

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ТРАВЕ ХВОЩА ПОЛЕВОГО И ТРАВЕ ХВОЩА БОЛОТНОГО

Ярыгина Т. И., Печерская Л. Г., Решетникова М. Д., Кляшева О. Н.

*ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пермь, Россия (614990, Пермь, ул. Полевая, 2) e-mail: perm@pfa.ru*

Разработана высокочувствительная, специфичная спектрофотометрическая методика количественного определения суммы свободных аминокислот в траве хвоща полевого и хвоща болотного. Для получения окрашенного продукта в качестве цветореагента использован нингидрин. Спектры продуктов реакции характеризуется двумя максимумами поглощения при длинах волн  $400 \pm 2$  нм и  $568 \pm 4$  нм. В качестве аналитической выбрана селективная длина волны 568 нм. Максимальная оптическая плотность поглощения продуктов реакции (в интервале 5,8-7,2) достигается при pH 6,4. Раствор продукта реакции (в присутствии аскорбиновой кислоты) подчиняется основному закону светопоглощения в интервале концентраций 0,5–5,0 мкг/мл (в пересчёте на сумму аминокислот сырья). Оптимальными условиями извлечения суммы аминокислот из травы хвоща полевого и хвоща болотного являются: экстрагент – вода; размер частиц сырья – 1 мм; соотношение сырьё : экстрагент – 1 г : 50–100 мл; однократная экстракция в течение 30 мин. Содержание суммы свободных аминокислот в пересчете на глутаминовую кислоту в образцах травы хвоща полевого составляет от 0,42 до 1 %; в образцах травы хвоща болотного - 1,51–4,05 %. Полученные результаты могут быть использованы для доказательства отсутствия примеси хвоща болотного в официальном сырье и разработки объективного показателя оценки качества травы хвоща полевого.

Ключевые слова: стандартизация лекарственного растительного сырья, хвощ полевой, хвощ болотный, аминокислоты, нингидрин, спектрофотометрия.

## DEVELOPMENT OF METHODIC OF DETERMINATION OF SUM OF FREE AMINO ACIDS IN HERBAE EQUISETI ARVENSIS AND HERBAE EQUISETI PALUSTRE

Yarygina T. I., Pecherskaya L. G., Reschetnikova M. D., Klyasheva O. N.

*«The Perm state pharmaceutical academy» Ministry of Health of Russian Federation, Perm, Russia (614990, Perm, Polevay st., 2) e-mail: perm@pfa.ru*

Developed a highly sensitive, specific spectrophotometric method for the quantitative determination of the amount of free amino acids in the herbae Equiseti Arvensis and Equiseti Palustre. To obtain a dyed product as color reagent used ninhydrin. Spectra of the reaction products characterized by two absorption maxima at wavelengths of  $400 \pm 2$  nm and  $568 \pm 4$  nm. As an analysis of the selected selective wavelength of 568 nm. The maximum optical density of the absorption of the reaction products (in the range of 5.8 to 7.2) is achieved at a pH of 6.4. A solution of the product of the reaction (in the presence of ascorbic acid) is subordinate to the basic law of light absorption in a concentration range of 0.5 to 5.0  $\mu\text{g/ml}$  (in terms of the amount of amino acids of raw materials). The optimal conditions of extraction of the amount of amino acids from herbae Equiseti Arvensis and Equiseti Palustre are: extractant – water; the particle size of the raw material is 1 mm; the ratio of raw material : extractant is 1 g : 50 to 100 ml; single extraction for 30 min. The content of total free amino acids in conversion to glutamic acid in the samples herbae Equiseti Arvensis is of 0.42 to 1%; in the samples of herbae Equiseti Palustre - 1.51 – 4.05%. The results can be used to prove the absence of impurities herbae Equiseti Palustre in officinal raw materials and the development of an objective measure to assess the quality of the herbae Equiseti Arvensis.

Keywords: standartisation medicinal plant raw material, herba Equiseti Arvensis, herba Equiseti Palustre, amino asids, ningidrin, spectrophotometry.

Актуальной проблемой фармации является разработка и совершенствование методик анализа действующих веществ, входящих в лекарственное растительное сырьё (ЛРС), позволяющих достоверно идентифицировать и определять его качество.

Хвощ полевой *Equisetum arvense* L. широко применяется в медицинской практике России и многих зарубежных стран. Трава хвоща полевого используется в виде настоя в

качестве диуретического, кровоостанавливающего средства; оказывает противовоспалительное, антибактериальное, антигрибковое и гепатопротекторное действие [5].

Трава хвоща полевого содержит различные группы биологически активных веществ (БАВ): фенольные соединения, соединения кремния, тритерпеновые соединения, полисахариды, аминокислоты и др. [5]. Количественное содержание БАВ в указанном сырье согласно ФС 50 ГФ XI, вып. 2 не регламентируется, а по ФС 42-0209-07 впервые введен показатель – содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин [2, 5].

Аминокислоты вносят существенный вклад в фармакологическое действие отечественных и зарубежных лекарственных растительных препаратов, поэтому актуальным является нормирование их содержания в траве и препаратах хвоща полевого.

В последние годы участились случаи фальсификации ЛРС и сбора растений, не разрешённых к использованию Государственным Реестром лекарственных средств.

Особые трудности возникают при идентификации измельчённого сырья растений, к которым возможны примеси близких в морфологическом, а иногда и в анатомическом отношении, видов растений. К таким растениям относится хвощ болотный, являющийся трудноотличимой примесью к хвощу полевому. Кроме сходства во внешних признаках, они имеют совмещённые ареалы и местообитание, всё это увеличивает вероятность заготовки неофициального вида [4].

Для изучения аминокислотного состава растений используют аминокислотные анализаторы, позволяющие определить содержание каждой аминокислоты в исследуемом объекте. Однако для целей стандартизации ЛРС достаточно нормировать сумму аминокислот, так как аминокислотный состав растений не постоянен [7].

Цель исследования – разработка высокочувствительной, специфичной, простой в исполнении спектрофотометрической методики количественного определения суммы свободных аминокислот для стандартизации травы хвоща полевого и изучение возможности использования ее для определения наличия примеси хвоща болотного.

В качестве цветореагента для получения окрашенного продукта использован нингидрин.

### **Материалы и методы исследования**

Объекты исследования – 9 образцов травы хвоща полевого индивидуального сбора, заготовленных в период с 2008 по 2011 г. на территории Пермского края, Свердловской области, республики Башкортостан, Ханты – Мансийского автономного округа; 4 образца промышленных серий ЛРС; 4 образца травы хвоща болотного разных районов заготовки на территории Пермского края.

Для разделения и идентификации аминокислот использовали метод восходящей хроматографии на бумаге марки «С» (фабрика № 2 им. Володарского, г. Санкт-Петербург). Система растворителей: бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2). Для проявления аминокислот хроматограммы обрабатывали 0,2 %-ым спиртовым раствором нингидрина и выдерживали в течение 5 мин. в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С.

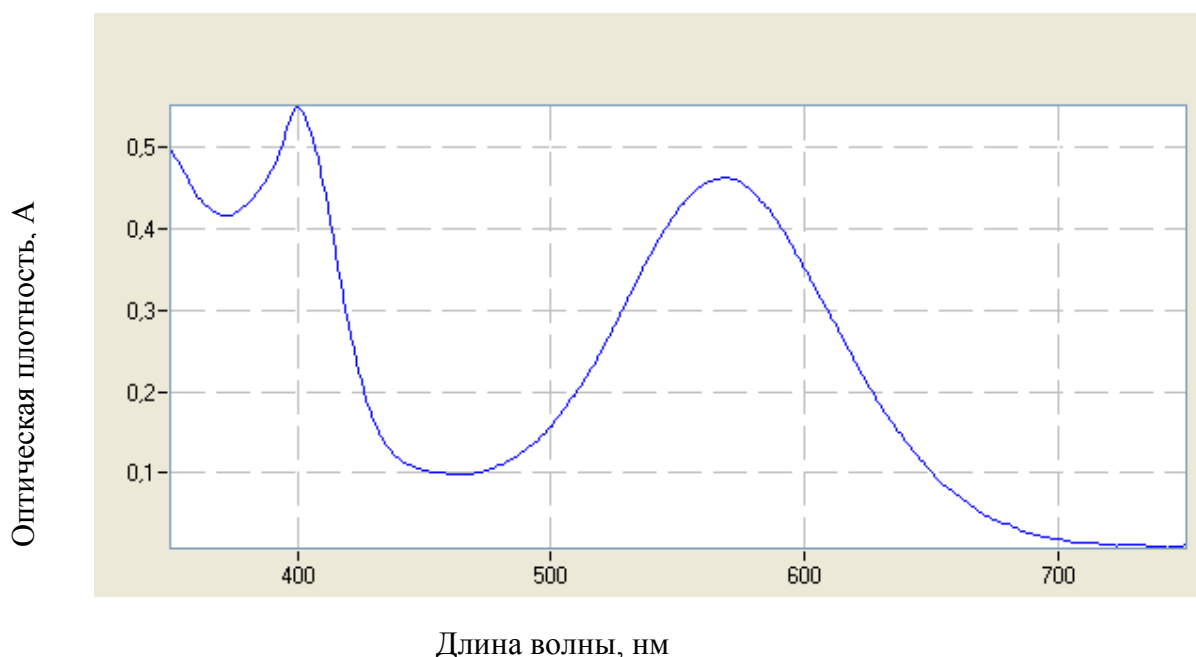
Количественное определение аминокислот проводили с помощью спектрофотометра СФ-2000.

На хроматограммы наносили спиртовые извлечения из травы хвоща полевого, травы хвоща болотного и растворы стандартных образцов 10 аминокислот. Установлено, что в исследуемых образцах содержится ряд аминокислот, преимущественно глутаминовая кислота, аргинин, валин, фенилаланин.

Снимали спектры поглощения продукта реакции аминокислот, содержащихся в водных извлечениях из травы хвоща полевого и хвоща болотного. Реагент – 1 % спиртовый раствор нингидрина; реакция проводилась в среде фосфатного буферного раствора с рН 6,4 при нагревании на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Измеряли оптическую плотность полученных растворов в кювете с толщиной слоя 1 см в интервале длин волн от 380 до 750 нм. В качестве раствора сравнения использовали контрольный опыт.

#### **Результаты исследований и их обсуждение**

Полученные спектры идентичны, характеризуются двумя четко выраженными максимумами поглощения при длинах волн  $400 \pm 2$  нм и  $568 \pm 4$  нм и одним минимумом, лежащим в области 465–475 нм (рис. 1). Для дальнейших исследований в качестве аналитической выбрали селективную длину волны 568 нм, при которой отсутствует собственное поглощение других компонентов растений (флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты). Изучение влияния величины рН реакционной среды на интенсивность поглощения продукта реакции (в интервале 5,8–7,2) показало, что максимальная оптическая плотность достигается при рН 6,4.



*Рис. 1. Спектр поглощения продукта реакции аминокислот травы хвоща полевого с нингидрином при рН 6,4*

Известно, что восстанавливающие вещества (небольшие количества олова хлорида, титана хлорида, гидразина сульфата, аскорбиновой кислоты) повышают чувствительность реакции аминов с нингидрином [3, 6, 7]. При разработке методики определения аминокислот в траве хвоща полевого и хвоща болотного в качестве восстановителя выбрали аскорбиновую кислоту, являющуюся наиболее доступным и нетоксичным реагентом. Результаты опытов показали, что введение в реакцию смесь аскорбиновой кислоты не влияет на положение максимумов поглощения; интенсивность поглощения увеличивается в 1,2 раза. Растворы продукта реакции аминокислот травы хвоща полевого и хвоща болотного с нингидрином подчиняются основному закону светопоглощения в интервале концентраций 0,5–5,0 мкг/мл (в пересчёте на сумму аминокислот сырья); коэффициент корреляции калибровочных графиков приближается к единице.

Экстрагирование лекарственного растительного сырья является сложным процессом, на который оказывают влияние различные факторы. Установлено, что оптимальными условиями извлечения суммы аминокислот из травы хвоща полевого и хвоща болотного являются: экстрагент – вода; размер частиц сырья – 1 мм; соотношение сырьё: экстрагент – 1 г: 50 – 100 мл; однократная экстракция в течение 30 мин.

Проведенными нами ранее исследованиями [7] в качестве унифицированного стандартного образца в расчетах содержания суммы свободных аминокислот в растительном сырье рекомендована субстанция глутаминовой кислоты, так как она, как правило, преобладает в аминокислотном составе растений (около 15 %) и является доступным, легко стандартизируемым соединением [1].

Максимумы поглощения продукта реакции глутаминовой кислоты с нингидрином находятся в области  $401 \pm 1$  нм;  $568 \pm 3$  нм; наибольшая интенсивность поглощения наблюдается при рН 6,2–6,8. Линейная зависимость оптической плотности окрашенного продукта реакции от концентрации глутаминовой кислоты (в присутствии аскорбиновой кислоты) наблюдается в интервале концентраций глутаминовой кислоты 1–8 мкг/мл. Предел обнаружения глутаминовой кислоты составляет 0,195 мкг/мл [7].

Для продуктов реакции комплекса аминокислот травы хвоща полевого и хвоща болотного с нингидрином нами получены аналогичные характеристики. Таким образом, глутаминовую кислоту можно использовать в качестве рабочего стандартного образца (РСО) при расчете содержания суммы аминокислот в исследуемом растительном сырье.

Для метрологической характеристики методики определения суммы свободных аминокислот готовили по 5 извлечений из травы хвоща полевого образца № 4 и из травы хвоща болотного образца № 2. Полученные извлечения исследовали по разработанной методике. Для каждого извлечения проводили по два параллельных определения; в расчетах учитывали среднее значение оптической плотности (табл. 1 и 2).

Метрологические характеристики свидетельствуют о хорошей повторяемости (сходимости) результатов.

**Таблица 1**

Метрологическая характеристика методики определения суммы свободных аминокислот в траве хвоща полевого

а, г	A	A <sub>0</sub>	а <sub>0</sub> , г	W, %	X, %	Метрологическая характеристика
1,9998	0,4764	0,5909	0,04625	9,3	0,51	$\bar{X} = 0,4730$ $\Delta X = 0,00995$ $S^2 = 0,0000128$ $\Delta \bar{X} = 0,00445$ $S = 0,00358$ $\varepsilon = 2,10\%$ $S_{\bar{X}} = 0,00160$ $\bar{\varepsilon} = 0,94\%$ $t(P,f) = 2,78$ $P = 95\%$
2,0000	0,4683				0,51	
1,9995	0,4727				0,51	
1,9990	0,4767				0,51	
1,9985	0,4711				0,47	

*Примечание.* A – оптическая плотность испытуемого раствора; A<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора РСО глутаминовой кислоты; а – навеска сырья, г; а<sub>0</sub> – навеска РСО глутаминовой кислоты, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

**Таблица 2**

Метрологическая характеристика методики количественного определения суммы свободных аминокислот в траве хвоща болотного

a, г	A	A <sub>0</sub>	a <sub>0</sub> , г	W, %	X, %	Метрологическая характеристика
0,5000	0,3355	0,5621	0,04625	9,43	3,05	$\bar{X} = 3,08$ $\Delta X = 0,1059$
0,4985	0,3399				3,10	$S^2 = 0,00145$ $\Delta \bar{X} = 0,04726$
0,4943	0,3414				3,14	$S = 0,03808$ $\varepsilon = 3,44\%$
0,4973	0,3371				3,08	$S_{\bar{X}} = 0,017$ $\varepsilon = 1,53\%$
0,4996	0,3350				3,05	$t(P,f) = 2,78$ $P = 95\%$

Правильность разработанной методики (отсутствие систематической ошибки) доказана методом добавок, в котором в качестве «добавки» использовали глутаминовую кислоту. Полученные результаты свидетельствуют о правильности методики (в реакцию вступают аминокислоты, содержащиеся в растительном сырье).

Содержание суммы свободных аминокислот в пересчете на глутаминовую кислоту в образцах травы хвоща полевого и травы хвоща болотного представлены в табл. 3–5.

**Таблица 3**

Содержание суммы свободных аминокислот в траве хвоща полевого индивидуальной заготовки

№ образца	Место сбора и дата заготовки	$X \pm \Delta \bar{X}$ , %
1	Свердловская обл., г. Сухой Лог, 27.07.2008	0,50±0,01
2	Ханты – Мансийский Автономный Округ, 07.08.2008	0,98±0,03
3	Пермский край, Чердынский р-н, 05. 08.2008	0,42±0,01
4	Пермский край, Краснокамский р-н, 12.07.2009	0,54±0,07
5	Пермский край, п. Кукуштан, 12.07.2009	0,44±0,06
6	Пермский край, Куединский р-н, 21.08.2009	0,88±0,06
7	Пермский край, окрестности г. Перми, 18.08.2010	0,50±0,02
8	р. Башкортостан, г. Нефтекамск, 06.07.2011	0,58±0,04
9	Пермский край, окрестности г. Перми, 12.07.2011	0,44±0,02

**Таблица 4**

Содержание суммы свободных аминокислот в траве хвоща полевого промышленных серий

№ образца	Серия	Производитель	$X \pm \Delta \bar{X}$ , %
1	010610	Ст-Медифарм	0,98 ± 0,03
2	080811	ОАО «Красногорслексредства»	0,77±0,04
3	010212	ЗАО «Здоровье»	0,49±0,02
4	020212	ОАО«Красногорслексредства»	0,89±0,04

**Таблица 5**

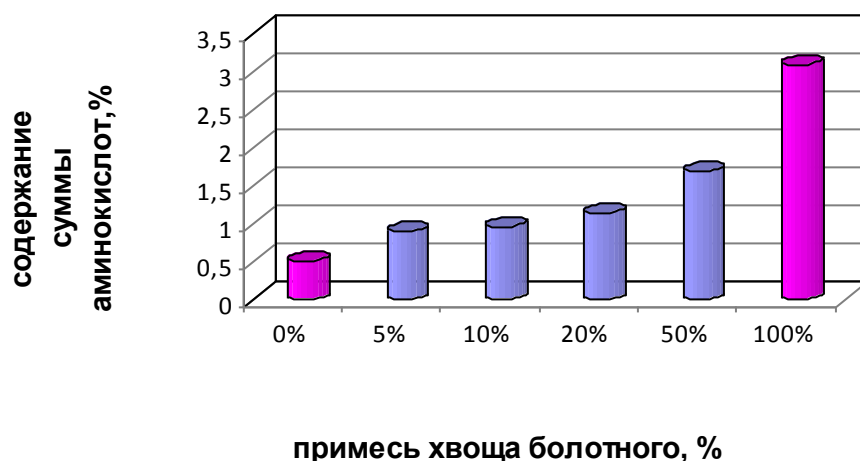
Содержание суммы свободных аминокислот в траве хвоща болотного

№ образца	Место сбора и дата заготовки	$X \pm \Delta \bar{X}$ , %
1	Пермский край, окрестности г. Пермь, 16.07.2008	1,51 ± 0,01

2	Пермский край, окрестности г. Пермь, 30.06.2009	$3,08 \pm 0,005$
3	Пермский край, окрестности г. Пермь, 04.07.2009	$3,90 \pm 0,04$
4	Пермский край, Краснокамский район, 18.07.2009	$4,05 \pm 0,01$

Содержание суммы свободных аминокислот в пересчете на глутаминовую кислоту в образцах травы хвоща полевого составляет от 0,42 до 1 %; в образцах травы хвоща болотного - 1,51–4,05 %.

Для установления возможности доказательства наличия примеси хвоща болотного в ЛРС – «Трава хвоща полевого» по содержанию суммы свободных аминокислот готовили модельные смеси травы хвоща полевого с содержанием в них примеси хвоща болотного 5, 10, 20, 50 %. Исследование проводили по разработанной методике. Зависимость содержания суммы аминокислот от процента примеси хвоща болотного в траве хвоща полевого представлена на рис. 2.



*Рис. 2. Зависимость содержания суммы свободных аминокислот в траве хвоща полевого от процента примеси хвоща болотного*

Установлено, что при увеличении процента примеси хвоща болотного в навеске, увеличивается и содержание аминокислот, в связи с более высоким содержанием аминокислот в траве хвоща болотного. Таким образом, полученные нами результаты могут быть использованы для доказательства отсутствия примеси хвоща болотного в официальном сырье и разработки объективного показателя оценки качества травы хвоща полевого.

### **Выводы**

1. Разработана методика спектрофотометрического определения суммы свободных аминокислот в пересчете на глутаминовую кислоту в траве хвоща полевого и траве хвоща болотного на основе реакции с нингидрином. Относительная ошибка отдельного определения составляет  $\pm 2,10\%$  и  $\pm 1,53\%$  соответственно.

2. Определено содержание суммы свободных аминокислот в образцах травы хвоща полевого и травы хвоща болотного разных районов произрастания и разных сроков заготовки. Содержание аминокислот в образцах травы хвоща полевого колеблется в пределах от 0,42 до 0,99 %; в образцах травы хвоща болотного – от 1,51 до 4,05 %.

3. Установлено, что при увеличении процента примеси хвоща болотного в траве хвоща полевого увеличивается и содержание суммы свободных аминокислот, что может быть использовано для доказательства отсутствия примеси хвоща болотного в официальном сырье – траве хвоща полевого.

### Список литературы

1. Глутаминовая кислота (ФС 42-0229-07) Государственная Фармакопея РФ / М-во Здравоохранения Рос. Федерации. – 12-е изд., репринт. – Изд-во «Научный центр экспертиз средств медицинского применения», 2008. – Ч.1 – 704 с.: ил.
2. Государственная фармакопея XI СССР. – М., 1998. – С. 318-320.
3. Кляшева О. Н. Использование реакции с нингидрином в количественном определении алифатических аминов / О. Н. Кляшева, Т. И. Ярыгина, С. М. Басс и др. // Современные проблемы науки и образования – 2013. – № 3; URL: <http://www.science-education.ru/109-9160> (дата обращения: 15.05.2013).
4. Коломиец Н. Э. Проблема фальсификации сырья хвоща полевого / Н.Э. Коломиец, Г.И.Калинкина // Фармация. – 2006. – № 2. – С. 37-42.
5. Коломиец Н. Э. Фармакогностическое исследование рода Equisetum L. Флоры Сибири как источника лекарственных средств: Автореф. дис. ... д-ра фарм. наук / Н. Э. Коломиец. – М., 2010 – С. 16.
6. Ярыгина Т. И. Способ количественного определения алифатических аминокислот / Т. И. Ярыгина, А. В. Захаров, В. А. Дубовик // Патент № 2167410, Россия, заявл. 03.08.1999. – Перм. Гос. Фармац. акад. – № 99116880; опубл. 20.05.01; приор. 03.08.1999. – 3 с.
7. Ярыгина Т. И. Разработка унифицированной методики количественного определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах / Т. И. Ярыгина, Г. И. Олешко, Е. В. Зорина, М. Д. Решетникова // Фармация. – 2011. – Т. 60. – № 3. – С. 14-17.

### Рецензенты:

Коркодинова Л. М., д.ф.н., профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии ФОО ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь;



Вихарева Е. В., д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой аналитической химии ГБОУ  
ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь.