

Е. С. Лапинская¹, Я. Ф. Копытько¹, Е. А. Тимохина², Б. А. Крапивкин³,
Г. С. Левандовский⁴, Т. Д. Даргаева¹, Т. А. Сокольская¹

АМИНОКИСЛОТЫ И ЦИКЛИЧЕСКИЕ ДИПЕПТИДЫ В НАСТОЙКАХ ГОМЕОПАТИЧЕСКИХ МАТРИЧНЫХ *URTICA DIOICA* L. И *URTICA URENS* L.

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений РАСХН (ВИЛАР), Москва, Россия;

² ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ГосНИИгенетика), Москва, Россия;

³ Федеральное государственное учреждение Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГУ "ВГНКИ"), Москва, Россия;

⁴ Главный ботанический сад РАН (ГБС РАН), Москва, Россия

Качественный и количественный состав аминокислот и азотсодержащих соединений липофильной фракции настоек гомеопатических матричных (НГМ), изготовленных из свежесобранного и высушенного сырья крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) и жгучей (*Urtica urens* L.) в соответствии с гомеопатической технологией изучен с помощью аминокислотного анализатора и методом ГЖХ-МС. В настойках идентифицировано 18 аминокислот. Содержание суммы свободных аминокислот составляет в НГМ от 0,02 до 0,21 %, связанных — от 0,03 до 0,29 %, установлено, что оно выше в НГМ из свежего сырья, чем в таковых из высушенного. При сравнении содержания аминокислот до и после гидролиза установлено, что аминокислоты в НГМ находятся преимущественно в свободном состоянии. В НГМ найдены производные пиразина и пиразола — изомеры 4-этил-4,5-дигидро-5-пропил-1Н-пиразол-1-карбоксальдегида и производные гексагидропирроло[1,2-а]пиразин-1,4-диона с -3-алкил и -3-фенилметил заместителями, а также 5,10-диэтокси-2,3,7,8-тетрагидро-1Н,6Н-дипирроло[1,2-а;1',2'-d]пиразин. Обнаруженные соединения могут вносить вклад в фармакологическое действие лекарственного растительного сырья и препаратов крапивы.

Крапива двудомная (*Urtica dioica* L.) и крапива жгучая (*Urtica urens* L.) издавна применяются в медицине, в том числе с конца XIX века в гомеопатии, при различных заболеваниях — ожогах, крапивнице, мочекаменной болезни и др. [1].

Трава крапивы содержит флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты (кофеил-яблочная, кофейная, хлорогеновая), танины, амины, стеролы, каротиноиды, глюкоиноны, ферменты, полисахариды, гидроксикумарины, витамины группы В, С, К, микроэлементы, в корнях обнаружены лектин (агглютинин), состоящий из 5 индивидуальных изолектинов, полисахариды, (+)-неооливил, (-)-секоизоларицирезинол, дегидрокониферилловый спирт, изоларицирезинол, пинорезинол и 3,4-диваниллилтетрагидрофуран [2–6]. В листьях, корневище и семенах крапивы двудомной идентифицировано 12 аминокислот, суммарное содержание которых колеблется от 0,23 до 13,5 %, в листьях преобладают аспарагиновая кислота, треонин, серин, аланин; в корнях — аспарагиновая кислота, аланин (глутаминовая кислота не обнаружена); в семенах — аспарагиновая кислота, треонин, серин (не найдены глутаминовая кислота, тирозин и фенилаланин). В траве крапивы жгучей преобладают треонин и серин, аспарагиновая кислота, аланин [7, 8].

Целью исследования являлось изучение состава аминокислот и азотсодержащих веществ в липофильной фракции настоек гомеопатических матричных крапивы двудомной и жгучей.

Материалы и методы

Настойки гомеопатические матричные (НГМ) изготавливали из травы обоих видов крапивы (*Urtica dioica*, *Urtica urens*) и корней (*Urtica dioica*), как свежесобранных, так и высушенных, заготовленных во время цветения в ГБС РАН и в Московской области в 2003 и 2006 гг. (образцы 1 и 2 соответственно), по технологии, принятой в гомеопатии (ОФС 42-0027-05) [9], мацерацией с 90 и 70 % (по объему) этиловым спиртом соответственно. Содержание спирта в конечном продукте соответствовало ≈ 70 %. Соотношение абсолютно сухого сырья — экстрагент составляет в настойке из сухого сырья около 9:100, из свежего сырья — около 17:100.

Анализ свободных, а также сумму свободных и связанных аминокислот (после кислотного гидролиза) проводили на аминокислотном анализаторе "Biotronik LC-5001" (Германия), снабженном аналитической колонкой (размеры 0,6 × 22 см), заполненной катионообменной смолой "Durrum DC-4A".

Методика определения. Помещают 10 мл настойки в делительную воронку и дважды экстрагируют по 15 мл гексана и хлороформа для удаления летучих веществ, липидов и части растительных пигментов, после чего настойку упаривают до небольшого объема (2–3 мл) и добавляют 10 мл метилового спирта для осаждения полимерных соединений и фильтруют через стеклянный фильтр (ПОР-40). Осадок на фильтре несколько раз промывают метиловым спиртом. Филь-

трат упаривают до сухого остатка и помещают в вакуум-эксикатор с калия гидроокисью на 48 ч, затем остаток растворяют в 5 мл 0,2 М натрий-цитратного буферного раствора с pH 2,2. К раствору прибавляют 0,5 мл 80 % трихлоруксусной кислоты для осаждения высокомолекулярных пептидов, выдерживают в течение 3 ч при 20 °С, центрифугируют, затем прибавляют 1 г активированного угля, периодически перемешивают в течение 1 ч и центрифугируют. К полученному раствору прибавляют натрий — цитратный буферный раствор и 0,2 мл этого раствора вводят на аналитическую колонку аминокислотного анализатора.

Идентификацию аминокислот в исследуемых образцах осуществляли по временам удерживания. В качестве стандарта использовали смесь, состоящую из 19 аминокислот.

Азотсодержащие липофильные вещества извлекали из НГМ, полученных как из травы, так и из корней, поочередно гексаном и хлороформом, растворитель отгоняли при температуре около 60 °С досуха. Сухой остаток растворяли в этилацетате и анализировали методом ТСХ. Полученный раствор наносили на стартовую линию хроматографической пластинки Сорбфил ПТСХ-ПА-УФ и хроматографировали в системе этанол 95 % — раствор аммиака 10 % (4:1). При опрыс-

кивании пластинки раствором нингидрина обнаружены зоны адсорбции веществ фиолетово-розового цвета с R_f около 0,21, 0,37 и 0,52, свидетельствующие о наличии аминов. Детальный анализ фракции проводили методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГЖХ-МС) на хроматомасс-спектрометре “Saturn 2000” (Varian) с масс-анализатором типа “ионная ловушка”. Хроматографическое разделение компонентов пробы проводили на кварцевой капиллярной колонке CP-SIL 24 CB Low Bleed/MS (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм). Газ носитель — гелий, постоянная скорость потока — 1,0 мл/мин. В инжектор (1079) хроматографа при температуре 280 °С и без деления потока вводили по 0,2 мкл пробы. Температурная программа колонки: 40 °С — 1 мин, нагрев до 150 °С со скоростью 10 °С/мин, нагрев до 290 °С — 4 °С/мин, изотерма при 290 °С до 60 мин.

Идентификацию разделенных компонентов проводили с использованием библиотеки масс-спектров NIST 98 и алгоритмов сравнения программного обеспечения Saturn WS (Varian). Количественную оценку осуществляли методом внутренней нормализации по площади пиков (полный ионный ток) идентифициро-

Таблица 1
Аминокислотный состав настоек гомеопатических матричных *Urtica urens*, *Urtica dioica*, изготовленных из свежесобранной и высушенной травы

Аминокислота	Содержание аминокислот, %											
	настойка <i>Urtica urens</i>						настойка <i>Urtica dioica</i>					
	Образец сырья 1 (свежее)		Образец сырья 2				Образец сырья 1 (свежее)		Образец сырья 2			
	Свободные	После гидролиза	свежее		сухое		Свободные	После гидролиза	свежее		сухое	
Свободные	После гидролиза	Свободные	После гидролиза	Свободные	После гидролиза	Свободные	После гидролиза	Свободные	После гидролиза	Свободные	После гидролиза	
Аспарагиновая кислота + аспарагин	0,0074	0,0101	0,0107	0,0160	0,0059	0,0071	0,0160	0,0181	0,0488	0,0494	0,0634	0,0647
Треонин	0,0018	0,0019	0,0041	0,0053	0,0012	0,0024	0,0017	0,0021	0,0119	0,0149	0,0068	0,0071
Серин	0,0021	0,0025	0,0044	0,0041	0,0020	0,0025	0,0022	0,0025	0,0135	0,0142	0,0089	0,0093
Глутаминовая кислота	0,0043	0,0027	0,0106	0,0116	0,0028	0,0034	0,0041	0,0047	0,0281	0,0426	0,0162	0,0172
Пролин	0,0009	0,0005	0,0017	0,0018	0,0020	0,0026	0,0005	0,0005	0,0058	0,0155	0,0020	0,0031
Глицин	0,0005	0,0005	0,0012	0,0024	0,0004	0,0011	0,0003	0,0005	0,0033	0,0104	0,0013	0,0032
Аланин	0,0041	0,0052	0,0076	0,0085	0,0056	0,0061	0,0022	0,0022	0,0270	0,0298	0,0086	0,0076
Цистеин	—	0,0006	—	—	—	—	0,0007	0,0008	—	0,0063	0,0027	0,0035
Валин	0,0024	0,0024	0,0025	0,0036	0,0015	0,0021	0,0020	0,0024	0,0161	0,0282	0,0080	0,0153
Метионин	—	—	—	0,0007	—	0,0006	—	—	—	—	—	—
Изолейцин	0,0015	0,0005	0,0010	0,0024	0,0004	0,0008	0,0006	0,0007	0,0099	0,0164	0,0024	0,0030
Лейцин	0,0029	0,0004	0,0039	0,0058	0,0013	0,0022	0,0003	0,0004	0,0192	0,0257	0,0014	0,0023
Тирозин	0,0010	0,0013	0,0004	0,0013	0,0001	0,0011	0,0005	0,0009	0,0065	0,0068	0,0019	0,0020
Триптофан	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Фенилаланин	0,0008	0,0008	—	0,0018	—	0,0005	0,0012	0,0018	0,0052	0,0120	0,0048	0,0048
Лизин	0,0011	0,0017	0,0008	0,0008	0,0004	0,0005	—	0,0007	0,0070	0,0146	—	0,0042
Гистидин	—	0,0001	0,0004	0,0005	—	0,0004	—	0,0001	—	0,0025	—	0,0006
Аргинин	0,0006	0,0008	0,0004	0,0012	—	0,0007	0,0004	0,0007	0,0039	0,0085	0,0014	0,0022
Суммарное содержание	0,0312	0,0320	0,0497	0,0678	0,0236	0,0341	0,0327	0,0391	0,2062	0,2978	0,1298	0,1501

ванных соединений с использованием автоматической системы обработки данных.

Результаты и их обсуждение

В исследуемых НГМ идентифицировано 18 аминокислот (табл. 1), причем в настойках *Urtica urens* преобладают аспарагиновая кислота и аспарагин, аланин, валин, лейцин; цистеин и метионин обнаружались в незначительном количестве после гидролиза, каждый только в одном из образцов настоек из свежего сырья. В НГМ *Urtica dioica* доминирующими являются аспарагиновая кислота и аспарагин, глутаминовая кислота, аланин, треонин; гистидин идентифицирован в гидролизатах настоек, что свидетельствует о нахождении этой аминокислоты в связанном виде. Метионин и триптофан во всех анализируемых пробах не обнаружены. Содержание суммы свободных аминокислот составляет в исследуемых НГМ от 0,02 до 0,21 %, связанных — от 0,032 до 0,29 %, установлено, что она выше в НГМ из свежего сырья, чем из сухого. Количество аминокислот до и после гидролиза сопоставимы, что может свидетельствовать о том, что они содержатся в НГМ преимущественно в свободном состоянии.

В результате ГЖХ-МС анализа извлечений из НГМ, полученных из травы *Urtica urens* и *Urtica dioica*, было найдено 43 вещества. Из 36 идентифицированных соединений основное количество составляют эти-

ловые эфиры жирных кислот (C14:0, C16:0, C18:1, C18:2, C18:3, C19:2 и т.д.), 9-оксононановой, гидроксикоричной и ванилиновой кислот, свободные жирные кислоты, а также ванилин, эвгенол, апиол, сквален и др.

Наряду с вышеперечисленными соединениями в исследуемых образцах НГМ впервые обнаружены производные пиразина и пиразола (табл. 2): изомеры 4-этил-4,5-дигидро-5-пропил-1Н-пиразол-1-карбоксамидегида (I) и производные гексагидропирроло[1,2-а]пиразин-1,4-диона (II) с -3-алкил и -3-фенилметил заместителями, а также 5,10-диэтокси-2,3,7,8-тетрагидро-1Н,6Н-дипирроло[1,2-а;1',2'-d]пиразин (III).

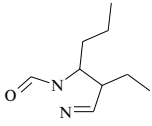
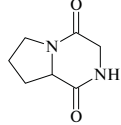
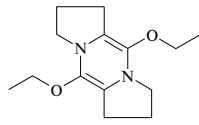
Средние значения параметров совпадения масс-спектров идентифицированных соединений при использовании алгоритма сравнения Saturn были не менее 800.

Обнаруженные соединения преимущественно содержатся в НГМ из свежей травы (образец 1) *Urtica urens*, суммарное содержание которых, по сравнению с настойками *Urtica dioica* из свежего и высушенного сырья, больше в 5 и 15 раз соответственно.

Следует отметить, что при анализе извлечения из другого образца настойки эти соединения содержались в значительно меньших количествах, вплоть до следовых, что свидетельствует о значительной вариабельности содержания данных компонентов.

Таблица 2

Производные пиразина и пиразола в липофильной фракции НГМ *Urtica dioica* L. и *Urtica urens* L.

Соединение	Время удерживания, мин	Трава <i>Urtica urens</i> (свежая) (образец сырья 1)		Трава <i>Urtica dioica</i> (образец сырья 2)				Корни <i>Urtica dioica</i>			
		Площадь пика	Содержание, %	Свежая		Сухая		Свежие		Сухие	
				Площадь пика	Содержание, %	Площадь пика	Содержание, %	Площадь пика	Содержание, %	Площадь пика	Содержание, %
	23,50	770857	20,51	—	—	—	—	—	—	—	—
I <i>m/z</i> 168	24,21	85272	2,27	613707	81,58	—	—	—	—	—	—
	-3-алкил (C ₃ H ₅)	440706	11,73	—	—	—	—	—	—	—	—
	<i>m/z</i> 196										
II	25,69	179531	4,78	—	—	—	—	—	—	—	—
	-3-алкил (C ₄ H ₇)	563431	15,99	52907	7,03	33249	65,60	33273	29,70	—	—
	26,62	804121	21,39	64389	8,56	17438	34,40	78741	70,30	53842	100
	<i>m/z</i> 210	319737	8,51	—	—	—	—	—	—	—	—
	26,82	147367	3,92	—	—	—	—	—	—	—	—
-3-фенилметил	37,30	123774	3,29	—	—	—	—	—	—	—	—
	37,76	220879	5,88	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>m/z</i> 244											
	28,37	102787	2,73	21278	2,83	—	—	—	—	—	—
III <i>m/z</i> 250											

В настойке *Urtica dioica* из свежей травы обнаружено соединение I, не найденное в настойке из высушенного сырья, в 2,3 раза больше содержится 3-алкил производных II. В настойке из свежих корней, по сравнению с таковой из высушенных, этих веществ содержится в 2 раза больше.

Известно, что дикетопиперазины (циклические дипептиды), простейшие производные пептидов, содержатся в различных природных источниках — растениях, грибах, бактериях [10 – 12], они ингибируют продукцию афлатоксина и обладают антимикробными свойствами [13, 14]. Ранее соединение II было обнаружено в пиве [15], оно является продуцентом *Lactobacillus plantarum* и обладает противогрибковыми свойствами [16], обнаружено также в грибе *Epichloe tiphina* [17]. Соединение III обнаружено методом ГХ-МС в экстракте личинок мухи *Lucilia sericata*, выявлена его антибактериальная активность в отношении *M. luteus* и *P. Aeruginosa* [18].

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. М. Вавилова, *Гомеопатическая фармакодинамика*, в 2-х частях, “Гомеопатический центр”, Смоленск, “Эверест”, Москва, ч. 1, сс. 462 – 463 (1994).
2. P. Akbay, A. A. Basaran, U. Undeger, and N. Basaran, *Phytot-her: Res.*, **17**(1), 34 – 37 (2003).
3. K. Harata, W. D. Schubert, and M. Muraki, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **57**(11), 1513 – 1517 (2001).
4. B. Obertreis, K. Giller, T. Teucher, et al., *Arzneimittelforschung*, **46**(1), 52 – 56 (1996).
5. W. Roslon, Z. Weglarz, *ISHS Acta Horticulturae 597: International Conference on Medicinal and Aromatic Plants (Part II)*, Budapest, Hungary (2003).
6. M. Schottner, D. Gansser, G. Spittler, *Planta Med.*, **63**(6), 529 – 532 (1997).
7. О. В. Сошникова, В. Я. Яцук, Г. А. Чалый, *Сб. научных трудов Пятигорской ГФА “Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции”*, Пятигорск (2004), вып. 59, сс. 216 – 217.
8. В. Я. Яцук, О. В. Сошникова, Г. А. Чалый, О. А. Елецкая, *Сб. научных трудов Пятигорской ГФА “Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции”*, Пятигорск (2005), вып. 60, сс. 75 – 76.
9. ОФС 42-0027-05 “Настойки гомеопатические матричные”.
10. C. Prasad, *Peptides*, **16**, 151 – 164 (1995).
11. F. Fdhila, V. Vazquez, J. L. Sanchez, and R. Riguera, *J. Nat. Prod.*, **66**(10), 1299 – 1301 (2003).
12. T. Stark and T. Gofmann, *J. Agric Food Chem.*, **53**(18), 7222 – 7231 (2005).
13. P. J. Milne, A. L. Hunt, K. Rostoll, et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 1331 – 1337 (1998).
14. P.-S. Yan, Y. Song, E. Sakuno, et al., *Appl. and Environ. Microbiol.*, **70**, 7466 – 7473 (2004).
15. M. Gautschi, J. P. Schmid, T. L. Peppard, et al., *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3183 – 3189 (1997).
16. K. Ström, J. Sjögren, A. Broberg, J. Schnörer, *Appl. Environm. Microbiol.*, **68**, 4322 – 4327 (2002).
17. Y. Seto, Y. Kogami, T. Shimanuki, et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**(8), 1515 – 1519 (2005).
18. K. Y. Mumcuoglu, J. Miller, M. Mumcuoglu, et al., *J. Med. Entomol.*, **38**(2), 161 – 166 (2001).

Поступила 26.03.07

AMINO ACIDS AND CYCLIC DIPEPTIDES IN STINGING NETTLE (*URTICA DIOICA* AND *URTICA URENS*) HOMEOPATHIC MATRIX TINCTURES

E. S. Lapinskaya¹, Ya. F. Kopyt'ko¹, E. A. Timochina², B. A. Krapivkin¹, G. S. Levandovskii², T. D. Dargaeva³, and T. A. Sokol'skaya⁴

¹ All-Russia Research Institute of Medicinal and Aromatic plants (VILAR), Moscow, Russia;

² All-Russia State Centre for Quality Control and Standardization of Veterinary Drugs and Nutrients, Moscow, Russia;

³ State Research and Development Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, Russia;

⁴ Main Botanical Garden, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Qualitative and quantitative content of amino acids and nitrogen-containing substances isolated from lypophylic fractions of tinctures, which were derived from both freshly collected plants and dried material of *Urtica dioica* L. and *Urtica urens* L. (herb and radix) in accordance with homeopathic technology, was studied using amino acid analyzer and GC-MS techniques. The amino acid composition includes 18 substances. The content of free amino acids amounted to 0.02 – 0.21% and that of bound amino acids was 0.03 – 0.29 %, both being higher in the tinctures obtained from freshly collected raw material. A comparison of the amino acids content before and after hydrolysis shows that amino acid are present in tinctures mostly in the free form. The analyses of tinctures showed the presence of pyrazine and pyrazole derivatives, including 4-ethyl-4,5-dihydro-5-propyl-1H-pyrazole-1-carboxaldehyde isomers (I), 3-alkyl and 3-phenylmethyl derivatives of hexahydro-pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione (II), and 5,10-diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a;1',2'-d]pyrazine (diketopiperazine) (III). These substances are contained in a greater amount in the tincture of *Urtica urens* than in that of *Urtica dioica*. The tincture of *Urtica dioica* radix contains only compounds II. These biologically active substances may contribute to the pharmacological effect of urtica-based phytopreparations.