

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОСТАВА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА *STELLARIA* L.

Анчеева Е. Ю.

ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия», Санкт-Петербург, Россия (197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14), e-mail: elena.ancheeva@pharminnotech.ru

4 вида рода *Stellaria* (семейство *Caryophyllaceae*) анализировались на содержание свободных аминокислот методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) после дериватизации фенилизотиоцианатом. Идентификация и оценка содержания производилась в сравнении со стандартными образцами исследуемых соединений. Качественный и количественный анализ 20 аминокислот был проведен для наземной части *Stellaria media*, *Stellaria dichotoma*, *Stellaria nemorum* и *Stellaria holostea*. Количественное содержание индивидуальных аминокислот было выявлено в пределах от 0,002 до 0,5 мг/г (в пересчете на сухое сырье); суммарное содержание аминокислот было максимальным у сырья звездчатки вильчатой, а минимальное – у звездчатки дубравной. Согласно экспериментальным данным в наземной части звездчатки средней накапливаются аспарагин, глутамин, пролин, аргинин, цистин+цистеин, триптофан, в звездчатке вильчатой – аспарагин, аргинин, триптофан; в наземной части звездчатки дубравной – пролин, а в звездчатке ланцетовидной – аргинин, пролин, глутамин, аланин.

Ключевые слова: свободные аминокислоты, ВЭЖХ, фенилизотиоцианат, качественное и количественное определение.

COMPARATIVE ANALYSIS OF FREE AMINO ACID COMPOSITION OF SEVERAL SPECIES OF *STELLARIA* L. GENUS

Ancheeva E. Y.

«Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy», Saint-Petersburg, Russia (197376, Saint-Petersburg, street prof. Popova, 14), e-mail: elena.ancheeva@pharminnotech.ru

Four species of the *Stellaria* genus (*Caryophyllaceae* family) have been analyzed for their free amino acid content using reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) after derivatization with phenylisothiocyanate. Identification and estimation has been performed with comparing to authentic standards. Qualitative and quantitative analyses of 20 amino acids has been performed for the aerial part of *Stellaria media*, *Stellaria dichotoma*, *Stellaria nemorum* and *Stellaria holostea*. The estimated content of individual amino acids ranged from 0,002 to 0,50 mg/g (dry weight); the sum of all measured substances reached up to 2,3 mg/g for *Stellaria dichotoma* and was the lowest for *Stellaria nemorum*. According to the experimental data the most abundant amino acids for the aerial part of *Stellaria media* are asparagine, glutamine, proline, arginine, cystin+cysteine, tryptophan, for *Stellaria dichotoma* are asparagine, glutamine, tryptophan, for *Stellaria nemorum* – proline, for *Stellaria holostea* – arginine, proline, glutamine, alanine.

Key words: free aminoacids, HPLC, phenylisothiocyanate, Qualitative and quantitative analyses.

Введение

Род *Stellaria* L. (семейство *Caryophyllaceae*) во флоре России и сопредельных государств представлен более 60 видами, произрастающими в основном в лесной, лесостепной и отчасти степной зоне, некоторые виды являются космополитами [5]. Представители данного рода привлекают внимание как зарубежных, так и отечественных исследователей. К настоящему времени из встречающихся на территории РФ видов наиболее изучен химический состав и биологическая активность наземной части звездчатки средней (*Stellaria media* (L.)Vill.) и подземных органов звездчатки вильчатой (*Stellaria dichotoma* L.). Трава звездчатки средней применяется в народной и традиционной медицине, а также является официальным сырьем в некоторых странах Европы. Ее используют в основном как противовоспалительное средство.

тельное, противозудное, антиревматическое и витаминное средство. Кроме того, имеются данные о наличии анксиолитического, коронарорасширяющего, гипотензивного, антиоксидантного действия, а также цитотоксической и противовирусной активности [4]. Недавно установлено, что полисахаридная фракция, выделенная из травы звездчатки средней, проявляет гепатопротективный эффект [1]. Корни звездчатки вильчатой издавна применяются в тибетской и народной медицине как средство при заболеваниях легких, сердца, инфекционных болезнях, а также при атеросклерозе и астении; трава применяется в китайских БАДах как общеукрепляющее средство [4]. Выделенные из корней специфические циклические пептиды показали умеренную вазодилатирующую активность, а алкалоиды-дихотомины – антиаллергическую активность [7,8].

Для обоснования применения в качестве лекарственных средств того или иного растительного сырья требуются наиболее полные данные о его химическом составе. Данная работа посвящена изучению аминокислотного состава надземной части звездчатки средней и звездчатки вильчатой, а также еще двух близких видов: звездчатки дубравной *Stellaria nemorum* L. и звездчатки ланцетовидной *Stellaria holostea* L. Сведения о биологической активности звездчатки дубравной и звездчатки ланцетовидной ограничены из-за их малой изученности, причем оба вида широко распространены на территории России. В доступной отечественной и зарубежной литературе данные о составе свободных аминокислот представителей рода *Stellaria* L. отсутствуют.

Как известно, в растениях аминокислоты выполняют ряд важных функций: являются транспортной формой азота, предшественниками фитогормонов, входят в состав ферментов, защищают от неблагоприятных абиотических факторов. Они же являются продуктами первичного метаболизма и в свободном виде встречаются во всех растениях, поэтому часто входят в состав комплексных фитопрепаратов. При этом аминокислоты обладают не только биологической активностью, но в составе сопутствующих веществ способствуют улучшению всасывания, пролонгации терапевтического эффекта и потенцированию действия основных растительных компонентов [2].

Цель исследования

Целью данной работы является изучение качественного и количественного состава свободных аминокислот суммарной вытяжки из надземной части звездчатки средней, звездчатки вильчатой, звездчатки дубравной и звездчатки ланцетовидной методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) после дериватизации фенилизотиоцианатом.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования служили образцы надземной части сырья звездчатки средней, звездчатки вильчатой, звездчатки дубравной и звездчатки ланцетовидной, собранные в мае – июне 2012 г. на территории России (табл. 1).

Таблица 1. Сведения об исследуемых образцах сырья видов рода *Stellaria*

Название объекта исследования	Место сбора	Фаза развития растения	Время сбора сырья
<i>Stellaria media</i>	Ленинградская область, Выборгский район, пос. Лебедевка	Цветение-плодоношение	июнь 2012 г.
<i>Stellaria dichotoma</i>	Республика Бурятия, Заиграевский район, окрестности с. Новая Брянь	Цветение	июль 2012 г.
<i>Stellaria nemorum</i>	Ленинградская область, Всеволожский район, пос. Лемболово	Цветение	июнь 2012 г.
<i>Stellaria holostea</i>	Республика Адыгея, Майкопский район, окрестности Лаго-наки	Цветение	май 2012 г.

Растительный материал – высушенные воздушно-теневым способом надземные части перечисленных видов – измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Аналитическую пробу сырья помещали в круглодонную колбу со шлифом, добавляли экстрагент (спирт этиловый 70 % в соотношении 1:10 к массе сырья) и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Экстракцию проводили трехкратно. Полученные объединенные извлечения, охлажденные до комнатной температуры, фильтровали через бумажный фильтр и упаривали на роторно-пленочном испарителе до густой консистенции, а затем сушили в термостате при температуре 50 °С до получения сухого остатка. Измельченный до состояния порошка сухой остаток подвергали хроматографическому анализу.

Качественный и количественный состав свободных аминокислот проводился методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе производства фирмы Shimadzu, Япония, LC-20AD Prominence со спектрофотометрическим детектором SPD-20A; колонка SUPELCO Discovery™ LC-18, 4,6x250 мм; детектирование производилось при длине волны 254 нм (278нм для определения триптофана); подвижная фаза – смесь раствора натрия ацетата 0.06 моль/л, рН = 5.5 (компонент А), спирта изопропилового раствор 1% в ацетонитриле (компонент В) и натрия ацетата раствор 0.06 моль/л, рН = 4.05 среды (компонент С). Хроматографический анализ проводили в режиме градиентного элюирования. Скорость потока подвижной фазы – 1.2 мл/мин. Система сбора и обработки данных для жидкостного хроматографа: компьютер с программным обеспечением LC solution.

Использовали стандартные образцы следующих аминокислот (Sigma): аспарагин (асп), глутамин (глу), гидроксипролин (о-про), серин (сер), глицин (гли), гистидин (гис), аргинин (арг), треонин (тре), аланин (ала), пролин (про), тирозин (тир), валин (вал), лизин (лиз), изолейцин (илей), лейцин (лей), фенилаланин (фен), метионин (мет), цистин (цис), цистеин (цис-цис), триптофан (три), а также реактивы: фенилизотиоцианат (Fluka), ацетонитрил (о.с.ч., Кристохром), изопропиловый спирт (о.с.ч.), натрия ацетат (х.ч.), хлористоводородная кислота конц. (х.ч.), натрия гидроксид (о.с.ч.).

Для построения калибровочного графика зависимости значений оптической плотности от концентрации аминокислоты навески стандартных образцов растворяли в хлористоводородной кислоты растворе 1 моль/л. Аликвоты стандартного раствора 5, 10, и 15 мкл помещали в три пробирки. Для удаления кислоты хлористоводородной аликвоты высушивали досуха на водяной бане при температуре 60 °С в токе воздуха. К высушенным аминокислотам добавляли 0.10 мл натрия гидроксида раствора 0.15 моль/л, перемешивали, а затем добавляли 0.35 мл раствора фенилизотиоцианата в изопропиловом спирте и 0.05 мл бидистиллированной воды. Раствор оставляли на 20 мин при комнатной температуре, после чего высушивали досуха при температуре 60 °С. Сухой остаток растворяли в 1 мл бидистиллированной воды. Полученные растворы подвергали хроматографическому анализу (рис. 1).

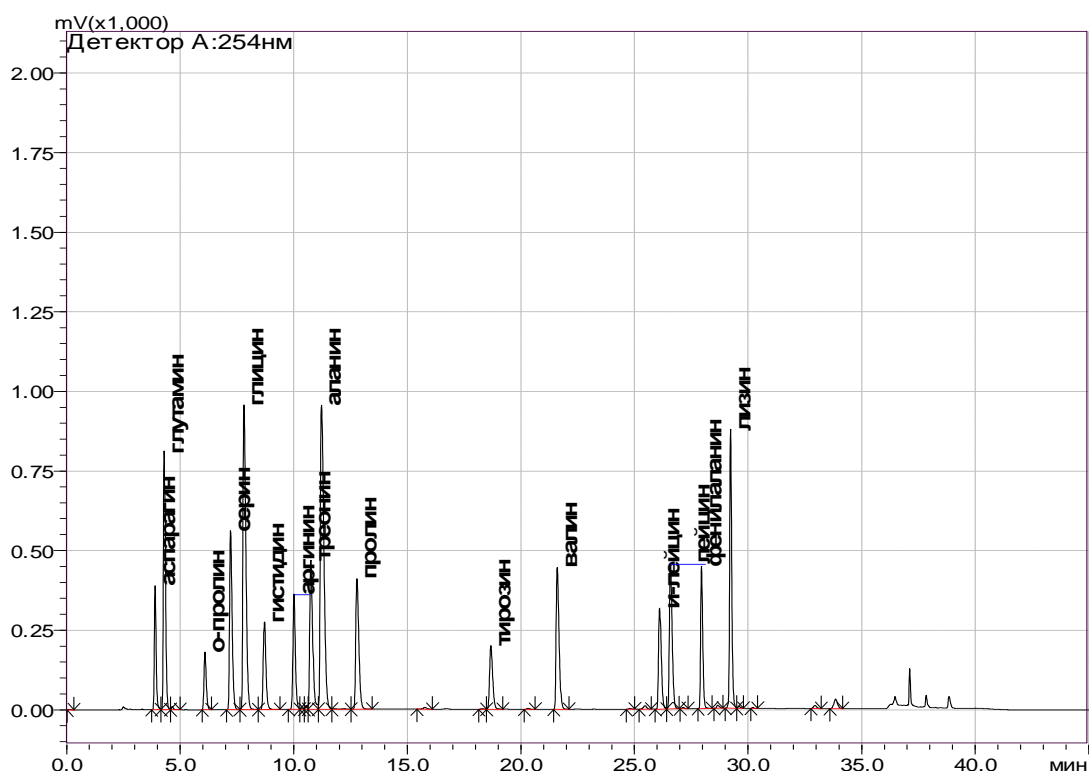


Рис. 1. Хроматограмма стандартных образцов аминокислот

Определение триптофана проводили без дериватизации фенилизотиоцианатом путем хроматографического анализа приготовленного ранее раствора стандартного образца в спирте этиловом 40 % (рис. 2).

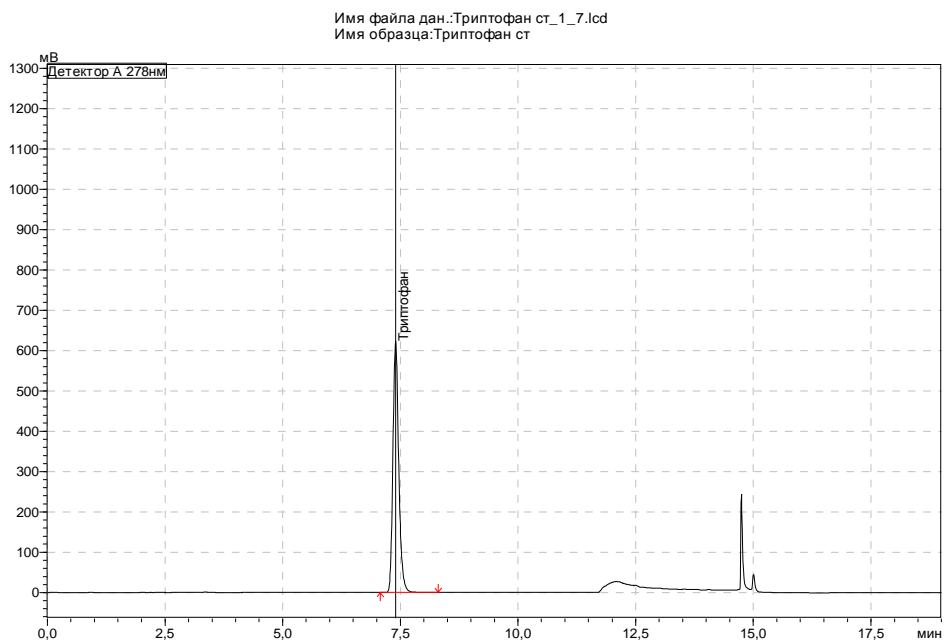


Рис. 2. Хроматограмма стандартного образца триптофана

Для определения суммы цистеина и цистина, стандартные образцы предварительно окисляли надмуравьиной кислотой, затем определяли цистеиновую кислоту в виде фенилтиокарбаматного производного. Для получения надмуравьиной кислоты в пробирке вместимостью 10 см³ смешивали одну часть пероксида водорода и 9 частей муравьиной кислоты, тщательно перемешивали.

Проводили дериватизацию фенилизотиоцианатом, отфильтровывали, и образец вводили в хроматографическую колонку (рис. 3).

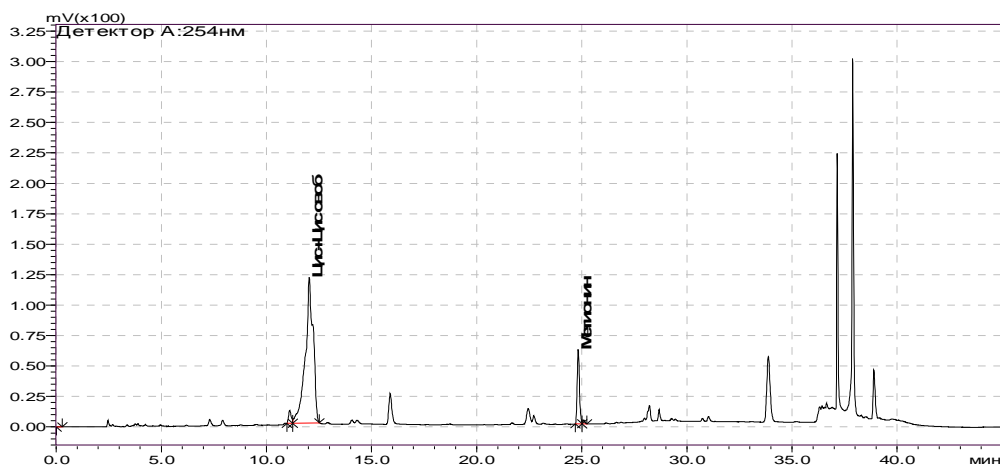


Рис. 3. Хроматограмма стандартных образцов для определения суммы цистин+цистеин и метионина

Для анализа состава образцов на их аминокислотный состав методом ВЭЖХ точную навеску сухого извлечения (~100 мг) из растительного материала растворяли в 5 мл спирта этилового 40 % и выдерживали в ультразвуковой ванне 10 мин. Отбирали аликвоты (0.1-0.2 мл) и помещали их в пробирку. Высушивали досуха на водяной бане при температуре 60 °С в

токе воздуха. Дальнейшую пробоподготовку проводили аналогично стандартным образцам аминокислот [3,6].

Результаты работы и их обсуждение

В результате анализа впервые был установлен качественный и количественный состав свободных аминокислот четырех представителей рода *Stellaria L.* (табл. 2). В надземной части всех исследуемых видов обнаружены и количественно определены 20 основных распространенных аминокислот: незаменимые – валин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин, аргинин, гистидин и заменимые – глицин, аланин, пролин, серин, цистин + цистеин, аспарагин, глутамин, тирозин, гидроксипролин.

Таблица 2. Аминокислотный состав надземной части видов рода *Stellaria L.*

Название аминокислоты	Содержание аминокислоты в пересчете на абсолютно сухое сырье, мг/г							
	<i>S. media</i>		<i>S. nemorum</i>		<i>S. holostea</i>		<i>S. dichotoma</i>	
	кол-во	%	кол-во	%	кол-во	%	кол-во	%
1	2	3	4	5	6	7	8	9
аспарагин	0,218	9,9	0,087	12,5	0,144	6,8	0,262	11,2
глутамин	0,384	17,5	0,067	9,6	0,305	14,4	0,149	6,4
гидроксипролин	0,003	0,1	0,006	0,9	0,002	0,1	0,002	0,1
серин	0,067	3,0	0,025	3,6	0,064	3,0	0,071	3,0
глицин	0,084	3,8	0,02	2,9	0,041	1,9	0,18	7,7
гистидин	0,003	0,1	0,008	1,2	0,014	0,7	0,048	2,1
аргинин	0,258	11,7	0,022	3,2	0,504	23,8	0,342	14,6
треонин	0,008	0,4	0,008	1,2	0,007	0,3	0,036	1,5
аланин	0,036	1,6	0,028	4,0	0,28	13,2	0,113	4,8
пролин	0,314	14,3	0,107	15,4	0,305	14,4	0,132	5,6
тирозин	0,05	2,3	0,087	12,5	0,062	2,9	0,036	1,5
валин	0,129	5,9	0,02	2,9	0,082	3,9	0,168	7,2
изолейцин	0,064	2,9	0,008	1,2	0,028	1,3	0,105	4,5
лейцин	0,028	1,3	0,008	1,2	0,023	1,1	0,082	3,5
фенилаланин	0,067	3,0	0,014	2,0	0,046	2,2	0,094	4,0
лизин	0,011	0,5	0,006	0,9	0,005	0,2	0,027	1,2
цистин+ цистеин	0,241	11,0	0,087	12,5	0,059	2,8	0,136	5,8
метионин	0,008	0,4	0,003	0,4	0,007	0,3	0,01	0,4
триптофан	0,224	10,2	0,084	12,1	0,142	6,7	0,344	14,7
Общее содержание аминокислот	2,197	100	0,695	100	2,120	100	2,337	100

Из таблицы 2 видно, что наибольшее суммарное содержание аминокислот в сырье среди объектов выявлено у звездчатки вильчатой. У звездчатки средней и звездчатки ланцетовидной этот показатель немного ниже и почти совпадает. Согласно полученным данным, в надземной части звездчатки средней преобладают следующие свободные аминокислоты –

аспарагин, глутамин, пролин, аргинин, цистин+цистеин, триптофан (64,7 %)¹; в надземной части звездчатки вильчатой – аспарагин, аргинин, триптофан (40,6 %); в надземной части звездчатки дубравной – пролин, аспарагин, тирозин, цистин+цистеин, триптофан (65 %); в надземной части звездчатки ланцетовидной – аргинин, пролин, глутамин, аланин (65,8 %). Сравнительный анализ содержания аминокислот показывает, что наиболее высокое содержание отмечено для аргинина (23,8 %) и аланина (13,2 %) в звездчатке ланцетовидной (рис. 4) по сравнению с другими видами (~12-14 %) и содержание триптофана в звездчатке вильчатой (14,7 %).

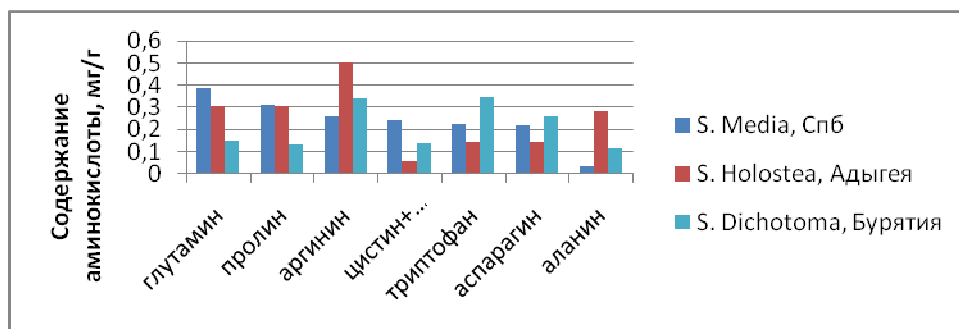


Рис. 4. Структурный анализ основных аминокислот, в % к общей сумме аминокислот

Выводы

1. Определен качественный и количественный состав свободных аминокислот надземной части звездчатки средней, звездчатки вильчатой, звездчатки дубравной и звездчатки ланцетовидной.
2. Во всех анализируемых объектах найдены 20 аминокислот, в том числе 10 незаменимых; для каждого образца определены преобладающие в составе сырья аминокислоты.

Список литературы

1. Горина Я. В. Фармакогностическое исследование некоторых видов рода *Stellaria* и возможность их использования в медицинской практике: автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук. Пермь, 2012.
2. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений: в двух томах. Т. 1 / под ред. чл.-корр. АН СССР В. Л. Кретовича. – Москва: Мир, 1986. – 392 с.
3. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методика выполнения измерений массовой доли аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: М-02-902-142-07. – Введ. 29.03.07. – М.: Стандартиформ, 2007.

¹ В % , по относительному содержанию данных соединений в общей сумме аминокислот.

4. Растительные ресурсы России. Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность Т. 1. Семейства Magnoliaceae - Juglandaceae, Ulmaceae, Moraceae, Cannabaceae, Urticaceae / отв. ред. А. Л. Буданцев. – СПб.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 421 с.
5. Черепанов С. А. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). – СПб., 1995. – 992 с.
6. Bidlingmeyer, B. A. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatisation / Cohen S.A., Tarvin T.L. // *Journal of Chromatography*. – 1984. – Vol. 336. – P. 93-104.
7. Dichotomins J. and K., vasodilator cyclic peptides from *Stellaria dichotoma* / Morita H., Iizuka T., Choo C. Y., Chan K. L., Itokawa H., Takeya K. // *Journal of Natural Product*. – 2005. – Nov. 68(11). – P. 1686-1688.
8. Structures of new beta-carboline-type alkaloids with antiallergic effects from *Stellaria dichotoma* / Sun B., Morikawa T., Matsuda H., Tewtrakul S., Wu L. J., Harima S., Yoshikawa M. // *Journal of Natural Product*. – 2004. – Sep. 67(9). – P. 1464-1469.

Рецензенты:

Каухова Ирина Евгеньевна, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой промышленной технологии лекарственных препаратов ГБОУ ВПО “Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия”, г. Санкт-Петербург.

Куклин Владимир Николаевич, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической химии ГБОУ ВПО “Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия”, г. Санкт-Петербург.