

ВИВЧЕННЯ АМІНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ СИРОВИНИ ЛІХНІСУ КОРОНЧАТОГО (*LYCHNIS CORONARIA* (L.) MURRAY EX DESR.)

Поліщук Ю. М., Бурда Н. Є.

Національний фармацевтичний університет
України

Вступ. Ліхніс корончатий (*Lychnis coronaria* (L.) Murray ex Desr.) – багаторічна трав'яниста рослина родини Гвоздикові (Caryophyllaceae). Рослина культивується в багатьох країнах світу, зокрема в Україні, як декоративна [1].

Різні частини ліхнісу корончатого використовуються у традиційній медицині країн світу для лікування прокази, діареї, геморою, захворювань легенів та печінки. Крім того, сировина володіє протизапальною активністю [1].

На сьогодні ліхніс корончатий вивчають науковці багатьох країн. Наприклад, новітні дослідження, проведені індійськими вченими, показали протиастматичний ефект ліхнісу корончатого через зниження гіперреактивності бронхів, а також клітинних і молекулярних маркерів запалення дихальних шляхів та імунітету [2].

Крім того, румунськими вченими запропоновано та досліджено комплексний рослинний засіб, до складу якого входив ліхніс корончатий. Для цього засобу встановлено виражену антимікробну та антиоксидантну активності [3].

Індійськими вченими для водного екстракту із трави ліхнісу корончатого встановлено антигепатотоксичну дію [4].

Стосовно фармакологічної активності амінокислот, то китайські вчені провели дослідження щодо вивчення нових сполук, які були одержані шляхом поєднання природних сполук із амінокислотами, зокрема валіном та проліном. Встановлено, що отримані похідні сприяли вищій швидкості проліферації в клітинах HerG2, ніж природні сполуки до дериватизації. Це свідчило про те, що ці похідні володіють покращеною гепатопротекторною здатністю [5].

Інші дослідження, проведені вченими Великобританії, показали цікаві результати щодо впливу амінокислот на профілактику та лікування бронхіальної астми. Оскільки амінокислоти сприяють різноманітній антиоксидантній та імунологічній діяльності, що має відношення до патогенезу астми, науковці припустили, що відмінності в амінокислотах можуть бути залучені до етіології астми. У підсумку проведених експериментів встановлено, що високі рівні цистину, введені у плазму, не мають захисного ефекту на ризик розвитку бронхіальної астми, але для гліцину ця кореляція простежується, тому потребує подальшого вивчення [6].

Наведена вище інформація дає можливість припустити, що амінокислоти опосередковано можуть впливати на прояв фармакологічної активності сировини ліхнісу корончатого. Для цього раціональним є проведення вивчення

амінокислотного складу сировини досліджуваної рослини, що і стало **метою цієї роботи**.

Матеріали та методи. Для вивчення використовували листя, квітки та стебла ліхнісу корончатого. Сировина була заготовлена у період цвітіння у 2020-2021 рр. у Харківській області.

Амінокислоти визначали на амінокислотному аналізаторі Т 339 (виробник Mikrotechna, Чехія) із використанням такої методики [7]:

На дні пробірки з вогнетривкого скла розміщали зважений зразок сировини. До сухої наважки в пробірку додавали відповідну кількість 6 н хлористоводневої кислоти. Пробірку охолоджували у рідкому азоті. Після того, як вміст пробірки замерзав, із неї відкачували повітря за допомогою вакуумного насоса для запобігання окислювання амінокислот у результаті гідролізу. Потім пробірку запаювали. Запаювану пробірку ставили на 24 години до термостату із постійною температурою +106 °С. Після закінчення гідролізу пробірку охолоджували до кімнатної температури та розкривали. Вміст кількісно переносили у скляний бюкс і випарювали хлористоводневу кислоту на водяній бані. Після висушування зразка у бюкс додавали 3-4 мл деіонізованої води і повторювали процедуру висушування. Підготовлений у такий спосіб зразок розчиняли у 0,3 н літій цитратному буфері рН 2,2 і наносили на іонообмінну колонку аналізатора амінокислот.

Принцип роботи амінокислотного аналізатору полягає в тому, що елюент із ємкості за допомогою насоса, що дозує, проганяли через хроматографічну колонку. На виході з колонки до елюату мікронасосом безупинно підкачували нінгідриновий реактив у визначеному співвідношенні з елюатом. Суміш елюата і нінгідринового реактиву по капілярній трубці направлялися в реактор, що нагрівався до температури 95-98 °С, і потім подавалися в проточну кювету. Інтенсивність забарвлення, що з'являлося, вимірювали фотокolorиметрируванням за допомогою фотоелементу, на який світло від джерела проходило через стінки кювети. Сигнали фотоелемента підсилювалися і реєструвалися самописним потенціометром у вигляді хроматограми. Площа піків на хроматограмі розраховувалася і порівнювалася з площею піків амінокислот з відомою концентрацією. З порівняння цих площ робилися обчислення абсолютної кількості амінокислоти в аналізованому зразку.

Елюація амінокислот із іонообмінної колонки проводилася по черзі літій цитратними буферними розчинами рН 2,75; рН 2,95; рН 3,2; рН 3,8; рН 5,0. Співвідношення нінгідринового реактиву і елюенту 1:2; температура термостатування колонки 38,5°С і 65°С. Досліджуваний зразок розводили в літій цитратному буфері рН 2,2 і наносили на іонообмінну колонку за допомогою дозатора.

Для того, щоб розрахувати кількість амінокислот у досліджуваному зразку, попередньо на колонку автоматичного аналізатора амінокислот

наносили стандартну суміш амінокислот із відомою концентрацією кожної амінокислоти.

На хроматограмі розраховували площу піка кожної амінокислоти (або висоту піка). Кількість мікромолей кожної амінокислоти (X) у досліджуваному розчині обчислювали за формулою:

$$X = S_1 / S_0,$$

де S_1 – площа піка (або висота) амінокислоти в досліджуваному зразку,

S_0 – площа піка (або висота) цієї ж амінокислоти в розчині стандартної суміші амінокислот, що відповідає 1 мікромолю кількості кожної амінокислоти.

Кількість амінокислот у мг одержували при множенні кількості мікромолей амінокислоти на відповідну їй молекулярну масу. Якісний склад суміші амінокислот визначали, порівнюючи хроматограми стандартної і досліджуваної суміші амінокислот.

Результати та обговорення. У результаті проведеного експерименту в усіх видах досліджуваної сировини ідентифіковано 18 амінокислот, а також визначено їх кількісний вміст. Результати дослідження наведені у таблиці.

Таблиця. Амінокислотний склад сировини ліхнісу корончатого

№ з/п	Амінокислота	Вміст амінокислот у сировині, %		
		листя	квітки	стебла
1	ГАМК	0,02±0,01	0,02±0,01	0,04±0,01
2	Лізин*	0,28±0,01	0,75±0,02	0,23±0,01
3	Гістидин**	0,07±0,002	0,16±0,01	0,06±0,001
4	Аргінін**	0,17±0,01	0,35±0,01	0,12±0,01
5	Аспарагінова кислота	0,75±0,02	1,28±0,05	0,59±0,02
6	Треонін*	0,31±0,01	0,52±0,02	0,22±0,01
7	Серин	0,26±0,01	0,69±0,02	0,23±0,01
8	Глутамінова кислота	0,97±0,03	1,77±0,06	0,77±0,03
9	Пролін	0,15±0,01	0,82±0,03	0,27±0,01
10	Гліцин	0,40±0,02	0,62±0,02	0,21±0,01
11	Аланін	0,33±0,01	0,59±0,02	0,26±0,01
12	Цистин	0,07±0,001	0,20±0,01	0,04±0,001
13	Валін*	0,13±0,01	0,29±0,01	0,09±0,003
14	Метіонін*	0,08±0,002	0,21±0,01	0,03±0,001
15	Ізолейцин*	0,11±0,01	0,31±0,01	0,10±0,01
16	Лейцин*	0,35±0,01	0,65±0,02	0,22±0,01
17	Тирозин	0,21±0,01	0,31±0,01	0,10±0,01
18	Фенілаланін*	0,27±0,01	0,33±0,01	0,14±0,01
Сума незамінних амінокислот		1,77	3,57	1,21
Сума амінокислот		4,93	9,87	3,72

Примітка. * – незамінна амінокислота, ** – умовно незамінна амінокислота; вірогідність похибки $P < 0,05$.

Як видно із наведених вище даних, найбільший вміст суми амінокислот спостерігався у квітках ліхнісу корончатого (9,87 %), найменший – у стеблах (3,72 %). Стосовно листя досліджуваної рослини, то вміст амінокислот був незначно більше за вміст цього класу сполук у стеблах. Така ж тенденція спостерігалася і у випадку аналізу суми незамінних амінокислот, їх превалювання відмічалася у квітках ліхнісу корончатого (3,57 %).

Слід відмітити, що в усіх досліджуваних видах сировини за вмістом переважали аспарагінова та глутамінова кислоти. Відомо, що ці амінокислоти застосовують при захворюваннях серцево-судинної та центральної нервової систем [7].

Щодо гліцину, про вплив на профілактику та лікування бронхіальної астми якого наведено інформацію у вступі, то у порівнянні із листям та стеблами у квітках його вміст був найвищим (0,62 %) проти 0,40 % та 0,21 % відповідно.

Стосовно проліну та валіну, то їх вміст домінував у квітках ліхнісу корончатого. Однак, слід зазначити, що вміст проліну у квітках був значно

вище (0,82 %) за вміст у листі та стеблах – 0,15 % та 0,27 % відповідно.

Таким чином, проведені дослідження можуть становити підґрунтя для подальших експериментів, пов'язаних із дослідженням фармакологічної активності ліхнісу корончатого. Крім того, на основі вмісту амінокислот можна виокремити більш перспективні для подальших досліджень види сировини ліхнісу корончатого – квітки та листя.

Висновки. Отже, одержані експериментальні дані стосовно вивчення амінокислотного складу сировини ліхнісу корончатого поглиблюють знання щодо хімічного складу цієї рослини. Також ці результати можуть використовуватися в подальшому при дослідженні фармакологічної активності сировини ліхнісу корончатого.

Study of amino acid composition of *Lychnis coronaria* raw materials

Polishchuk Yu. M., Burda N. Ye

Introduction. *Lychnis coronaria* (L.) Murray ex Desr. is a perennial herbaceous plant in the Caryophyllaceae family. The plant is cultivated in many countries of the world, in particular in Ukraine, as a decorative plant. Various parts of *Lychnis coronaria* are used in traditional medicine around the world to treat leprosy, diarrhea, hemorrhoids, lung and liver diseases. In addition, the raw materials have anti-inflammatory activity. Today, *Lychnis coronaria* is studied by scientists from many countries. For example, recent studies conducted by Indian scientists have shown the anti-asthmatic effect of *Lychnis coronaria* due to the reduction of bronchial hyperreactivity, as well as cellular and molecular markers of airway inflammation and immunity. In addition, Romanian scientists proposed and researched a complex herbal remedy, which included *Lychnis coronaria*. Pronounced antimicrobial and antioxidant activity has been established for this medicinal product. Indian scientists have established an antihepatotoxic effect for a water extract from the herb *Lychnis coronaria*. Regarding the pharmacological activity of amino acids, Chinese scientists have conducted research on the study of the combination of natural compounds with amino acids, in particular valine and proline. It was found that the obtained derivatives promoted a higher proliferation rate in HepG2 cells than the natural compounds before derivatization. This indicated that these derivatives have improved hepatoprotective ability. Other studies conducted by UK scientists have shown interesting results regarding the effect of amino acids on the prevention and treatment of bronchial asthma. Because amino acids contribute to a variety of antioxidant and immunological activities relevant to the pathogenesis of asthma, scientists have hypothesized that differences in amino acids may be involved in the etiology of asthma. As a result of the conducted experiments, it was established that high levels of cystine introduced into the plasma do not have a protective effect on the risk of developing bronchial asthma, but for glycine this correlation can be traced, therefore it requires further study. Therefore, the above information makes it possible to assume that amino acids can indirectly affect the manifestation of the pharmacological activity of *Lychnis coronaria* raw materials. For this purpose, it is rational to conduct a study of the amino acid composition of the raw materials of the studied plant, which became the **purpose of this work.** **Materials and methods.** Leaves, flowers and stems of *Lychnis coronaria* were used for the study. The raw material was harvested during the flowering period in 2020-2021 in the Kharkiv region. The determination of the qualitative composition and quantitative content of amino acids in the raw material was carried out by ion-exchange chromatography using an automatic amino acid analyzer AAA T-339M. The study of amino acids was performed after prehydrolysis with hydrochloric acid. To this end, 6 N hydrochloric acid solution was added to the test tube with exactly measured portion of herb and after that the tube was cooled in a liquid nitrogen flow. When the test tube contents were frozen,

the air was removed from it under vacuum to avoid amino acid oxidation. Then the test tube was sealed and preserved in thermostat at a constant temperature of 106°C within 24 hours. Then the test tube contents were cooled, totally transferred to a glass weighing box, and hydrochloric acid was evaporated on a water bath. 3-4 ml of deionized water was added to a dried sample, and the evaporation went on. The obtained sample was dissolved in 0.3 N lithium citrate buffer at pH 2.2 and applied on amino acid analyzer ion exchange column, whose cation exchanger was previously equalized with sodium citrate or lithium citrate buffer solution.

Research results. As a result of the conducted experiment, 18 amino acids were identified in all types of studied raw materials, and their quantitative content was also determined. The highest content of the total amount of amino acids was observed in *Lychnis coronaria* flowers (9.87%), the lowest – in the stems (3.72%). Regarding the leaves of the studied plant, the content of amino acids was slightly higher than the content of this class of compounds in the stems. The same trend was observed in the analysis of the amount of essential amino acids, their predominance was noted in the flowers of *Lychnis coronaria* (3.57%). It should be noted that in all studied types of raw materials, aspartic and glutamic acids prevailed in terms of content. It is known that these amino acids are used in diseases of the cardiovascular and central nervous systems. As for glycine, information about its effect on the prevention and treatment of bronchial asthma is given in the introduction, compared to leaves and stems, its content in flowers was the highest (0.62%) versus 0.40% and 0.21%, respectively. Regarding proline and valine, their content dominated in *Lychnis coronaria* flowers. However, it should be noted that the proline content in flowers was significantly higher (0.82%) than the content in leaves and stems – 0.15% and 0.27%, respectively. Thus, the conducted research can form the basis for further experiments related to the study of pharmacological *Lychnis coronaria*. In addition, based on the content of amino acids, it is possible to single out the more promising types of *Lychnis coronaria* raw materials for further research - flowers and leaves.

Conclusions. Therefore, the obtained experimental data regarding the study of the amino acid composition of *Lychnis coronaria* raw materials deepens the knowledge about the chemical composition of this plant. Also, these results can be used in the future in the study of the pharmacological activity of *Lychnis coronaria* raw materials.

Keywords: *Lychnis coronaria*, amino acid composition.

References

1. Bahar Ahmed, Mubashir H. Masoodi, Shamshir Khan et al. *Lychnis coronaria* Linn. A review. NPAIJ. 2008. Vol. 4(1). P. 22-25.
2. Verma P., Gulati K., Ray A. Evaluation of Cellular and Molecular Mechanism of Anti-Asthmatic Effects of A Traditional Herbal Drug In Rats. Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development. 2021. Vol. 9(5). P. 29-34.
<https://doi.org/https://doi.org/10.22270/ajprd.v9i5.1022>

3. Grigore Alice, Pirvu Lucia Camelia, Bejanaru Ionica et al. Biochemical Profile and Antimicrobial Activity of an Herbal-Based Formula and Its Potential Application in Cosmetic Industry. *Appl. Microbiol.* 2022. Vol. 2. P. 227–236. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010016>
4. Mubashir Masoodi, Shamshir Khan, Khan S, Amita Verma. Evaluation of antihepatotoxic activity of *Lychnis coronaria* L. aqueous extract in carbon tetrachloride induced toxicity. *Indian Drugs.* 2007. Vol. 44 (4). P. 618-621.
5. Pei Liang Dong, Zhen Lei Gao, Xin Yin et al. Hepatoprotective activity assessment of amino acids derivatives of picoside I and II. *Chem Biol Drug Des.* 2021. Vol. 97(2). P. 341-348. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13786>
6. Fogarty A., Broadfield E., Lewis S. et al. Amino acids and asthma: a case-control study. *Eur Respir J.* 2004. Vol. 23 (4). P. 565-568. doi: 10.1183/09031936.04.00090404.
7. Kuznetsova M., Zhuravel I., Hutsol V. The study of qualitative and quantitative content of amino acids in Cabbage leaves (*Brassica oleracea* L.). *Norwegian Journal of development of the International Science.* 2019. № 35/2019, Vol. 2. P. 48-51.