания у хвойных растений и получения обогащенных аргинином хвойных препаратов.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris*, хвоя, аргинин, реакция Сакагучи, спектрофотометрия, модификация метода.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (Институт леса КарНЦ РАН).

Введение

Отличительной особенностью хвойных растений является значительное количество аргинина в их тканях, который участвует в различных метаболических процессах, в том числе в реакциях орнитинового цикла, в запасании азота [1–3]. Путем регуляции азотного и борного питания хвойных растений предложено получать обогащенную аргинином хвою с содержанием его до 4% от сухого вещества и использовать препараты из нее в животноводстве [4–11]. При разработке инновационной технологии получения хвойной лапки, обогащенной аргинином, необходимо изучение закономерностей, характеризующих запасание аминокислоты в органах хвойных растений. Для разработки такой технологии и дальнейшего ее совершенствования необходимо проведение экспериментов по оптимизации режима внесения удобрений (состава, сроков, доз), сроков и условий заготовки, хранения, переработки растительного материала, обогащенного аргинином. Выполнение этой задачи требует получения значительного количества экспериментальных данных по содержанию аргинина у хвойных растений.

Чернобровкина Надежда Петровна – ведущий научный сотрудник, e-mail: chernobrovkina50@bk.ru

Робонен Елена Вильямовна – научный сотрудник, e-mail: er51@bk.ru

Никерова Ксения Михайловна – заведующая лабораторией, e-mail: knikerova@yandex.ru

Галибина Наталья Алексеевна – заместитель директора по научной работе, e-mail: galibina@krc.karelia.ru

Макарова Тамара Николаевна – ведущий химик, e-mail: tamakarova48@bk.ru

Репин Андрей Владимирович – главный биолог, e-mail: andyrepin@gmail

Представлены сравнительные характеристики наиболее распространенных методов анализа аргинина в биологических объектах [12]. Современные методы включают использование ВЭЖХ [13, 14], аминокислотного анализатора [15], капиллярного электрофореза [16]. Эти методы точны, но продолжительны по времени, требуют специального оборудования и дорогостоящих реактивов [17]. Для рутинного определения содержания аргинина в хвое необходима несложная методика,

* Автор, с которым следует вести переписку.

позволяющая проводить большое количество анализов за короткое время. Цветная реакция Сакагучи, основанная на взаимодействии аргинина с хромогенными реагентами в присутствии окислителя, наилучшим образом подходит для таких целей. Метод прост в воспроизведении, обладает высокой чувствительностью и может использоваться для определения следовых количеств аргинина в биологических объектах со спектрофотометрическим окончанием. Эта реакция для количественного определения аргинина предложена еще в 1925 г. Сакагучи [18]. В качестве реактива для выявления аргинина в цветной реакции Сакагучи первоначально использовали α -нафтол с гипохлоритом натрия. В дальнейшем при совершенствовании этого метода были исследованы различные хромогенные реактивы. 8-оксихинолин с гипобромитом натрия зарекомендовал себя как эффективный реагент для получения окрашенных соединений в реакции Сакагучи [19–21]. Целесообразно было провести испытание хромогенных реагентов при анализе аргинина в хвое с различным его содержанием.

Важным является выявление экстрагентов, максимально извлекающих аргинин из хвои. В настоящее время активно проводится поиск рациональных способов экстракции конкретных групп БАВ с целью повышения их выхода [22]. На примере *Pinus sylvestris* L. показано, что экстракция этиловым спиртом не позволяет полностью извлекать аргинин из хвои [1]. Применение фосфатного буфера повышает количество экстрагированной аминокислоты.

В составе водных экстрактов из тканей хвойных растений кроме аминокислот могут присутствовать различные органические соединения, преимущественно углеводы, которые могут мешать определению аргинина с помощью реакции Сакагучи. Для адсорбции аминокислот из экстрактов используют катионообменные смолы. Ионообменные смолы имеют ограниченную адсорбционную емкость, поэтому необходимо оценить адсорбционную емкость смолы, особенно при наличии высоких концентраций аминокислоты в экстракте. При очистке аминокислот хвои от органических соединений на колонке, заполненной ионообменной смолой КУ-2, традиционно в качестве элюента используется раствор 4N HCl. В данной работе, учитывая необходимость проведения анализа образцов хвои с аномально высоким содержанием аргинина, целесообразно было провести испытание различных концентраций HCl.

Следует отметить, что поскольку цветная реакция Сакагучи характерна не только для аргинина, но и для других соединений, содержащих гуанидиновую группу монопроизводных гуанидина, то необходимо проведение контрольного анализа образцов хвои на автоматическом аминокислотном анализаторе (ААА).

Таким образом, для разработки ускоренного СФ-метода анализа аргинина у хвойных растений необходимо определить экстрагенты, обеспечивающие максимальное извлечение аргинина из хвои, разработать способы очистки экстракта от органических соединений и показать ее необходимость при проведении анализа, испытать различные хромогенные реагенты для цветной реакции Сакагучи и определить длину волны, при которой происходит максимальное оптическое поглощение у исследуемых растворов.

Цель исследований – модификация способа определения L-аргинина в хвое сосны обыкновенной с использованием цветной реакции Сакагучи спектрофотометрическим методом.

Экспериментальная часть

Растительный материал. В качестве растительного материала использовали хвою текущего года 10-летних деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), растущих на песчаной почве, имеющей оптимальную для роста хвойных растений кислотность и низкий уровень азота и бора [8]. Для получения хвои, обогащенной аргинином, на трех опытных модельных участках в почву в первой декаде июня вносили азот в дозе 300 кг га⁻¹ в виде сухой аммиачной селитры и бор в дозе 3.0 кг га⁻¹ в виде водного раствора борной кислоты. На трех контрольных участках азот и бор в почву не вносили.

Образцы хвои для проведения методических работ отбирали с деревьев опытных и контрольных участков в декабре (в год внесения удобрений) между 14:00 и 15:30 ч, с третьей мутовки, хранили в период проведения анализа в морозильной камере при температуре -20 °С. Перед проведением анализа определяли влажность растительных образцов и рассчитывали содержание аргинина в расчете на абсолютно сухое вещество (а.с.в.).

Извлечение аминокислот из хвои. 1 г хвои растирали в ступке, помещали в коническую колбу на 50 мл, заливали 10 мл теплой дистиллированной воды (60 °С) и взбалтывали 0.5 ч на шейкере [15]. Проводили осаждение белка 50% трихлоруксусной кислотой (ТХУ), 1 мл которой заливали в коническую колбу с 9 мл

взвеси растительного материала при помешивании стеклянной палочкой. Взбалтывали 0.5 ч на шейкере. Содержимое колбы переносили в центрифужную пробирку. Перед центрифугированием уравнивали пробирки на технических весах. Проводили центрифугирование 15 мин при 3000–4000 г (центрифуга MPW-351R, Польша). После центрифугирования, не перемешивая, содержимое пробирки фильтровали через мелкопористый фильтр с размером пор 2–3 мкм (синяя лента, синяя бумага) в колбу на 100 мл. Осадок из пробирки переносили в коническую колбу, заливали 10 мл 2% ТХУ при помешивании, взбалтывали на шейкере 0.5 ч. Содержимое колбы переносили в центрифужную пробирку и проводили центрифугирование 15 мин при 3000–4000 г. После центрифугирования, не перемешивая, содержимое пробирки фильтровали в колбу на 100 мл. Осаждение белков 2% ТХУ проводили еще 2 раза. Осадок из пробирки переносили в коническую колбу, заливали 10 мл дистиллированной воды при помешивании, взбалтывали на шейкере 0.5 ч. Содержимое колбы переносили в центрифужную пробирку и проводили центрифугирование 15 мин при 3000–4000 г. После центрифугирования, не перемешивая, содержимое пробирки фильтровали в колбу на 100 мл. Содержимое колбы на 100 мл со свободными аминокислотами доводили до метки дистиллированной водой и определяли рН (экстракт №1).

Очистка водного экстракта из хвои от углеводов

Очистку водного хвойного экстракта от углеводов проводили на колонке с катионитом – смолой КУ-2 с величиной зерен 0.5 мм [15]. Длина заряженной части колонки составляла 14.5 см. Скорость прохождения экстракта – 1 мл/мин. Предварительно определяли статическую адсорбционную емкость катионообменной смолы КУ-2 (мкг/г) [20], которую рассчитывали по уравнению:

$$\frac{(C_0 - C) \cdot V}{M},$$

где C_0 – концентрация аргинина в исследуемом растворе до адсорбции (мкг/мл), C – концентрация аргинина в растворе после адсорбции (мкг/мл), V – объем раствора (мл), и M – количество используемой смолы (г).

Зарядку колонок катионитом КУ-2, подготовку их для анализа и очистку экстракта от углеводов проводили следующим образом. 10 г катионита встряхивали на шейкере в течение 2 ч с 300 мл 4N HCl. На фильтре отмывали смолу от кислоты дистиллированной водой до нейтральной реакции. В результате обработки катионит насыщался водородными ионами. Для удаления воздуха смолу заливали водой и выдерживали сутки, после чего ее заливали в мокрые колонки при помешивании, и они были готовы к проведению анализа. Экстракт свободных аминокислот из колбы на 100 мл (экстракт №1) переносили в колонки и пропускали через катионит (скорость потока 1 мл/мин). Аминокислоты адсорбировались катионитом и задерживались в колонке, а углеводы и другие электронейтральные молекулы в колонке не задерживались. Для дополнительного освобождения адсорбированных на смоле аминокислот от углеводов через смолу пропускали 80 мл дистиллированной воды. Для контроля полноты осаждения аргинина на смоле определяли его содержание в растворах углеводов. Аминокислоты элюировали из смолы 100 мл HCl различной концентрации – по вариантам эксперимента: 2, 4, 6, 8 или 10N HCl. Выпаривали воду и HCl из раствора в фарфоровых чашках, приливая дистиллированную воду. В осадке определяли содержание аргинина по методу Сакагучи.

Для выявления необходимости очистки водного хвойного экстракта от углеводов при анализе аргинина проводили определение его содержания в идентичных образцах хвои с использованием [15] и без применения очистки на катионите КУ-2 [23]. При этом анализировали образцы хвои контрольного и опытного вариантов; с включением в состав экстрактов из них химически чистого (х.ч.) аргинина, который добавляли в экстракты по вариантам, исходя из расчета 0, 10, 30 мкг/мг а.с.в., а в дистиллированную воду – в дозах 10 и 30 мкг/мл.

Экстракция аргинина из хвои без очистки от углеводов. 200 мг измельченной хвои помещали в колбочку на 25 мл, заливали 4 мл теплой (60 °С) дистиллированной воды и помещали в нагретую до кипения водяную баню на 10 мин. Затем содержимое колбочки помещали на шейкер с подогревом до 60 °С на 30 мин. Экстракт отделяли от растительного материала центрифугированием в течение 5 мин при 3000 г. Экстракт сливали в выпарительную фарфоровую чашку. Экстракцию дистиллированной водой проводили трижды. Растительный остаток выбрасывали. Объединенные фильтраты в фарфоровой чашке упаривали до сухого остатка на водяной бане при 70 °С. Для выявления наиболее эффективного экстрагента испытывали для экстракции аргинина из хвои кроме дистиллированной воды также 80% этанол, боратные буферы с рН: 9.3; 9.6; 10.8 и фосфатные буферы с рН 8.0; 9.8.

Анализ аргинина в хвое по методу Сакагучи с α -нафтолом или 8-оксихинолином. Определение аргинина было основано на реакции Сакагучи, как описано Gilboe, William [24]. Аргинин в присутствии α -нафтола с гипобромитом натрия окрашивает раствор в красный цвет. Водный раствор мочевины используется для разрушения возможного избытка гипобромита натрия и предотвращения выцветания окраски. Все реагенты и растворы охлаждали на льду перед проведением анализа. Определяли содержание аргинина в исследуемых растворах в количестве от 1 до 12 мкг/мл.

200 мг измельченной хвои помещали в колбочку на 25 мл, заливали 4 мл теплой (60 °С) дистиллированной воды и помещали в нагретую до кипения водяную баню на 10 мин, затем выдерживали на шейкере в течение 30 мин. Взвесь переносили в центрифужную пробирку и отделяли от растительного материала центрифугированием в течение 5 мин при 3000 г. Экстракт сливали в выпарительную фарфоровую чашку. Сухой остаток из центрифужной пробирки переносили снова в колбочку, заливали 4 мл теплой (60 °С) дистиллированной воды и встряхивали на шейкере в течение 30 мин. Центрифугировали, экстракт сливали в фарфоровую чашку. Повторяли процедуру еще раз, в результате суммарный объем экстракта составлял 12 мл. Растительный остаток выбрасывали. Объединенный экстракт упаривали до 5.0 мл в термостате при 90 °С в течение 1 ч 40 мин и переносили в мерную пробирку. Экстракт остужали и фильтровали через мелкопористый фильтр с размером пор 2–3 мкм (синяя лента, синяя бумага). Если объем экстракта был менее 5.0 мл, то дистиллированной водой доводили до этого объема. Из фильтрата на анализ отбирали в пробирку 1 мл, добавляли 4 мл дистиллированной воды, чтобы суммарный объем составлял 5 мл. Ставили пробирку в лед. Добавляли последовательно 1 мл 10% NaOH и 1 мл 0.1% раствора α -нафтола. Через 2 мин приливали 1 мл 5% водного раствора мочевины. Затем постепенно при перемешивании, сняв пробирку из бани, добавляли 2 мл 0.4% гипобромита натрия (NaBrO получали растворением 0.67 мл брома в 100 мл 1 N раствора NaOH). После этого пробирки плотно закрывали пробками, тщательно встряхивали, затем убирали пробки (чтобы удалить пузырьки из раствора) и определяли оптическую плотность (D) раствора на спектрофотометре СФ-2000 (Спектрофотометр ОКБ Спектр, Россия) в кювете толщиной 10 мм. Измерение оптической плотности (D) растворов проводили в режиме сканирования СФ-2000 для определения длины волны с максимумом поглощения. В качестве холостого раствора использовали дистиллированную воду с реагентами реакции Сакагучи. Измерения проводили сразу после удаления пузырьков, так как через 10–12 мин после добавления последнего раствора оптическая плотность раствора уменьшалась. Концентрацию аргинина в исследуемом образце хвои в мкг/мг абсолютно сухого вещества (а.с.в.) определяли на основании калибровочной кривой по формуле (2):

$$\frac{(D_{обр.} - D_{хол.}) \cdot K \cdot V \cdot P}{M},$$

где $D_{обр.}$ – оптическая плотность экстракта образца хвои, $D_{хол.}$ – оптическая плотность холостого раствора с реагентами; K – коэффициент оптической плотности, установленный по калибровочной кривой, отражающий зависимость концентрации аргинина от оптической плотности раствора; V – объем экстракта образца хвои, мл; P – разведение экстракта образца хвои в процессе проведения цветной реакции; M – абсолютно сухая масса хвои, мг.

При испытании 8-оксихинолина в качестве хромогенного реагента в цветной реакции Сакагучи анализ содержания аргинина в образцах хвои опытного и контрольного вариантов проводили аналогично изложенной методике, за исключением того, что вместо 1.0 мл 0.1% раствора α -нафтола использовали 1.0 мл 0.1% раствора 8-оксихинолина [19–21].

Для получения калибровочной кривой готовили исходный раствор аргинина путем растворения 100 мг в 100 мл дистиллированной воды. Стандартные растворы с концентрациями от 3 до 30 мкг мл⁻¹ были получены путем разбавления исходного раствора дистиллированной водой. Далее в пробирку, содержащую 5 мл стандартного раствора аргинина, добавляли последовательно 1.0 мл 0.1% раствора α -нафтола (или 1.0 мл 0.1% раствора 8-оксихинолина) и 1.0 мл 10% гидроксида натрия. Раствор тщательно перемешивали и помещали на лед на 10 мин. Затем добавляли 0.5 мл 0.4% раствора гипобромита натрия, чтобы получить окраску путем энергичного встряхивания. После этого добавляли 1.0 мл 40% раствора мочевины по каплям в течение 30 сек. Затем раствор равномерно перемешивали и определяли его оптическую плотность на спектрофотометре СФ-2000 в режиме сканирования. Использовали в качестве холостого раствора дистиллированную воду с реагентами реакции Сакагучи.

Параллельно с анализом аргинина в хвое по методу Сакагучи проводили контрольный анализ тех же образцов контрольного и опытного вариантов на автоматическом аминокислотном анализаторе ААА-339 [15].

Статистический анализ результатов, полученных в трехкратной биологической и трехкратной аналитической повторностях, проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel с применением однофакторного дисперсионного анализа. На рисунках представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Обсуждение результатов

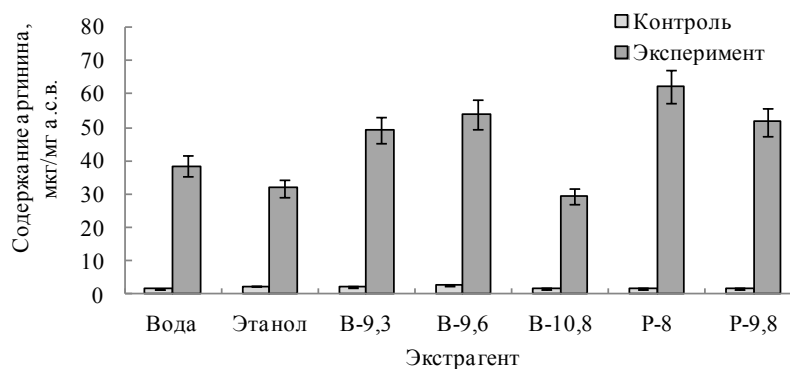
Экстрагенты аргинина. Использование различных экстрагентов не оказало значительного влияния на количество экстрагируемого аргинина из хвои контрольного варианта с низким содержанием аминокислоты (рис. 1). При экстрагировании аргинина из хвои опытного варианта, с высоким содержанием аминокислоты, максимальное извлечение отмечалось при использовании в качестве экстрагента фосфатного буфера с рН 8.0 (62.2 мкг/мг а.с.в.). Эффективными экстрагентами аргинина оказались боратные буферы с рН 9.6 и 9.3, а также фосфатный буфер с рН 9.8. При использовании дистиллированной воды при 60 °С количество извлекаемого аргинина из хвои составляло на треть меньшую величину по сравнению с максимальным извлечением – фосфатным буфером с рН 8.0. Экстракция аргинина из хвои опытного варианта 80% этанолом и боратным буфером с рН 10.8 приводила к меньшему результату (31.9–29.6 мкг/мг а.с.в.).

Очистка экстракта на колонке с катионообменной смолой КУ-2. Адсорбционная емкость аргинина на катионообменной смоле КУ-2 составила 3.65 ± 0.31 мкг/г. Адсорбционная способность аргинина на смоле зависит от рН экстракта, поскольку заряд аргинина зависит от рН раствора. Arg^{2+} является основным катионом при рН ниже 2.17, тогда как Arg^+ является основным катионом при рН от 2.17 до 9.04 [25]. Коэффициент селективности Arg^{2+} выше, чем у Arg^+ . В нашем эксперименте значения рН экстрактов из хвои опытного и контрольного вариантов после осаждения белков ТХУ составили соответственно 1.3 и 1.2. Результаты анализа аргинина в водных элюатах, содержащих углеводы после пропускания хвойного экстракта опытного и контрольного вариантов, а также дистиллированной воды через смолу КУ-2, показали отсутствие аминокислоты в них. Это свидетельствовало о полной адсорбции аргинина на смоле при использовании ее в количестве 10 г при рН хвойных экстрактов 1.3 и 1.2 и при пропускании их через смолу со скоростью 1 мл/мин.

Использование растворов HCl различной концентрации для элюирования аргинина из катионита КУ-2 показало, что раствор 4N HCl наиболее подходит для этой цели в случае анализа хвои контрольного и опытного вариантов, соответственно с низким и высоким содержанием аргинина (рис. 2). Раствор 2N HCl элюировал низкое количество аргинина, растворы HCl с концентрациями от 6N до 10N элюировали аргинин в убывающем количестве при возрастании концентрации HCl.

Не выявлено существенных отличий в содержании аргинина в хвое при его анализе с использованием очистки экстракта от углеводов на колонке с катионитом КУ-2 и при определении его без очистки экстракта от углеводов (рис. 3). Полученные данные позволяют проводить анализ аргинина в хвое сосны без очистки водного экстракта на колонке.

Рис. 1. Количество аргинина, извлекаемого из хвои сосны обыкновенной опытного и контрольного вариантов при использовании различных экстрагентов – дистиллированной воды при 60 °С, 80% этанола, боратных буферов (В) с рН 9.3, 9.6, 10.8; фосфатных буферов (Р) с рН 8.0, 9.8



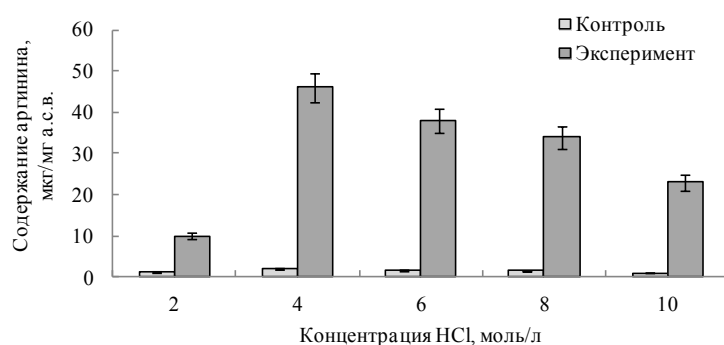


Рис. 2. Количество элюированного со смолы КУ-2 аргинина, содержащегося в экстрактах хвой сосны обыкновенной опытного и контрольного вариантов, при использовании в качестве элюента различных концентраций HCl

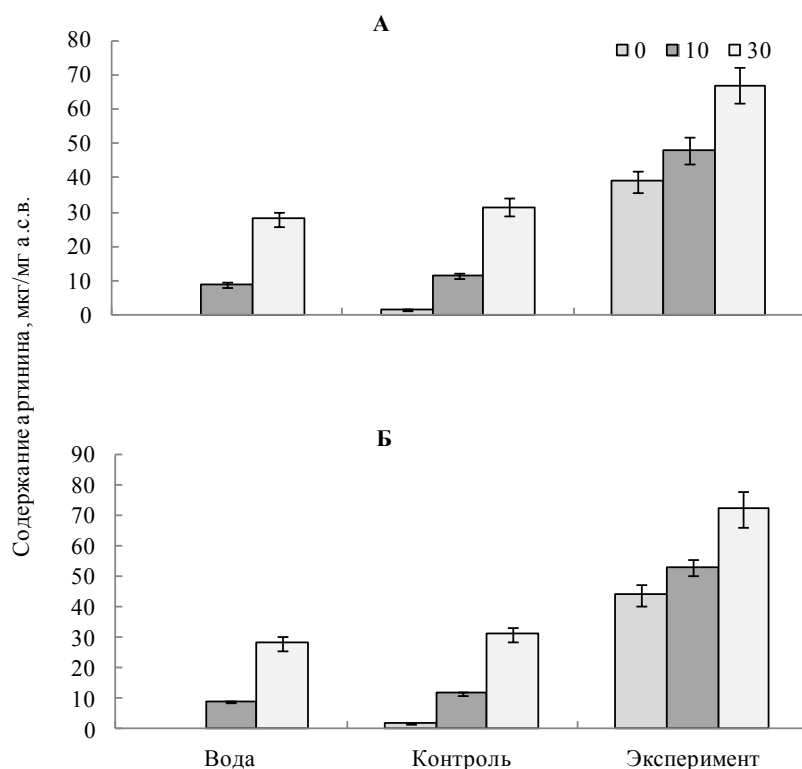


Рис. 3. Количество аргинина в дистиллированной воде и водных экстрактах из хвой сосны обыкновенной опытного и контрольного вариантов с добавлением в них х.ч. аргинина при использовании очистки на смоле КУ-2 (А) и без очистки (Б). Х.ч. аргинин добавляли в дистиллированную воду в дозах 10 и 30 мкг/мл, в экстракты по вариантам, исходя из расчета 0, 10, 30 мкг/мг а.с.в.

Цветная реакция Сакагучи с использованием α -нафтола или 8-оксихинолина. Использование в цветной реакции Сакагучи α -нафтола или 8-оксихинолина в присутствии окислителя – гипобромита натрия не показало количественных различий в результатах определения аргинина в хвое. Показатели содержания аргинина в хвое контрольного и опытного вариантов составили соответственно с использованием α -нафтола 2.2 ± 0.2 и 38.6 ± 3.9 мкг/мг а.с.в., с использованием 8-оксихинолина – 2.3 ± 0.2 и 39.1 ± 4.0 мкг/мг а.с.в. Значения показателей оптической плотности (D) окрашенных продуктов реакции аргинина с α -нафтолом были выше, чем с 8-оксихинолином (рис. 4). Окрашивание растворов в присутствии 8-оксихинолина было более стабильным, сохранялось в течение более длительного времени по сравнению с присутствием α -нафтола – соответственно до 20 и 10 мин. Длины волн спектров максимальных значений оптического поглощения при анализе аргинина в хвое по методу Сакагучи при использовании в качестве реагентов α -нафтола и 8-оксихинолина составили соответственно 490 и 520 нм (рис. 5, 6).

Полученные данные показали, что при определении аргинина в хвое по методу Сакагучи можно использовать оба реагента. При анализе образцов хвой с низкими концентрациями аргинина предпочтительно использование α -нафтола, поскольку оптическая плотность растворов продуктов реакции Сакагучи с его применением более высокая. При анализе образцов хвой с высокими концентрациями аргинина применение 8-оксихинолина можно считать более рациональным в связи с более стабильным во времени окрашиванием продуктов реакции. В работах [19–21] показано, что 8-оксихинолин в цветной реакции Сакагучи при анализе аргинина в биологических объектах проявил себя как эффективный хромогенный реагент, образующееся

окрашенное соединение с его использованием имело высокие показатели оптического поглощения и оставалось стабильным длительное время.

Значения содержания аргинина в экстрактах из хвои исследуемой партии образцов при анализе по реакции Сакагучи и на ААА-339 были близки, соответственно, в контрольном варианте 2.6 ± 0.3 и 2.2 ± 0.2 мкг/мг а.с.в., в опытном – 43.1 ± 0.5 и 39.8 ± 0.4 мкг/мг а.с.в. При анализе аргинина с помощью реакции Сакагучи в опытном варианте отмечалась тенденция повышенного содержания аргинина, что, возможно, обусловлено наличием в хвое в незначительных количествах кроме аргинина других монопроизводных соединений гуанидина. Поскольку данные по содержанию аргинина в хвое, полученные методом Сакагучи, соответствовали полученным результатам при его анализе на ААА-339, предлагается использование СФ-метода для рутинного анализа аминокислоты в хвое сосны при отработке технологий повышения содержания аргинина у хвойных растений и получения обогащенных аргинином хвойных препаратов с контрольным анализом аминокислоты каждой партии растительных образцов на ААА.

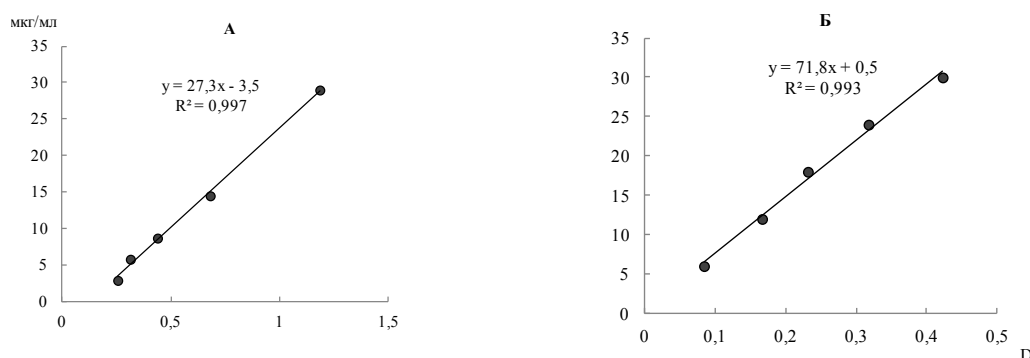


Рис. 4. Калибровочные графики, отражающие зависимость концентрации аргинина (мкг/мл) от оптической плотности (D) продуктов реакции аминокислоты с 0.1% α -нафтолом (А), 0.1% 8-оксихинолином (Б)

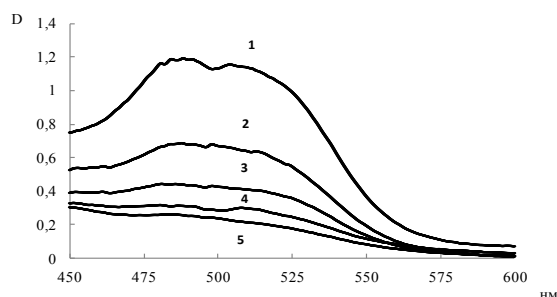


Рис. 5. Спектры поглощения градуировочных растворов аргинина в цветной реакции Сакагучи с использованием α -нафтола. Концентрации аргинина в градуировочных растворах: 1, 2, 3, 4, 5 – соответственно 30, 15, 9, 6, 3 мкг/мл

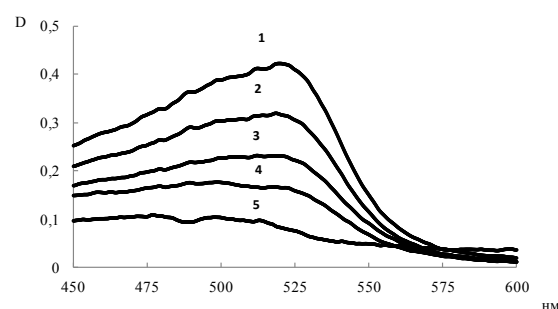


Рис. 6. Спектры поглощения градуировочных растворов аргинина в цветной реакции Сакагучи с использованием 8-оксихинолина. Концентрации аргинина в градуировочных растворах: 1, 2, 3, 4, 5 – соответственно 30, 24, 18, 12, 6 мкг/мл

Выводы

Испытание различных экстрагентов – дистиллированной воды (60°C), 80% этанола, боратных буферов с рН: 9.3; 9.6; 10.8, фосфатных буферов с рН 8.0; 9.8 при экстракции аргинина из хвои с высоким содержанием аминокислоты (до 62 мкг/мг а.с.в.) показало, что самым эффективным экстрагентом был фосфатный буфер с рН 8.0, несколько менее эффективными были фосфатный буфер с рН 9.8, а также боратные буферы с рН 9.3 и 9.6. При использовании дистиллированной воды при 60°C количество извлекаемого аргинина из хвои составляло на треть меньшую величину по сравнению с максимальным извлечением с помощью фосфатного буфера

с рН 8.0. Экстракция аргинина из хвои опытного варианта 80% этанолом и боратным буфером с рН 10.8 приводила к меньшему результату. Количество экстрагированного аргинина из хвои контрольного варианта, с низким содержанием аминокислоты (до 3 мкг/мг а.с.в.), не зависело от используемого экстрагента.

При очистке водного хвойного экстракта от углеводов на колонке с катионообменной смолой КУ-2 аргинин максимально элюировали из смолы при использовании в качестве элюента раствора 4N HCl.

Не выявлено существенных отличий в содержании аргинина в хвое при его анализе без очистки экстракта от углеводов и с использованием очистки экстракта от углеводов на колонке с катионитом КУ-2.

Использование хромогенных реактивов – α -нафтола или 8-оксихинолина в цветной реакции Сакагучи при анализе аргинина в хвое сосны показало возможность применения их. Преимуществом α -нафтола является более интенсивное окрашивание растворов реакции Сакагучи, 8-оксихинолина – более высокая стабильность окрашенных растворов во времени.

Длины волн спектров максимальных значений оптического поглощения калибровочных растворов для анализа аргинина в хвое по методу Сакагучи при использовании в качестве хромогенных реактивов α -нафтола и 8-оксихинолина составили соответственно 490 и 520 нм.

По результатам исследований разработана методика анализа содержания аргинина с использованием реакции Сакагучи в хвое сосны обыкновенной, что позволяет проводить большое количество анализов в исследуемых растительных образцах с естественным (низким) и аномально высоким содержанием аминокислоты. Использование простого, воспроизводимого, достаточно точного метода Сакагучи приемлемо для рутинного анализа аргинина в хвое сосны при отработке технологий повышения содержания аминокислоты у хвойных растений и получения обогащенных аргинином хвойных препаратов. Разработка ускоренных методов анализа органических соединений в растительном материале способствует решению задач, касающихся целенаправленного изменения биохимического состава растений и фармакологических свойств растительного сырья, что позволяет осваивать новые сырьевые источники БАВ, используемых для производства лекарственных средств и пищевых добавок.

Список литературы

1. Näsholm T.G., Ericsson A. Seasonal changes in amino acids, protein and total nitrogen in needles of fertilized Scots pine trees // *Tree Physiology*. 1990. Vol. 6. Pp. 267–281.
2. Gezelius K., Nasholm T. Free amino acids and protein in Scots pine seedlings cultivated at different nutrient availabilities // *Tree Physiology*. 1993. Vol. 13. N1. Pp. 71–86.
3. Алаудинова Е.В., Миронов П.В. Свободные аминокислоты вегетативных органов *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L. // *Химия растительного сырья*. 2017. №3. С. 85–91.
4. Чернобровкина Н.П., Робонен Е.В., Зайцева М.И. Накопление L-аргинина в хвое сосны обыкновенной при регуляции азотного и борного обеспечения // *Химия растительного сырья*. 2010. №3. С. 71–75.
5. Чернобровкина Н.П., Робонен Е.В., Морозов А.К., Макарова Т.Н. Накопление L-аргинина в хвое ели европейской при регуляции азотного и борного обеспечения // *Труды КарНЦ РАН*. 2013. №3. С. 159–165.
6. Чернобровкина Н.П., Робонен Е.В. Содержание азота, бора и аминокислот в хвое сосны обыкновенной при регуляции азотного и борного обеспечения // *Труды КарНЦ РАН*. 2015. №12. С. 35–44.
7. Чернобровкина Н.П., Робонен Е.В., Унжаков А.Р., Тютюнник Н.Н. Аргинин в жизни хвойных растений // *Сибирский экол. журнал*. 2016. №5. С. 729–738.
8. Чернобровкина Н.П., Робонен Е.В., Макарова Т.Н., Репин А.В. Сезонная динамика содержания аргинина в хвое *Pinus sylvestris* L. после внесения азота и бора // *Лесоведение*. 2017. №5. С. 39–46.
9. Чернобровкина Н.П., Робонен Е.В., Макарова Т.Н., Репин А.В. Сезонная динамика аргинина в хвое *Pinus sylvestris* L. в зависимости от сроков внесения азота и бора // *Химия растительного сырья*. 2018. №2. С. 159–168.
10. Патент №2515015 (РФ). Хвойная биологически активная добавка, обогащенная L-аргинином, для повышения продуктивных качеств кур-несушек / В.П. Короткий, Ю.Н. Прытков, С.С. Марисов, Н.И. Гибалкина, А.А. Кистина, Н.П. Чернобровкина, Е.В. Робонен. 2014.
11. Патент №2540354 (РФ). Способ кормления пушных зверей / Н.П. Чернобровкина, Е.В. Робонен, Т.Н. Макарова, А.Р. Унжаков, Н.Н. Тютюнник, Л.Н. Узенбаева, И.В. Баишникова. 2015.
12. Gayda G.Z., Stasyuk N.Y., Gonchar M.V. The methods of l-arginine analysis (review) // *Biotechnologia Acta*. 2014. Vol. 7(1). Pp. 31–39.
13. Teerlink T., Nijveldt R.J., Jong S. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography // *Anal. Biochem*. 2002. Vol. 303. Pp. 131–137.
14. Marra M., Bonfigli A.R., Testa R. High-performance liquid chromatographic assay of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, and arginine in human plasma by derivatization with naphthalene-2, 3-dicarboxaldehyde // *Anal. Biochem*. 2003. Vol. 318. Pp. 13–17.

15. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. М., 1976. 256 с.
16. Zhang L., Liu Y., Chen G. Simultaneous determination of allantoin, choline and L-arginine in Rhizoma Dioscoreae by capillary electrophoresis // J. Chromatogr. 2004. Vol. 1043. Pp. 317–321.
17. Durzan D.J. Arginine and the shade tolerance of white spruce saplings entering winter dormancy // J. Forest Science. 2010. Vol. 56. Pp. 77–83.
18. Sakaguchi S. Colorimetric determination of arginine // J. of Biochemistry. 1925. Vol. 5. P. 25.
19. Li H., Liang X., Feng L., Liu Y., Wang H.A. Simple and Fast Method for Arginine Determination in Grape Juice // Journal of Food and Drug Analysis. 2008. Vol. 16. N3. Pp. 53–58.
20. Wang H., Liang X., Zhao R., Feng L., Li H. Spectrophotometric Determination of Arginine in Grape Juice Using 8-Hydroquinoline // Agricultural Sciences in China. 2008. Vol. 7. N10. Pp. 1210–1215.
21. Chacher B., Liu J.-X., Liu H.-Y., Marghazani I.B. Development of Simple and Precise Method of Arginine Determination in Rumen Fluid by Spectrophotometer // J. Chem. Soc. Pak. 2015. Vol. 37. N3. Pp. 426–430.
22. Ушанова В.М. Переработка древесной зелени и коры пихты сибирской с получением биологически активных продуктов // Хвойные бореальной зоны. 2013. Т. 30. №1-2. С. 138–142.
23. Калинкина Л.Х., Назаренко Л.В., Гордеева Е.Е. Модифицированный метод выделения свободных аминокислот для определения на аминокислотном анализаторе // Физиология растений. 1990. Т. 37, вып. 3. С. 617–621.
24. Gilboe D.D., William J.N. Evaluation of the Sakaguchi reaction for quantitative determination of arginine // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1956. Vol. 91. Pp. 535–536.
25. Gan L.H., Weng L.J., Wang S.B. Research on the properties of the adsorption of L-arginine by 732 cation exchange resin // Ion Exch. Membr. 2002. Vol. 18. Pp. 559–563.

Поступила в редакцию 14 ноября 2019 г.

После переработки 14 января 2020 г.

Принята к публикации 7 марта 2020 г.

Для цитирования: Чернобровкина Н.П., Робонен Е.В., Никерова К.М., Галибина Н.А., Макарова Т.Н., Репин А.В. Определение содержания L-аргинина в хвое сосны обыкновенной с использованием метода Сакагучи // Химия растительного сырья. 2020. №3. С. 245–254. DOI: 10.14258/jcrpm.2020036645.

Chernobrovkina N.P.*, Robonen E.V., Nikerova K.M., Galibina N.A., Makarova T.N., Repin A.V. DETERMINATION OF L-ARGININE CONTENT IN SCOTS PINE NEEDLES USING THE SAKAGUCHI TEST

Forest Institute, KarRC RAS, ul. Pushkinskaya, 11, Petrozavodsk, 185910 (Russia), e-mail: chernobrovkina50@bk.ru

Arginine can be accumulated in substantial amounts in coniferous plants whose mineral nutrition is regulated. A simple, quick, accurate and inexpensive method for determining the amino acid in coniferous plant organs is needed to improve the technique of raising the arginine level in the plants and making arginine-rich products of their needles. The aim of this study was to modify a spectrophotometric method for determining arginine in *Pinus sylvestris* L. needles containing low or abnormally high levels of the amino acid using the Sakaguchi test. Our studies revealed the agents providing for maximum extraction of arginine from needles. Techniques for stripping the extract of organic compounds and chromogenic reagents for the Sakaguchi test were tested, and the wavelengths of maximum optical absorption of solvents in needle arginine content spectrophotometric analysis were determined. This method is simple, reproducible, accurate, and can be employed to quickly analyze pine needles for arginine content, in particular when developing techniques for augmenting it in coniferous plants and making arginine-rich products of coniferous needles.

Keywords: *Pinus sylvestris*, needles, arginine, Sakaguchi test, spectrophotometry, method modification.

References

1. Näsholm T.G., Ericsson A. *Tree Physiology*, 1990, vol. 6, pp. 267–281.
2. Gezelius K., Nasholm T. *Tree Physiology*, 1993, vol. 13, no. 1, pp. 71–86.
3. Alaudinova Ye.V., Mironov P.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2017, no. 3, pp. 85–91. (in Russ.).
4. Chernobrovkina N.P., Robonen Ye.V., Zaytseva M.I. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2010, no. 3, pp. 71–75. (in Russ.).
5. Chernobrovkina N.P., Robonen Ye.V., Morozov A.K., Makarova T.N. *Trudy KarNTS RAN*, 2013, no. 3, pp. 159–165. (in Russ.).
6. Chernobrovkina N.P., Robonen Ye.V. *Trudy KarNTS RAN*, 2015, no. 12, pp. 35–44. (in Russ.).
7. Chernobrovkina N.P., Robonen Ye.V., Unzhakov A.R., Tyutyunnik N.N. *Sibirskiy ekol. Zhurnal*, 2016, no. 5, pp. 729–738. (in Russ.).
8. Chernobrovkina N.P., Robonen Ye.V., Makarova T.N., Repin A.V. *Lesovedeniye*, 2017, no. 5, pp. 39–46. (in Russ.).
9. Chernobrovkina N.P., Robonen Ye.V., Makarova T.N., Repin A.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 2, pp. 159–168. (in Russ.).
10. Patent 2515015 (RU). 2014. (in Russ.).
11. Patent 2540354 (RU). 2015. (in Russ.).
12. Gayda G.Z., Stasyuk N.Y., Gonchar M.V. *Biotechnologia Acta*, 2014, vol. 7(1), pp. 31–39.
13. Teerlink T., Nijveldt R.J., Jong S. *Anal. Biochem.*, 2002, vol. 303, pp. 131–137.
14. Marra M., Bonfigli A.R., Testa R. *Anal. Biochem.*, 2003, vol. 318, pp. 13–17.
15. Pleshkov B.P. *Praktikum po biokhimii rasteniy*. [Workshop on plant biochemistry]. Moscow, 1976, 256 p. (in Russ.).
16. Zhang L., Liu Y., Chen G. *J. Chromatogr.*, 2004, vol. 1043, pp. 317–321.
17. Durzan D.J. *J. Forest Science*, 2010, vol. 56, pp. 77–83.
18. Sakaguchi S. *J. of Biochemistry*, 1925, vol. 5, p. 25.
19. Li H., Liang X., Feng L., Liu Y., Wang H.A. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2008, vol. 16, no. 3, pp. 53–58.
20. Wang H., Liang X., Zhao R., Feng L., Li H. *Agricultural Sciences in China*, 2008, vol. 7, no. 10, pp. 1210–1215.
21. Chacher B., Liu J.-X., Liu H.-Y., Marghazani I.B. *J. Chem. Soc. Pak.*, 2015, vol. 37, no. 3, pp. 426–430.
22. Ushanova V.M. *Khvoynyye boreal'noy zony*, 2013, vol. 30, no. 1-2, pp. 138–142. (in Russ.).
23. Kalinkina L.Kh., Nazarenko L.V., Gordeyeva Ye.Ye. *Fiziologiya rasteniy*, 1990, vol. 37, no. 3, pp. 617–621. (in Russ.).
24. Gilboe D.D., William J.N. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1956, vol. 91, pp. 535–536.
25. Gan L.H., Weng L.J., Wang S.B. *Ion Exch. Membr.*, 2002, vol. 18, pp. 559–563.

Received November 14, 2019

Revised January 14, 2020

Accepted March 7, 2020

For citing: Chernobrovkina N.P., Robonen E.V., Nikerova K.M., Galibina N.A., Makarova T.N., Repin A.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 3, pp. 245–254. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2020036645.

* Corresponding author.