I.O. Kolychev, T.O. Krasnikova, O.M. Koshovyi

Study of phenolic composition of liquid alcohol extract of vaccinium myrtillus leaves

National University of Pharmacy, Kharkiv city

Introduction. In the folk and scientific medicine vaccinium shoots and leaves are used as hypoglycemic agents in the form of decoctions and are part of the glucose-lowering fees of Arphasetinum and Myrphazmum, but in the Ukrainian market there are no galenic or new galenic agents on the basis of this raw material. It is therefore advisable to conduct studies of the phenolic composition of the liquid alcohol extract of leaves of vaccinium myrtillus for the new standardized drug based on this material.
Aim. To explore the qualitative composition and quantitative content of phenolic compounds of alcoholic liquid extract of leaves of vaccinium myrtillus.
Materials and methods. The study of qualitative composition and quantitative content of phenolic substances was performed by TLC and high-performance liquid chromatography (HPLC).
Results. By TLC with authentic samples was established the presence in the studied extract of chlorogenic and caffeic acids, rutin, and hyperoside. By HPLC method 14 phenolic substances were found. Phenolic compounds represented by simple phenols, derivatives of hydroxycinnamic acids and flavonoids have identified five compounds as chlorogenic, caffeic acid, rutin, arbutin and quercetin.
Conclusions. The experimental data on the qualitative and quantitative composition of biologically active substances of phenolic liquid alcohol extract of leaves of vaccinium myrtillus indicate the prospects of new standardized drug based on the phenolic compounds.
Key words: vaccinium myrtillus leaves, phenolic composition, study, liquid alcohol extract.

Відомості про авторів:
Количев Ілля Олександрович - аспірант кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету. Адреса: Харків, вул. Пушкінська, 53, тел.: (057) 706-30-74.
Кошовий Олег Миколайович – д. фарм. н., завідувач кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету. Адреса: Харків, вул. Пушкінська, 53, тел.: (057) 706-30-74.
Краснікова Тетяна Олександрівна – к. фарм. н., доцент кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету. Адреса: Харків, вул. Пушкінська, 53, тел.: (057) 706-30-74.

УДК 615.322; 543.544.5.068.7

© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2015

М.А. Комісаренко, О.М. Кошовий, Г.П. Зайцев, А.М. Ковальова

ДОСЛІДЖЕННЯ АМІНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ СПИРТОВОГО ЕКСТРАКТУ З ЛИСТЯ БРУСНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Вступ. Продовжуючи дослідження БАР листя брусниці звичайної та продуктів їх переробки, ми звернули увагу на те, що амінокислотний склад майже не вивчений.

Мета. Дослідити амінокислотний склад спиртового екстракту з листя брусниці звичайної.
Матеріали та методи. Якісний і кількісний аналіз вільних та зв'язаних амінокислот у спиртовому екстракті з листя брусниці звичайної проводили за допомогою високоефективного рідинного хроматографа фірми Agilent Technologies (модель 1100).
Результати. В результаті дослідження амінокислотного складу спиртового екстракту з листя брусниці звичайної було встановлено 16 амінокислот та визначено їх кількісний вміст. Було досліджено амінокислотний склад спиртового екстракту з листя брусниці звичайної, домінуючими сполуками є метіонін, лейцин, ізолейцин, валін та аргінін. Вміст вільних амінокислот складає 26,98% від суми усіх амінокислот, а вміст зв'язаних – 73,02%. Більшість амінокислот у досліджуваному екстракті знаходиться у зв'язному стані, тому вони будуть впливати на розчинність, біодоступність та загальний фармакотерапевтичний ефект екстракту.
Ключові слова: Вересові, брусниця звичайна, листя, спиртовий екстракт, амінокислота.

Вступ. У традиційній та офіційній медицині використовують як високоефективний засіб для лікування хвороб нирок і сечовивідних шляхів відвар із листя брусниці. Але ця лікарська форма має ряд недоліків: складнощі у приготуванні, відсутність стандартизації, неможливість тривалого зберігання, не вичерпне використання лікарської рослинної сировини. Тому створення нового стандартизованого лікарського засобу на основі біологічно активних речовин листя брусниці звичайної є актуальним [1]. Раніше ми повідомляли про якісне та кількісне хімічне визначення в листі та екстрактах з листя брусниці деяких класів БАР: простих фенолів, похідних гідроксикоричної кислоти, флавоноїдів, поліфенольних сполук, летких речовин, органічних кислот [2, 3, 4]. Продовжуючи дослідження БАР листя брусниці звичайної та продуктів їх переробки, ми звернули увагу на те, що амінокислотний склад майже не вивчений. Оскільки амінокислоти можуть утворювати солі та комплексні сполуки з фенольними речовинами їх якісний склад та кількісний вміст буде впливати на розчинність, біодоступність та загальний фармакотерапевтичний ефект екстракту, тому доцільно вивчити їх склад у спиртовому екстракті з листя брусниці звичайної.

Мета. Вивчити амінокислотний склад спиртового екстракту з листя брусниці звичайної.

Матеріали та методи. Об'єктом нашого дослідження був рідкий спиртовий екстракт з листя брусниці звичайної, отриманий екстракцією 50% спиртом. Отриманий екстракт відповідав вимогам загальної монографії ДФУ «Екстракти» [5] та був віднесений до рідких екстрактів. Якісний і кількісний аналіз вільних та зв'язаних амінокислот в екстракті з листя брусниці звичайної проводили за допомогою високоефективного рідинного хроматографа фірми Agilent Technologies (модель 1100), укомплектованим проточним вакуумним дегазатором G1379A, 4-х канальним насосом градієнта низького тиску G13111A, автоматичним інжектором G1313A , термостатом колонок G13116A, діодноматрічним детектором G1316A. Для проведення аналізу була використана хроматографічна колонка розміром 4,6×50мм, заповнена октадецілсілільним сорбентом, зернення 1,8мкм, «ZORBAX - XDB - C18».

Пробопідготовка для вивчення складу вільних амінокислот. У віалу (А) на 10мл додавали 0,3мл екстракту. Потім у віалу приливали 3мл 0,1N водного розчину соляної кислоти, який містить 0,2% β-меркаптоетанолу. Віалу герметично закривали та помістили на 2 години у ультразвукову баню при

температурі 50°С. Пробопідготовка для вивчення загального вміст амінокислот. У віалу (В) додається 0,20мл екстракту. Потім в віалу приливали 3мл 6N водного розчину соляної кислоти який містить 0,4% β-меркаптоетанолу. Віалу герметично закривали і витримували 24 години при температурі 110°С. Віалу із зразками центрифугували і фільтрували. Відбирали у реакційну 2 мл віалу фільтрати 100 мкл із віали А і 20мкл із віали В і поміщали у вакуумний ексикатор при температурі 40-45ºС і тиску 1,5 мм рт.ст. до повного видалення соляної кислоти. Потім у віалу для аналізу послідовно додавали автоматичним дозатором - 200 мкл 0,8 М боратного буферу рН 9,0, 200 мкл 20 мМ розчину 9-флуоренілметоксікарбоніл хлориду в ацетонітрилі, після 10 хвилинної витримки у реакційну віалу додавали 20 мкл 150 мМ розчину амантадину гідрохлориду в 50% водному ацетонітрилі [6, 7].

Для проведення аналізу встановлювали такий режим хроматографування: робочий тиск елюента 220-275 кПа; температура термостата колонки 50°С; об'єм проби 2 мкл. Параметри детектування встановлені такі: масштаб вимірювань 1,0; час сканування 0,5 сек.; довжина хвилі детектування 265 нм. Ідентифікацію амінокислот проводили за часом утримування стандартів. Розрахунок вмісту зв'язаних амінокислот проводиться шляхом віднімання вмісту вільних амінокислот з їх загального змісту. Однак такі амінокислоти як аспарагін і глутамін в процесі кислотного гідролізу майже кількісно перетворюються на аспарагінову і глутамінову кислоти відповідно. У тих же умовах цистин, може частково або повністю розпадається на цистеїн і цистеїнову кислоту. Таким чином, розрахунок вмісту зв'язаних амінокислот: аспарагина і аспарагінової к-ти, глутаміну і глутамінової кислоти зручно робити по їх сумі відповідно. Розрахунок вмісту зв'язаних амінокислот цистину і цистеїну можна проводити також за їх сумою, але з урахуванням того, що 1 молекула цистину розпадається на 1 молекулу цистеїну і 1 молекулу цистеїнової кислоти.

Результати. Результати визначення якісного складу та кількісного вмісту вільних та зв'язаних амінокислот у спиртовому екстракті з листя брусниці звичайної наведені в таблиці.

Таблиця

Амінокислотний склад спиртового екстракту з листя брусниці звичайної

№ з/п	Амінокислота	Вміст амінокислот (мг на л рідкого екстракту)	
		Вільні	Зв'язані
1	Аспарагінова кислота	2.0	3.6
2	4-Гідроксипролін	0.0	2.9
3	Аспарагін	1.0	0.0
4	Серін	2.3	4.6
5	Аргінін	4.9	8.0
6	Гліцин	3.6	5.5
7	Треонін	0.0	2.4
8	Аланін	2.8	6.6
9	Пролін	1.6	5.5
10	Гамма-аміномасляна кислота	3.5	6.0
11	Валін	2.4	15.4
12	Метіонін	16.5	17.2
13	Ізолейцин	0.7	15.3
14	Лейцин	1.3	27.9
15	Моноетаноламін	4.8	8.1
16	Лізин	4.8	11.7

В результаті дослідження амінокислотного складу спиртового екстракту з листя брусниці звичайної було встановлено 16 амінокислот , 14 з яких вільні та 15 зв'язаних амінокислот, сім з яких є незамінними – треонін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, лізин та аргінін. Вміст вільних амінокислот складає 26,98% від суми усіх амінокислот, а вміст зв'язаних – 73,02%.

Висновки. Досліджено амінокислотний склад спиртового екстракту з листя брусниці звичайної, домінуючими сполуками є метіонін, лейцин, ізолейцин, валін та аргінін. Більшість амінокислот у екстракті з листя брусниці звичайної знаходиться у зв'язному стані, тому вони будуть впливати на розчинність, біодоступність та загальний фармакотерапевтичний ефект екстракту, що потрібно враховувати у технологічному процесі та при його стандартизації.

Література

1. Оптимізація фітотерапії хронічного пієлонефриту / В.М. Фролов, Т.П. Гарник, В.С. Гришина // Фітотерапія. – 2006. - № 4.-С.32-35.

2. Дослідження фенольних сполук спиртового екстракту з листя брусниці звичайної / М.А. Комісаренко, А.С. Гейдеріх, А.М. Ковальова, О.М. Кошовий // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2012.– №2. – С. 24-26.

3. Дослідження летких речовин Мучниці звичайної / Комісаренко М.А., Гейдеріх А.С., Кошовий О.М. // «Хімія природних сполук» III Всеукраїнська науково-практична конференція (30-31 жовтня 2012 р.). – Тернопіль «Укрмедкнига», 2012. – С. 28.

4. Дослідження органічних кислот листя Vaccinium vitis-idaea / Комісаренко М.А. , О. М. Кошовий, А.М. Ковальова, Н.В., Н.В. Сидора // Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П.Л. Шупика. – 2014. – Вип. 23, кн. 4.– С. 291–295.

5. Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. - Доповнення 2. - Харків: ДП «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.

6. 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. – 2009. –Vol. 1216. – P. 6218–6223.

7. A. Jámbor, I. Molnár-Perl. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. Literature overview and further study. // Journal of Chromatography A. – 2009. –Vol. 1216. – P. 3064–3077.

М.А. Комиссаренко, О.Н. Кошевой, Г.П. Зайцев, А.М. Ковалева

Изучение аминокислотного состава спиртового экстракта из листьев брусники обыкновенной

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Введение. Продолжая исследования БАВ листа брусники обыкновенной и продуктов их переработки, мы обратили внимание на то, что аминокислотный состав почти не изучен.

Цель. Изучить аминокислотный состав спиртового экстракта из листьев брусники обыкновенной.

Материалы и методы. Качественный и количественный анализ свободных и связанных аминокислот в экстракте из листьев брусники обыкновенной

проводили с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа фирмы Agilent Technologies (модель 1100).
Результаты. В результате исследования аминокислотного состава спиртового экстракта из листьев брусники обыкновенной было установлено 16 аминокислот и определен их количественный состав.
Выводы. Исследовано аминокислотный состав спиртового экстракта из брусники обыкновенной, доминирующими соединениями являются метионин, лейцин, изолейцин, валин и аргинин. Большинство аминокислот находится в связном состоянии, поэтому они будут влиять на растворимость, биодоступность и общий фармакотерапевтических эффект экстракта.
Ключевые слова: Вересковые, брусника обыкновенная, листья спиртовой экстракт, аминокислота.

M.A. Komisarenko, O.M. Koshovyi, G.P. Zaitsev, A.M. Kovaleva

Investigation of amino acid composition of alcohol extract of cowberry leaves

National University of Pharmacy, Kharkiv city

Introduction. During research of biologically active substances of cowberry leaves and their derived products we noticed that amino acid composition is poorly investigated.
Aim. To study the amino acid composition of alcohol extract of cowberry leaves.
Materials and methods. Qualitative and quantitative analysis of free and bound amino acids in the extract of cowberry leaves was performed by using high performance liquid chromatograph Agilent Technologies 1100.
Results. In the result of investigation of amino acid composition of cowberry leaves alcohol extract was found 16 amino acids and determined their quantitative composition.
Conclusions. The amino acid composition of cowberry leaves alcohol extract was investigated and methionine, leucine, isoleucine, valine and arginine were the predominant compounds. The majority of amino acids were in the bound state, so they would affect the solubility, bioavailability and overall pharmacological effect of the extract.
Key words: Ericaceae, cowberry, leaves, alcohol extract, amino acid.

Відомості про авторів:
Комісаренко Микола Андрійович – аспірант каф. фармакогнозії Національного Фармацевтичного Університету. Адреса: Харків вул. Пушкінська, 53, тел.: (0572) 67-92-08.
Кошовий Олег Миколайович – д. фарм. н., доцент, завідувач кафедри фармакогнозії Національного Фармацевтичного Університету. Адреса: Харків, вул. Пушкінська, 53, тел.: (0572) 67-92-08.
Зайцев Георгій Павлович - провідний фахівець лабораторії відділу біологічно активних продуктів винограду Інституту Винограду та Вина «Магарач». Адреса: АР Крим, м. Ялта, вул. Кірова, 31, тел.: (0654) 32-55-91.
Ковальова Алла Михайлівна – д. фарм. н., професор кафедри фармакогнозії Національного Фармацевтичного Університету. Адреса: Харків, вул. Пушкінська, 53, тел.: (0572) 67-92-08.