

П.Ю. Шкроботько

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА И СОДЕРЖАНИЯ ЗАМЕНИМЫХ И НЕЗАМЕНИМЫХ АМИНОКИСЛОТ В ЛИСТЬЯХ ТРЕХ ВИДОВ ВАЛЕРИАНЫ

Запорожский государственный медицинский университет

Ключові слова: валеріана, листя, амінокислоти, амінокислотний аналізатор.

Ключевые слова: валериана, листья, аминокислоты, аминокислотный анализатор.

Key words: valerian, leaves, aminoacid, aminoacidic analyzer.

Наведено дані про якісний склад та вміст 12 замінних і 8 незамінних амінокислот у листі трьох видів валеріани.

Представлены данные о качественном составе и количественном содержании 12 заменимых и 8 незаменимых аминокислот в листьях трех видов валерианы.

Data of qualitative composition and quantitative contents of 12 replaceable and 8 irreplaceable aminoacids in leaves of three species of Valeriana L. were received.

Центральное место в семействе валериановых занимает род валериана (*Valeriana L.*), включающий более 200 видов [4]. Сколько видов этого рода произрастает в Украине до настоящего времени неясно [2,13]. С учетом современных данных, возможно, он представлен 4 немедицинскими видами и 5 видами из цикла валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis L.s.l.*), сравнительное химикофармакологическое изучение которых не проводилось [4]. Несмотря на то, что за более чем 200-летний промежуток времени, начиная от К. Линнея, внесен значительный вклад в познание валерианы лекарственной, одного из труднейших по сложности видовых циклов, до наших дней не решен окончательно вопрос, представляет ли она один вид или несколько, а если несколько, то каких именно [3]. В связи с чем к медицинскому применению допускается весь сборный цикл валерианы лекарственной (*V. officinalis L.s.l.*) [3,4]. К тому же, именно она наиболее широко распространена в Украине [2,13]. Из этого цикла в качестве самостоятельных таксонов признают в СНГ 9 видов [4], в их числе валериану холмовую (*V. collina Wallr.*) или в. побегоносную (*V. stolonifera Czern.*), иногда образующую популяции на склонах балок в окр. г. Запорожья, и валериану лекарственную в узком смысле (*V. officinalis L.s.str.*), произрастающую в окр. г. Ярославля. На правом скалистом берегу р. Днепра в окр. г. Запорожья в весеннее время обильно вегетирует валериана клубненосная (*V. tuberosa L.*). Названные виды относятся к различным секциям рода валериана [4]. Вместе с тем, не предпринимались химические исследования по выявлению их филогенетического родства. На протяжении более 100 лет интенсивно изучаются вещества вторичного обмена валерианы лекарственной в широком понимании [14]. Наряду с этим, значительно реже исследовались вещества первичного обмена, в частности аминокислоты, участвующие во многих жизненно важных процессах растений и животных [6,8]. Так, тирозин и фенилаланин – непереносимые компоненты для биогенеза флавоноидов. С помощью глутаминовой кислоты осуществляется перенос аминокислот при переаминировании, а метильных групп

метионина – при переметилировании и др. С одной стороны, имеются все предпосылки для использования легкоусвояемой формы аминокислот в комплексном лечении различных заболеваний. Так, глутаминовая кислота участвует в поддержании дыхания мозговых клеток, стимулирует окислительные процессы, играет роль в метаболизме серого и белого вещества мозга; метионин обладает липотропным, аланин – церебропротективным, аргинин и глутаминовая кислота – антиоксидантным, гепатопротективным и мембраностабилизирующим действием, тирозин служит основным субстратом для синтеза тироксина, адреналина и глутаминовой кислоты; при недостатке лизина нарушается азотистое равновесие, прекращается развитие плода и рост молодых животных, тормозится образование гемоглобина и эритроцитов; аланин и глицин регулируют уровень сахара в крови, принимают участие в регенерации тканей и др. [1,5,9-12]. С другой стороны, аминокислоты представляют интерес для эволюционной биохимии. Кроме того, пытаются стандартизировать отдельные лекарственные препараты валерианы по наличию суммы аминокислот.

Следует отметить, что в известной мере одной из возможных форм применения является свежий сок, отжатый из корневищ с корнями валерианы, уменьшающий возбудимость ЦНС и умственное напряжение, улучшающий сон, снимающий головные боли, обеспечивающий устойчивость организма к стрессовым ситуациям. Аналогичными, но менее выраженными свойствами обладает сок из травы [13]. В.И. Линенко с соавторами [7] провели фармакологические исследования настоек, приготовленных из надземной части валерианы, в результате которых отметили успокаивающие свойства отдельных из них. Некоторые настойки из валерианы побегоносной оказались более эффективными, чем валерианы лекарственной. В ГНЦЛС под руководством В.И. Литвиненко разработан способ получения сухого экстракта из травы валерианы, при фармакологическом испытании которого обнаружено его антистрессовое действие, сравнимое с таковым аптечной настойки [12,14]. Вместе с тем, отсутствуют объясне-



ния, какими веществами обуславливаются успокаивающие свойства. Ни в одной из упомянутых выше лекарственных форм не выявлены валепотриаты и эфирное масло, т.е., по современным представлениям, основные вещества, ответственные за седативный эффект сырья и препаратов валерианы. Возможно, одни из действующих веществ травы валерианы – аминокислоты.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: проанализировать состав и содержание заменимых и незаменимых аминокислот в листьях трех видов валерианы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлись листья валерианы холмовой, в. клубненосной, произрастающих в окр. г. Запорожья, и в. лекарственной из окр. г. Ярославля.

Аналитическую пробу листьев анализируемых валериан измельчали до размера частиц, проходивших сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм. Пробу массой 1,0 г (точная навеска) помещали в круглодонную колбу со шлифом, прибавляли 20 мл 70% спирта этилового, взвешивали с точностью $\pm 0,01$ г, нагревали на водяной бане с обратным холодильником на протяжении 1 часа, охлаждали до комнатной температуры, снова взвешивали и при необходимости до

первоначальной массы доводили 70% этанолом. Первоначальное извлечение фильтровали через бумажный фильтр. Первые 10 мл фильтрата отбрасывали. Из последующей порции элюата отбирали 50 мкл и упаривали досуха в вакуумном испарителе фирмы «Servanta» (США). Сухой остаток растворяли в 200 мкл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты, нагревали на водяной бане в течение 15 мин при температуре 60°C, перемешивали и центрифугировали в течение 3 минут при 4000 оборотах. Для анализа использовали 50 мкл полученного гидролизата.

Аминокислотный анализ водорастворимых фракций проводили на аминокислотном анализаторе фирмы «Hitachi» модель 835 на стальной колонке (0,4X15 см), заполненной катионообменной смолой марки 2619 (Hitachi custom Ion-Exchange Resin). Разделение аминокислот осуществляли в трехбуферной системе натрий-цитратных буферных растворов: 0,18 Н рН 3,25; 0,3 Н рН 3,9; 1,6 Н рН 4,75. Нингидриновый реактив готовили с использованием метилового эфира этиленгликоля. Цитратные буферные растворы подавали в колонку по стандартной программе со скоростью 32 мл/ч, нингидриновый реактив – со скоростью 20 мл/ч. После выхода из аналитической колонки разделенные

Таблица 1

Аминокислотный состав листьев трех видов валерианы

Заменимые аминокислоты	В пробе, нмоль			Незаменимые аминокислоты	В пробе, нмоль		
	1	2	3		1	2	3
Моноаминокарбоновые кислоты				Моноаминокарбоновые кислоты			
Аланин	3,92	2,63	5,18	Валин	3,45	2,22	3,83
Глицин	12,25	5,36	9,17	Изолейцин	2,51	1,47	2,78
Серин	3,42	1,57	3,38	Лейцин	3,91	2,36	4,72
Тирозин	1,29	0,28	1,06	Метионин	0,65	0,42	0,76
Цистеин	0,12	0,07	0,08	Треонин	2,84	1,49	2,73
Сумма	21,00	9,91	18,87	Фенилаланин	2,81	1,26	2,14
Моноаминодикарбоновые кислоты				Сумма	16,17	9,22	16,96
Аспарагиновая	8,08	2,45	5,30	Диаминокарбоновые кислоты			
Глутаминовая	4,24	2,71	4,96	Лизин	2,78	1,48	2,96
Сумма	12,32	5,16	10,26	Оксилизин	0,78	0,23	0,63
Диаминокарбоновые кислоты				Сумма	3,49	1,71	3,59
Аргинин	3,14	1,11	2,07	Общая сумма	20,66	10,93	20,55
Гетероциклические кислоты				Общая сумма заменимых и незаменимых аминокислот	61,66	29,91	56,25
Гистидин	1,19	0,45	0,92				
Оксипролин	0,29	0,17	0,17				
Пролин	3,06	2,18	3,41				
Сумма	4,54	2,80	4,50				
Общая сумма	41,00	18,98	35,70				

Примечание. Листья собраны: 1 – валерианы холмовой в стадии прикорневой розетки и высотой генеративного побега до 10 см в окр. г. Запорожья в Канцеровской балке 25.04.07; 2 – в. клубненосной в стадии цветения в окр. г. Запорожья на правом берегу р. Днепр 25.04.07; в. лекарственной в стадии прикорневой розетки и высотой генеративного побега до 10-20 см в окр. г. Ярославля на правом берегу р. Волги 13.05.07.

Содержание заменимых и незаменимых аминокислот в листьях трех видов валерианы

Заменимые аминокислоты	Содержание, мг/100 мг			Незаменимые аминокислоты	Содержание, мг/100 мг		
	1	2	3		1	2	3
Моноаминокарбоновые кислоты				Моноаминокарбоновые кислоты			
Аланин	0,74	1,00	0,97	Валин	0,85	1,11	0,94
Глицин	3,79	3,38	2,84	Изолейцин	0,69	0,83	0,77
Серин	0,76	0,71	0,75	Лейцин	1,08	1,33	1,30
Тирозин	0,49	0,22	0,40	Метионин	0,20	0,27	0,24
Цистеин	0,06	0,07	0,04	Треонин	0,71	0,76	0,68
Сумма	5,84	4,38	5,00	Фенилаланин	0,98	0,89	0,74
Моноаминодикарбоновые кислоты				Сумма	4,51	5,19	4,67
Аспарагиновая	2,26	1,40	1,48	Диаминокарбоновые кислоты			
Глутаминовая	0,67	0,87	0,78	Лизин	0,86	0,93	0,91
Сумма	2,93	2,27	2,26	Оксилизин	0,24	0,16	0,21
Диаминокарбоновые кислоты				Сумма	1,10	1,09	1,12
Аргинин	1,15	0,83	0,76	Общая сумма	5,61	6,28	5,79
Орнитин	0,04	0,02	0,01	Общая сумма заменимых и незаменимых аминокислот	16,78	15,26	15,30
Сумма	1,19	0,85	0,77				
Гетероциклические кислоты							
Гистидин	0,39	0,30	0,30				
Оксипролин	0,08	0,10	0,05				
Пролин	0,74	1,08	0,83				
Сумма	1,21	1,48	1,18				
Общая сумма	11,17	8,98	9,51				

Примечание. Обозначения те же, что и в таблице 1.

аминокислоты смешивали с нингидриновым реактивом в смесительном блоке в соотношении 2:1. Реакция аминокислот с нингидриновым реактивом проходила в течение 4 минут при 100°C в реакционной бане. Колориметрическое измерение окрашенных комплексов, образующихся в результате реакции с нингидрином, проводилось непрерывно и одновременно при двух длинах волн. Первичные амины образовывали пурпурную окраску, измеряемую при длине волны 570 нм, а вторичные (пролин и оксипролин), образующие соединения желтой окраски, измеряли при длине волны 440 нм. Расчет каждой из аминокислот (нмоль) проводили в аликвоте, непосредственно использованной для анализа (табл. 1), и в дальнейшем пересчитывали на количество мг в 100 мг (табл. 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основании полученных аналитических данных видно, что в листьях трех видов валерианы обнаружено 20 аминокислот. Среди них в суммарном отношении преобладали моноаминокарбоновые кислоты, представленные заменимыми (аланин, глицин, серин, тирозин, цистеин)

и незаменимыми (валин, изолейцин, лейцин, метионин, трионин, фенилаланин) кислотами. Кроме них содержались моноаминокарбоновые (аспарагиновая и глутаминовая кислоты), диаминокарбоновые (аргинин, лизин, оксилизин, орнитин) и гетероциклические (оксипролин, пролин, гистидин) кислоты. Аргинин и гистидин относят к условно-заменимым аминокислотам.

Данные об аминокислотном составе и содержании отдельных аминокислот в анализируемых образцах представлены на рисунках 1–3 и обобщены в таблицах 1–2.

Больше всего суммы заменимых моноаминокарбоновых (5,84 мг/100 мг), моноаминодикарбоновых (2,93 мг/100 мг) и диаминокарбоновых (1,19 мг/100 мг) кислот определено в листьях валерианы холмовой (табл. 2), гетероциклических (1,48 мг/100 мг) и незаменимых моноаминокарбоновых (5,19 мг/100 мг) кислот – в листьях валерианы клубненой, незаменимых диаминокарбоновых кислот (1,12 мг/100 мг) – в листьях валерианы лекарственной. Суммарное содержание заменимых аминокислот по мере убывания в анализируемых образцах можно расположить в следующий ряд: валериана

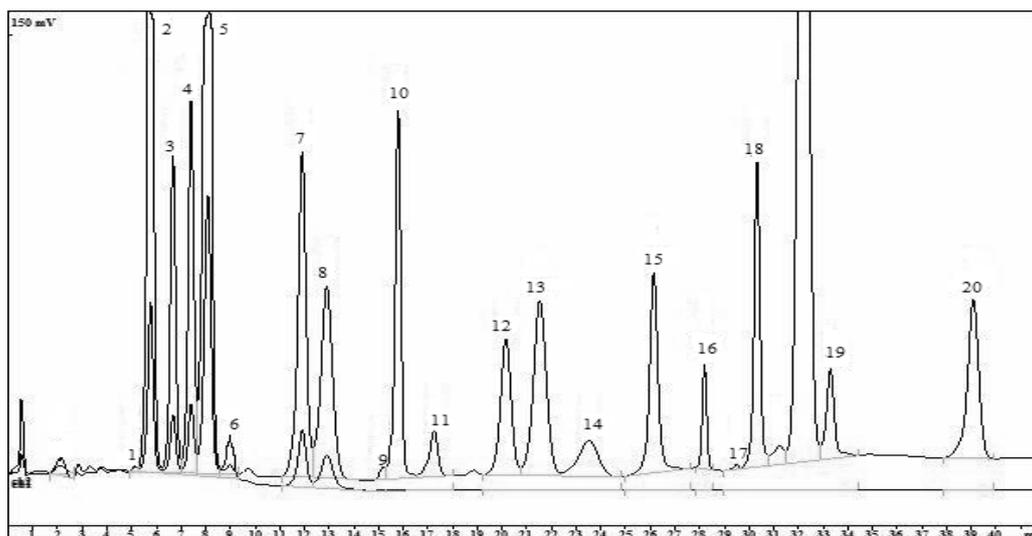


Рис. 1. Хроматограмма аминокислот листьев валерианы холмовой.

Условные обозначения: 1 – оксипролин, 2 – аспарагиновая кислота, 3 – треонин, 4 – серин, 5 – глутаминовая кислота, 6 – пролин, 7 – глицин, 8 – аланин, 9 – цистеин, 10 – валин, 11 – метионин, 12 – изолейцин, 13 – лейцин, 14 – тирозин, 15 – фенилаланин, 16 – оксализин, 17 – орнитин, 18 – лизин, 19 – гистидин, 20 – аргинин.

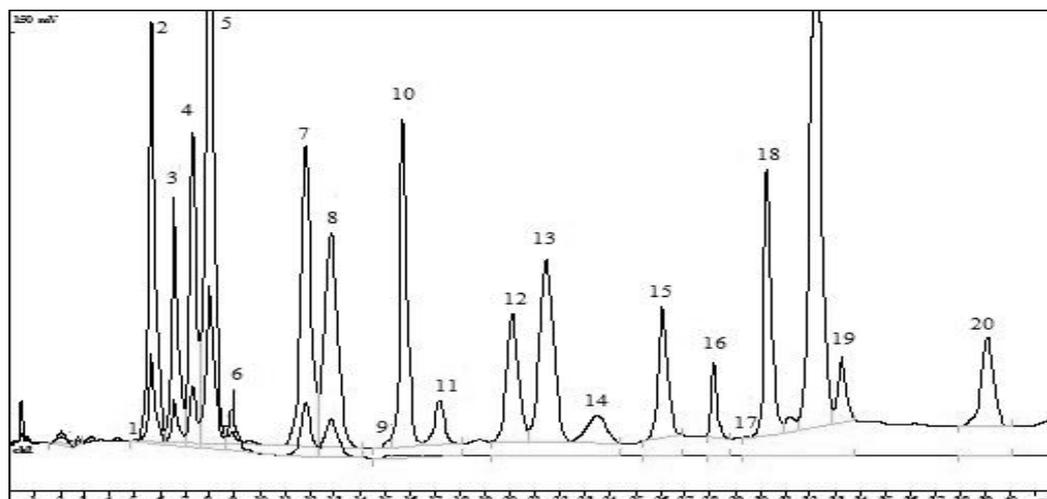


Рис. 2. Хроматограмма аминокислот листьев валерианы клубненосной.

Условные обозначения: те же, что и на рис. 1.

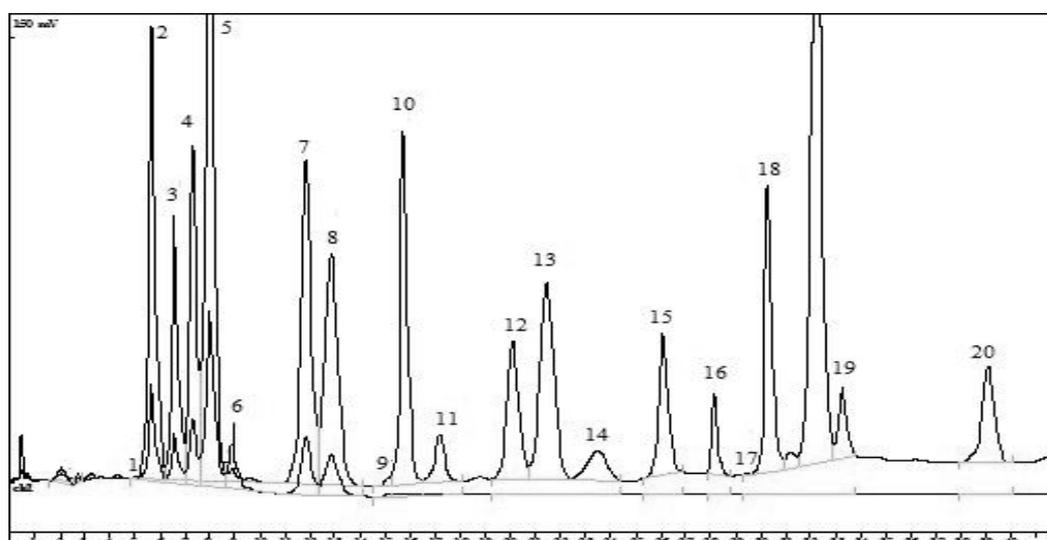


Рис. 3. Хроматограмма аминокислот листьев валерианы лекарственной.

Условные обозначения: те же, что и на рис. 1.

холмовая >в. лекарственная>в. клубненосная, незаменимых – в. клубненосная>в. лекарственная >в. холмовая, общей суммы тех и других – в. холмовая>в. лекарственная >в. клубненосная, т.е. обнаруживаются специфические особенности в накоплении аминокислот в валерианах различных секций. Независимо от анализируемого образца в них преобладали глицин, аспарагиновая кислота, аргинин (больше всего в листьях валерианы холмовой), лейцин, валин, пролин, аланин (в листьях в. клубненосной) и меньше всего обнаружено орнитина (рис. 1-3, табл. 2).

Результаты исследований аминокислотного состава листьев трех видов валерианы свидетельствуют, что валериана холмовая и в. лекарственная представляются более близкими в сравнении с в. клубненосной. Особенности накопления заменимых и незаменимых аминокислот в листьях анализируемых валериан, по-видимому, обусловлены, с одной стороны, видовыми различиями, а с другой, зависели от фазы вегетации.

Суммарная доля заменимых аминокислот в листьях валерианы холмовой и в. лекарственной больше, чем в. клубненосной, а в последней – несколько более высокое содержание незаменимых, в частности моноаминокарбоновых кислот (табл. 2).

ВЫВОДЫ

Проанализирован качественный состав и количественное содержание заменимых и незаменимых аминокислот в листьях валерианы холмовой (*V. collina* Wallr.), в. клубненосной (*V. tuberosa* L.), в. лекарственной (*V. officinalis* L.s.str.) и выявлены их отдельные биохимические особенности.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Балясова Н.М.* Исследования антиаритмической активности некоторых аминокислот: / *Балясова Н.М.* // Автореф. ... кандидата мед. наук. – Купавна, 1998. – 16 с.
2. *Визначник рослин України.* – Київ: АН УССР, 1965. – С. 636-650.
3. *Ворошилов В.Н.* Лекарственная валериана / *Ворошилов В.Н.* // – М.: АН СССР, 1959. – 160 с.
4. *Горбунов Ю.Н.* Валерианы флоры России и сопредельных государств. / *Горбунов Ю.Н.* // – М.: Наука, 2002. – 208 с.
5. *Западнюк В.И.* Аминокислоты в медицине. / *Западнюк В.И.* // – Киев: Здоровье, 1982. – С. 58-151.
6. *Кретович В.Л.* Биохимия растений. / *Кретович В.Л.* // – М.: Высшая школа, 1980. – 448 с.
7. *Линенко В.І.* До фармакологічного дослідження валеріани пагононосної / *Линенко В.І., Стець В.Р., Корнієвський Ю.І.* // Фармац. журнал. – 1975. – №2. – С. 51-53.
8. *Меньшиков Ф.К.* Диетотерапия. / *Меньшиков Ф.К.* // – М.: Медицина, 1972. – 296 с.
9. *Напалкова С.М.* Аминокислоты и их производные как потенциальные средства фармакологической коррекции нарушений сердечного ритма и острой ишемии миокарда: Автореф. дисс. ... доктора мед. наук. / *Напалкова С.М.* // – Купавна, 1999. – 32 с.
10. *Сергунов Е.В.* Изучение аминокислотного состава плодов и экстракта шиповника / *Сергунов Е.В., Самылина И.А., Сорочкина А.А.* // Фармация. – 2003. – №3. – С. 13-15.
11. *Слюнькова Н.Е.* К вопросу о механизме церебропротекторного действия β-аланина и кальция пантотената при ишемическом инсульте / *Слюнькова Н.Е., Погорелький В.Е., Макарова Л.М.* // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сб. науч. тр.– Вып. 59. – Пятигорск, 2004. – С. 318.
12. *Талашова С.В.* Фармакогностическое изучение, стандартизация и комплексная переработка валерианы лекарственной: / *Талашова С.В.* // Автореф. ... кандидата фармац. наук. М., 1996. – 24 с.
13. *Флора УССР.* – Київ: АН УРСР, 1961. – Т.10. – С. 314-346.
14. *Фурса Н.С.* Валерианотерапия нервно-психических болезней. / *Фурса Н.С. и др.* // – Запорожье: ЗАО «ИВЦ с/х», 2000. – 348 с.

Сведения об авторе:

Шкроботько П.Ю., ассистент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ЗГМУ.

Адрес для переписки:

Шкроботько Павел Юрьевич, 69035, г. Запорожье, ул. Маяковского, 26, кафедра фармакогнозии с курсом ботаники.