

**Статистическая обработка метода количественного определения
 α -аминокислот в таблетках и растительном сырье**

Образец	f	$\langle x \rangle$, %	s^2	s	P, %	Δx	ε , %
Таблетки глицина	5	99,13	0,93575	0,9673	95	2,49	2,51
Шрот яблок	5	0,1703	$3,06 \cdot 10^{-6}$	$1,75 \cdot 10^{-3}$	95	0,0045	2,64
Какаовелла	5	0,1907	$4,69 \cdot 10^{-6}$	$2,16 \cdot 10^{-3}$	95	0,0056	2,9

Нами разработаны оптимальные условия выделения и очистки суммы аминокислот из растительного сырья. Кроме того, оптимизированы условия проведения нингидриновой реакции для количественного анализа α -аминокислот в исследуемых объектах.

Исходное сырье (шрот яблок, какаовелла) экстрагируется горячей водой. К полученному извлечению добавляется трехкратный объем 96 %-го этанола для осаждения балластных высокомолекулярных соединений и затем отстаивается в течение 10–12 ч при температуре 3–4 °С. Образующийся осадок отделяется центрифугированием, после чего извлечение сгущают до полного удаления спирта, перенося в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводя водой до метки. К 1,5 мл полученного водного извлечения добавляется 1,7 мл 0,2 %-го водного раствора нингидрина и нагревается при температуре 120 °С в течение 20 мин. После полного охлаждения продукт реакции необходимо разбавлять водой (2:1) и спустя 1 ч после начала реакции определять оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 400 нм. Параллельно проводится реакция свежеприготовленного 0,02 %-го раствора пролина с 0,2 %-м водным раствором нингидрина, после охлаждения продукт реакции разбавляется водой (2:1) и определяется оптическая плотность в аналогичных условиях. Следует отметить, что водные извлечения шрота яблок и какаовеллы

с нингидрином образуют стабильные продукты (за период 1–1,5 ч после начала реакции интенсивность светопоглощения снижается на 0,4 и 1,4 % соответственно).

Количественное содержание суммы аминокислот в образцах шрота яблок составило 0,17 %, какаовеллы – 0,19 % в пересчете на пролин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании изучения спектральных характеристик продуктов нингидриновой реакции и последующей оптимизации условий ее проведения разработан простой, доступный и точный метод количественного определения α -аминокислот в лекарственных препаратах и растительном сырье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У. и др. Справочник биохимика. – М., 1991. – 544 с.
2. Симонян А. В., Саламатов А. А., Покровская Ю. С. и др. // Бюлл. ВНИЦ РАМН и АВО. – 2004. – № 2. – С. 27–29.
3. ФСП 42-0025265-02-99. Глицин таблетки сублингвальные 0,1 г. – 07.06.2002.
4. Шилова И. В., Краснов Е. А., Пяк А. М. // Хим.-фарм. журн. – 2002. – Т. 36, № 11. – С. 36–38.
5. Kuryt T., Sawnor-Corszynska D. // Acta chromatogr. – 2000. – № 10. – P. 97–103.

УДК:546.46:541.48:616-092.4

ОСОБЕННОСТИ ТРЕВОЖНОГО ПОВЕДЕНИЯ У КРЫС В УСЛОВИЯХ АЛИМЕНТАРНОГО ДЕФИЦИТА МАГНИЯ И ИХ КОРРЕКЦИЯ

М. В. Харитонова, М. С. Кравченко, А. А. Желтова

НИИ фармакологии и кафедра фармакологии ВолГМУ

Существует мнение, что нарушение гомеостаза магния в организме играет немаловажную роль в патогенезе многих психических заболеваний, симптомами которых являются депрессия и повышенная тревожность [5, 9, 10]. Более того, после терапии магнием наблюдается стабилизация настроения у пациентов с биполярными расстройствами [2].

Согласно литературным данным, различные соли магния обладают разной биодоступностью [4, 8], которая может повышаться при комбинации солей с пиридоксином. При исследовании скорости компенсации алиментарного дефицита магния неорганическими и органическими солями магния [7] было показано, что наиболее активными в этом отношении из органических со-

лей является Mg L-аспарагинат, а из неорганических – Mg хлорид. Однако в литературе не описано влияние данных солей магния, в том числе и в комбинации с витамином B₆, на поведение животных в сравнительном аспекте.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Сравнительное изучение влияния Mg L-аспарагината, Mg хлорида и их комбинаций с витамином B₆ на поведение у крыс в условиях алиментарного дефицита магния.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были выполнены на 79 белых беспородных крысах самцах с исходной массой 170–250 г. Животные были разделены на группы, первая из которых составляла группу контроля ($n = 8$). Для моделирования патологических изменений у остальных крыс вызывали алиментарный дефицит магния с помощью магнийдефицитной диеты фирмы "ICN Biomedicals Inc." (Aurora, Ohio, США). Концентрацию магния в плазме крови и эритроцитах определяли спектрофотометрически по цветной реакции с титановым желтым [3]. После снижения концентрации магния ниже 1,4 ммоль/л в эритроцитах и ниже 0,7 ммоль/л в плазме исследуемые соли магния – Mg L-аспарагинат, Mg хлорид, их комбинации с витамином B₆, а также препараты сравнения магне B₆[®] (Mg лактат с витамином B₆) и Mg сульфат – вводились перорально в дозе 50 мг элементарного магния на кг веса животного в течение 21 дня до полной компенсации уровня магния в плазме и эритроцитах. Витамин B₆ добавлялся к субстанции Mg хлорида и Mg L-аспарагината в дозе 5 мг/кг.

Величину компенсации дефицита Mg (X) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{C_{\text{соли}} - C_{\text{диеты}}}{C_{\text{интактные}} - C_{\text{диеты}}} \times 100\%,$$

где $C_{\text{соли}}$ – концентрация Mg у животных после введения соли;

$C_{\text{диеты}}$ – концентрация Mg у животных, получавших Mg-дефицитную диету;

$C_{\text{интактные}}$ – концентрация Mg у животных в интактной группе.

Тревожность животных и транквилизирующее действие изучаемых солей магния оценивались с помощью метода приподнятого крестообразного лабиринта [11]. В течение двух минут наблюдения фиксировали следующие параметры: латентный период с момента высадки животного в центр лабиринта до захода в темный отсек, латентный период до первого выглядывания из темного отсека, время до выхода в светлый отсек, число посещений закрытых и открытых рукавов, время нахождения в них, количество фекальных болюсов. Увеличение количества выходов в открытые рукава и времени пребывания в них расценивалось как проявление транквилизирующего (антифобического) действия исследуемого соединения магния.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы "Statistica 6.0" с использованием непараметрического метода сравнения независимых групп по критерию Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Через 50 дней магнийдефицитной диеты у животных отмечалось снижение массы тела, потускнение шерстяного покрова, снижение концентрации магния ($p < 0,0001$) в плазме крови [(0,567±0,029) мМ/л] и эритроцитах [(0,748±0,036) мМ/л] по сравнению с контролем – (1,20±0,030) и (1,83±0,026) мМ/л соответственно.

У магнийдефицитных крыс были обнаружены следующие поведенческие изменения. В "крестообразном лабиринте" (см. табл.) животные данной группы в 2 раза дольше оставались в центральной части установки ($p = 0,023$); латентный период до выглядывания из темного отсека у них был в 3 раза дольше ($p = 0,063$), а время до выхода в светлый отсек превышало в 2 раза аналогичный период ($p = 0,0005$) у контрольной группы. Около 70 % животных, находящихся на магнийдефицитной диете, не выходили в светлые рукава. Время пребывания в светлых отсеках у диетных животных оказалось на 78,5 % меньше ($p = 0,003$), чем у контрольных. Они в 4 раза чаще оставляли после себя болюсы ($p = 0,258$).

После перорального введения изучаемых солей в течение 21 дня произошла компенсация дефицита магния в плазме крови и эритроцитах. По уровню магния в эритроцитах группы, получавшие соли магния, расположились в следующем порядке: Mg L-аспарагинат в комбинации с витамином B₆ – (2,22±0,017) мМ/л > Mg хлорид в комбинации с витамином B₆ – (2,19±0,023) мМ/л > Магне B₆[®] – (1,96±0,017) мМ/л > Mg L-аспарагинат – (1,92±0,034) мМ/л > Mg хлорид – (1,85±0,034) мМ/л > Mg сульфат – (1,69±0,013) мМ/л. При этом группы, получавшие Mg хлорид и Mg L-аспарагинат в комбинациях с витамином B₆, статистически значимо отличались как от обеих препаратов сравнения, так и от Mg хлорида и Mg L-аспарагината. В свою очередь, Mg хлорид и Mg L-аспарагинат превосходили Mg сульфат ($p < 0,0001$). Необходимо отметить, что, несмотря на статистически значимые межгрупповые различия, в группах животных, получавших препараты магния, все изменения были в пределах верхних границ физиологической нормы.

В тесте "крестообразный лабиринт" латентный период пребывания в центре у животных, получавших соли магния, сокращался. Этот показатель достоверно отличался от аналогичного периода для диеты на 59,8 % ($p = 0,003$) и 57,9 % ($p = 0,003$) для групп Mg L-аспарагината и Mg хлорида в комбинациях с пиридоксином, на 47,9 % ($p = 0,029$) для магне B₆ и 55 % ($p = 0,025$) для Mg сульфата. Латентный период до выглядывания из темного отсека после введения солей магния также восстанавливался. Лидерами по влиянию на данный параметр были Mg L-аспарагинат и

Mg хлорид в комбинациях с витамином B₆ и магне B₆. Увеличивалось число посещений темных и светлых отсеков. Удлинялось время пребывания в светлых рукавах лабиринта, особенно в группах солей, комбинированных с пиридоксином. Время нахождения в темных рукавах не изменялось.

В целом, результаты наших экспериментов согласуются с данными, полученными другими исследователями [15]. В данное время обсуждается вопрос о том, какие именно биохимические механизмы вовлечены в патогенез аффективных расстройств и на какие из них действует магний. Существуют различные точки зрения относительно механизма влияния дефицита магния на поведенческие реакции. Так, снижение уровня внеклеточного магния облегчает активацию NMDA-рецепторов, что ведет к повышению возбудимости нейронов в области гиппокампа и голубого пятна [6]. NMDA-опосредованная гиперактивность, как полагают R. Shiekhattar и G. Aston-

Jones (1992) [14], является одной из составляющих патогенеза депрессий и тревожности. Поэтому антагонисты NMDA-рецепторов или высокие дозы солей магния могут проявлять антидепрессантную активность и анксиолитический эффект [13]. В наших экспериментах исследуемые соли магния проявили наибольшую активность в комбинации с пиридоксином. Гомеостаз магния и пиридоксина тесно взаимосвязаны. С одной стороны, пиридоксин обеспечивает транспорт магния в клетку и его депонирование, с другой – магний входит в состав щелочной фосфатазы, необходимой для поступления пиридоксальфосфата в ткани [16]. Пиридоксин также является кофактором для реакций синтеза многих нейромедиаторов (серотонина, норадреналина, дофамина, ГАМК) [3]. Этим можно объяснить тот факт, что в наших исследованиях соли, комбинированные с витамином B₆, проявили максимальный эффект.

Влияние солей магния при пероральном введении (50 мг элементарного магния на кг массы) на поведение магнидефицитных крыс в тесте "крестообразный лабиринт", M±m

Группа	Латентный период нахождения в центре, с	Латентный период до вы- гляживания из темного отсека, с	Время до выхода в светлый отсек, с	Количество посещений темных отсеков	Количество посещений светлых отсеков	Время пребывания в светлом отсеке, с	Время пребывания в темном отсеке, с	Количество болюсов
Интактные	7,86±1,76 (n=8)	30,57±5,59 (n=8)	55,43±4,14 (n=8)	1,57±0,22 (n=8)	1,00±0,00 (n=8)	9,71±1,74 (n=8)	102,43±2,53 (n=8)	0,71±0,39 (n=8)
Диета	15,82±2,24* (n=10)	79,18±14,96* (n=10)	110,82±4,64* (n=10)	1,00±0,00* (n=10)	0,36±0,16* (n=10)	2,09±1,01** (n=10)	102,09±2,53 (n=10)	2,64±1,03 (n=10)
Mg L-аспарагинат в комбинации с витамином B ₆	6,36±1,44** (n=11)	28,34±1,32**, [¶] , [‡] , [#] (n=11)	27,27±2,89**,* [‡] , [‡] , [#] (n=11)	2,46±0,22**,* [‡] , [‡] (n=11)	1,82±0,28** (n=11)	18,55±1,81**,* [‡] , [‡] , [#] (n=11)	95,09±2,32**,* [‡] (n=11)	0,55±0,33 (n=11)
Mg хлорид в комбинации с витамином B ₆	6,67±1,34** (n=9)	31,89±1,07**, [¶] , [‡] , [#] (n=9)	41,44±2,17**,* [‡] , [‡] , [#] (n=9)	1,78±0,34** (n=9)	1,56±0,26** (n=9)	9,44±1,08**, [‡] , [#] (n=9)	103,89±1,72 [§] (n=9)	1,11±0,48 (n=9)
Mg L-аспарагинат	11,44±5,02 (n=9)	35,33±1,28**, [‡] , [‡] (n=9)	27,22±6,70**,* [‡] , [‡] , [#] (n=9)	2,22±0,52**,* (n=9)	1,33±0,25** (n=9)	14,67±2,28**,* [‡] , [‡] (n=9)	93,89±6,22 [‡] (n=9)	0,33±0,18 (n=9)
Mg хлорид	9,73±1,71 (n=11)	37,36±1,10 [‡] (n=11)	46,27±1,80**, [‡] (n=11)	1,55±0,17** (n=11)	1,55±0,16** (n=11)	9,27±0,71**, [‡] , [‡] (n=11)	101,00±1,64 (n=11)	0,46±0,17 (n=11)
магне B ₆ [®]	8,25±3,19** (n=11)	31,08±1,22**, [‡] (n=11)	39,42±3,65**,* (n=11)	1,83±0,36** (n=11)	1,33±0,20** (n=11)	14,00±1,07**, [‡] , [‡] (n=11)	97,75±3,07 [‡] (n=11)	0,33±0,27 (n=11)
Магния сульфат	7,11±2,66** (n=9)	40,78±1,24 (n=9)	54,89±3,20** (n=9)	1,11±0,12 (n=9)	1,11±0,12** (n=9)	7,00±0,83** (n=9)	105,89±3,03 (n=9)	0,89±0,37 (n=9)
Kruskal-Wallis test	H(7,N=79)=12,98182 p=0,0726	H(7,N=79)=3,02198 p=0,0000	H(7,N=79)=55,07888 p=0,0000	H(7,N=79)=24,67945 p=0,0009	H(7,N=79)=30,00712 p=0,0001	H(7,N=79)=49,09410 p=0,0000	H(7,N=79)=12,72464 p=0,0791	H(7,N=79)=9,986785 p=0,1894

* – отличия достоверны от контроля; ** – отличия достоверны от группы животных с экспериментальной патологией; [§] – достоверно от группы животных, получавших Mg L-аспарагинат с витамином B₆; [¶] – достоверно от группы животных, получавших Mg L-аспарагинат; [#] – достоверно от группы животных, получавших Mg хлорид; [‡] – достоверно от группы животных, получавших Магне B₆[®] (Mg лактат с витамином B₆); [†] – отличия достоверны от группы животных, получавших Mg сульфат.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследований было подтверждено, что дефицит магния у крыс приводит к повышению уровня тревожности. Также было установлено, что при пероральном введении солей магния происходит компенсация дефицита магния. По эффективности коррекции дефицита соли можно расположить в следующем порядке: Mg L-аспарагинат в комбинации с витамином B₆ ≥ Mg хлорид в комбинации с витамином B₆ ≥ магне B₆[®] > Mg L-аспарагинат > Mg хлорид > Mg сульфат. В тесте "крестообразный лабиринт" под действием солей магния уменьшалась продолжительность латентного периода до выгладывания из темного отсека, увеличивалось число посещений темных и светлых рукавов лабиринта. При этом лидерами по большинству показателей оказались Mg L-аспарагинат и Mg хлорид в комбинациях с витамином B₆, которые по эффективности оказались сопоставимы с препаратом сравнения магне B₆[®] и значительно превосходили Mg сульфат.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Меньшиков В. В.* Лабораторные методы исследования в клинике. – М.: Медицина, 1987.
2. *Chouinard G., Beauclair L., Geiser R., et al.* // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. – 1990. – Vol. 14. – P. 171–180.
3. *Dakshinamurti K., Paulose C. S., Viswanathan M., et al.* // Neurosci. Biobehav. Rev. – 1988. – Vol. 12. – P. 189–193.
4. *Firoz M., Graber M.* // Magnes. Res. – 2001. – Vol. 14, № 4. – P. 257–262.
5. *Grimaldi B. L.* // Med. Hypotheses. – 2002. – Vol. 58. – P. 47–60.
6. *Grunze H., Walden J.* // Magnes. Res. – 1997. – Vol. 10. – P. 119–126.
7. *Iezhitsa I. N., Spasov A. A., Kravchenko M. S., et al.* // J. Japan. Soc. Magnes. Res. – 2006. – Vol. 25, № 2. – P. 99 (153).
8. *Kiss Z.* // Magnes. Res. – 2006. – Vol. 19, № 1. – P. 72.
9. *Murck H.* // Nutr. Neurosci. – 2002. – Vol. 5. – P. 375–389.
10. *Murck H.* // Acta Neuropsychiatrica. – 2003. – Vol. 15. – P. 227–241.
11. *Pellow S., Chopin P., File S., et al.* // J. Neurosci. Res. Method. – 1985. – Vol. 14, № 3. – P. 149–167.
12. *Planells E., Lerma A., Sanchez-Morito N., et al.* // J. Am. Coll. Nutr. – 1997. – Vol. 16, № 4. – P. 352–356.
13. *Poleszak E., Szewczyk B., Kedzierska E., et al.* // Pharmacol. Biochem. Behav. – 2004. – Vol. 78 – P. 7–12.
14. *Shiekhhattar R., Aston-Jones G.* // Synapse. – 1992. – Vol. 10. – P. 103–109.
15. *Singewald N., Sinner C., Hetzenauer A., et al.* // Neuropharm. – 2004. – Vol. 47. – P. 1189–1197.