

Порівняльне оцінювання вмісту амінокислот деяких видів бобових флори півдня України

О. В. Гречана^{1,B,C,D}, А. Г. Сербін^{2,A,F}, А. М. Руднік^{1,B,C},
І. М. Шевченко^{1,A,E}, О. О. Салій^{3,E,F}

¹Запорізький державний медичний університет, Україна, ²Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна, ³Київський національний університет технологій та дизайну, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Актуальним є аналіз відомостей щодо складу амінокислот та їхньої кількості в сировині п'ятьох видів представників родини Бобові, що ростуть у флорі півдня України (*Securigera varia* (L.) Lassen – в'язіль різнокольоровий (строкатий), *Vicia cracca* L. – віка мишача, *Lupinus luteus* L. – люпин жовтий, *Melilotus officinalis* (L.) Pall. – буркун лікарський, *Melilotus albus* Medic. – буркун білий), як джерел отримання амінокислот, особливо незамінних, ресурс яких має поповнюватися ззовні.

Мета роботи – вивчити та порівняти амінокислотний профіль деяких видів бобових флори півдня України, виконати багатовимірний статистичний кластерний аналіз і побудувати гістограми за результатами визначення вмісту та складу амінокислот у *Securigera varia* (L.) Lassen, *Vicia cracca* L., *Lupinus luteus* L., *Melilotus officinalis* (L.) Pall. та *Melilotus albus* Medic.

Матеріали та методи. Висушену сировину, що заготовили на півдні України, досліджували методом газо-рідинної хроматографії з використанням амінокислотного аналізатора після гідролізу хлоридною кислотою за підвищеної температури.

Результати. Визначили 19 амінокислот, дев'ять із них незамінні або частково замінні. Серед незамінних найбільший вміст встановили для неполярної амінокислоти пролін (сумарно 6932 мг/100 г), здатність до її накопичення виявили у буркуна лікарського (2276 мг/100 г). Найменшу кількість проліну встановили в люпині жовтому (388 мг/100 г). У рослинах, які аналізували, найменший вміст мала сульфурвмісна неполярна амінокислота метіонін (сумарно 506 мг/100 г). Привертає увагу відсутність у деяких рослинах замінної полярної амінокислоти глутаміну: її не містять в'язіль строкатий, віка мишача та буркун лікарський. Найбільша концентрація речовин цієї природи встановлена для полярної кислоти аспарагінової (сумарно 6824 мг/100 г): найвищий показник – у віки мишачої, найменший – у буркуна білого (2660 мг/100 г та 385 мг/100 г відповідно).

Висновки. Аналіз наявності та кількості амінокислот – підґрунтя для багатовимірного статистичного кластерного аналізу та побудови гістограм презентації амінокислотного профілю представників родини *Fabaceae* L. Під час побудови дендрограми визначили три кластери, представники одного роду (*Melilotus* L.) визначили в різних кластерах, що має значення для наступних хемосистематичних досліджень.

Ключові слова:
амінокислотний вміст, газо-рідинна хроматографія, кластерний аналіз.

Запорізький медичний журнал.
2021. Т. 23, № 4(127).
С. 541-546

*E-mail:
1310grecanaya@
ukr.net

Comparative assessment of the amino acids content of some legumes species in Southern Ukraine

O. V. Hrechana, A. H. Serbin, A. M. Rudnik, I. M. Shevchenko, O. O. Saliy

The data on the composition and amount of amino acids have been analyzed in the raw materials of five legume species. All of them grow in Southern Ukrainian flora (*Securigera varia* (L.) Lassen, *Vicia cracca* L., *Lupinus luteus* L., *Melilotus officinalis* (L.) Pall., *Melilotus albus* Medic.) and may be used as a source of amino acids, especially essential, whose resource has to be replenished from the outside.

Aim. We have studied and compared the amino acid profile of some species of the Ukrainian South Legumes, and used the multidimensional statistical cluster analysis to construction of histograms based on the amino acids content and composition of such plants as: *Securigera varia* (L.) Lassen, *Vicia cracca* L., *Lupinus luteus* L., *Melilotus officinalis* (L.) Pall., *Melilotus albus* Medic.

Materials and methods. The raw materials were harvested at the South of Ukraine and were investigated by gas-liquid chromatography. The amino acid analyzer has been used after hydrochloric acid hydrolysis at elevated temperature.

Results. 19 amino acids have been identified, of which nine are essential or partially interchangeable. The non-polar amino acid proline is in the lead in terms of quantity among the essential amino acids. Its amount was 6932 mg/100 g and the ability to accumulate it was noted in *Melilotus officinalis* (2276 mg/100 g). The smallest proline amount was found in *Lupinus luteus* (388 mg/100 g). The sulfur-containing non-polar amino acid methionine is in the smallest amount in the selected plants (506 mg/100 g). Our attention was drawn to the absence of the polar amino acid glutamine among the non-essential amino acids in some plants. *Securigera varia*, *Vicia cracca*, and *Melilotus officinalis* did not contain glutamine. In this subgroup, the polar aspartic acid was found in the highest amount (6824 mg/100 g) with the highest content in *Vicia cracca* and the lowest – in *Melilotus albus* (2660 mg/100 g and 385 mg/100 g, respectively).

Conclusions. The analysis of the presence and number of amino acids was the basis for our multidimensional statistical cluster analysis and histograms of the presentation of the amino acid profile of the studied plant members of the family *Fabaceae* L. In constructing the dendrogram, three clusters were identified, and representatives of one genus (*Melilotus* L.) were attributed to different clusters which is significant for further chemosystematic studies.

Key words:
amino acid content, gas-liquid chromatography, cluster analysis.

Zaporozhye medical journal
2021; 23 (4), 541-546

Ключевые слова:
содержание
аминокислот,
газо-жидкостная
хроматография,
кластерный анализ.

Запорожский
медицинский журнал.
2021. Т. 23, № 4(127).
С. 541-546

Сравнительная оценка состава аминокислот некоторых видов бобовых флоры юга Украины

Е. В. Гречаная, А. Г. Сербин, А. М. Рудник, И. Н. Шевченко, Е. А. Салий

Актуальный анализ данных о составе и количестве аминокислот в представителях семейства бобовые флоры южной части Украины (*Securigera varia* (L.) Lassen, *Vicia cracca* L., *Lupinus luteus* L., *Melilotus officinalis* (L.) Pall. и *Melilotus albus* Medic.) как структурных компонентов белков, особенно незаменимых, ресурс которых должен пополняться извне.

Цель работы – изучить и сравнить аминокислотный профиль некоторых видов бобовых флоры юга Украины, провести многомерный статистический кластерный анализ и построить гистограммы, исходя из данных о содержании и количестве аминокислот в *Securigera varia* (L.) Lassen, *Vicia cracca* L., *Lupinus luteus* L., *Melilotus officinalis* (L.) Pall. и *Melilotus albus* Medic.

Материалы и методы. Высушенное сырье, заготовленное на юге Украины, исследовали методом газо-жидкостной хроматографии с использованием аминокислотного анализатора. Предварительно проводили гидролиз кислотой хлоридной при повышенной температуре.

Результаты. Определили 19 аминокислот, девять из них относят к незаменимым или частично заменимым. Среди незаменимых лидирует неполярная аминокислота пролин (суммарно – 6932 мг/100 г), максимальную способность к её накоплению показал *Melilotus officinalis* – донник лекарственный (2276 мг/100 г). Наименьшее количество пролина определили в *Lupinus luteus* (388 мг/100 г). В изучаемых растениях наименьшее содержание установлено для сульфурсодержащей неполярной аминокислоты метионин (суммарно 506 мг/100 г). Обращает внимание отсутствие в некоторых изучаемых растениях заменимой полярной аминокислоты глутамина: её не содержат *Securigera varia*, *Vicia cracca* и *Melilotus officinalis*. Наибольшее содержание веществ этой природы отмечено для кислоты аспарагиновой (6824 мг/100 г). Среди этой подгруппы в изучаемых объектах в наибольшем количестве была обнаружена полярная кислота аспарагиновая (суммарно 6824 мг/100 г): наибольший показатель – у *Vicia cracca*, наименьший – у *Melilotus albus* (2660 мг/100 г и 385 мг/100 г соответственно).

Выводы. Наличие и количество аминокислот в объектах исследования – основа для проведения многомерного статистического кластерного анализа и гистограмм презентации аминокислотного профиля представителей семейства *Fabaceae* L. При построении дендрограммы определены три кластера, представители одного рода (*Melilotus* L.) отнесены к разным кластерам, что имеет значение для дальнейших хемосистематических исследований.

Рослини – багате джерело амінокислот [1]. Індивідуальний уміст амінокислот у рослинах має важливе значення, особливо з погляду медицини [2,3]. Створення бази даних щодо вмісту амінокислот у рослинах – важливе завдання. Транслокація амінокислот між різними органами відбувається за допомогою ксилеми та флоєми: вони є будівельним матеріалом для білків і впливають на біохімічні шляхи росту, розвитку, стійкості до стресу та передачі сигналів [4,5].

В організмі людини амінокислоти необхідні для обмінних процесів, а також для транспортування та зберігання всіх поживних речовин: вуглеводів, білків, вітамінів, мінералів, води і жирів [6]. Такі патології, як цукровий діабет, безсоння, ожиріння та артрит спричиняються порушенням обміну речовин. Цистеїн застосовують у хіміотерапії лейкемії, L-пролін є осмопротектором, і тому його використовують у багатьох фармацевтичних і біотехнологічних програмах [7].

Понад 60 % білків, необхідних людині для росту та розвитку, надходять із рослинних ресурсів [8]. Багато сучасних публікацій щодо амінокислот рослинного походження та їхньої кількості в рослинах актуалізували дослідження та вивчення складу амінокислот рослин із широким ареалом, достатніми ресурсними запасами на території України: *Securigera varia* (L.) Lassen (в'язіль різнокольоровий), *Vicia cracca* L. (віка мишача), *Lupinus luteus* L. (люпин жовтий), *Melilotus officinalis* (L.) Pall. (буркун лікарський) і *Melilotus albus* Medic (буркун білий).

Мета роботи

Вивчити та порівняти амінокислотний профіль деяких видів бобових флори півдня України, виконати багатовимірний статистичний кластерний аналіз і побудувати

гістограми за результатами визначення вмісту та складу амінокислот у *Securigera varia* (L.) Lassen, *Vicia cracca* L., *Lupinus luteus* L., *Melilotus officinalis* (L.) Pall. і *Melilotus albus* Medic.

Матеріали і методи дослідження

Рослинний матеріал (траву) заготовляли в період активного цвітіння рослини (червень – серпень 2018–2020 рр.) у передмісті Запоріжжя (Василівський і Бердянський райони). Сушили траву природним способом у добре провітрюваному, захищеному від сонця місці.

Стандарти та реактиви для здійснення досліджень використовували класу «ч. д. а.» або «х. ч.». Воду використовували дистильовану, двічі свіжоперегнану [8].

Для підтвердження якісного та визначення кількісного складу біологічно активних амінокислот використали методику, запропоновану Штейном і Муром методом високоефективної рідинної хроматографії на приладі ААА 400 (Чеська Республіка). Метод заснований на екстракції вільних амінокислот із рослинної сировини, кислотному гідролізі рослинних препаратів із наступним аналізом гідролізатів методом газо-рідинної хроматографії з передколонковою дериватизацією та наступною детекцією флуоресцентним детектором.

Пробопідготовка рослинної сировини: наважку сировини 0,1 г, подрібненої до порошкоподібного стану, поміщали у віалу, додавали 2 мл водного розчину 6 М хлоридної кислоти та поміщали в термостат за температури 110 °С. Гідроліз виконували протягом 24 годин. Пробірку охолоджували, вміст пробірки фільтрували в колбу зі шліфом. 0,5 мл відфільтрованого екстракту/гідролізату випаровували на роторному випаровувачі, тричі промиваючи водою очищеною Р для видалення кислоти хлоридної; темпе-

Таблиця 1. Склад амінокислот (мг/100 г) та їхня характеристика

№	Характеристика	Амінокислота	<i>Sec. varia.</i>	<i>Lup. luteus</i>	<i>Vicia gracca</i>	<i>M. offic.</i>	<i>M. alba</i>	Сума
1	Полярна, основна, незамінна	Аргінін	542	124	631	817	250	2364
2	Полярна, незамінна	Треонін	521	186	705	883	283	2578
3	Неполярна, незамінна	Ізолейцин	324	80	286	417	66	1173
4	Неполярна, незамінна	Лейцин	915	199	890	1299	314	3617
5	Неполярна, незамінна	Пролін	1355	388	1417	2276	1496	6932
6	Неполярна, незамінна	Метіонін	113	27	136	174	56	506
7	Неполярна, незамінна	Валін	484	128	542	736	222	2112
8	Полярна, основна, незамінна	Лізін	673	147	890	1069	111	2890
9	Полярна, основна, незамінна	Гістидін	322	91	435	497	301	1646
10	Полярна, замінна	Глутамін	0	22	0	0	16	38
11	Неполярна, замінна	Оксипролін	220	57	265	174	103	819
12	Полярна, кисла, замінна	Аспарагінова кислота	439	840	2660	2500	385	6824
13	Полярна, замінна	Серин	798	275	1177	1140	356	3746
14	Полярна, кисла, замінна	Глутамінова кислота	613	245	2118	1924	236	5136
15	Полярна, замінна	Тирозин	578	128	562	718	313	2299
16	Неполярна, замінна	Гліцин	1047	258	1034	1203	485	4000
17	Неполярна, замінна	Аланін	640	219	1192	1300	161	3512
18	Неполярна, замінна	Фенілаланін	714	193	3569	1075	720	6271
19	Неполярна, замінна	Цистеїн	8	23	9	24	10	74
Загалом, мг/100 г			10306	3630	18519	18227	5883	56565

ратура водяної бані – 40 °С. Ресуспендували в 0,5 мл води очищеної Р і фільтрували через мембранні фільтри з регенованої целюлози з порами 0,2 мкм. Сухий залишок розчиняли в цитратному буферному розчині (рН 2,2) і вводили в колонку приладу (100 мкл зразка).

Суміш амінокислот хроматографічно розділяли на окремі компоненти на рідинному хроматографі Agilent 1200 (Agilent technologies, USA). Аналітична колонка Zorbax AAA з катіонітом LG ANB має довжину 150 мм, внутрішній діаметр 4,6 мм і діаметр зерна сорбенту 3 мкм. Мобільна фаза А – 40 mM Na₂HPO₄ рН 7,8; В – АСН: MeOH: water (45:45:10, v/v/v). Режим розділення градієнтний із постійною швидкістю потоку 1,5 мл/хв. Температура термостату колонки – 40 °С. Передколону дериватизацію виконали в автоматичному програмованому режимі, використовуючи 0,4 % розчин β-меркаптоетанолу. Детекцію дериватизованих амінокислот реалізували за допомогою флуоресцентного детектора. Електронний інтегратор, який приєднаний до виходу аналізатора, фіксував час виходу та площу піка кожної амінокислоти.

Калібрування приладу здійснили за результатами 2–3 аналізів стандартної суміші амінокислот.

Вміст амінокислоти X (мг %) в аналізованому зразку обчислювали за площею її хроматографічного піка за формулою 1. Вміст зв'язаних амінокислот визначали шляхом віднімання вільних амінокислот від їхнього загального показника.

$$X = \frac{S_{on} \times K \times M_b}{S_{cm}}, \quad (1)$$

де S_{on} – площа піка амінокислоти у зразку;

S_{cm} – площа піка амінокислоти у стандартній суміші;

K – коефіцієнт, який враховує наважку та розведення зразка;

M_b – молекулярна маса амінокислоти.

Результати

Результати шести визначень опрацювали методом варіаційної статистики [9,10].

Результати, наведені на рис. 1–3 і в таблиці 1, показали: в надземній частині рослин представників родини Бобові в період цвітіння містилися 19 амінокислот, у тому числі й незамінні [10,11].

Обговорення

Найвищий показник мала *Vicia gracca* L. (18519 мг/100 г або 32,74 % загальної кількості амінокислот); 3630 мг/100 г містив *Lupinus luteus* L. – це найменший показник (6,4 %).

П'ять зразків видів родини Бобові відрізнялися за кількістю амінокислот.

Пролін вважають амінокислотою, що є показником стресового стану рослини. Накопичення цієї сполуки підтверджує зростання та адаптацію рослин до температурного стресу [12].

У вивченні амінокислотного складу будь-якого об'єкта привертають увагу склад і кількість незамінних амінокислот [13,14]. Усі об'єкти нашого дослідження містили незамінні амінокислоти, які мають надходити ззовні для поповнення запасів, що постійно витрачаються в різних кількостях, а це в сумі становить 23 739 мг/100 г (41,97 % від загальної маси) [14]. Певні відмінності встановили і в загальному профілі, і за незамінними амінокислотами: їхня кількість коливається від 27 мг/100 г метіоніну в люпину жовтому до 2276 мг/100 г проліну в буркуні лікарському [1,15].

За результатами кількісного аналізу амінокислот виконали кластерний аналіз, мета якого полягала в розподілі за вмістом і профілем амінокислот на класи (кластери), кожен із них має певний рівень обраних показників. Види, що потрапили до одного кластера, характеризуються максимально подібною картиною щодо амінокислотного профілю, а інші елементи кластерів відрізнялися.

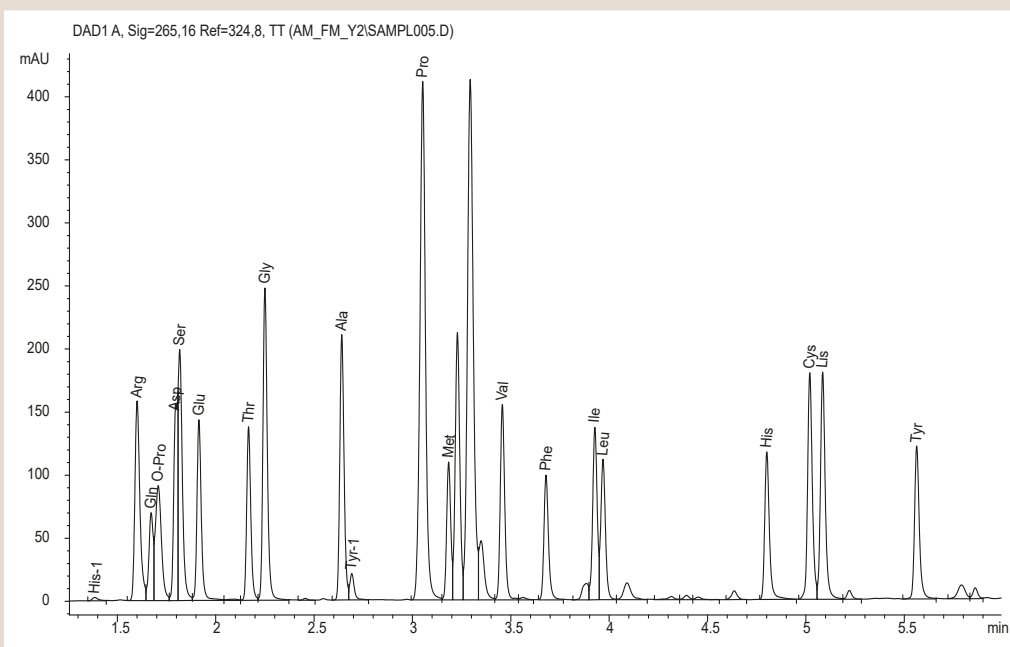


Рис. 1. Амінограма суміші стандартів амінокислот.

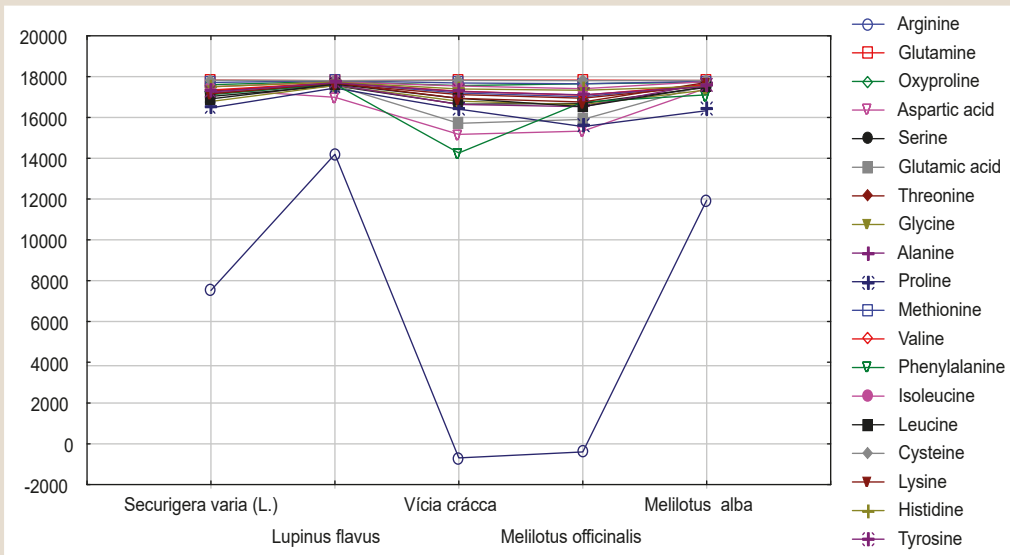


Рис. 2. Лінійний графік складу та вмісту амінокислот.

Однорідні та неоднорідні сукупності розподіляли групуванням і класифікацією (статистичними методами) на групи за істотними ознаками, котрі широко використовують у багатьох сферах. Багатомірне групування здійснювали кластеризацією, що дало змогу дослідити великий обсяг інформації, який стосується чималої кількості різноманітних ознак, що характеризують сукупність об'єктів, і стиснути цю інформацію до зручних, наочних розмірів.

Для здійснення аналізу використали програму Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., № JPZ8041382130ARCN10-J), що містить усі відомі методи статистичного аналізу даних. Це дало змогу зробити процес дослідження ефективнішим і простішим. Використали метод ієрархічної класифікації, що характеризується побудовою ієрархічної (деревоподібної) структури (дендрограми), та двохідне об'єднання, яке передбачає одночасну кластеризацію за змінними та результатами

спостережень. У нашому випадку дендрограму побудували методом поодинокого зв'язку для сукупності кількостей амінокислот у мг/100 г (arginine, glutamine, oxypoline aspartic acid, serine, glutamic acid, threonine, glycine, alanine, proline, methionine, valine, phenylalanine, isoleucine, leucine, cysteine, lysine, histidine, and tyrosine), змінних у 5 видах рослин (*Securigera varia* (1), *Vicia cracca* (2), *Lupinus luteus* (3), *Melilotus officinalis* (4), *Melilotus alba* (5)).

Під час кластеризації як адекватну міру близькості між об'єктами дослідження обрали «евклідову відстань».

Після вибору міри близькості обирали правило об'єднання об'єктів у кластери. Для кластеризації застосували метод одинарного зв'язку (Single Linkage), який називають методом «найближчого сусіда» (Nearest Neighbor), та двохідного об'єднання (Two Way Joining) як перевіреного та такого, що вказує на внесок кожного компонента в об'єднання.

Результати кластеризації наведені як дендрограми з наочним зображенням близьких окремих об'єктів (видів), кластерів, що показує послідовність об'єднання (рис. 4, 5). У дендрограмі на вертикальній осі показані відстані схожості, на горизонтальній – об'єкти класифікації (види родини Бобові).

За даними дендрограм, побудованих за показниками амінокислотного складу, визначили три первинні кластери. Цікавим є розподіл на кластерні групи – відбувається роз'єднання на різні кластери представників одного роду *Melilotus*, а відстань буркуна за дендрограмою до сусіда за кластером віки мишачої дорівнювала відстані між білим буркуном і люпином жовтим. На більшій відстані від цієї кластерної «пари» приєднується єдиний представник третього кластера – в'язіль різнокольоровий. Вочевидь, різний зв'язок між видами одного роду підтверджує еволюційні роз'єднувальні внутрішньородові процеси або різні здатності до експансії.

Висновки

1. Аналіз наявності та кількості амінокислот – основа для здійснення багатовимірного статистичного кластерного аналізу та побудови гістограм презентації амінокислотного профілю представників родини *Fabaceae* L.

2. Під час побудови дендрограми визначили три кластери, представники одного роду (*Melilotus* L.) віднесено до різних кластерів, що має значення для наступних хемосистематичних досліджень.

Перспективи подальших досліджень полягають у дослідженні амінокислотного профілю інших представників флори півдня України для встановлення хемосистематичних зв'язків.

Фінансування

Дослідження виконано в рамках НДР кафедри фармакогнозії, фармакології і ботаніки ЗДМУ.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 31.03.2021

Після доопрацювання / Revised: 17.05.2021

Прийнято до друку / Accepted: 21.05.2021

Відомості про авторів:

Гречана О. В., канд. фарм. наук, доцент каф. фармакогнозії, фармакології та ботаніки, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-1756-6372](https://orcid.org/0000-0002-1756-6372)

Сербін А. Г., д-р фарм. наук, професор каф. ботаніки, Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-6247-7520](https://orcid.org/0000-0002-6247-7520)

Руднік А. М., канд. фарм. наук, доцент каф. фармакогнозії, фармакології та ботаніки, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0003-2860-0967](https://orcid.org/0000-0003-2860-0967)

Шевченко І. М., канд. фарм. наук, старший викладач каф. фармакогнозії, фармакології та ботаніки, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Салій О. О., канд. фарм. наук, доцент каф. промислової фармації, Київський національний університет технологій та дизайну, Україна.

ORCID ID: [0000-0001-7103-2083](https://orcid.org/0000-0001-7103-2083)

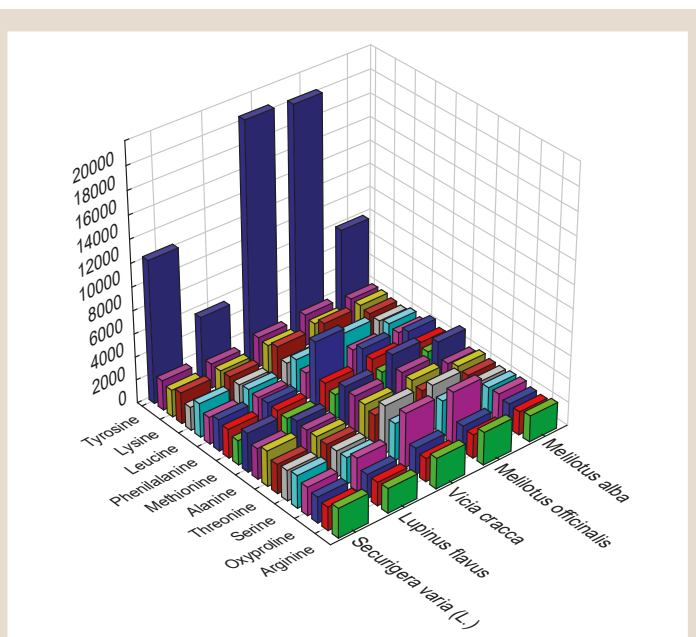


Рис. 3. Послідовна 3М діаграма складу та вмісту амінокислот.

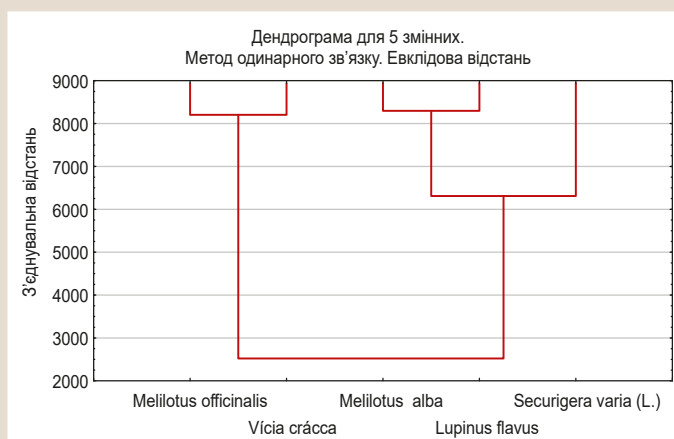


Рис. 4. Дендрограма 5 видів родини Бобові.

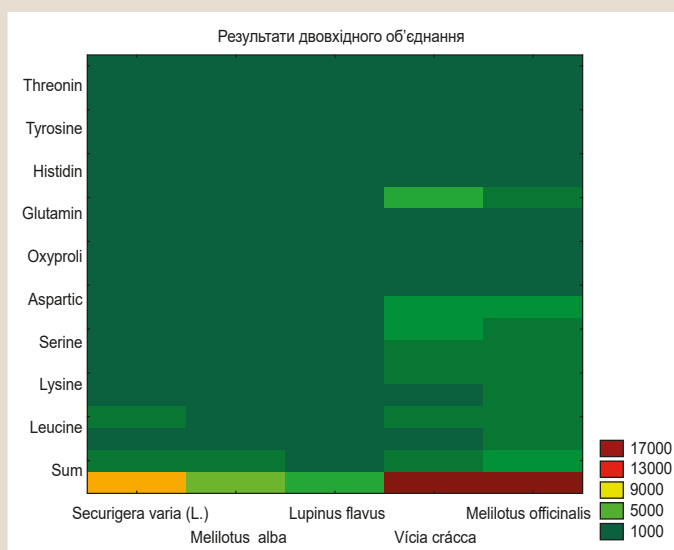


Рис. 5. Дендрограма 5 видів родини Бобові (двовідне об'єднання).

Information about authors:

Hrechana O. V., PhD, Associated Professor of the Department of Pharmacognosy, Pharmacology and Botany, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Serbin A. H., PhD, DSc, Professor of the Department of Botany, National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine.

Rudnik A. M., PhD, Associated Professor of the Department of Pharmacognosy, Pharmacology and Botany, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Shevchenko I. M., Senior Lecturer of the Department of Pharmacognosy, Pharmacology and Botany, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Salii O. O., PhD, Associated Professor of the Department of Industrial Pharmacy, Kyiv National University of Technologies and Design, Ukraine.

Сведения об авторах:

Гречаная Е. В., канд. фарм. наук, доцент каф. фармакогнозии, фармакологии и ботаники, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Сербин А. Г., д-р фарм. наук, профессор каф. ботаники, Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина.

Рудник А. М., канд. фарм. наук, доцент каф. фармакогнозии, фармакологии и ботаники, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Шевченко И. Н., канд. фарм. наук, старший преподаватель каф. фармакогнозии, фармакологии и ботаники, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Салий Е. А., канд. фарм. наук, доцент каф. промышленной фармации, Киевский национальный университет технологий и дизайна, Украина.

Список літератури

- [1] Comparative Investigation of Amino Acids Content in the Dry Extracts of *Juno bucharica*, *Gladiolus Hybrid Zefir*, *Iris Hungarica*, *Iris Variegata* and *Crocus Sativus* Raw Materials of Ukrainian Flora / O. Mykhailenko et al. *Scientia Pharmaceutica*. 2020. Vol. 88. Issue 1. P. 8. <https://doi.org/10.3390/scipharm88010008>
- [2] Rodrigues-Corrêa K. C. da S., Fett-Neto A. G. Abiotic Stresses and Non-Protein Amino Acids in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2019. Vol. 38. Issue 5-6. P. 411-430. <https://doi.org/10.1080/07352689.2019.1707944>
- [3] Prasad K. HPLC Analysis of Amino Acid and Antioxidant Composition of Three Medicinal Plants of (Pithoragarh) Uttarakhand Himalayas. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*. 2017. Vol. 6. Issue 6. P. 00186. <https://doi.org/10.15406/japlr.2017.06.00186>
- [4] O'Neill K. C., Lee Y. J. Visualizing Genotypic and Developmental Differences of Free Amino Acids in Maize Roots With Mass Spectrometry Imaging. *Frontiers in Plant Science*. 2020. Vol. 11. P. 639. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00639>
- [5] Kolkisaoglu Ü. D-amino Acids in Plants: Sources, Metabolism, and Functions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21. Issue 15. P. 5421. <https://doi.org/10.3390/ijms21155421>
- [6] Recovery of protein from green leaves: Overview of crucial steps for utilisation / Tamayo Tenorio A. et al. *Food Chemistry*. 2016. Vol. 203. P. 402-408. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.092>
- [7] Differential distribution of amino acids in plants / V. Kumar et al. *Amino Acids*. 2017. Vol. 49. Issue 5. P. 821-869. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2401-x>
- [8] Grechana O V., Serbin A. G. Study of native extracts from raw lupin yellow and alfalfa yellow (like-sickle or Romanian) by chromat mass spectrometry. *Journal of Chemistry and Technologies*. 2018. Vol. 26. Issue 2. P. 39-44. <https://doi.org/10.15421/0817260205>
- [9] Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Наук.-експерт. фармакопейний центр». 1-е вид. Харків : PIPEF, 2001. 556 с.
- [10] High-throughput analysis of amino acids in plant materials by single quadrupole mass spectrometry / R. Dahl-Lassen et al. *Plant Methods*. 2018. Vol. 14. P. 8. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0277-8>
- [11] A novel mass spectrometry-based method for simultaneous determination of asymmetric and symmetric dimethylarginine, l-arginine and l-citrulline optimized for LC-MS-TOF and LC-MS/MS / J. Wiśniewski et al. *Biomedical Chromatography*. 2017. Vol. 31. Issue 11. P. e3994. <https://doi.org/10.1002/bmc.3994>
- [12] Dotsenko G., Lange L. Enzyme Enhanced Protein Recovery from Green Biomass Pulp. *Waste and Biomass Valorization*. 2017. Vol. 8. P. 1257-1264. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9718-7>
- [13] Gallii G., Amir R., Fernie A. R. The Regulation of Essential Amino Acid Synthesis and Accumulation in Plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2016. Vol. 67. P. 153-178. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112213>
- [14] Targeted modification of storage protein content resulting in improved amino acid composition of barley grain / M. S. Sikdar et al. *Transgenic Research*. 2016. Vol. 25. Issue 1. P. 19-31. <https://doi.org/10.1007/s11248-015-9911-7>
- [15] Comparative study on the composition of free amino acids and derivatives in the two botanical origins of an edible Chinese herb "Xiebai", i.e., *Allium chinense* G. Don and *Allium macrostemon* Bunge species / Q. He et al. *Food Research International*. 2018. Vol. 106. P. 446-457. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.007>

References

- [1] Mykhailenko, O., Ivanauskas, L., Bezruk, I., Lesyk, R., & Georgiyants, V. (2020). Comparative Investigation of Amino Acids Content in the Dry Extracts of *Juno bucharica*, *Gladiolus Hybrid Zefir*, *Iris Hungarica*, *Iris Variegata* and *Crocus Sativus* Raw Materials of Ukrainian Flora. *Scientia Pharmaceutica*, 88(1), Article 8. <https://doi.org/10.3390/scipharm88010008>
- [2] Rodrigues-Corrêa, K. C. da S., & Fett-Neto, A. G. (2019). Abiotic Stresses and Non-Protein Amino Acids in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 38(5-6), 411-430. <https://doi.org/10.1080/07352689.2019.1707944>
- [3] Prasad, K. (2017). HPLC Analysis of Amino Acid and Antioxidant Composition of Three Medicinal Plants of (Pithoragarh) Uttarakhand Himalayas. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 6(6), Article 00186. <https://doi.org/10.15406/japlr.2017.06.00186>
- [4] O'Neill, K. C., & Lee, Y. J. (2020). Visualizing Genotypic and Developmental Differences of Free Amino Acids in Maize Roots With Mass Spectrometry Imaging. *Frontiers in Plant Science*, 11, Article 639. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00639>
- [5] Kolkisaoglu, Ü. (2020). D-amino Acids in Plants: Sources, Metabolism, and Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), Article 5421. <https://doi.org/10.3390/ijms21155421>
- [6] Tamayo Tenorio, A., Gieteling, J., de Jong, G., Boom, R. M., & van der Goot, A. J. (2016). Recovery of protein from green leaves: Overview of crucial steps for utilisation. *Food Chemistry*, 203, 402-408. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.092>
- [7] Kumar, V., Sharma, A., Kaur, R., Thukral, A. K., Bhardwaj, R., & Ahmad, P. (2017). Differential distribution of amino acids in plants. *Amino Acids*, 49(5), 821-869. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2401-x>
- [8] Grechana, O V., & Serbin, A. G. (2018). Study of native extracts from raw lupin yellow and alfalfa yellow (like-sickle or Romanian) by chromat mass spectrometry. *Journal of Chemistry and Technologies*, 26(2), 39-44. <https://doi.org/10.15421/0817260205>
- [9] State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality. (2001). *Derzhavna Farmakopeia Ukrainy*. [The State Pharmacopoeia of Ukraine (1st ed.)]. Kharkiv: Naukovo-ekspertnyi farmakopeinyi tsentr. [in Ukrainian].
- [10] Dahl-Lassen, R., van Hecke, J., Jørgensen, H., Bukh, C., Andersen, B., & Schjoerring, J. K. (2018). High-throughput analysis of amino acids in plant materials by single quadrupole mass spectrometry. *Plant Methods*, 14, Article 8. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0277-8>
- [11] Wiśniewski, J., Fleszar, M. G., Piechowicz, J., Krzystek-Korpaczka, M., Chachaj, A., Szuba, A., Lorenc-Kukula, K., Mastowski, L., Witkiewicz, W., & Gamian, A. (2017). A novel mass spectrometry-based method for simultaneous determination of asymmetric and symmetric dimethylarginine, l-arginine and l-citrulline optimized for LC-MS-TOF and LC-MS/MS. *Biomedical Chromatography*, 31(11), Article e3994. <https://doi.org/10.1002/bmc.3994>
- [12] Dotsenko, G., & Lange, L. (2017). Enzyme Enhanced Protein Recovery from Green Biomass Pulp. *Waste and Biomass Valorization*, 8, 1257-1264. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9718-7>
- [13] Gallii, G., Amir, R., & Fernie, A. R. (2016). The Regulation of Essential Amino Acid Synthesis and Accumulation in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 67, 153-178. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112213>
- [14] Sikdar, M. S., Bowra, S., Schmidt, D., Dionisio, G., Holm, P. B., & Vincze, E. (2016). Targeted modification of storage protein content resulting in improved amino acid composition of barley grain. *Transgenic Research*, 25(1), 19-31. <https://doi.org/10.1007/s11248-015-9911-7>
- [15] He, Q., Huang, S., Wu, Y., Zhang, W., Wang, F., Cao, J., Sheng, Q., Liang, Z., Liu, L., & Ou, W. B. (2018). Comparative study on the composition of free amino acids and derivatives in the two botanical origins of an edible Chinese herb "Xiebai", i.e., *Allium chinense* G. Don and *Allium macrostemon* Bunge species. *Food Research International*, 106, 446-457. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.007>