

УДК 615.322:582.573.16:547.466.06:543.545.2

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛИИНА В НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ ЛУКА МЕДВЕЖЬЕГО (*ALLIUM URSINUM* L.) МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

© 2013 К.А. Манукян, С.П. Сенченко, Е.В. Компанцева

Пятигорский медико-фармацевтический институт –  
филиал Волгоградского государственного медицинского университета, г. Пятигорск

Поступила в редакцию 29.04.2013

Разработана методика идентификации и количественного определения аллиина (основного компонента серосодержащих соединений) в надземной части лука медвежьего (черемши) (*Allium ursinum* L.) методом капиллярного электрофореза. Проведена валидационная оценка методики. Изучены условия оптимальной экстракции аллиина (S-Allyl-L-cysteinesulfoxide) из высушенного сырья: влияние температуры, экстрагента, времени экстракции, степени измельчения сырья, вида экстракции, соотношение сырья и экстрагента. Содержание аллиина в 5 образцах различного географического происхождения составило от 0,87% до 1,50%.

Ключевые слова: лук медвежий (черемша), аллиин, капиллярный электрофорез, идентификация, количественное определение

В последнее время все больше проявляется направленный характер химических исследований как дикорастущих, так и культурных растений с целью создания высокоэффективных лекарственных препаратов. Лук медвежий (черемша, или дикий чеснок, или калба (*Allium ursinum* L.) – многолетнее травянистое растение рода *Allium* семейства луковые *Alliaceae*) — ценное пищевое, медоносное, декоративное, лекарственное растение с выраженными бактерицидными и фунгицидными свойствами. Применение черемши препятствует накоплению холестерина в крови, стимулирует сердечную деятельность, снижает кровяное давление и способствует нормализации обмена веществ. Все эти незаменимые качества сырья, а также его популярность как традиционного пищевого продукта населения страны ведут к массовому сбору лука медвежьего, что приводит к истощению природных ресурсов. Страдает черемша при рубке и освещении древесного полога, осушении земель, вытаптывании при пастьбе скота. Поэтому лук медвежий, являясь редким видом, во всех известных местах произрастания нуждается в действенной охране, а вопрос широкого введения

его в культуру и использовании исключительно надземной части растения является актуальным для многих регионов России.

Известно, что сырье лука медвежьего содержит фитонциды, эфирное масло, инулин, флавоноиды, аскорбиновую кислоту, микроэлементы, среди которых йод, германий и селен. По данным зарубежных исследователей, особое внимание уделяется изучению серосодержащих соединений, отвечающих за большинство лечебных эффектов растений рода *Allium*, основным среди которых является аллиин (более 1,0%), вызывающий регрессии опухолей до полного исчезновения или торможения их роста при инъекциях крысам [5]. Аллиин –(S-Allyl-L-cysteinesulfoxide);3-((S)- Allylsulfiniyl)-L-alanine; (R)-2 fmino-3-(prop-2-tnt-1sulfiny)-propionicacid) – серосодержащая аминокислота, способная под влиянием фермента аллииназы расщепляться до аллицина, обуславливающего чесночный запах черемши. Однако в литературе нет данных о количественном содержании ни суммы серосодержащих соединений, ни аллиина в надземной части лука медвежьего, произрастающего на территории Северного Кавказа и Краснодарского края.

**Цель работы:** разработка методики качественного и количественного содержания аллиина в надземной части лука медвежьего методом капиллярного электрофореза [1, 3].

**Материалы и методы.** Исследовали образцы высушенной надземной части лука медвежьего с применением метода капиллярного

Манукян Карина Артуровна, аспирантка. E-mail: [asgoodasitgets@mail.ru](mailto:asgoodasitgets@mail.ru)

Сенченко Сергей Петрович, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии. E-mail: [asr\\_naika@mail.ru](mailto:asr_naika@mail.ru)

Компанцева Евгения Владимировна, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической химии. E-mail: [dskompanceva@mail.ru](mailto:dskompanceva@mail.ru)

электрофореза. Образцы сырья были собраны на Северном Кавказе и в Краснодарском крае в 2011-2012 гг. С целью получения оптимальных условий экстракции аллиина из исследуемого сырья, определяли его влажность, изучали влияние температуры, экстрагента, времени экстракции, степени измельчения сырья, вида экстракции, соотношение сырья и экстрагента. Измельченное сырье заливали экстрагентом, настаивали, затем экстрагировали на аппарате для встряхивания. Качественное и количественное определение аллиина в извлечениях проводили методом капиллярного электрофореза, используя систему капиллярного электрофореза Капель 105 (группа компаний «Льюмэкс», Россия). В работе использовались кварцевый термостатируемый капилляр с диаметром 50 мкм, общей длиной 75 см и рабочей длиной 65 см. Электролит: раствор натрия тетрабората декагидрата (0,02 М) с добавкой β-циклодекстрина (0,0044 М) [2]. Для подготовки капилляра и восстановления его поверхности проводили его последовательную промывку водой, 0,5 М раствором хлористоводородной кислотой, водой, 0,5 М раствором натрия гидроксида, водой и затем ведущим электролитом. Аллиин не имеет селективного поглощения в УФ-области спектра, поэтому его определение проводили при 200 нм в катодной области капилляра. Анализ проводили при 20 кВ и температуре 50<sup>0</sup>С. Ввод пробы осуществляли гидродинамически в режиме 150 мБар×с. Все растворы перед вводом центрифугировались при 7000 мин<sup>-1</sup> в течение 5 мин. Валидационную оценку разработанной методики проводили по показателям специфичность, линейность, прецизионность и правильность [4]. В качестве стандартного образца использовали аллиина фирмы SigmaAldrich (с чистотой не менее 99%). Раствор стандартного образца готовили в спирте этиловом 40%.

**Результаты и их обсуждение.** Результаты анализа раствора стандартного образца аллиина и извлечения из исследуемого сырья представлены на рис. 1 и 2. Из полученных данных следует, что пик аллиина полностью разделен с сопутствующими компонентами сырья (разрешение с ближайшим пиком составляет 1,4), что позволяет использовать выбранные условия для дальнейших исследований.

Следующим этапом работы стало определение основных валидационных характеристик разработанной методики. Ввиду невозможности воспроизведения точного качественного и количественного состава изучаемого объекта, параметр «Специфичность» определяли путем сопоставления времен миграции пика аллиина на электрофореграмме раствора стандартного и испытуемого образца. Кроме того, использовалась

добавка стандартного образца к испытуемому объекту. В результате было установлено, что пик аллиина увеличивается пропорционально количеству добавленного стандарта, при этом асимметрия (0,80) и эффективность (порядка 170 000 т.т.) остаются без изменений. Также следует отметить, что разрешение пика аллиина с ближайшим сопутствующим пиком на электрофореграмме составило 1,2, что свидетельствует о приемлемом разделении компонентов пробы. Полученные данные позволяют считать разработанную методику качественного и количественного анализа аллиина специфичной.

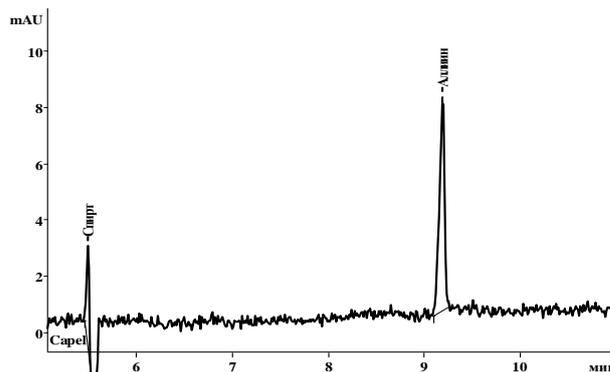


Рис. 1. Электрофореграмма раствора стандартного образца аллиина

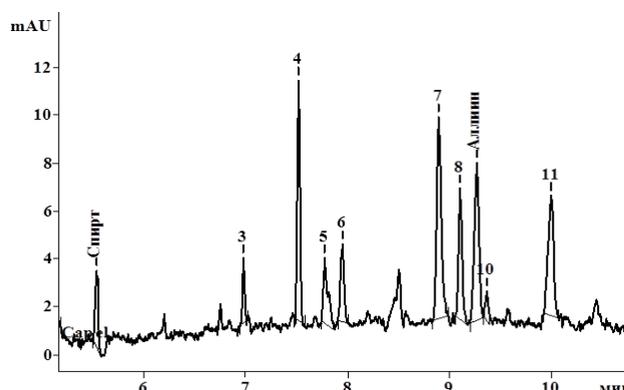


Рис. 2. Электрофореграмма водного извлечения из лука медвежьего

Параметр «Линейность» определяли путем построения градуировочного графика и расчета коэффициента корреляции (r); «Прецизионность» - путем расчета стандартного (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD); для оценки показателя «Правильность» использовали расчет открываемости (R). Результаты исследования данных валидационных характеристик приведены в таблице 1. Полученные данные свидетельствуют о приемлемых значениях основных валидационных характеристик разработанной методики, что позволяет использовать ее для оценки количественного содержания аллиина в сырье.

**Таблица 1.** Параметры валидационной оценки методики количественного определения аллиина

Характеристика	Параметры
линейность	$y = 2033x - 0,236, r=0,9997$
прецизионность	$SD = 0,030, RSD = 2,78 \%$
правильность	$R = 99,81\%$

Далее следовало оптимизировать условия экстракции аллиина, используя разработанную методику. В результате установлено, что максимальное количество аллиина извлекается при использовании в качестве экстрагента воды. При этом достаточно было проводить двукратную экстракцию при комнатной температуре (20°C) в течение 30 минут при использовании соотношения сырье - экстрагент 1:20. Размер частиц сырья 2 мм позволял добиться максимального выхода анализируемого вещества.

Следующим этапом явилось определение аллиина в образцах лука медвежьего различных мест сбора. Полученные результаты представлены в таблице 2. Содержание аллиина в испытуемых образцах составило от 0,86% до 1,50%

**Таблица 2.** Содержание аллиина в различных образцах лука медвежьего

Место и год сбора образца	Содержание аллиина, %
Чеченская Республика, 2011	0,865
Краснодарский край, 2011	1,205
г. Пятигорск (культивируемый вид), 2012	0,743
Республика Дагестан, 2012	1,012
Чеченская Республика, 2012	1,503

**Выводы:** разработана методика идентификации и количественного определения аллиина в высушенной надземной части лука медвежьего методом капиллярного электрофореза. Установлены оптимальные параметры его экстракции из сырья. Установлено содержание аллиина в образцах черемши различного географического происхождения от 0,87% до 1,50% в пересчете на массу сухого сырья.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Беленький, Б.Г.* Высокоэффективный капиллярный электрофорез. – СПб.: Наука, 2009. 320 с.
2. *Гаврилин, М.В.* Совершенствование способов оценки качества корней и сиропа солодки / *М.В. Гаврилин, С.П. Сенченко, А.М. Тамирян, А.В. Печенова* // Химия растительного сырья. 2009. № 4. С. 147-150.
3. *Комарова, Н.В.* Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ» / *Н.В. Комарова, Я.С. Каменцев.* – СПб.: ООО «Веда», 2006. 212 с.
4. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности. Методические рекомендации. – М.: Издательство «Спорт и Культура-2000», 2007. 192 с.
5. *Horie, H.* Non-derivatized analysis of methiin and alliin in vegetables by capillary electrophoresis / *H. Horie, H. Hideki, K. Yamashita* // J. of Chromatography. 2006. Vol. 62, № 12. P. 337-339.

## ALLIIN'S DEFINITION IN ELEVATED PART OF THE ONION BEAR (*ALLIUM URSINUM* L.) BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHOD

© 2013 K.A. Manukyan, S.P. Senchenko, E.V. Kompantseva  
Pyatigorsk Medical-pharmaceutical Institute –  
Branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk

The technique of identification and quantitative definition of alliin (the main component of sulfur-containing composition) in the elevated part of onion bear (ramson) (*Allium ursinum* L.) by capillary electrophoresis method is developed. The validation estimation of a technique is carried out. Conditions of optimum alliin extraction (S-Allyl-L-cysteinesulfoxide) from the dried-up raw materials are studied: temperature effect, extragent, time of extraction, reduction ratio of raw materials, type of extraction, ratio of raw materials and extragent. The alliin contents in 5 species from various geographical provenance made from 0,87% to 1,50%.

Key words: onion bear (ramson), alliin, capillary electrophoresis, identification, quantitative definition

Karina Manukyan, Post-graduate Student. E-mail: [asgoodasitgets@mail.ru](mailto:asgoodasitgets@mail.ru); Sergey Senchenko, Candidate of Pharmacy, Associate Professor at the Department of Pharmaceutical Chemistry. E-mail: [asp\\_nauka@mail.ru](mailto:asp_nauka@mail.ru); Evgeniya Kompantseva, Doctor of Pharmacy, Professor at the Department of Pharmaceutical Chemistry. E-mail: [dskompanceva@mail.ru](mailto:dskompanceva@mail.ru)