

Изучение аминокислотного состава ноотропного сбора

Е.А. Доровских, В.А. Ермакова, Т.Ю. Ковалева

Первый Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет),
Российская Федерация, 119048, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Доровских Екатерина Анатольевна – аспирант кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (ПМГМУ им. И.М. Сеченова) (Сеченовский Университет). Тел.: +7 (915) 014-67-29. E-mail: 5ksusha5@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2741-1796>

Ермакова Валентина Алексеевна – профессор кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), доктор фармацевтических наук, профессор. Тел.: +7 (905) 746-39-36. E-mail: ermakova1701@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0006-5002>

Ковалева Татьяна Юрьевна – доцент кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (916) 321-68-04. E-mail: tatyana_kovaleva_75@inbox.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5961-9030>

РЕЗЮМЕ

Введение. Число пациентов, нуждающихся в лекарственных средствах ноотропного действия, постоянно растет как в России, так и во всем мире. В связи с этим является актуальной разработка эффективных и безопасных лекарственных средств для лечения и профилактики данных заболеваний. Химический скрининг сбора и отдельных его компонентов показал присутствие в них азотистых соединений, в том числе аминокислот. Учитывая важную роль аминокислот для функционирования нервной системы, представляет научный и практический интерес более детальное изучение биологически активных соединений этой группы.

Цель исследования – изучение качественного и количественного состава свободных и связанных аминокислот сбора ноотропного действия.

Материал и методы. Объектом исследований служил воздушно-сухой измельченный сбор ноотропного действия. Детальный качественный и количественный анализ проведен методами ТСХ и ВЭЖХ с применением предколоночной дериватизации образцов и разделением аминокислот методом обращенно-фазовой хроматографии с применением флуорометрического детектора по методике WatersAccQTag.

Результаты. Аминокислотный состав сбора ноотропного действия представлен 16 аминокислотами в свободном и связанном виде, 7 из которых – незаменимые. Суммарное содержание свободных аминокислот составило 1,165%, а связанных – 3,216%.

Заключение. В результате изучения биологически активных веществ сбора ноотропного действия было получены данные по составу и количественному содержанию аминокислот.

Ключевые слова: ноотропные препараты, сбор лекарственных растений, аминокислоты, метод WatersAccQTag.

Для цитирования: Доровских Е.А., Ермакова В.А., Ковалева Т.Ю. Изучение аминокислотного состава ноотропного сбора. Фармация, 2020; 69 (3): 18–22. <https://doi.org/10/29296/25419218-2020-03-03>

INVESTIGATION OF THE AMINO ACID COMPOSITION OF A NOOTROPIC HERBAL TEA

E.A. Dorovskikh, V.A. Ermakova, T.Yu. Kovaleva

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); 8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119048, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Dorovskikh Ekaterina Anatolyevna – postgraduate Student of Department of the Pharmaceutical Natural Science, Institute of Pharmacy of Sechenov University. Tel.: +7 (915) 014-67-29. E-mail: 5ksusha5@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2741-1796>

Ermakova Valentina Alekseevna – professor of Department of the Pharmaceutical Natural Science, Institute of Pharmacy of Sechenov University, Doctor Pharmaceutical Science, Professor. Tel.: +7 (905) 746-39-36. E-mail: ermakova1701@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0006-5002>

Kovaleva Tatiana Yuryevna – dotsent of Department of the Pharmaceutical Natural Science, Institute of Pharmacy of Sechenov University, PhD Pharmaceutical Science. Tel.: +7 (916) 321-68-04. E-mail: tatyana_kovaleva_75@inbox.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5961-9030>

SUMMARY

Introduction. The number of patients who need nootropic drugs is constantly growing both in Russia and around the world. In this connection, it is relevant to design effective and safe medicines for the treatment and prevention of these diseases. Chemical screening of a nootropic herbal tea and its individual components has shown that they contain nitrogenous compounds, including amino acids. Taking into account the important role of amino acids in the functioning of the nervous system, a more detailed study of this group of biologically active compounds is of scientific and practical interest.

Objective: to investigate the qualitative and quantitative composition of free and bound amino acids in the nootropic herbal tea.

Material and methods. The investigation object was an air-dry ground nootropic herbal tea. A detailed qualitative and quantitative analysis was carried out by TLC and HPLC with pre-column derivatization of samples and separation of amino acids by reversed-phase chromatography on a fluorometric detector, by applying the Waters AccQ Tag method.

Results. The amino acid composition of a nootropic herbal tea was represented by 16 amino acids in free and bound forms, 7 of which were essential. The total content of free and bound amino acids was 1.165 and 3.216%, respectively.

Conclusion. The investigation of biologically active substances in the nootropic herbal tea provided data on the composition and quantitative content of amino acids.

Key words: nootropic drugs, herbal tea, amino acids, Waters AccQ Tag method.

For reference: Dorovskikh E.A., Ermakova V.A., Kovaleva T.Yu. Investigation of the amino acid composition of a nootropic herbal tea. *Farmatsiya*, 2020; 69 (3): 18–22. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-03-03>

Введение

Число пациентов, нуждающихся в лекарственных средствах ноотропного действия, постоянно растет как в России, так и во всем мире. Это связано как с увеличением числа лиц пожилого возраста, так и с неблагоприятными экологическими факторами, отсутствием здорового образа жизни и непрерывным стрессом у более молодых людей. Согласно данным ВОЗ, в 2016 г. нарушения мозгового кровообращения привели к смерти почти 6 млн человек [1]. В связи с этим является актуальной разработка эффективных и безопасных лекарственных средств для лечения и профилактики данных заболеваний. Лекарственные растительные препараты отличаются комплексностью действия, а также относительной безопасностью в сравнении с синтетическими препаратами. На кафедре фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) был разработан состав сбора ноотропного действия, в который входят 5 видов лекарственного растительного сырья, принадлежащего к различным морфологическим группам. Фармакологическая активность сбора была доказана в ходе доклинических исследований.

Как свидетельствуют данные научной литературы и результаты изучения химического состава сбора, в него входят биологически активные вещества различных групп, доминирующими из которых являются фенольные соединения. Химический скрининг сбора и отдельных его компонентов показал присутствие в них азо-

тистых соединений, в том числе аминокислот. Учитывая важную роль, которую играют аминокислоты в жизнедеятельности растительных и животных организмов, представляет научный и практический интерес более детальное изучение этой группы биологически активных соединений.

В настоящее время известно, что аминокислоты являются важнейшим строительным материалом во всех клетках организма. Помимо участия в синтезе белка и ферментов, они выполняют функции нейромедиаторов или являются их предшественниками, регулируют и участвуют в обменных процессах, работе ЦНС, иммунной и гормональной систем. Недостаток той или иной аминокислоты может сказываться на функционировании всего организма в целом, в том числе вызывать психические расстройства, нарушать работу сердечно-сосудистой системы, мозга и снижать умственную активность и память [2]. Аминокислоты, по современным представлениям, регулируют уровень кальция в нервных клетках, стимулируют кровообращение в нервной ткани, экспрессию рецепторного аппарата, подавляют процессы перекисного окисления липидов [3]. Некоторые аминокислоты являются природными антиоксидантами – цистеин, глицин, пролин, β-аланин, таурин и др. [4].

Глицин – естественный медиатор центральной нервной системы, который сочетает ноотропный эффект с мягким седативным действием. В составе одноименного лекарственного препарата назначается при ишемии, гипоксии мозга и для лечения неврозов [5]. Аргинин способствует улучшению клинического состояния больных ишемической болезнью сердца, сни-

жает вязкость крови и уменьшает риск тромбоза сосудов. Глутаминовая кислота поддерживает дыхание клеток головного мозга, ее применяют при лечении некоторых нервных и психических заболеваний [6].

Цель исследования – изучение качественного и количественного состава свободных и связанных аминокислот сбора ноотропного действия.

Материал и методы

Объектом исследований служил воздушно-сухой измельченный сбор ноотропного действия, компоненты которого были заготовлены в различных областях РФ в 2018–2019 гг.

Точную навеску (5,0 г) измельченного сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, заливали 50 мл дистиллированной воды и нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 ч. Извлечение фильтровали, сырье заливали новым объемом воды (50 мл) и повторяли экстракцию еще 2 раза. Водные извлечения, полученные после трехкратной экстракции, объединяли, упаривали под вакуумом до 25 мл и проводили с ними качественный и количественный анализ [7].

При качественном анализе смешивали равные объемы исследуемых извлечений из сбора и отдельных его компонентов и 0,1% свежеприготовленного раствора нингидрина, затем осторожно нагревали до появления устойчивого

красно-фиолетового окрашивания. При проведении хроматографического анализа на пластинки «Сорбфил» наносили по 5 мкл полученных извлечений и хроматографировали в системе растворителей «96% спирт этиловый : концентрированный аммиак» в соотношении 16:4,5) Хроматограммы высушивали на воздухе, обрабатывали 0,2% спиртовым раствором нингидрина и нагревали в сушильном шкафу при температуре 100–105°C в течение нескольких минут. Аминокислоты проявлялись в виде красно-фиолетовых зон адсорбции [8].

Таблица 2

Состав и содержание аминокислот в ноотропном сборе, %

Table 2

The composition and content of amino acids in the nootropic herbal tea, %

№	Аминокислота	Содержание аминокислот	
		свободных	связанных
1	Аспарагиновая кислота	0,014	0,031
2	Серин	0,071	0,751
3	Глутаминовая кислота	0,008	0,022
4	Глицин	0,042	0,092
5	Гистидин	0,007	0,039
6	Аргинин	0,003	0,025
7	Треонин*	0,001	0,152
8	Аланин	0,009	0,064
9	Пролин	0,502	0,045
10	Тирозин	–	0,003
11	Валин*	0,017	0,787
12	Метионин*	0,060	0,224
13	Лизин*	0,027	0,062
14	Изолейцин*	0,290	0,676
15	Лейцин*	0,086	0,194
16	Фенилаланин*	0,027	0,049
Суммарное содержание аминокислот, %		1,165	3,216
Суммарное содержание незаменимых аминокислот, %		0,507	2,144

Примечание: * – незаменимая аминокислота.
Note: * essential amino acid.

Таблица 1

Соотношение растворителей при градиентном элюировании

Table 1

The ratio of solvents in gradient elution

Время, мин	Буфер А, %	Буфер Б, %
0	97	3
16	96	4
25	90	10
35	80	20
40	80	20
50	70	30
51	0	100
54	100	0
60	100	0

Для более детального и количественного изучения аминокислотного состава ноотропного сбора проводили предколоночную дериватизацию и разделение аминокислот методом обращенно-фазовой хроматографии с применением флуориметрического детектора по методике WatersAccQTag. Для определения свободных аминокислот водное извлечение сбора и водные стандартные растворы аминокислот подвергли дериватизации реагентом ACCQ FLUOR. Затем перемешивали на вихревом миксере и инкубировали 10 мин при температуре 55°C. Готовые дериватизированные растворы вводили в хроматографическую систему.

Для определения связанных аминокислот водное извлечение подвергли гидролизу. Для этого образец выпаривали в чашке досуха, затем к сухому остатку добавляли 200 мкл 6М хлористоводородной кислоты и выдерживали пробу в термостате при температуре 105°C в течение 24 ч. К полученному остатку прибавляли 20 мл воды, снова выпаривали и добавляли 10 мл буферного раствора с рН 2,2. Полученные образцы подвергли дериватизации описанным способом.

Условия хроматографирования: колонка Acc Q Tag 150 × 3,9 мм; температура колонки – 37°C; скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин; время цикла – 60 мин; детектор флуоресцентный (длина волны возбуждения – 250 нм, длина волны эмиссии – 395 нм); объем пробы – 10 мкл; метод элюирования – градиентный. В качестве подвижных фаз были использованы Буфер А – натрия ацетат, триэтиламин, раствор ЭДТА, вода очищенная, Буфер Б – ацетонитрил – вода. (табл. 1).

Результаты и обсуждение

В процессе исследования в сборе ноотропного действия было установлено наличие аминокислот по реакции с нингидрином (красно-фиолетовое окрашивание раствора). При ТСХ-анализе было обнаружено 5 зон адсорбции красно-фиолетового цвета с значениями Rf 0,41; 0,52; 0,65; 0,73 и 0,84.

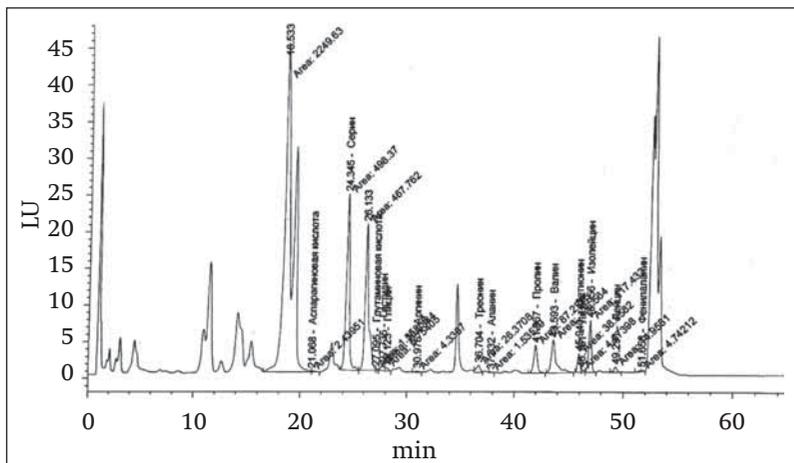


Рис. 1. Хроматограмма аминокислот ноотропного сбора
Fig. 1. Chromatogram of amino acids in the nootropic herbal tea

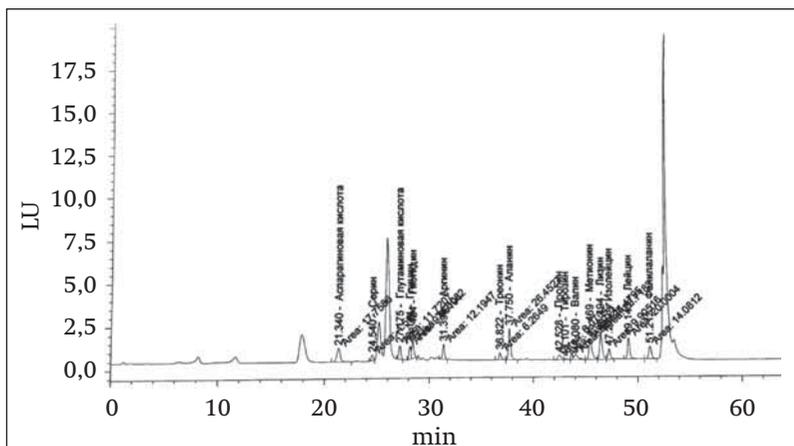


Рис. 2. Хроматограмма стандартных образцов аминокислот
Fig. 2. Chromatogram of standard samples of amino acids

В результате детального анализа аминокислот было установлено, что в сборе присутствует 16 аминокислот, из них 7 незаменимых. Тирозин присутствует только в связанном виде, а остальные 15 аминокислот – как в свободном, так и в связанном виде (табл. 2; рис. 1, 2). Суммарное содержание свободных аминокислот составило 1,165%, среди которых почти половину (0,507%) составляют незаменимые аминокислоты. Преобладающими аминокислотами являются пролин и незаменимая аминокислота изолейцин – соответственно 43 и 25% от общего содержания свободных аминокислот.

Количество связанных аминокислот составило 3,216%, из которых незаменимых 2,144%, что составляет почти $\frac{2}{3}$ от общего количества. Почти 70% связанных аминокислот представлены серином, валином и изолейцином и находятся в сборе примерно в одинаковом количестве.

Заключение

Изучен аминокислотный состав нового разрабатываемого сбора ноотропного действия. В ходе эксперимента обнаружено 16 аминокислот как в свободном, так и в связанном состоянии. Из них 7 являются незаменимыми (треонин, валин, метионин, лизин, изолейцин, лейцин, фенилаланин).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература

1. Всемирная организация здравоохранения, [Электронное издание]. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
2. Чистякова А.С., Гудкова А.А., Сорокина А.А., Сливкин А.И. Сравнительное изучение аминокислотного состава представителей рядов *Persicariaeformes* Kom. и *Lapathiiformes* Worosch. Химия растительного сырья. 2019; 4: 157–162. DOI: 10.14258/jcprm.2019044347
3. Жумагулова К.В. и др. Опыт применения незаменимых аминокислот в комплексной терапии пациентов с ишемическим инсультом в остром периоде. Международный неврологический журнал. 2016; 5 (83): 88–90. DOI: 10.22141/2224-0713.5.83.2016.78476
4. Левченкова О.С., Новиков В.Е. Антигипоксанта: возможные механизмы действия и клиническое применение. Вестник Смоленской государственной медицинской академии, 2011; 4: 43–57.
5. Дайронас Ж.В., Корочинский А.В., Зилфикаров И.Н., Микроскопия диагностических элементов листьев гинкго двулопастного и травы лабазника вязолистного в таблетках «Гинкготропил». Фармация и фармакология. 2016; 4, 1 (14): 36–45. DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-1(14)-36-45
6. Лысиков Ю.А. Аминокислоты в питании человека. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2012, лекции, 86–105.
7. Бубенчикова В.Н., Степнова И.В. Изучение азотсодержащих соединений горлоухи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.). Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, 2016; 11: 1133–5.

8. Бубенчиков Р.А. Аминокислотный и минеральный состав травы фиалки удивительной *Viola mirabilis* L. Вестник Воронежского государственного университета. Серия Химия. Биология. Фармация. 2006; 1: 186–8.

References

1. The World Health Organization [Electronic resource]. Access mode: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (in Russian)
2. Chistyakova A.C., Gudkova A.A., Sorokina A.A., Slivkin A.I. Comparative study of amino acid composition of representatives of series *Persicariaeformes* Kom. and *Lapathiiformes* Worosch. Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya, 2019; 4: 157–62. DOI: 10.14258/jcprm.2019044347 (in Russian)
3. Zhumahulova K.H. et al. The experience in the use of the essential amino acids for the combination treatment of patient with ischemic stroke in the acute period. Mezhdunarodnyy nevrologicheskiy zhurnal, 2016; 5 (83): 88–90. DOI: 10.22141/2224-0713.5.83.2016.78476 (in Russian)
4. Levchenkova O.S., Novikov V.E. Antihypoxants: possible mechanisms of action and their clinical uses? Vestnik Smolenskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii. 2011; 4: 43–57 (in Russian)
5. Daironas J.V., Korochinsky A.V., Zilfikarov I.N. Microscopical diagnostic elements of leaves of *Ginkgo biloba* L. and herbs of a *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. in the tablets «Ginkgotropil». Farmatsiya i farmakologiya. 2016; 4, 1 (14): 36–45. DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-1(14)-36-45. (in Russian)
6. Lysikov Yu.A. Amino acids in human nutrition. Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya. 2012, Lektsii, 86–105. (in Russian)
7. Bubenichikova V.N., Stepnova I.V. Investigation of nitrogen-containing compounds of *Picris hieracioides* L. Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy. 2016; 11: 1133–5 (in Russian)
8. Bubenchikov R.A., The amino acid and mineral composition of *Viola mirabilis* L. Vestnik VGU. Seriya Khimiya. Biologiya. Farmatsiya. 2006; 1: 186–8 (in Russian)

Поступила 28 октября 2019 г.

Received 28 October 2019

Принята к публикации 15 января 2020 г.

Accepted 15 January 2020