

Я. Ф. Копытько

АМИНОКИСЛОТЫ И ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ НАСТОЕК ПАРНАСИЯ (БЕЛОЗОРА БОЛОТНОГО) ГОМЕОПАТИЧЕСКИХ МАТРИЧНЫХ

Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных
и ароматических растений, Москва

Белозор болотный (*Parnassia palustris* L.) в гомеопатии применяется в глазной практике, при эпилепсии, метrorрагиях и легочных кровотечениях [1]. Химический состав изучен мало. Установлено, что в настоеке белозора болотного содержатся дубильные вещества, сапонины, флавоноиды кемпферол, кверцетин и мирицетин в форме 3-О-моно-, 3-О-ди- и 3-О-тригликозидов [2, 3].

Настойки гомеопатические матричные парнасия описаны в гомеопатической фармакопее Германии 1958 г. и руководстве В. Швабе [4, 5]. Гомеопатические настойки могут быть получены по правилам гомеопатической технологии из свежесобранного или высушенного сырья. Настойки из свежесобранного сырья изготавливали по методу 3 общей фармакопейной статьи “Настойки матричные гомеопатические” [6], используя в качестве экстрагента 86 масс.% этанол, путем мацерации в течение 8 суток, после чего массу отжимали, жидкость отстаивали в течение 8 суток и фильтровали.

Настойки из высушенного сырья изготавливали в соответствии с методом 4, используя 60 масс.% этанол в соотношении сырье — экстрагент 1:10 путем мацерации по той же технологии.

Целью настоящего исследования являлось изучение аминокислотного и жирнокислотного состава матричных гомеопатических настоек парнасия, полученных из свежесобранного и высушенного сырья белозора болотного, собранного в Котласском районе Архангельской области, с использованием методов тонкослойной хроматографии (ТСХ), хроматомасс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (аминокислотный анализатор).

Качественный анализ аминокислот, содержащихся в гомеопатических настойках парнасия, проводили методом ТСХ на пластинках со слоем силикагеля “Сорбфил” (Россия) с использованием подвижной фазы *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:1). Вещества на хроматограмме обнаруживали раствором нингидрина [7].

Исследовали настойки, полученные из свежесобранного и высушенного сырья. Сравнение свободных аминокислот в настойках проводилось с 0,1 % растворами аспарагиновой кислоты, лейцина, треонина, глутаминовой кислоты, серина и валина в 10 % водном растворе *n*-пропанола, различающихся по величине R_f .

На стартовую линию хроматографической пластинки наносили отдельно полосами 10 мм по 20 мкл настойки и по 5 мкл растворов свидетелей и хроматографировали восходящим способом на высоту 12 см.

Хроматограмму высушивали в сушильном шкафу при температуре 90 °С в течение 10 мин. Пластинку опрыскивали раствором нингидрина и нагревали при температуре 100 °С до появления окрашивания зон, после чего хроматограмму рассматривали в дневном свете.

На хроматограмме растворов свидетелей обнаруживаются зоны фиолетово-розового цвета со значениями R_f около 0,14 (серин), 0,16 (треонин), 0,18 (аспарагиновая кислота), 0,23 (глутаминовая кислота), 0,15 (серин), 0,25 (валин), 0,36 (лейцин).

На хроматограмме настойки белозора из высушенного сырья выявляется 2 – 3 зоны фиолетово-розового цвета от линии нанесения до R_f около 0,06, зона желтого цвета с R_f около 0,06 (пролин), последовательность зон фиолетово-розового цвета различной интенсивности в пределах значений R_f 0,09 – 0,32 (треонин, серин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, серин, валин), несколько зон в пределах значений R_f 0,34 – 0,42 (лейцин). Хроматограмма настойки белозора из свежесобранного сырья содержит такое же количество зон, но окраска некоторых менее интенсивна, по сравнению с соответствующими зонами на хроматограмме настойки из высушенного сырья.

Поскольку настойки наряду со свободными аминокислотами содержат низкомолекулярные пептиды, то при анализе в тонком слое сорбента значения R_f коротких пептидов могут совпадать с R_f свободных аминокислот, что затрудняет идентификацию. Для детального изучения содержания аминокислот в гомеопатических настойках белозора болотного, полученных из свежесобранного и высушенного сырья, применяли аминокислотный анализатор.

Анализ свободных аминокислот проводили на аминокислотном анализаторе “Biotronik LC-2000” (Германия), снабженном аналитической колонкой (размеры 0,6 × 22 см), заполненной катионообменной смолой “Durrum DC-4A”.

Методика определения. 10 мл настойки помещают в делительную воронку и экстрагируют последовательно *n*-гексаном и хлороформом для удаления липофильных веществ и части растительных пигментов, после чего настойку упаривают до объема около 3 мл и прибавляют 10 мл метилового спирта для осаждения полимерных соединений и фильтруют через стеклянный фильтр (ПОР-40). Осадок на фильтре несколько раз промывают метиловым спиртом. Фильтрат упаривают до сухого остатка, растворяют в 5 мл 0,2 М натрий-цитратного буферного раствора с pH 2,2, затем к 0,5 мл полученного раствора прибавляют 2 мл того же натрий-цитратного буферного раствора и 0,2 мл этого

раствора вводят на аналитическую колонку аминокислотного анализатора. Разделение аминокислот проводилось в трех-буферной системе натрий-цитратных буферных растворов; 0,18н., рН 3,25; 0,3н., рН 3,9; 1,6н., рН 4,75. Нингидриновый реактив приготавливали с использованием метилового эфира этиленгликоля (метилцелозольва). Цитратные буферные растворы подавали в колонку по стандартной программе со скоростью 32 мл/ч. Нингидриновый реактив подавался со скоростью 20 мл/ч. На выходе из аналитической колонки разделенные аминокислоты смешивались с нингидриновым реактивом в смесительном блоке в соотношении 2:1 (по объему). Реакция аминокислот с нингидрином проходила за 4 мин при 100 °С в реакционной бане. Колориметрическое измерение окрашенных комплексов, которые образуются в результате реакции с нингидрином, проводится непрерывно и одновременно при 2-х длинах волн в проточной кювете фотометра. Первичные амины образуют пурпурную окраску, измеряемую при длине волны 570 нм, а вторичные амины (пролин и оксипролин) образуют соединения желтой окраски, измеряемой при длине волны 440 нм.

Качественный состав аминокислот в исследуемых образцах осуществляли по временам удерживания. В качестве стандарта использовали смесь, состоящую из 24 аминокислот.

Количественное содержание обнаруженных аминокислот рассчитывали в мг на 10 мл настойки и в пере-

Таблица 1

Свободные аминокислоты в гомеопатических настойках белозора болотного, полученных из свежесобранного и высушенного сырья

Аминокислота	Настойка белозора болотного гомеопатическая матричная			
	Из свежесобранного сырья		Из высушенного сырья	
	мг/мл	В пересчете на абсолютно сухое сырье, %	мг/мл	В пересчете на абсолютно сухое сырье, %
Аспарагиновая кислота	0,1840	0,140	0,1080	0,120
Треонин	0,0240	0,018		
Серин	0,0256	0,020	0,3204	0,356
Глутаминовая кислота	0,2987	0,228	0,1463	0,162
Пролин	0,0163	0,012	0,0488	0,054
Глицин	0,0018	0,001	0,0029	0,003
Аланин	0,0336	0,026	0,0512	0,057
Полу-цистин	0,0076	0,006	0,0051	0,006
Валин	0,0393	0,030	0,0663	0,074
Изолейцин	0,0251	0,019	0,0407	0,045
Лейцин	0,0188	0,014	0,0330	0,037
Тирозин	0,0077	0,006	0,0128	0,014
Триптофан	0,0775	0,059	0,0343	0,038
Фенилаланин	0,0234	0,018	0,0809	0,090
Лизин	0,0024	0,002	0,0033	0,004
Гистидин	0,0775	0,059	0,2596	0,298
Аргинин	0,1096	0,084	0,1036	0,115
Суммарное содержание	0,9054	0,743	1,3172	1,462

Таблица 2

Жирные кислоты в гомеопатических настойках белозора болотного, полученных из свежесобранного и высушенного сырья.

№№ п/п	Название вещества	Время удерживания, с	Настойка из свежесобранного сырья		Настойка из высушенного сырья		Содержание в настойке из высушенного сырья относительно сырьевого компонента (100 %), %
			Площадь пика	% от общего содержания компонентов	Площадь пика	% от общего содержания компонентов	
1	Каприновой кислоты этиловый эфир	20,7824	22799	0,0611	6790	0,0518	29,8
2	Миристиновой кислоты этиловый эфир	27,086	107199	0,2874	59027	0,4503	55,1
3	Пентадекановой кислоты этиловый эфир	30,184	112434	0,3014	75369	0,5749	67,0
4	Пальмитиновой кислоты этиловый эфир	33,198	6458756	17,3160	4611708	35,1790	71,4
5	Пальмитиновой кислоты этиловый эфир изо-	33,863	139173	0,3731	44431	0,3389	31,9
6	Пальмитиновой кислоты этиловый эфир изо-	34,560	162494	0,4356	77862	0,5939	47,9
7	Гептадекановой кислоты этиловый эфир	36,176	126890	0,3402	113598	0,8665	89,5
8	Неидентифицированной полиненасыщенной жирной кислоты этиловый эфир	36,533	109825	0,2944	0	0,0000	0,0
9	Гексадекатриеновой кислоты этиловый эфир	36,783	976456	2,6179	43487	0,3317	4,4
10	Стеариновой кислоты этиловый эфир	38,987	446360	1,1967	403430	3,0774	90,4
11	Олеиновой кислоты этиловый эфир	39,434	1441188	3,8638	694035	5,2942	48,2
12	Олеиновой кислоты 11-дис-этиловый эфир	39,661	266958	0,7157	169020	1,2893	63,3
13	Линолевой кислоты этиловый эфир	40,699	5886853	15,7827	1704420	13,0017	29,0
14	Линоленовой кислоты этиловый эфир	42,479	14026050	37,6040	2566328	19,5765	18,3
15	Арахидиновой кислоты этиловый эфир	44,479	95717	0,2566	138486	1,0564	144,7
16	Пальмитиновая кислота	50,597	1445606	3,8757	1445116	11,0236	99,97
17	Линолевая кислота	59,032	1050668	2,8169	956143	7,2937	91,00
18	Линоленовая кислота	62,133	4423917	11,8606	0	0,0000	0,00

счете на 100 г абсолютно сухого сырья. В качестве расчетного параметра использовали площади пиков. Аминокислотный анализатор был откалиброван на стандартных образцах аминокислот в наномолях. Результаты анализа приведены в табл. 1. Исследуемые настойки содержат значительное количество свободных аминокислот — 0,9054 г/мл в настойке из свежего сырья (0,74 % в пересчете на абсолютно сухое сырье) и 1,3172 мг/мл в настойке из высушенного сырья (1,46 % в пересчете на абсолютно сухое сырье) и характеризуются широким набором аминокислот. Настойки, полученные из высушенного сырья, содержат больше свободных аминокислот, чем настойки из свежесобранного сырья. Количество незаменимых аминокислот в настойках из высушенного сырья в 1,5 раза больше, чем в настойках из свежесобранного сырья. Так, в настойке из высушенного сырья существенно больше гистидина, треонина и серина (в сумме), пролина, аланина, валина, изолейцина, фенилаланина, чем в настойках из свежесобранного сырья.

Метионин, метионин-сульфон, метионин-сульфоксид, цистеиновая кислота, лактон гомосерина и орнитин в гомеопатических матричных настойках белозора болотного не обнаружены.

Анализ жирных кислот липидной фракции, содержащейся в настойках гомеопатических матричных белозора болотного, проводили на хроматомасс-спектрометре “Saturn-3” (США) типа “ионная ловушка” с кварцевой капиллярной колонкой длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм. Неподвижная фаза — DBWAX с толщиной пленки 0,25 мкм. Газ-носитель — гелий.

Условия проведения анализа: температура инжектора — 250 °С; температурный режим термостата колонки программируемый: 35 °С в течение 3 мин от начала анализа. Затем нагрев со скоростью 20 °С в мин до 90 °С; нагрев со скоростью 3 °С в мин до 230 и 230 °С в течение 27 мин; объемная скорость газа носителя — 1,5 см³/мин; объем вводимой пробы — 0,5 мкл; деление потока газа носителя в инжекторе 1:20.

Приготовление пробы. В делительную воронку вместимостью 50 мл помещают 10 мл настойки и 10 мл *n*-гексана, встряхивают в течение 10 мин. Гексановое извлечение сливают в круглодонную колбу вместимостью 50 мл. Экстракцию проводят повторно с таким же количеством *n*-гексана. Извлечения объединяют и отгоняют на вакуум-выпарном ротационном аппарате при температуре не выше 40 °С досуха. Остаток растворяют в 2 мл этилацетата.

Проведение анализа: 0,5 мкл пробы вводят в испаритель хроматомасс-спектрометра.

Количественное определение проводили внутренней нормировкой площадями пиков с использованием автоматической системы обработки данных. Значения

времен удерживания и количественное содержание приведены в табл. 2. Из данных таблицы следует, что жирные кислоты в настойках содержатся в основном в виде этиловых эфиров. Преобладающими являются пальмитиновая, линолевая, линоленовая и олеиновая кислоты. В настойках из свежесобранного сырья содержится больше жирных кислот, чем в настойках из высушенного сырья. Также в настойках из высушенного сырья выявлено уменьшение содержания этиловых эфиров ненасыщенных кислот (линолевой, олеиновой, гексадекатриеновой, линоленовой), не обнаруживается линоленовая кислота, но одновременно увеличивается содержание арахидиновой кислоты, что свидетельствует о происходящем в процессе сушки разложении полиненасыщенных жирных кислот.

Таким образом, в настойках белозора болотного (парнасия) идентифицированы и количественно определены 17 аминокислот, в том числе незаменимые, основными из которых являются глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, аргинин, триптофан, гистидин, валин и аланин.

Изучено содержание жирных кислот в настойках белозора болотного гомеопатических матричных. Преобладающими являются пальмитиновая, линолевая, линоленовая и олеиновая кислоты.

Настойки парнасия, изготовленные из свежесобранного и высушенного сырья, отличаются по качественному и количественному составу аминокислот и жирных кислот.

Настойки, полученные из высушенного сырья, содержат большее количество аминокислот и меньше жирных кислот, что связано, по-видимому, с происходящими во время сушки ферментативными процессами, приводящими к разрушению пептидных цепей и, как следствие, увеличению содержания аминокислот, а также разложению полиненасыщенных жирных кислот, уменьшая их содержание в настойках высушенного сырья.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. С. Мищенко, А. М. Иванова, *Гомеопатические лекарственные средства (пособие для врачей и провизоров)*, Московский гомеопатический центр, Москва (1995), с. 164.
2. В. А. Bohm, L. S. Donevan, U. G. Bhat, *Biochem. Syst. Ecol.*, **14**(1), 75 – 77 (1986).
3. М. Палов, *Энциклопедия лекарственных растений*, Мир, Москва (1998), сс. 72 – 73.
4. В. Швабе, *Гомеопатические лекарственные средства*, В. И. Рыбак (ред.), Москва (1967), с. 360.
5. *Homöopathisches Arzneibuch — 3 Auflage — 1958*, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart (1958).
6. ВФС 42-2799–96 “Настойки матричные гомеопатические”.
7. М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец, *Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии*, т. 2, Мир, Москва, (1980).

Поступила 21.11.02