

**ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

© Коллектив авторов, 2016  
УДК 615.322:582.738].07  
DOI:10.23888/НМЖ2016472-76

**ИЗУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ТРАВЫ  
КОПЕЕЧНИКА КУСТАРНИКОВОГО (HEDYSARUM FRUTICOSUM PALL.)**

А.Н. КИСИЛЁВА, А.В. КРИКОВА, Е.Г. КОГАН

Смоленский государственный медицинский университет,  
ул. Крупской, 28, 214019, г. Смоленск, Российская Федерация

В статье представлены результаты комплексного определения аминокислот в траве копеечника кустарникового. Изучение аминокислотного состава включало в себя проведение качественного обнаружения методом тонкослойной хроматографии и количественное определение содержания аминокислот методом спектрофотометрии. В траве копеечника кустарникового выявлено наличие ряда аминокислот, а также установлено количественное содержание данной группы биологически активных веществ. Все используемые методы анализа прошли процесс валидации, так как относительная ошибка результатов опытов с добавками не превысила относительную ошибку единичного определения и имеет отклонения в сторону как положительных, так и отрицательных значений, это свидетельствует об отсутствии систематической ошибки в предлагаемой методике количественного анализа аминокислот.

*Ключевые слова:* копеечник кустарниковый, *Hedysarum fruticosum Pallas*, трава, тонкослойная хроматография (ТСХ), спектрофотометрия, аминокислоты, метрология.

**THE STUDY OF AMINO ACID COMPOSITION OF GRASS-SHRUB HEDYSARUM  
(HEDYSARUM FRUTICOSUM PALL.)**

A.N. KISILYOVA, A.V. KRIKOVA, E.G. KOGAN

Smolensk State Medical University,  
Krupskayastr., 28, 214019, Smolensk, Russian Federation

The article presents the results of a comprehensive determination of amino acids in the grass *Hedysarumfruticosum*. The study of amino acid composition consisted of conducting qualitative detection by thin-layer chromatography and quantitative determination of amino acids by the method of spectrophotometry. In the grass *Hedysarumfruticosum* revealed the presence of several amino acids as well as quantitative of the contents of this group of biologically active substances. All used methods of analysis passed the validation process, as the relative error of the results of the experiments with additives did not exceed the relative error of a single determination and has deviation to both positive and negative values; this indicates the absence of systematic errors in the proposed method for the quantitative analysis of amino acids.

**Keywords:** *Hedysarum fruticosum* Pallas, grass, thin-layer chromatography (TLC), spectrophotometry, amino acids, metrology.

Род Копеечник (*Hedysarum*) относится к семейству бобовых (Fabaceae). В пределах границ бывшего СССР род *Hedysarum* насчитывает свыше 100 видов, некоторые из которых используются как растительное сырье, обладающее фармакологической активностью и содержащее разные группы биологически активных соединений [6, 8, 10, 11]. Экстракт корней копеечника чайного (*H. theinum*) применяется при воспалении предстательной железы, острых и хронических нефрологических и неврологических заболеваниях [6]. Тонизирующее свойство данного растения обуславливаются высоким содержанием в корнях фенольных соединений. Из травы копеечника альпийского (*H. alpinum*) получен противовирусный препарат «Алпизарин», фармакологическая активность которого обусловлена наличием ксантона – мангиферина. Перспективным на наш взгляд является изучение копеечника кустарникового (*Hedysarum fruticosum* Pallas), целебные свойства которого подтверждает опыт тибетской медицины, где настои травы копеечника кустарникового на протяжении долгих лет применяли для нормализации обменных и воспалительных процессов [1, 2, 4].

Копеечник кустарниковый (*Hedysarum fruticosum* Pallas) – многолетний кустарник или полукустарник, деревенеющий иногда только у основания, высотой 30-120 см. Копеечник кустарниковый распространен на юге Средней и Восточной Сибири, а за пределами России – в Монголии и Китае, описан в районе р.Селенга (река в Монголии и России (Бурятия), крупнейший приток озера Байкал). Растет в песчаных степях и по окраинам сосновых лесов. Обычно встречается на подвижных песках и в этих условиях имеет различный габитус. При засыпании песком образует длинные корневища, а при выдувании песка и понижении уровня субстрата образует, искривленные ство-

лики и впоследствии нередко погибает. Растение декоративное своими яркими и крупными цветками. Может быть использовано для закрепления песков, но в культуре пока не встречается [9, 10].

Предварительный фитохимический скрининг извлечений из травы копеечника кустарникового показал наличие таких групп биологически-активных соединений как флавоноиды, дубильные вещества, аминокислоты, сапонины и др. Среди природных соединений определенный интерес вызывают аминокислоты как важнейшие элементы питания человека и регуляторы обмена веществ [3, 5].

Аминокислоты участвуют в биосинтезе специфических тканевых белков, ферментов, гормонов и других физиологически активных соединений [7, 12]. Аминокислоты являются продуктами первичного метаболизма, поэтому они входят в состав растений и в связи с этим переходят в водные извлечения и фитопрепараты [12].

#### **Цель исследования**

Обнаружение и количественное определение аминокислотного состава в траве копеечника кустарникового.

#### **Материалы и методы**

Объектом исследования служили надземные части копеечника кустарникового, собранные в июле 2014 г. на территории района Южный лагерь в окрестностях Улан-Удэ.

Исследование по составу свободных аминокислот проводилось методом ТСХ с применением в качестве неподвижной фазы хроматографических пластин Kieselgel, Merck размером 15x20 см, а в качестве подвижной фазы смеси растворителей: н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода в соотношении 40:40:20. Смесь растворителей помещали в стеклянную камеру для хроматографии, которую насыщали в течение 2 ч.

В качестве исследуемого раствора использовали водное извлечение из сухо-

го сырья. Сырьё измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм по (ГОСТ 214-83).

Около 5,00 г измельчённого сырья помещали в колбу вместимостью 250 мл, прибавляли по 70 мл воды дистиллированной, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 1 ч с момента закипания смеси в колбе. После охлаждения смесь фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу объёмом 100 мл и доводили водой очищенной до метки (исследуемый раствор).

В качестве растворов сравнения использовали 0,05% растворы рабочих стандартных образцов аминокислот: серин, пролин, фенилаланин, глицин, глутаминовая кислота. Для приготовления рабочих стандартных образцов около 0,05 г (точная навеска) соответствующих аминокислот помещали в мерные колбы объёмом 100 мл, прибавляли по 50 мл воды очищенной, перемешивали до растворения в ультразвуковой бане при температуре 50°C и доводили до метки тем же растворителем.

На линию старта хроматографической пластины наносили 50 мкл исследуемого раствора и по 5 мкл рабочих стандартных образцов аминокислот. Длина пробега растворителей 15 см. Хроматограмму высушивали при комнатной температуре в вытяжном шкафу до полного улетучивания растворителей и опрыскивали 0,2% раствором нингидрина в 95% спирте этиловом (1,0 г нингидрина, 2,5 г ацетата кадмия, 10 мл ледяной уксусной кислоты растворяют в 500 мл спирта этилового) и нагревали в сушильном шкафу при температуре 100-105 градусов в течение 5 мин.

Количественное определение суммы свободных аминокислот проводится после реакции с нингидрином и последующем спектрофотометрировании полученного окрашенного комплекса при длине волны около 570 нм. В ходе эксперимента нами была уточнена длина волны максимума поглощения окрашенного комплекса с нингидрином глутаминовой кислоты и водного извлечения из травы копеечника. Комплекс и раствор для исследования по-

лучали по нижеприведенной методике. Согласно полученным данным, комплекс глутаминовой кислоты и нингидрина имеет максимум поглощения при длине волны 568±2 нм, а комплекс водного извлечения с нингидрином имеет максимум поглощения при длине волны 568,5±2 нм. Поэтому в наших исследованиях мы использовали длину волны 568 нм.

Для исследования около 5,000 (точная навеска) растительного сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещали в колбу вместимостью 200 мл, прибавляли 100 мл воды дистиллированной и нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 ч. Охлаждали и извлечение фильтровали через обеззоленный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл; объем доводили до метки водой, перемешивали (исследуемый раствор А). 20 мл раствора А доводили до 100 мл водой (раствор Б). Около 0,0500 г (точная навеска) кислоты глутаминовой (ВФС 42-2722-96) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 20-30 мл воды и доводили раствор водой до метки (раствор стандартного образца).

1 мл исследуемого раствора Б помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл прибавляли 1 мл 0,25% раствора натрия карбоната. 2 мл спиртового раствора нингидрина и нагревали 10 минут на кипящей водяной бане. После охлаждения раствор доводили водой до метки. Параллельно в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 1 мл раствора РСО кислоты глутаминовой и далее поступали, как указано выше. Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре при длине волны 568 нм в кювете с толщиной слоя жидкости 10 мм относительно воды.

Содержание суммы аминокислот в пересчете на кислоту глутаминовую вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D_x \cdot 100 \cdot 100 \cdot 50 \cdot m_0 \cdot 1 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 20 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 50}, \text{ где}$$

$D_x$  и  $D_0$  – оптические плотности испытуемого и стандартного раствора;

$m$  и  $m_0$  – навески стандартного образца и сырья, г.

### Результаты и их обсуждение

Качественное обнаружение аминокислот методом ТСХ показало наличие 8 хроматографических зон адсорбции (рис. 1). На хроматограммах в исследуемых растворах после проявления 0,2% раствором нингидрина обнаружены окрашенные зоны

аминокислот с  $R_f$  около 0,47 (глутаминовая кислота),  $R_f$  около 0,43 (глицин),  $R_f$  около 0,38 (пролин) и  $R_f$  около 0,71 (фенилаланин). Кроме того, обнаружено 4 неидентифицированных соединения со значениями  $R_f$  около 0,55; 0,62; 0,67 и 0,75.

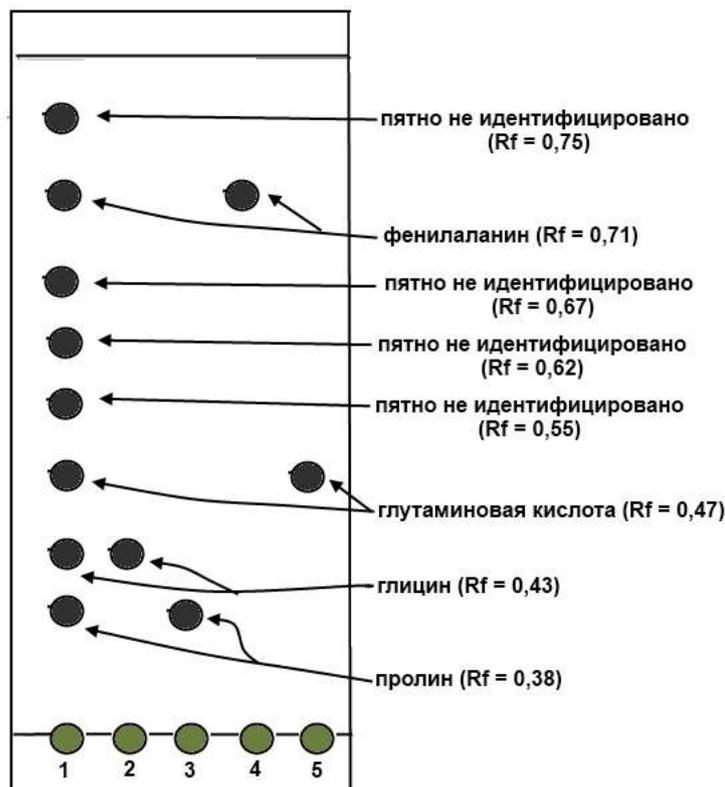


Рис. 1. Хроматограмма водного извлечения из травы копеечника кустарникового после обработки 0,2% раствором нингидрина

(1 – исследуемый раствор, 2 – стандартный раствор глицина, 3 – стандартный раствор пролина, 4 – стандартный раствор фенилаланина, 5 – стандартный раствор глутаминовой кислоты)

Спектрофотометрический метод количественного определения показал, что

содержание аминокислот в траве копеечника составляет не менее 3,14% (табл. 1).

Таблица 1

**Результаты спектрофотометрического определения содержания суммы аминокислот в пересчете на кислоту глутаминовую в траве копеечника кустарникового**

№ образца	Содержание аминокислот в траве, %
1	3,14
2	3,21
3	3,29
4	3,37
5	3,20
6	3,18

Таблица 2

**Метрологические характеристики количественного определения суммы аминокислот в сырье копеечника кустарникового**

n	f	P, %	t(P,f)	X <sub>ср.</sub> %	S <sup>2</sup>	S <sub>x</sub>	Δ X <sub>ср.</sub>	E <sub>ср.</sub> %
6	5	95	2,57	3,232	0,00702	0,0342	0,0879	2,72

Правильность аналитической методики количественного определения доказывается на всем диапазоне применения, то есть методика должна давать отсутствие систематической ошибки и близость результатов (табл. 2, 3). Проверка правильности исполнения методики заключается в отсутствии систематической ошибки измерений при добавке к испытуемому раствору известного количества стандарт-

ного образца кислоты глутаминовой.

Таким образом, относительная ошибка результатов опытов с добавками не превышает относительную ошибку единичного определения и имеет отклонения в сторону как положительных, так и отрицательных значений, что свидетельствуют об отсутствии систематической ошибки в предлагаемой методике анализа (рис. 2).

Таблица 3

**Определение правильности выполнения методики спектрофотометрического определения суммы аминокислот**

Взято в траве, г	Добавлено СО, г	Должно быть, г	Найдено, г	Ошибка	
				Абсолютная, г	Относительная, %
3,23	0,8075	4,0375	4,0370	- 0,0005	- 0,012
3,23	1,615	4,845	4,851	+ 0,0060	+ 0,124
3,23	2,4225	5,6525	5,6500	- 0,0025	- 0,044
3,23	3,23	6,46	6,49	+ 0,030	+ 0,46

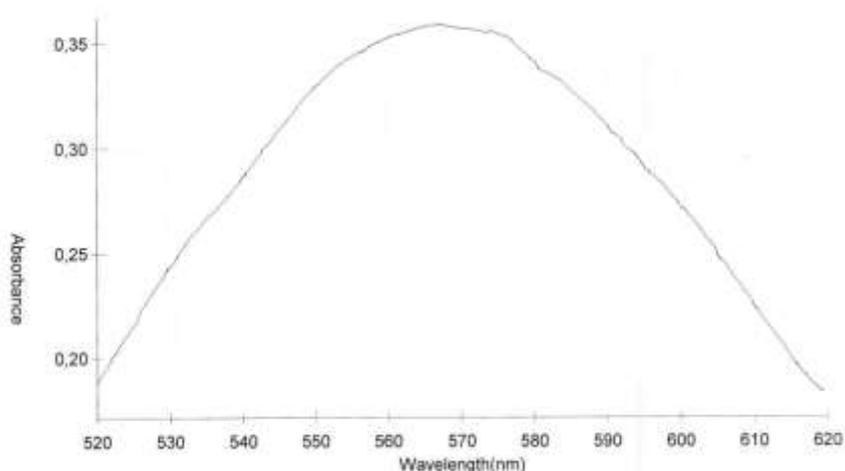


Рис. 2. Спектр поглощения комплекса аминокислот с нингидрином в извлечении из травы копеечника кустарникового

### Выводы

1. Методом тонкослойной хроматографии с использованием образцов сравнения в водных извлечениях травы копеечника кустарникового установлено наличие свободных аминокислот (глутаминовая кислота, глицин, пролин, фенилаланин).

### Литература

1. Асеева Т.А., Блинова К.Ф., Яковлев Г.П. Лекарственные растения тибетской медицины. Новосибирск, 1985. 154 с.
2. Бадмаев П.А. Основы врачебной науки Тибета. Жуд-Ши. М.: Наука, 1991. 256 с.
3. Гараева С.Н., Редкозубова Г.В., Постолати Г.В. Аминокислоты в живом организме. Кишинев: ASM, 2009. 552 с.
4. Коган Е.Г., Кисилёва А.Н., Елагина Е.М. Анатомическое изучение листьев копеечника кустарникового // Фармация. 2016. №4. С. 19-22.
5. Коган Е.Г., Кисилёва А.Н., Елагина Е.М. Сравнительный анализ анатомо-диагностических признаков листа копеечника кустарникового (*Hedysarum fruticosum* Pall.) и копеечника альпийского (*Hedysarum alpinum* L.) // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2016. №1. С. 88-93.
6. Минаева В.Г. Лекарственные растения Сибири. Новосибирск: Наука, 1991. С. 273-274.
7. Пилат Т.Л., Иванов А.А. Биологически активные добавки к пище (теория, производство, применение). М.: Аввалон, 2002. 710 с.
8. Попова И.А., Плаксина Т.И., Куркин В.А. и др. Рациональное использование видов рода *Hedysarum* L., произрастающих в Самарской области // Биологические ресурсы: флора. 2012. Т. 20, № 5. С. 2279-2281.
9. Попова И.А., Плаксина Т.И., Рыжов В.М. и др. Новое в диагностике краснокнижных видов растений рода *Hedysarum* // Modern Phytomorphology. 2013. №3. Р. 207-211.

2. В траве копеечника кустарникового установлено содержание 3,232% суммы аминокислот в пересчете на глутаминовую кислоту.

3. Полученные данные могут быть использованы при разработке нормативной документации на новый вид лекарственного растительного сырья «Копеечника кустарникового трава».

*Конфликт интересов отсутствует.*

10. Федченко Б.А. Копеечник – *Hedysarum* // Флора СССР / Ботанич. ин-т им. В.Л. Комарова Ак. наук СССР; гл. ред. акад. В.Л. Комаров; Ред. тома Б.К. Шишкин и Е.Г. Бобров. М.-Л.: Изд-во Академии наук СССР, 1948. Т. XIII. С. 259-319.

11. Флора Сибири Fabaceae (Leguminosae) / под ред. А.В. Положия, Л.И. Малышевой. Новосибирск: Наука, 1994. Т. 9. 280 с.

12. Davies J.S. Aminoacids, peptides and proteins. Cambiidge: The Royal Society of Chemistry; 2006. 472 p.

### References

1. Aseeva TA, Blinova KF, Jakovlev GP. *Lekarstvennye rastenija tibetskoj mediciny [Medicinal plants of Tibetan medicine]*. Novosibirsk; 1985. 154 p. (in Russian)
2. Badmaev PA. *Osnovy vrachebnoj nauki Tibeta. Zhud-Shi [Foundations of medical science of Tibet. Zhud-Shi]*. Moscow: Nauka; 1991. 256 p. (in Russian)
3. Garaeva SN, Redkozubova GV, Postolati GV. *Aminokisloty v zhivom organizme [Amino acids in living organism]*. Chisinau: ASM; 2009. 552 p. (in Russian)
4. Kogan EG, Kisiljova AN, Elagina EM. Anatomicheskoe izuchenie list'ev kopееchnika kustarnikovogo [*Anatomical study of the leaves of Hedysarum fruticosum*]. Farmacija. 2016; 4:19-22. (in Russian)
5. Kogan EG, Kisiljova AN, Elagina EM. Sravnitel'nyj analiz anatomo-diagnosticheskikh priznakov lista kopееchnika kustarnikovogo (*Hedysarum fruticosum* Pall.) i kopееchnika al'pijskogo (*Hedysarum alpinum* L.) [*Comparative anatomical study of the leaves of Hedysarum fruticosum Pall. and*

*Hedysarum alpinum* L.]. Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj medicinskoj akademii. 2016; 1:88-93. (in Russian)

6. Minaeva VG. *Lekarstvennyye rastenija Sibiri* [Medicinal plants of Siberia]. Novosibirsk: Nauka; 1991. P. 273-274. (in Russian)

7. Pilat TL, Ivanov AA. *Biologicheski aktivnye dobavki k pishhe (teorija, proizvodstvo, primenenie)* [Biologically active food supplements (theory, production, use)]. Moscow: Avvalon; 2002. 710 p. (in Russian)

8. Popova IA, Plaksina TI, Kurkin VA, idr. Racional'noe ispol'zovanie vidov roda *Hedysarum* L., proizrastajushhix v Samarskoj oblasti [Rational use of species of the genus *Hedysarum* L., grown in the Samara region]. Biologicheskie resursy: flora. 2012; V. 20; 5:2279-81. (in Russian)

9. Popova IA, Plaksina TI, Ryzhov VM, idr. Novoe v diagnostike krasnokniznyh vidov rastenij roda *Hedysarum* [New developments in diagnosis species of the genus *Hedysarum*] Modern Phytomorphology. 2013; 3:207-11. (in Russian)

10. Fedchenko BA. *Kopeechnik – Hedysarum* [*Hedysarum*] // Flora SSSR / Botanich. in-t im. VL. Komarova Ak. nauk SSSR; gl. red. akad. VL Komarov; red. toma BK Shishkini EG Bobrov. M.-L.: Izd-vo Akademii nauk SSSR; 1948. V. 13. P. 259-319. (in Russian)

11. *Flora Sibiri Fabaceae (Leguminosae)* [Flora Of Siberia Fabaceae (Leguminosae)] / pod red. AV. Polozhija, LI. Malyshevoj. Novosibirsk: Nauka; 1994. V. 9. 280 p. (in Russian)

12. Davies J.S. Aminoacids, peptides and proteins. Cambiidge: The Royal Society of Chemistry; 2006. 472 p.

---

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кисилёва А.Н. – к.фарм.н., доц., зав. кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии с курсом фармации ДПО ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России.

E-mail: a.kisilyova@mail.ru

Крикова А.В. – д.фарм.н., доц., зав. кафедрой управления и экономики фармации ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России.

E-mail: anna.krikova@mail.ru

Коган Е.Г. – аспирант кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии с курсом фармации ДПО ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России.

E-mail: e.g.kogan@yandex.ru