

## **АМИНОКИСЛОТНЫЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ НА ПРИМЕРЕ CHELIDONII HERBAE**

**Ходаковский Владимир Андреевич**

студент, Белорусский государственный медицинский университет, Республика Беларусь, г. Минск

**Еремейчик Антон Игоревич**

студент, Белорусский государственный медицинский университет, Республика Беларусь, г. Минск

### **Введение**

Возможность длительного безопасного применения препаратов растительного происхождения благодаря мягкому терапевтическому действию, минимизации противопоказаний наряду с высокой эффективностью, оправдывает их широкое использование при лечении различных заболеваний [2, с. 367]. Применение водных извлечений лекарственного растительного сырья (ЛРС) имеет преимущество в том, что они обеспечивают хорошую доступность лекарственных веществ, и их приготовление не требует применения специальной аппаратуры [1, с. 117]. По сравнению с индивидуальными лекарственными средствами они вызывают более мягкое действие на организм, лучше переносятся, имеют низкий уровень проявления побочного эффекта, могут применяться длительно [7, с. 82].

Одной из актуальных задач современной фармацевтической науки является поиск отечественных растительных сырьевых источников биологически активных веществ для создания на их основе препаратов различной фармакологической направленности [7, с. 83]. По данным литературы, ЛРС имеет достаточно сложный химический состав и многообразие биологически активных соединений, что позволяет определить их широкое применение в медицине [4, с. 228]. Однако аминокислотный состав ЛРС достаточно глубоко не изучен. Исходя из вышесказанного, актуальной задачей является аминокислотный анализ водных извлечений ЛРС [2, с. 226].

Нами была проанализирована *Chelidonii herbae*, поскольку этот фитопрепарат обладает рядом фармакологических свойств: анальгезирующее, иммуносупрессивное, спазмолитическое, противовоспалительное и др., а также очень широко применяется как в народной, так и в традиционной медицине [1, с. 366]. Состав *Chelidonii herbae*, в основном представлен алкалоидами, флавоноидами, органическими кислотами и другими соединениями [5, с. 392]. Информация об аминокислотном составе водных извлечений *Chelidonii herbae* не представлена широко, что послужило целью нашего исследования.

**Целью** данного исследования явилось изучить возможность аминокислотного анализа водных извлечений *Chelidonii herbae* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

### **Материалы и методы исследования**

Объектом исследования служат свободные аминокислоты в водных извлечениях (настоях) *Chelidonii herbae*. Пробоподготовка водных извлечений проводилась согласно Государственной Фармакопее Республики Беларусь в инфундирном аппарате с соблюдением температурного и временного режимов. Анализ аминокислот проводился с использованием

техники обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Из образцов стандартизированного суховоздушного сырья *Chelidonii herbae* готовили настой с использованием инфундирного аппарата. Среди факторов, влияющих на динамику извлечения действующих веществ учитывали степень измельченности сырья (было использовано стандартизированное сырье, применяемое в домашних условиях), режим перемешивания, соотношение сырья и реагента (для обеспечения полноты извлечения действующих веществ соотношение сырья и воды составило 1:400), степень водопоглощения (так как данных не было, проводилось экспериментально), продолжительность нагревания и охлаждения (15 и 50 минут соответственно), значение pH среды (так как необходима депротеинизация белковых комплексов, добавляли раствор хлорной кислоты).

Анализ аминокислот проводился с использованием техники обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Непосредственно перед процессом преобразования аминокислот полученный супернатант фильтровали через фильтр PVDF 0,2 µm (Whatman, Германия).

Условиями хроматографирования были следующие. Использовался хроматограф Aligent 1100 HP, хроматографическая колонка AA-ODS Hypersil, размеры колонки: 2,1x200 mm, размер зерна: 5 µm. Колонка содержит протестированный сорбент с обращенной фазой. Скорость потока 0,45 мл/мин.

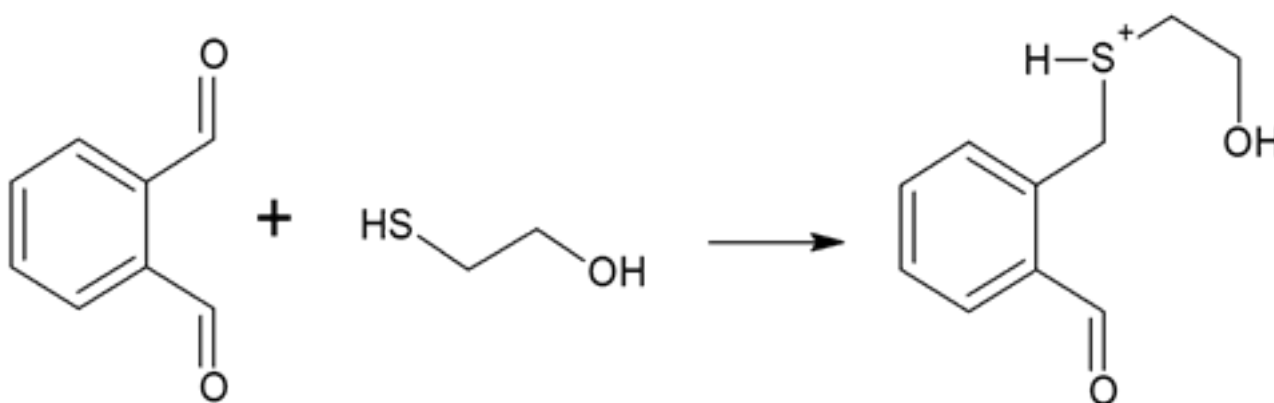
В качестве подвижных фаз использовались А-фаза и В-фаза. Состав А-фазы: 0,018% ацетатный буфер с концентрацией 20 mM; триэтиламин, доведенный до pH 7,2 с добавлением 1-2% уксусной кислоты. Состав В-фазы: 20% ацетата натрия с концентрацией 100 mM, доведенного до pH 7,2 раствором 1-2% уксусной кислоты + 40% ацетонитрила + 40% метанола [1;2].

### Анализ полученных результатов

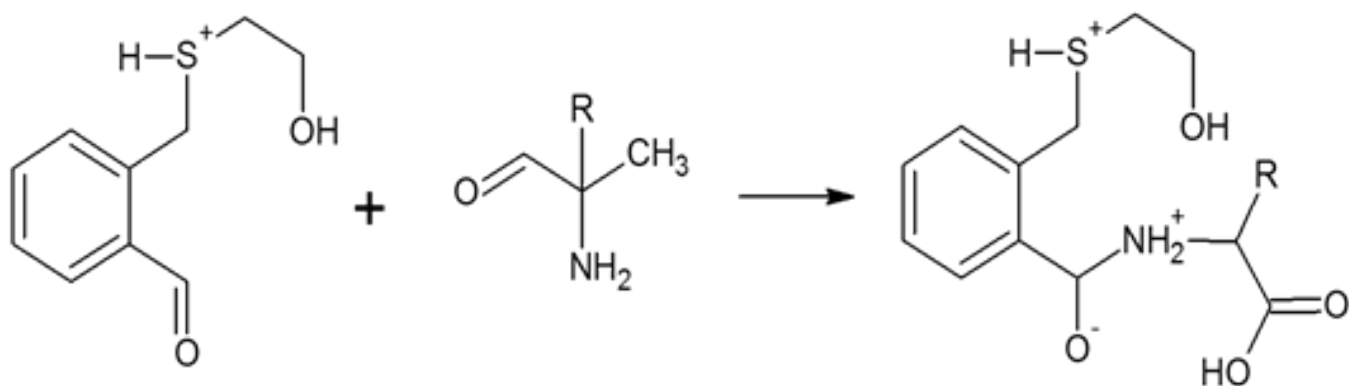
Для регистрации первичных аминокислот, их необходимо подвергнуть реакции с ортофталевым альдегидом (ОФА).

Установлено, что при образовании дериватов, ее адсорбционный спектр изменяется и регистрируется дополнительная полоса поглощения с максимумом при длине волны 338 нм.

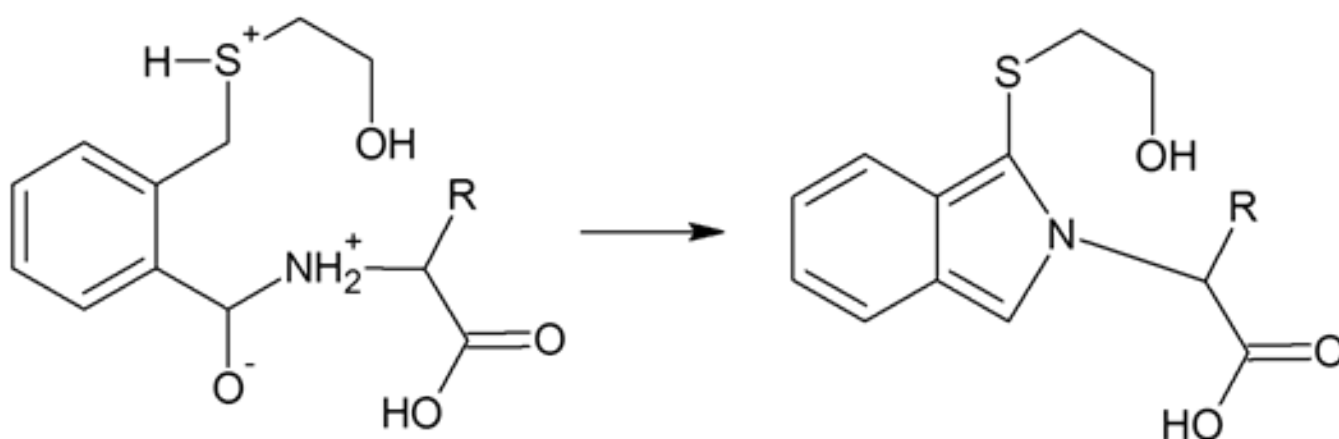
Образование ОФА-дериватизированных аминокислот осуществляется по механизму нуклеофильного присоединения и проводится в щелочной среде, т.к. в этой реакции аминогруппа аминокислоты выступает в роли нуклеофила и должна находиться в депротонированной форме.



**Рисунок 1. Взаимодействие ортофталевого альдегида с меркаптоэтанолом**



**Рисунок 2. Взаимодействие продукта первой реакции с аминокислотой**



**Рисунок 3. Образование дериватизированной аминокислоты**

В результате была получена хроматограмма с хроматографическими пиками, соответствующими зонам выхода аминокислот или их производным. Идентификация соединений проводилась программой Chemstation 09.03 путем сравнения зон выхода аминокислот с калибровочной кривой смеси аминокислот. Так, аспарагиновая и глутаминовая кислоты имели время удерживания 2–3 минуты, а аргинин и аланин – 7–8 минут.

## Заключение

В ходе выполнения работы были получены следующие результаты:

1. Исследованы оптимальные условия пробоподготовки водных извлечений *Chelidonii herbae* с депротеинизацией белковых соединений 0,1М HClO<sub>4</sub>.
2. Установлена возможность применения методики обращенно-фазовой хроматографии для анализа свободных аминокислот (глутаминовой, аспарагиновой, аргинина и аланина) по реакции с ортофталевым альдегидом.

## Список литературы:

1. Государственная фармакопея Республики Беларусь: (ГФ РБ II): в 2 т. Т. 1: Общие методы контроля качества лекарственных средств / Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Республиканское унитарное предприятие «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под общ. ред. А.А. Шерякова. – Молодечно: Типография «Победа», 2012. – 1220 с.

2. Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия: учебное пособие / под ред. Г.П. Яковлева, К.Ф. Блиновой. – СПб: СпецЛит, 2004. – 765 с.
3. Жебентяев А.И. Аналитическая химия. Хроматографические методы анализа: Учебное пособие / А.И. Жебентяев. – М.: НИЦ ИНФРА-М, Новое знание, 2013. – 206 с.
4. Зенкевич И.Г. Аналитическая химия. В 3-х т. Т. 3. Химический анализ: Учебник для студ. высших учебных заведений / И.Г. Зенкевич. – М.: ИЦ Академия, 2010. – 368 с.
5. Spectrophotometric and chromatographic analysis of amino acids present in leaves of Ailanthus excels / Khokhani K., Khatri T., Joshi H. – International Journal of ChemTech Research. – USA, 2012. – Vol. 4. №1. P. 389-393.
6. Elbashir, A.A. The application of 7-chloro-4-nitrobenzoxadiazole and 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole for the analysis of amines and amino acids using High-Performance Liquid chromatography / A. A. Elbashir, F. O. Suliman/ – GU J. Sci, 2011. – Vol. 24(4). P. 679-697.
7. Indirect chiral HPLC determination and fluorimetric detection of d-amino acids in milk and oyster samples / S. Rubio-Barroso, C. Martin-Oliver, M. L. Polo-Diez/ – J. Dairy Sci. 2006. – Vol. 89. №1. P. 82-89.
8. Amino acid determination in grape juices and wines by HPLC using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method / P. Hernandez-Orte, V. Ferreira. – Chromatographia, 2003. – Vol. 58. P. 29-35.