

УДК 615:633.877.3

ИССЛЕДОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ПЫЛЬЦЫ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PINUS SYLVESTRIS* L.), ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ РСО-АЛАНИЯ

^{1,2}Бидарова Ф.Н., ¹Сидакова Т.М., ¹Кисиева М.Т.¹ФГБОУ ВО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России, Владикавказ, e-mail: pharm-sogma@mail.ru;²ООО «МедФармКонсалтинг и Экспертиза», Владикавказ, e-mail: apteka-83@yandex.ru

В статье представлены результаты исследования аминокислотного состава пыльцы сосны обыкновенной, произрастающей на территории РСО-Алания. Установлено содержание суммы аминокислот исследуемого сырья в объеме 12,14%. Проведено качественное и количественное изучение аминокислотного состава пыльцы сосны обыкновенной и установлено наличие 16 аминокислот, 9 из которых относятся к незаменимым. Расчеты площади пиков испытуемого и стандартного растворов, концентрации каждой аминокислоты в процентном соотношении проведены на основании аминogramмы пыльцы сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), выданной прибором – ААА 40. В результате проведенных исследований получены сведения об аминокислотном составе и их количественном содержании в пыльце сосны обыкновенной, которые могут быть использованы при разработке нормативной документации на лекарственное средство из этого вида сырья.

Ключевые слова: аминокислоты, аминокислотный состав, хроматография, пыльца сосны обыкновенной

THE AMINO ACID COMPOSITION OF PINE POLLEN (*PINUS SYLVESTRIS* L.), GROWING ON THE TERRITORY OF RNO-ALANIA

^{1,2}Bidarova F.N., ¹Sidakova T.M., ¹Kisieva M.T.¹North-Osetian State Medical Academy the Republic of North Ossetia – Alania, Vladikavkaz, e-mail: pharm-sogma@mail.ru;²ООО «MedFarmConsulting and Expertise», Vladikavkaz, e-mail: apteka-83@yandex.ru

The content of the sum of amino acids of the investigated raw materials in the volume of 12.14% is established. A qualitative and quantitative study of the amino acid composition of pine pollen (*pinus sylvestris* L.) has been carried out and the presence of 16 amino acids, 9 of which are irreplaceable, has been established. Calculations of the peak area of the test and standard solutions, the concentration of each amino acid as a percentage was carried out on the basis of the aminogram of pine pollen (*pinus sylvestris* L.) obtained from the device – ААА 40. The results of these studies expand on the existing information about the amino acid composition and quantitative content in the pollen pine, and can be used in the development of methods of pharmaceutical quality obtained from this raw material.

Keywords: amino acids, structure of aminoacids, chromatography, pollen pine

Исследования лекарственных растений, применяемых в народной медицине, представляют практический интерес для современной фармации во всем мире. Наличие в растительном сырье различных химических веществ, проявляющих в организме животного и человека биологическую активность, обуславливают его лечебное действие.

Установление фармакологической активности таких растений для применения в медицинской практике предваряет целый комплекс исследований.

Изучение фармакологических свойств и химического состава растительного сырья способствует также созданию новых современных высокоэффективных лекарственных средств. Опыт использования пыльцы сосны обыкновенной в народной медицине доказывает относительную безопасность, отсутствие противопоказаний и побочных эффектов, наравне с уникальным оздоровлением организма и излечением многих

заболеваний. С другой стороны, в России отсутствуют данные исследований состава биологически активных веществ пыльцы сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.).

В рамках выполнения государственного задания, комплексной темы кафедры фармации Северо-Осетинской медицинской академии за период 2013–2017 гг. были проведены следующие исследования пыльцы сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.):

- макро- и микроскопическое изучение;
- определение товароведческих показателей;
- изучение элементного состава пыльцы сосны обыкновенной;
- определение острой и хронической токсичности;
- количественное определение флавоноидов;
- изучение кислоты аскорбиновой.

Аминокислоты как основные составные части белков, наряду с нуклеиновыми кис-

лотами, углеводами и липидами, участвуют во всех жизненных процессах. Однако, в отличие от растений, организм человека в основном не способен синтезировать такие незаменимые аминокислоты, дефицит которых возможно восполнять как растительной пищей, так и лечебными препаратами из растительного сырья.

Данные исследования по изучению качественного и количественного состава аминокислот в лекарственном растительном сырье вызывают научный интерес и имеют практическое значение [1–4].

Цель исследования – изучение аминокислотного состава пыльцы сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), произрастающей на территории РСО-Алания, современными физико-химическими методами.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования послужила пыльца сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), произрастающей на территории РСО-Алания, заготовленная в мае 2016 г. в период цветения. Заготавливали только мужские нераскрытые соцветия с пыльцой (пыльнички), расположенные в основании молодых побегов.

Качественное определение аминокислот в пыльце сосны обыкновенной проводилось на базе лаборатории фармацевтического и токсикологического анализа кафедры фармации СОГМА в 2016 г. С целью качественного определения аминокислот в пыльце сосны обыкновенной были использованы различные реакции идентификации аминокислот [1].

Количественное определение аминокислотного состава пыльцы сосны обыкновенной проводили на аминокислотном анализаторе – ААА 400 производства ИНГОС Чехия, автоматизированном жидкостном хроматографе с компьютерным управлением [5–6].

Все расчеты проводились методом абсолютной градуировки хроматографических пиков.

Элюат смешивался с нингидриновым реагентом и вступал в реакцию в проточной ячейке реактора при $t = 121^\circ\text{C}$.

Неподвижная фаза (смола) – для аминокислотного анализа использовали сильноокислые ионообменные смолы.

Подвижная фаза (элюент) – растворы, отвечающие за хроматографическое разделение, включали элюционные буферы и регенерант.

Другие растворы, называемые загрузочными буферами, использовались для приготовления образца и разбавления (табл. 1).

Буферы для аминокислотного анализа состояли из ингредиентов двух типов. Главные ингредиенты управляют хроматографической средой, а вспомогательные предохраняют от окисления и бактериального заражения. Желаемая кислотность и ионная сила буферов создавалась при помощи следующих основных ингредиентов: лимонная кислота; натрий или литий цитрат; натрий или литий хлорид.

Два других компонента являлись частями натриевого буфера № 4 ($\text{pH} \sim 8$):

– концентрированный раствор NaOH ($50\% = 12,5\text{M}$) используется для подводки буфера с целью получения оптимального разделения аминокислот;

– борная кислота (для компенсации потерь буферной способности цитратного буфера в заданном pH диапазоне).

В качестве вспомогательных ингредиентов использовались тиодигликоль как антиоксидант и азид натрия как консервант.

Подготовленные образцы перед введением их в анализатор отвечали следующим требованиям:

- значение pH как можно ближе к 2,20,
- постоянная ионная сила в течение всей последовательности цикла,
- концентрация аминокислот достаточна для детектирования (0,2 – 1,5 AU (значения у-оси хроматограммы)),
- отсутствие белка, микроорганизмов, взвешенных частиц,
- оптимальное разведение загрузочным буфером (с минимальным содержанием органики) [4].

Методика. В пенициллиновый флакон на 20 мл вносили 0,2 г образца – пыльцы сосны обыкновенной (точная навеска на аналитических весах), затем доливали до верха 6 нормальной кислотой хлористоводородной, ставили на 23 часа в сушильный шкаф с закрытой крышкой. Устанавливали температуру $t = 110^\circ\text{C}$. По окончании гидролиза охлаждали до комнатной температуры с последующим выпариванием досуха в ротационном испарителе, после чего добавляли 5 мл H_2O и повторно выпаривали (промывание водой необходимо, данную манипуляцию проделывали два раза). К выпаренному досуха образцу приливали 50 мл загрузочного буфера ($\text{pH} = 2,2$). Перед вводом в ионообменную колонку образец пыльцы обыкновенной фильтровали через бумажный фильтр – синяя лента (табл. 2) [1–3].

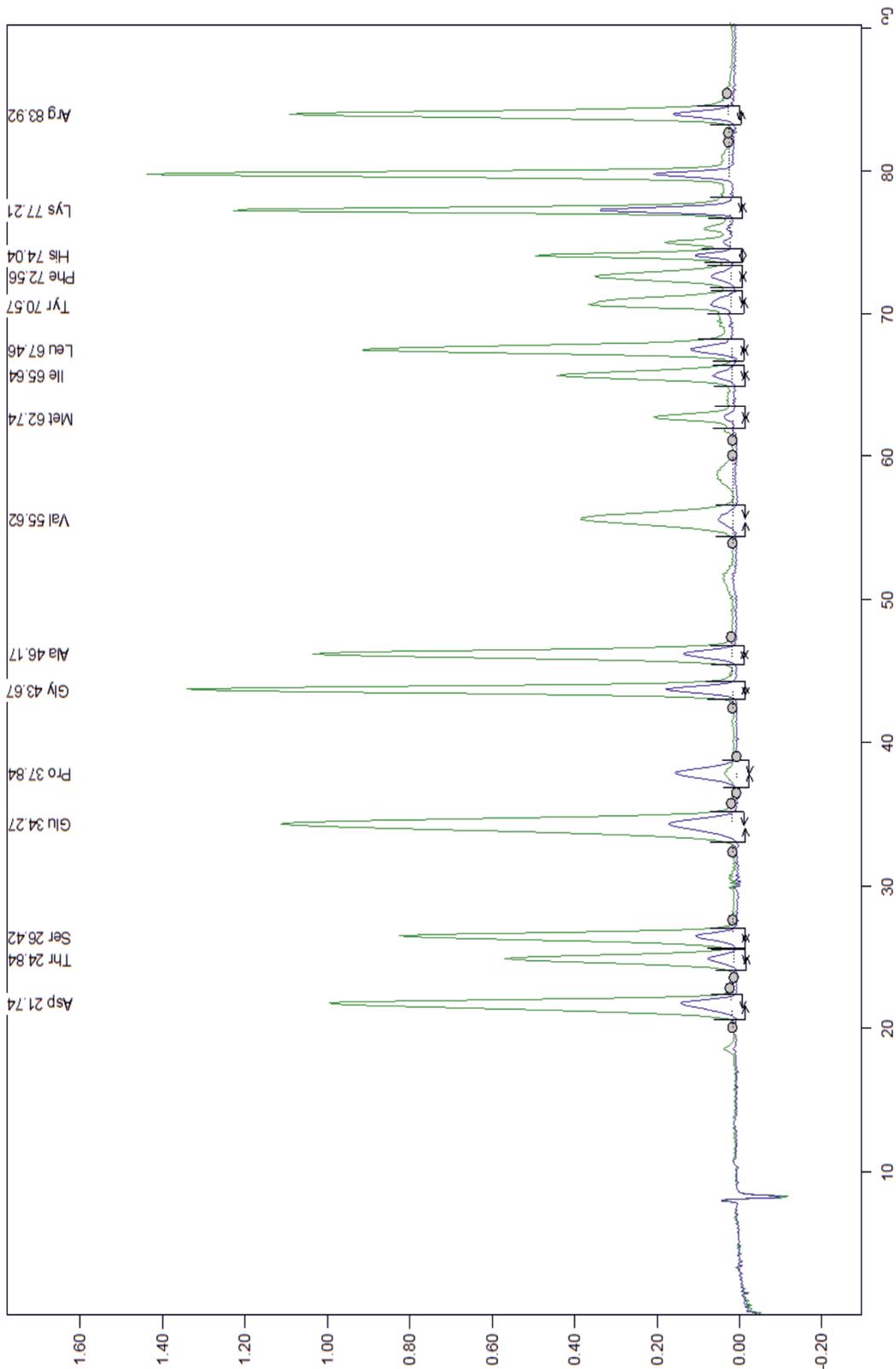
Условия аминокислотного анализа смеси:

- использовали ступенчатый градиент;
- скорость потока буферных растворов 0,3 мл/мин;
- скорость потока нингидринового реактива 0,2 мл/мин;
- детектирование в УФ областях 440 и 570 нм;
- температуры термостата реактора – 121°C .

Таблица 1

Растворы, используемые в ионообменной хроматографии аминокислот

Раствор		Применение
Загрузочный буфер		Подготовка и разбавление образцов, самый кислый буфер (0,2M, pH 2,2).
Элюанты	Элюционные буферы	Буферы используются для создания градиента pH и ионной силы для уравновешивания колонки и элюант-образца
	Регенерант	Сильно щелочной раствор гидроксида, применяемый для удаления всех остатков образца из колонки



Аминограмма пыльцы сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), выданная прибором – ААА 40

Таблица 2

Программа работы аминокислотного анализатора для определения количественного содержания аминокислот в исследуемом образце пыльцы сосны

Время, мин	Температура колонки	Номер раствора буферного	Команды
0	55	1	Ввод образца в колонку
5	55	1	Обнуление линии детектора
12	55	2	–
40	55	3	–
52	55	4	–
68	74	4	–
76	74	4	Регенерация колонки
78	74	6	–
88	74	1	Вместо нингидрина подача воды
93	55	1	–
100	55	1	Загрузка образца в петлю и ожидание ввода в колонку
101	55	1	Включает подачу нингидринового реактива в реактор
107	55	1	Окончание и сохранение аминокрамы

Заданные количества стандартного и испытуемого раствора через дозировочную петлю (100 мкл) вводили в колонку аминокислотного анализатора, после чего прибором рассчитывали площади пиков испытуемого и стандартного растворов и по формуле проводили расчет концентрации каждой аминокислоты в процентном соотношении (рисунок).

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты качественного определения аминокислот в пыльце сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) отражены в табл. 3.

Таблица 3

Качественные реакции на аминокислоты в пыльце сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.)

№ п/п	Наименование реакции	Результат реакции
1	Биуретовая реакция	сине-фиолетовая окраска
2	Нингидриновая реакция	фиолетово-синяя окраска
3	Ксантопротеиновая реакция	желтое окрашивание
4	Реакция Сакагучи	оранжево-красное окрашивание
5	Нитропруссидная реакция	пурпурное окрашивание
6	Реакция Паули	вишнево-красное окрашивание

Необходимо отметить положительные результаты проведенных качественных ре-

акций, обусловленных специфичностью данных реакций, что дает возможность использовать их в дальнейших исследованиях по разработке методик качественного обнаружения аминокислот в пыльце сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.).

Результаты оценки количественного аминокислотного состава пыльцы сосны обыкновенной представлены в табл. 4.

Таблица 4

Содержание аминокислот в пыльце сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.)

№ п/п	Наименование аминокислоты	Содержание в образце, %
1	Аспарагиновая кислота (Asp)	1,23
2	Треонин (Thr)	0,50
3	Серин (Ser)	0,61
4	Глютаминовая кислота (Glu)	1,73
5	Пролин (Pro)	0,95
6	Глицин (Gly)	0,58
7	Аланин (Ala)	0,68
8	Валин (Val)	0,56
9	Метионин (Met)	0,17
10	Изолейцин (Ile)	0,44
11	Лейцин (Leu)	0,84
12	Тирозин (Tyr)	0,60
13	Фенилаланин (Phe)	0,51
14	Гистидин (His)	0,34
15	Лизин (Lys)	0,87
16	Аргинин (Arg)	1,51
Сумма аминокислот, %		12,14
Сырой протеин, %		15,02
Содержание незаменимых аминокислот, %		37,88

Таким образом, в исследуемом образце пыльцы сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), произрастающей и собранной на территории РСО-Алания, выявлено 16 аминокислот, из которых девять незаменимы: треонин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, гистидин, лизин и аргинин. Установлено содержание суммы аминокислот исследуемого сырья в объеме 12,14%.

Содержание незаменимых аминокислот в исследуемом образце от общего числа составляет 37,88%.

В результате оценки аминокислотного состава пыльцы сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в порядке убывания выявлено преобладание глютаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты и аргинина. Наибольшее количество составила кислота глютаминовая (1,73%), которая играет важную роль в азотистом обмене.

Выводы

Полученные результаты исследований пыльцы сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) могут являться предварительным обоснованием дальнейших разработок лекарственных средств, обладающих эффективным ноотропным действием ввиду наличия глютаминовой кислоты, психостимулирующим и мягким антидепрессивным действием ввиду наличия аспарагиновой

кислоты, дезинтоксикационным действием ввиду наличия аргинина, кардиостимулирующим действием ввиду наличия пролина.

Итоги проведенных исследований также дополняют ранее полученные сведения о составе пыльцы сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и могут быть использованы при дальнейшей разработке новых лекарственных средств из данного лекарственного сырья.

Список литературы

1. Государственная фармакопея XI СССР: вып.2. – 11-е изд. – М.: Медицина, 1990. – 398 с.
2. Круглова М.Ю. [и др]. Полисахаридный и аминокислотный состав наиболее распространенных видов лабазника // Электронный журнал «Медицина и образование в Сибири». – 2011. – № 5. URL: <http://ngmu.ru/cozo/mos/article/abauthors.php?id=534> (дата обращения: 01.12.2017).
3. Олешко Г.И. [и др.]. Разработка унифицированной методики количественного определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах // Фармация. – 2011. – № 3. – С. 14–17.
4. Никифоров Л.А., Белоусов М.В., Фурса Н.С. Изучение аминокислотного состава ряски малой (*Lemna minor* L.) // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 5. – С. 74–77. URL: <http://bulletin.tomsk.ru/jour/article/view/774/635> (дата обращения: 01.12.2017).
5. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Медицина, 2005. – 827 с.
6. Миронов А.Н. [и др]. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – М.: ЗАО «Гриф и К», 2012. – 944 с.