

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ *POLEMONIUM COERULEUM* L.

А. А. Гудкова, Г. Ю. Шестакова, А. С. Чистякова, А. И. Сливкин

ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 15.03.2021 г.

Аннотация. Синюха голубая на протяжении долгого времени была известна в медицинской практике. В качестве официального средства на территории РФ разрешены к применению корневища с корнями растения, трава же является БАД. Однако, не смотря на большое разнообразие научных публикаций, посвященных изучению химического состава растения, информация об аминокислотном составе растительного сырья (как корневищ с корнями, так и травы) синюхи голубой отсутствует. Целью исследования являлось изучение аминокислотного состава травы и корневищ с конями синюхи голубой. В работе были использованы высушенные образцы травы и корневищ с корнями синюхи голубой, которые были заготовлены в 2019 году. Для изучения состава свободных аминокислот использовали водные извлечения из растительного сырья (соотношение сырье : экстрагент 1:5). Подвижная фаза – бутанол : уксусная кислота : вода (4:1:2), проявитель 0.2% спиртовой раствор нингидрина. Количественное определение суммы свободных аминокислот в пересчете на глутаминовую кислоту в траве изучаемых видов определяли спектрофотометрическим методом, по их реакции с нингидрином.

Полный состав аминокислот (свободные и связанные аминокислоты) определяли методом капиллярного электрофореза («Капель-105/105М», Россия), после 18 часов кислотного гидролиза при температуре 110 ± 5 °С.

Впервые поведено изучение аминокислотного состава корневищ с корнями и травы синюхи голубой. Методом ТСХ установлены различия в качественном составе аминокислот надземных и подземных частей данного растения. Установлено количественное содержание суммы свободных АК в пересчете на глутаминовую кислоту, которая составила 0.12% и 0.11% для корневищ с корнями и травы синюхи голубой соответственно. Впервые методом капиллярного электрофореза получена информация и выявлены различия в качественном составе профиля аминокислот и количественном содержании отдельных аминокислот в растительном сырье синюхи голубой. Полученные результаты позволяют расценивать изучаемое растение в качестве дополнительного источника аминокислот.

Ключевые слова: Синюха голубая, *Polemonium coeruleum* L., аминокислоты, спектрофотометрия, капиллярный электрофорез.

Синюха голубая (син. валериана греческая, лестница Иакова (Jacob's Ladder)) известна в медицинском сообществе уже порядка 100 лет. Активное изучение растения в России началось с 30-х годов XX столетия, когда подземные органы синюхи голубой были предложены Варлаковым М.Н. для лечения заболеваний органов дыхания [1]. В настоящее время в соответствии с Государственной Фармакопеей XIV издания к медицинскому применению разрешены корневища с корнями синюхи голубой, а надземная часть реализуется в качестве БАД, успокаивающего действия. Изучению растительного сырья синюхи

голубой посвящено большое количество научных исследований [2-4], но, несмотря на изученность химического состава растения, исследований аминокислотного состава не проводилось. Актуальность данного вопроса несомненна, аминокислоты (АК) входят в состав сложного комплекса метаболома растительных организмов и представляют собой отправную точку биосинтеза ряда органических соединений [5-9]. Одним из главных достоинств АК необходимо выделить их способность придавать соединениям разной природы (как органической, так и неорганической) легкоусвояемую форму, способствуют снижению их токсичности и потенцированию активности [10-11]. Попадая в организм человека, АК являются фармакологически активными соединениями.

© Гудкова А. А., Шестакова Г. Ю., Чистякова А. С., Сливкин А. И., 2021

Целью исследования являлось изучение аминокислотного состава травы и корневищ с корнями синюхи голубой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы высушенные образцы травы и корневищ с корнями синюхи голубой. Растения были заготовлены по правилам сбора разных морфологических групп сырья в 2019 году в Алтайском крае и приобретены у частного поставщика. Трава синюхи голубой заготавливалась во время цветения на 2 году жизни растения, подземные органы выкапывались осенью на 1 году вегетации, высушивание растительного сырья проводилось воздушно – тeneвым способом.

Приготовление извлечения для ТСХ. Водные извлечения из растительного сырья для определения в них свободных аминокислот готовили в соотношении сырье – экстрагент 1:5. Образцы сырья измельчали до размера частиц 1.0 мм, экстрагировали на кипящей водяной бане с обратным холодильником 30 [12,13].

Условия хроматографирования. Подвижная фаза – бутанол : уксусная кислота : вода (4:1:2), проявитель 0.2% спиртовой раствор нингидрина. Объем наносимой пробы составил 5.0 мкл (треки №1 и №2 рис.1) и 7 мкл (треки №1` и №2` рис.1), хроматографические пластинки фирмы Sorbfil (Россия), высота пробега 10 см [13-15]. Аминокислоты проявлялись на хроматограммах в виде розовато-фиолетовых пятен.

Количественное определение суммы свободных АК в траве изучаемых видов определяли спектрофотометрическим методом, по их реакции с нингидрином в аналитическом максимуме 568 нм, согласно методике Г.И. Олешко с соавт. [16,17]. Экстракцию суммы свободных аминокислот из растительного сырья проводили водой (1:12,5) при двукратном нагревании по 30 минут на водяной бане с обратным холодильником. Рабочий раствор имел состоял из 2 мл извлечения, помещенного в мерную колбу объемом 100 мл, 4 мл фосфатного буфера (рН 6.4); 2 мл 1% раствора нингидрина в 95% спирте этиловом и 2 мл 0.05% водного раствора аскорбиновой кислоты, который нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут; после охлаждения под струей воды, доводили объем раствора до метки и затем перемешивали. В аналогичных условиях проводилась пробоподготовка РСО глутаминовой кислоты. В качестве контрольного раствора выступала смесь схожего состава, где вместо

исследуемого раствора была использована вода дистиллированная.

Полный состав аминокислот (свободные и связанные аминокислоты) определяли методом капиллярного электрофореза («Капель-105/105М», Россия) [18-20]. Навески образцов подвергали гидролизу раствором 6 М кислоты хлороводородной в течение 16-18 часов при температуре 110 ± 5 °С [8]. Метод включал получение фенилизотиокарбамильных производных из свободных форм аминокислот, их разделении и количественном определении. Условия эксперимента: капилляр (Lэфф/Лобщ =65/75 см, ID=50 мкм); буфер 30 мМ фосфатный, 4 мМ β-циклодекстрин (рН 7.4); напряжение +25 кВ; ввод пробы 150 мбар×с; температура 30°С; УФ-детектирование 254 нм [18-20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом работы являлся предварительный скрининг аминокислот в растительном сырье синюхи голубой методом ТСХ. В результате анализа в водном извлечении из травы синюхи голубой обнаружено 6 (проба 5 мкл) – 11 (проба 7 мкл) зон, в подземных органах 6 зон, которые по окраске пятен и величинам R_f в сравнении с достоверными образцами были отнесены к группе АК (рис.1). При исследовании данным методом АК травы синюхи голубой, предпочтительнее наносить объем пробы 7 мкл, так как в этом случае наблюдается максимальное количество зон свободных АК при условии их хорошего разделения. Увеличение объема пробы приведет к перенасыщению пробы. Оценивая полученные хроматографические картины, можно отметить различия в составе АК подземной и надземной частей изучаемого растения. В корневищах с корнями синюхи голубой были идентифицированы аргинин (Arg), глицин (Gly), глутаминовая кислота (Glu), валин (Val) и лейцин (Leu). Для травы синюхи голубой в свободном виде характерно присутствие таких АК, как лизин (Lis), аргинин (Arg), цистин (Cys), метеонин (MeU), глутаминовая кислота (Glu), валин (Val) и фенилаланин (Phe). Кроме того, на треках присутствовали зоны неидентифицированных АК.

В результате количественного определения суммы свободных АК в пересчете на глутаминовую кислоту были получены УФ-спектры поглощения исследуемого извлечения из травы и корневищ с корнями синюхи голубой и УФ - спектр поглощения 0.1% раствора РСО глутаминовой

кислоты. На всех спектрах присутствует максимум поглощения при длине волны 580 нм, что говорит о наличии глутаминовой кислоты в исследуемых объектах (рис.2). На рис.3. приведены усредненные данные по результатам пяти определений по содержанию суммы свободных АК в пересчете на глутаминовую кислоту в сырье синюхи голубой.

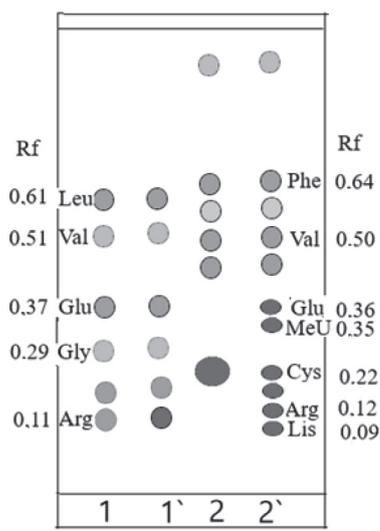


Рис. 1. Хроматографическая картина свободных аминокислот корневищ с корнями (1, 1') и травы (2, 2') синюхи голубой

Было установлено, что в траве и корневищах с корнями синюхи голубой содержание суммы свободных АК в пересчете на глутаминовую кислоту сходно ($0.12 \pm 0.003\%$ и $0.11 \pm 0.006\%$ соответственно).

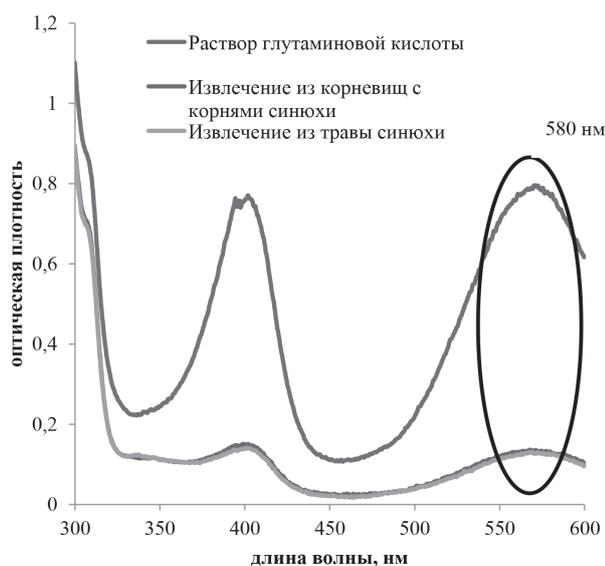


Рис. 2. Спектры поглощения продуктов взаимодействия глутаминовой кислоты и аминокислот растительного сырья синюхи голубой с нингидридом

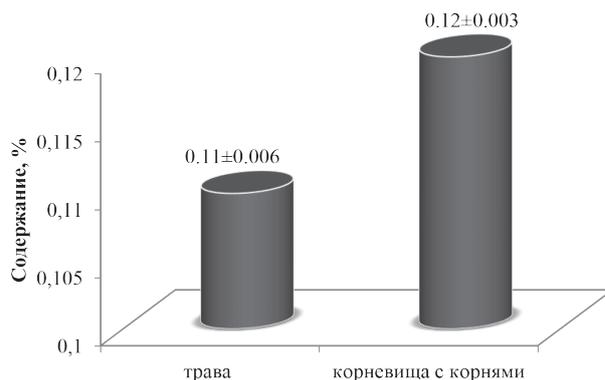


Рис. 3. Содержание суммы аминокислот в сырье синюхи голубой в пересчете на глутаминовую кислоту ($n=5$, $p>95\%$)

Более полную информацию о качественном составе профиля АК и количественном содержании отдельных АК в растительном сырье синюхи голубой получали методом капиллярного электрофореза. Полученные электрофореграммы приведены на рис. 4, 5.

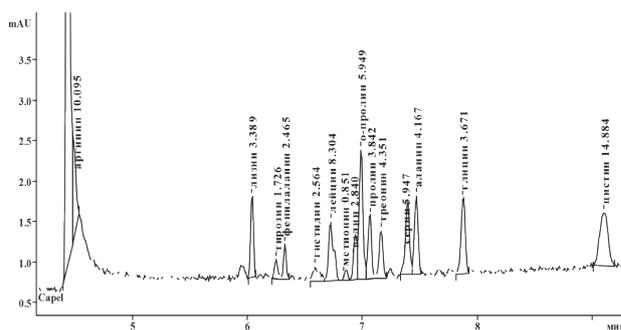


Рис. 4. Электрофореграмма аминокислот корневищ с корнями синюхи голубой

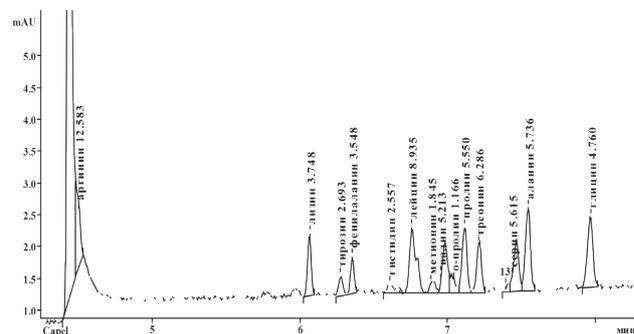


Рис. 5. Электрофореграмма аминокислот травы синюхи голубой

В результате эксперимента было установлено, что состав АК (как свободных, так и связанных, высвобождающихся после гидролиза) представлен 17 аминокислотами, 7 из которых незаменимые (табл.1). Показано, что АК в сырье синюхи присутствуют в основном в связанном

Таблица 1.

Состав профиля аминокислот синюхи голубой и их количественное содержание

Аминокислоты	Содержание, %			
	Корневища с корнями		Трава	
	Пересчет на сухое сырье	% от суммы	Пересчет на сухое сырье	% от суммы
Аргинин **	0.89	12.69	1.39	12.88
Лизин *	0.29	4.23	0.41	3.84
Тирозин	0.15	2.19	0.29	2.70
Фенилаланин *	0.22	3.13	0.39	3.63
Гистидин **	0.23	3.29	0.28	2.59
Лейцин* + изолейцин*	0.74	10.50	0.98	9.14
Метионин *	0.07	1.09	0.20	1.87
Валин *	0.25	3.60	0.57	5.30
Пролин	0.34	4.85	1.25	11.64
Треонин *	0.38	5.48	0.69	6.44
Серин	0.53	7.52	0.61	5.71
Аланин	0.37	5.32	0.62	5.82
Глицин	0.33	4.70	0.52	4.88
Цистин	1.33	18.80	1.53	14.24
Глутаминовая кислота	0.57	8.15	0.65	6.02
Аспарагиновая кислота	0.31	4.38	0.34	3.22
Сумма	6.38		9.62	

*- незаменимые АК, ** - условно заменимые АК

виде. В траве синюхи суммарное количество АК в полтора раза выше, чем в подземных органах (9.62% и 6.38% соответственно). Необходимо отметить, что большую долю АК в подземных органах синюхи голубой составляют цистин (18.8% от суммы), аргинин (12.7% от суммы), сумма лейцин+изолейцин (10.5% от общей суммы АК), глутаминовая кислота (8.15% от суммы) и серин (7.5% от суммы). В траве синюхи голубой также превалирует содержание цистина (14.2% от суммы), аргинина (12.8% от суммы), пролина (11.6% от суммы) и суммы лейцин+изолейцин (9.1% от суммы). Главным различием состава АК надземной и подземной частей растения является высокое содержание в траве пролина, а в корневищах с корнями глутаминовой кислоты и серина.

ВЫВОДЫ

Впервые проведено изучение аминокислотного состава растительного сырья синюхи голубой. Методом ТСХ установлены различия в качественном составе АК травы и корневищ с корнями растения. Уникальной АК, присутствующими в свободном виде в корневищах с корнями синюхи голубой являются глицин и лейцин, для травы - лизин, цистин, метеонин и фенилаланин. Установлено количественное содержание суммы свободных АК в пересчете на глутаминовую кислоту, которая составила 0.12% и 0.11% для корневищ с корнями и травы синюхи голубой соответственно. Впервые методом капиллярного электрофореза получена информация и выявлены различия в ка-

чественном составе профиля АК и количественном содержании отдельных АК в растительном сырье синюхи голубой. Показано, что в траве синюхи голубой суммарное количество АК в полтора раза выше, чем в подземных органах (9.62% и 6.38% соответственно). Полученные результаты позволяют расценивать изучаемое растение в качестве дополнительного источника аминокислот. Данная информация может также использоваться в дальнейшем при оценке биогенетических аспектов происхождения вторичных метаболитов синюхи голубой и последующей оценке их содержания в растительном сырье.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мальцева А.А. Дисс. канд. фарм. наук. Москва, 2011, 128 С.
2. Чистякова А.С., Мальцева А.А., Сливкин А.И. // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. Пятигорск, 2011. Вып. 66. С. 216-217.
3. Чистякова А.С., Мальцева А.А., Брежнева Т.А., Сливкин А.И. // Проблемы здоровьесбережения дошкольников, учащихся и студентов. Новые здоровьесберегающие тенденции в фармации и медицине. Материалы Всероссийской с международным участием научно-практической конференции. Под общей редакцией: И.В. Ручкин, С.Б. Короткова. Воронеж, 26-27 апреля 2011. С. 456-459.
4. Мальцева А.А., Сорокина А.А. // Фармация. 2010. № 5. С. 54-56.

5. Наумов А.В. Дисс. канд. фарм. наук. Москва, 2017, 153 с.
6. Бранги Т.А. // Вопросы фармакологической регуляции деятельности сердца. Москва, 1969, С. 84 – 85.
7. Западнюк В.И., Купраш Л.П., Занина М.У. // Аминокислоты в медицине. Киев, 1982, с. 58 – 151.
8. Morita K., Hara M., Kada T. Studies on natural dismutagen Sarcosine pyruvate product from amino acid / K. Morita, // Arg. and Biol. chem. 1978, - Vol. 42, - № 6, - p. 1235 – 1238.
9. Ripa A. Brivo aminoskabju un ocelactum – vielu satur vilkabelu sugaugos un to nozime sistematika. / A. Ripa // Tautsaimniecibaderigo audu aerotehika un biokimya. Riga. 1981, - L. 109 – 124.
10. Кретович В.Л. Биохимия растений. Москва, Высш. шк. 1980, 448 С.
11. Разаренова К.Н., Захарова А.М., Протасова И.Д., Жохова Е.В. // Бутлеровские сообщения. 2012. Т. 31. № 8. С. 73-78.
12. Ладыгина Е.Я., Сафронич Л.Н., Отряшенкова В.Э. Химический анализ лекарственных растений. Москва, Высш. шк. 1983, 176 с.
13. Чистякова А. С. Дисс. канд. фарм. наук. Москва, 2017, 200 с.
14. Никифоров Л.А., Белоусов М.В., Фурса Н.С. // Бюллетень сибирской медицины. 2011. Т. 10 №5 С. 74-77.
15. Чистякова А.С., Ткачева А.С., Логунова С.А., Мальцева А.А., Сорокина А.А. Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ: материалы 5-й международной научно-методической конференции "Фармообразование 16-18 апреля 2013". Воронеж, 2013. С. 599-601.
16. Тринеева О. В. Дисс. д-ра фарм. наук. Москва, 2017, 441 с.
17. Олешко Г.И. // Фармация. 2011. № 3. С. 14-17.
18. Гудкова А.А., Чистякова А.С., Сорокина А.А., Сливкин А.И., Коренская И.М. // Вестник Воронежского государственного университета. Сер. Химия. Биология. Фармация. 2018. № 4. С. 195-200.
19. Тринеева О.В. Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине: 5-я научно-практическая конференция 15 марта 2017. Москва, 2017. С. 222-225.
20. Комарова Н.В. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза Капель Санкт-Петербург, Веда, 2006, 213 с.

ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет

Гудкова А. А., доктор фармацевтический наук, доцент кафедры управления и экономики фармации и фармакогнозии
E-mail: al.f84@mail.ru

Чистякова А. С., Кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии
E-mail: anna081189@yandex.ru

Шестакова Г. Ю., аспирант кафедры ботаники и микологии
E-mail: wwwshestakova@mail.ru

Сливкин А. И., доктор фармацевтических наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии
E-mail: slivkin@pharmvsu.ru

Voronezh State University
Gudkova A. A., PhD., DSci., Associate Professor of the Department of Management and Economics of Pharmacy and Pharmacognosy
E-mail: al.f84@mail.ru

Chistyakova A.S., PhD, Associate Professor of the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology
E-mail: anna081189@yandex.ru

Shestakova G. Yu., postgraduate student of the Department of Botany and Mycology
E-mail: wwwshestakova@mail.ru

Slivkin A. I., PhD., DSci., Full Professor, Head Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology
E-mail: slivkin@pharmvsu.ru

AMINO ACID COMPOSITION OF *POLEMONIUM COERULEUM* L.

A. A. Gudkova, G. Yu. Shestakova, A. S. Chistyakova, A. I. Slivkin

Voronezh State University

Abstract. Jacob's Ladder has been known in medicine for a long time. As an official remedy, rhizomes with roots are allowed for use, the herb is a dietary supplement. Despite the wide variety of scientific publications devoted to the study of the chemical composition of the plant, there is no information on the amino acid composition of the plant raw materials of Jacob's Ladder. The aim of the study was to study the amino acid composition of Jacob's Ladder's grass and rhizomes with roots. Dried samples Jacob's Ladder's grass and rhizomes with roots were used in this work. To study the composition of free amino acids, we used water extracts from plant raw materials (1: 5). Mobile phase - butanol: acetic acid: water (4: 1: 2), developer 0.2% alcohol solution of ninhydrin. The quantitative determination of the amount of free amino acids in the herb of the studied species was determined by the spectrophotometric method, according to their reaction with ninhydrin. The complete composition of amino acids (free and bound amino acids) was determined by capillary electrophoresis (Kapel-105 / 105M, Russia), after 18 hours of hydrolysis at a temperature of 110 ± 5 ° C. For the first time, the study of the amino acid composition of Jacob's Ladder's plant raw materials was carried out. Differences in the qualitative composition of amino acids of grass and rhizomes with roots were established by TLC. The quantitative content of the sum of free amino acids in terms of glutamic acid was established, which was 0.12% and 0.11% for Jacob's Ladder's grass and rhizomes with roots, respectively. For the first time, the method of capillary electrophoresis obtained information and revealed differences in the qualitative composition of the profile of amino acids and the quantitative content of individual amino acids in the plant raw material of Jacob's Ladder. The results obtained make it possible to regard the studied plant as an additional source of amino acids.

Keywords: Jacob's Ladder, *Polemonium coeruleum* L., amino acids, spectrophotometry, capillary electrophoresis.

REFERENCES

1. Mal'ceva A.A. Diss. kand. farm. nauk. Moskva, 2011, 128 S.
2. Chistjakova A.S., Mal'ceva A.A., Slivkin A.I., Razrabotka, issledovanie i marketing novoj farmacevticheskoj produkcii. Pjatigorsk, 2011, Vyp. 66, pp. 216-217.
3. Chistjakova A.S., Mal'ceva A.A., Brezhneva T.A., Slivkin A.I., Problemy zdorov'esberezhenija doshkol'nikov, uchashhihsja i studentov. Novye zdorov'esberegajushhie tendencii v farmacii i medicine. Materialy Vserossijskoj s mezhdunarodnym uchastiem nauchno-prakticheskoj konferencii. Pod obshhej redakciej: I.V. Ruchkin, S.B. Korotkova. Voronezh, 26-27 aprelja 2011, pp. 456-459.
4. Mal'ceva A.A., Sorokina A.A., Farmacija, 2010, № 5, pp. 54-56.
5. Naumov A.V. Diss. kand. farm. nauk. Moskva, 2017, 153 s.
6. Brangi T.A. Voprosy farmakologicheskogo reguljaciej dejatel'nostiserdca. Moskva, 1969, pp. 84-85.
7. Zapadnjuk V.I., Kuprash L.P., Zanina M.U., Aminokisloty v medicine. Kiev, 1982, pp. 58-151.
8. Morita K., Hara M., Kada T. Studies on natural dismutagen Sercenigic pyralysis product from amino acid, Arg. and Biol. Chem, 1978, Vol. 42, № 6, pp. 1235-1238.
9. Ripa A. Brivo aminoskabju um ocelaetum – vielu satur vilkabelu sugaugos un to nozime sistematika, Tautsaimnicibaderigo audu aerotehika un biokimya, Riga, 1981, pp. 109-124.
10. Kretovich V.L. Biohimija rastenij. Moskva, Vyssh. shk. 1980, 448 p.
11. Razarenova K.N., Zaharova A.M., Protasova I.D., Zhohova E.V., Butlerovskie soobshhenija, 2012, T. 31, № 8, pp. 73-78.
12. Ladygina E.Ja., Safronich L.N., Otrjashenkova V.Je. Himicheskij analiz lekarstvennyh rastenij. Moskva, Vyssh. shk. 1983, 176 p.
13. Chistjakova A. S. Diss. kand. farm. nauk. Moskva, 2017, 200 p.
14. Nikiforov L.A., Belousov M.V., Fursa N.S., Bjulleten' sibirskoj mediciny, 2011, T. 10, №5, pp. 74-77.
15. Chistjakova A.S., Tkacheva A.S., Logunova S.A., Mal'ceva A.A., Sorokina A.A. Puti i formy sovershenstvovanija farmacevticheskogo obrazovanija. Sozdanienovyh fiziologicheskii aktivnyh veshhestv: materialy 5-j mezhdunarodnoj nauchno-metodicheskoi konferencii "Farmobrazovanie 16-18

апреля 2013", Voronezh, 2013, pp. 599-601.

16. Trineeva O. V. Diss. d-ra farm. nauk. Moskva, 2017, 441 p.

17. Oleshko G.I., Farmacija, 2011, № 3, pp. 14-17.

18. Gudkova A.A., Chistjakova A.S., Sorokina A.A., Slivkin A.I., Korenskaja I.M., Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Ser. Himija. Biologija. Farmacija, 2018, № 4, pp. 195-200.

19. Trineeva O.V. Sovremennye aspekty ispol'zovanija rastitel'nogo syr'ja i syr'ja prirodnogo proishozhdenija v medicine: 5-ja nauchno-praktičeskaja konferencija 15 marta 2017, Moskva, 2017, pp. 222-225.

20. Komarova N.V. Praktičeskoe rukovodstvo po ispol'zovaniju sistem kapilljarnogo jelektroforeza Kapel' Sankt-Peterburg, Veda, 2006, 213 p.