

Фармацевтические науки

Н.В. Бородина¹, В.Н. Ковалев², А.А. Стремоухов³

АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ПОБЕГОВ SALIX ALBA L

¹Бородина Наталья Валерьевна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии НФаУ; ²Ковалев Владимир Николаевич, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармакогнозии НФаУ; ³Стремоухов Александр Александрович, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии НФаУ;

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина,

Резюме

Побеги ивы являются богатым источником разнообразных биологически активных веществ. Объектами нашего изучения служили побеги *Salix alba L.*, которые заготавливались на протяжении 2013- 2014 годов в различных районах Харьковской области Украины. Впервые изучен аминокислотный состав и определено количественное содержание свободных и связанных аминокислот в исследуемых видах сырья методом высокоеффективной жидкостной хроматографии. Установлено наличие 23 аминокислот, 9 из которых являются незаменимыми. Подученные результаты говорят о перспективности использования вегетативной части ив.

Ключевые слова: *Salix alba L.*, аминокислоты, высокоеффективная жидкостная хроматография.

Summary

Branch of willow are a rich source of connections of phenolic nature (flavonoids, tannic substances), carbohydrates, organic acids, vitamins, macro - and microelements. The objects of the study were branch *Salix alba L* which were collected during 2013 - 2014 years in various parts of the Kharkiv region. It was made at first comparative analysis of free and bonded amino acids composition by high performance liquid chromatography in different herbal samples. It was established 23 amino acids, 9 of which belong to essential. Dominant amino acids in all the test samples are alanine, lysine, leucine. Results talk about perspective of the use of vegetative part of willows.

Введение. В Украине естественно произрастают многие виды ивы (*Salix L.*, семейство Salicaceae). Наиболее известны и распространены ива белая (серебристая), остролистная, ломкая, козья – древесные виды; ива пятитычинковая (верболов), пурпурная, остролистная (шелюга) – кустарниковые виды. Безусловным фаворитом является Ива белая (украинское название – верба, ветла) *Salix alba L.*. На сегодняшний день имеется значительное число работ, посвященных изучению химического состава коры ивы белой, в основном соединений фенольной природы, фенолгликозидов, флавоноидов, дубильных веществ. Между тем побеги ивы являются богатым источником самых разнообразных биологически активных веществ, поэтому могут быть использованы в качестве перспективного растительного сырья для получения комплексных препаратов [1-3].

Цель исследования. Анализ аминокислотного состава побегов *Salix alba L.*.

Материалы и методы. Объектами нашего изучения служили побеги *Salix alba L.*, которые заготавливались 2013- 2014 году на

протяжении вегетационного периода в различных районах Харьковской области.

Аминокислотный состав исследуемых видов сырья изучали на хроматографе фирмы Agilent Technologies (модель 1100), укомплектованном проточным вакуумным дегазатором G1379A, 4-х канальным насосом градиента низкого давления G13111A, автоматическим инжектором G1313A, термостатом колонок G13116A, диодноматричным детектором G1316A. Для проведения анализа была использована хроматографическая колонка размером 4,6 × 50 мм, заполненная октадецилсилильным сорбентом, зернем 1,8 мкм, «ZORBAX-XDB-C18».

Пробоподготовка для анализа растительного сырья.

Свободные аминокислоты. На аналитических весах в виале на 10 мл взвешивается 0,3 г мелкоизмельченного растительного сырья. Затем в виалу приливается 3 мл 0,1 N водного раствора соляной кислоты содержащего 0,2% β-меркаптоэтанола. Виала герметично закрывается и помещается на 2 ч в ультразвуковую баню при температуре 50 °C

Общее содержание аминокислот (связанные + свободные). На аналитических весах в виале взвешивается 0,20 г мелкоизмельченного растительного сырья. Затем в виалу приливается 3 мл 6 N водного раствора соляной кислоты содержащего 0,4% β-меркаптоэтанола. Виала герметично закрывается и выдерживается 24 ч при температуре 110 °C.

Виалы с образцами приготовленными по п 2.1 и 2.2 центрифугируют и фильтруют. Отбирают в реакционную 2 мл виалу фильтраты 100 мкл по п 2.1 и 20 мкл по п.2.2 и помещают в вакуумный эксикатор при температуре 40-45°C и давлении 1,5 мм рт.ст. до полного удаления соляной кислоты. Затем в виалу для анализа последовательно добавляют автоматическим дозатором - 200 мкл 0,8M боратного буфера pH 9.0, 200 мкл

20 мМ раствора 9-флуоренилметоксиарбонил хлорида в ацетонитриле, после 10 минутной выдержки в реакционную виалу добавляется 20 мкл 150 мМ раствора амантадина гидрохлорида в 50% водном ацетонитриле.

Условия хроматографирования: Для проведения анализа устанавливают следующий режим хроматографирования: градиентный режим хроматографирования:

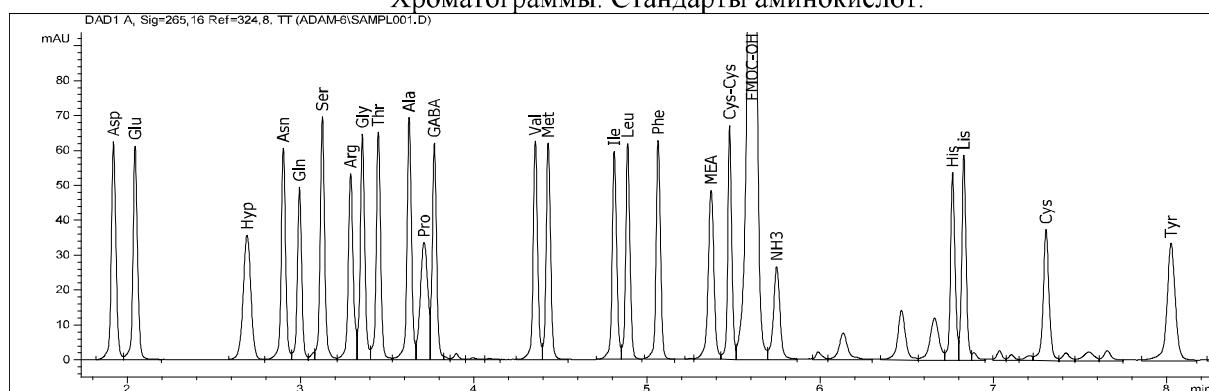
- рабочее давление элюента 220-275 кПа; температура термостата колонки 50 °C;
- объем пробы 2 мкл; Параметры детектирования устанавливают следующие: масштаб измерений 1,0; время сканирования 0.5 сек. Длина волны детектирования 265 нм

Время мин.	A% 0.05M водн. раствор ацетата натрия, pH 6.5	B% 0.10 M водный раствор ацетата натрия :ACN= (23:22, v/v), pH 6.5	C % H ₂ O	D% ацетон-итрил	Скорость подачи подвижной фазы мл/мин;
0	70	30	0	0	1.5
3.87	27	73	0	0	1.5
5.73	0	100	0	0	1.5
7.83	0	100	0	0	1.5
8.17	0	0	15	85	1.5
10.00	0	0	2	98	2.0
10.10	70	30	0	0	2.0
11.00	70	30	0	0	2.0

Идентификацию аминокислот производили по временам удерживания стандартов. Расчет содержания связанных аминокислот производится путем вычитания содержания свободных аминокислот из их общего содержания. Однако такие аминокислоты как аспарагин и глутамин в процессе кислотного гидролиза (пробоподготовка для анализа) превращаются в аспарагиновую и глутаминовую кислоты соответственно. В

тех же условиях цистин, может частично или полностью распадаться на цистein и цистеиновую кислоту. Таким образом, расчет содержания связанных аминокислот: аспарагина и аспарагиновой кислоты, глутамина и глутаминовой кислоты, цистина и цистеина удобно производить по их сумме соответственно. [4].

Хроматограммы. Стандарты аминокислот.



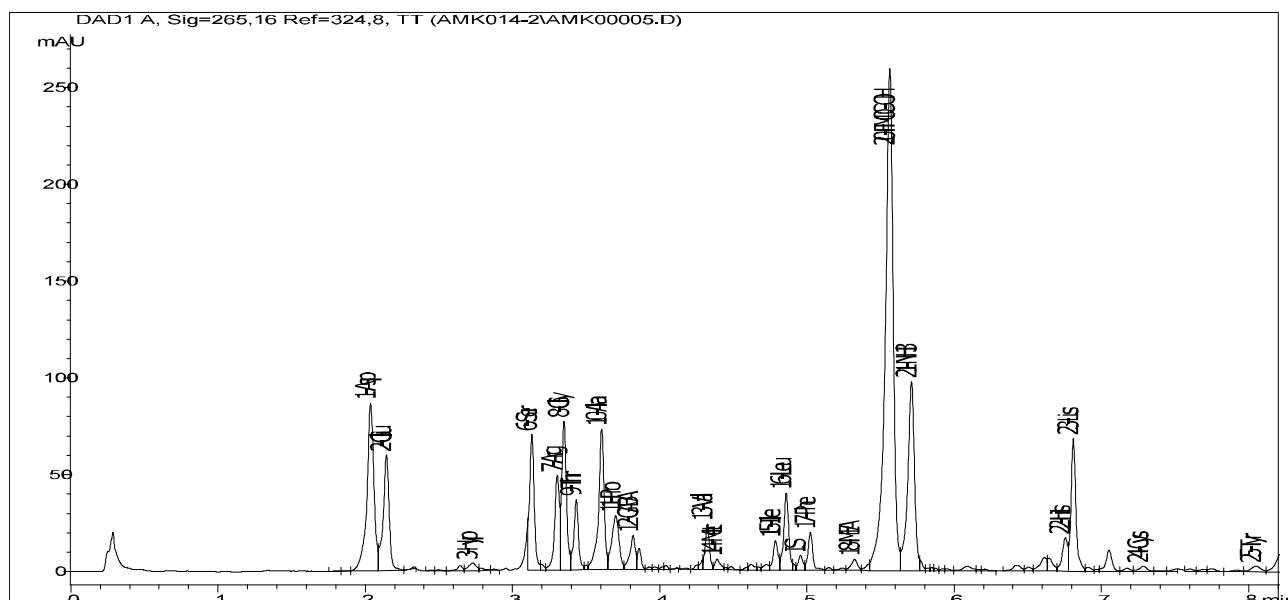
Результаты и обсуждение.

Результаты определения аминокислотного состава побегов *Salix alba* L. представлены в таблице и рис.1 и 2.

Таблица

Аминокислотный состав побегов *Salix alba* L.

Название аминокислот	Время удерживания мин.	Концентрация аминокислот мг в 100 г <i>Salix alba</i> L.	
		общее	сводных
Аспарагиновая кислота	2,01	1708	143
Глутаминовая кислотата	2,11	1218	27
4-Гидроксипролин	2,70	88	8
Аспарагин	2,90	0	364
Глутамин	2,99	0	5
Серин	3,11	832	155
Аргинин	3,30	906	234
Глицин	3,34	602	21
Треонин	3,42	460	56
Аланин	3,60	768	116
Пролин	3,70	587	65
Аминомасляная кислота	3,84	243	108
Валин	4,33	242	60
Метионин	4,39	113	2
Изолейцин	4,79	209	45
Лейцин	4,86	640	26
Фенилаланин	5,02	345	42
2-Этаноламин	5,42	47	35
Цистин	6,74	0	0
Гистидин	6,80	240	46
Лизин	7,27	595	37
Цистеин	8,02	37	0
Тирозин	8,71	74	9

Рис.1. Хроматограмма суммы свободных и связанных аминокислот побегов *Salix alba* L.

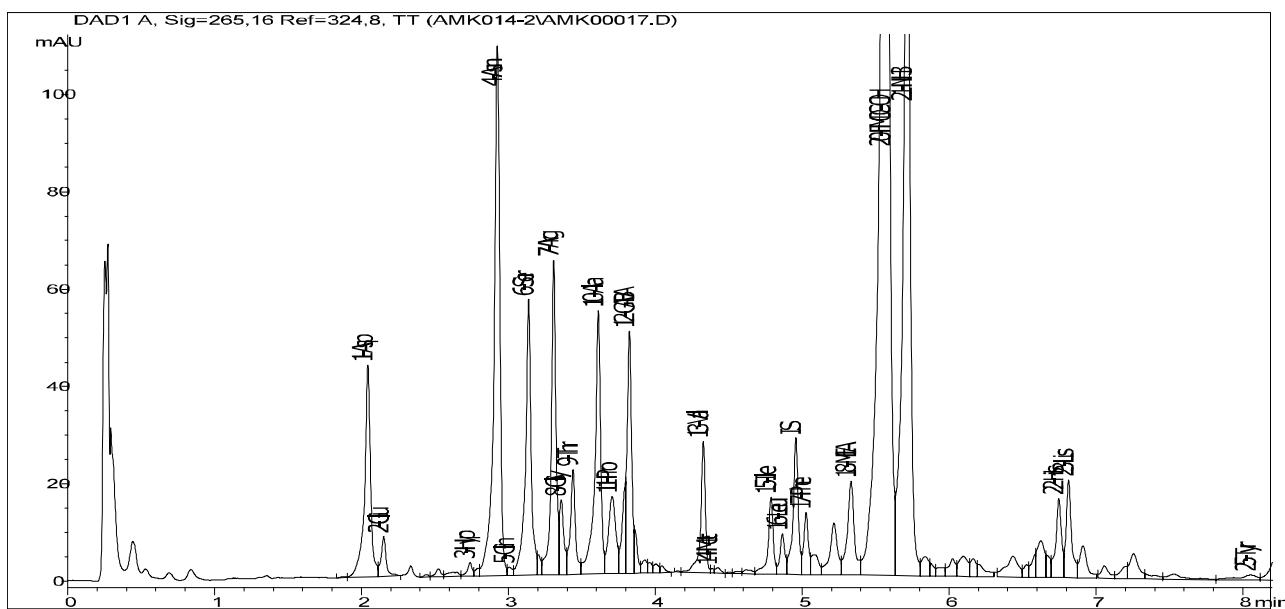


Рис.1. Хроматограмма свободных аминокислот побегов Salix alba L.

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определено количественное содержание аминокислот в побегах *Salix alba* L. Установлено наличие 23 аминокислот, 9 из которых являются незаменимыми. В количественном отношении в сырье преобладают заменимые аминокислоты (7350 мг в 100 г). Среди незаменимых кислот преобладают лейцин, лизин. Аминокислоты принимают участие в процессах нервной регуляции различных функций организма и оказывают выраженное влияние на сосудистый тонус. Так, глутаминовая кислота применяется при гипоксиях и аритмиях, аспарагиновая - для улучшения коллатерального сердечного кровообращения и повышения потребления миокардом кислорода, метионин - при железодефицитных анемиях, для профилактики атеросклероза, глицин - для уменьшения возбуждения ЦНС. Известно, что незаменимые кислоты - лейцин, изолейцин и валин стимулируют синтез белка в мышцах, способствуют развитию мышечной массы и уменьшению объема жировых отложений, подавляют развитие злокачественных опухолей и усиливают иммунные функции организма. Лейцин также участвует в восстановлении костей, мышц и кожи, снижает уровень сахара в крови и стимулирует выделение гормона. Полученные результаты будут учтены в дальнейшем при разработке комплексных препаратов на основе биологически активных веществ побегов ивы.

Выводы.

Впервые методом высокоэффективной жидкостной хроматографии изучен аминокислотный состав и определено количественное содержание аминокислот в побегах *Salix alba* L. флоры Украины. Результаты говорят о перспективности использования вегетативной части ивы.

Литература

- Кузьмичева Н.А. Фармакогностический анализ цветков ивы.козьей / Кузьмичева Н.А. // Вестник фармации. 2012. - №2 (56) - С. 16-21.
- Петрук А. А. Сезонная динамика содержания дубильных веществ в листьях и соцветиях некоторых видов рода *Salix* (Salicaceae) при интродукции / А. А. Петрук // Химия растительного сырья. - 2013. - № 2. - С. 135-138
- Sushma Semwal Isolation and characterization of a new flavine diglucoside from *Salix denticulata* / Semwal Sushma, Rawat Usha, Kant Sharma Rajni // Химия природных соединений. - 2011. - N 3. - C. 328-329
- A. Jámbor, I. Molnár-Perl. Quantitation of amino acids in plasma by high performance liquid chromatography: Simultaneous deproteinization and derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 6218–6223.