

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОДЛИННОСТИ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ - ЛУКА МЕДВЕЖЬЕГО ЛИСТЬЕВ

© 2015 К.А. Манукян¹, А.Ю. Айрапетова², Н.Н. Вдовенко-Мартынова², Т.И. Ширшова³

¹ Пятигорский государственный научно-исследовательский институт курортологии

² Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал
Волгоградского государственного медицинского университета

³ Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН», г. Сыктывкар

Статья поступила в редакцию 10.11.2015

Проведен анализ листьев лука медвежьего, собранных в регионе Северного Кавказа, и определены основные морфолого-анатомические характеристики. Результаты исследований позволяют подтвердить подлинность сырья независимо от региона произрастания и заготовки. Установлена совокупность микродиагностических признаков, необходимых для идентификации листьев лука медвежьего цельных, измельченных и порошка. В ходе товароведческого анализа разработаны числовые показатели, характеризующие доброкачественность лекарственного растительного сырья – лука медвежьего листьев. Проведено определение макро- и микроэлементов в образцах лука медвежьего листьев, содержания тяжелых металлов и радионуклидов. Показано, что лука медвежьего листья концентрируют: калий, магний, селен, цинк, железо. Результаты анализов свидетельствуют об экологической чистоте и безопасности сырья.

Ключевые слова: *лука медвежьего листья, анатомо-морфологические особенности, стандартизация, микроэлементы, экологическая чистота*

Семейство Луковых объединяет около 30 родов и 650 видов, распространенных на всех континентах, кроме Австралии. Все виды очень разнообразны по своей экологической приуроченности и встречаются почти повсюду от высокогорий до побережья морей. Согласно современным взглядам систематиков на семейство луковых, в нем выделяют 6 триб: агапантовые (Agapantheae), луковые (Allieae), гесперокаллисовые (Hesperocallideae), гилясиевые (Gilliesiae), миллиевые (Millieae) и бродиевые (Brodieae). Триба луковых (Alliaceae) самая большая и разнообразная в семействе – 8 родов и около 550 видов.

Лук медвежий (черемша) *Allium ursinum* (L.) - многолетнее травянистое луковичное растение семейства луковые Alliaceae. Распространен в европейских равнинных широколиственных лесах, в дубравах Центральной и Южной России. Обильные заросли образует в знаменитых Тульских засеках. На Кавказе образует заросли в Цейском ущелье, Фиагдоне, в районе Кобани (республика Северная Осетия), в Чародинском районе республики Дагестан, Ачхой-Мартановском районе Чеченской республики,

Манукян Карина Артуровна, кандидат фармацевтических наук, переводчик технической литературы. E-mail: asgoodasitgets@mail.ru

Айрапетова Ася Юрьевна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии. E-mail: asyargfa@mail.ru

Вдовенко-Мартынова Наталья Николаевна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии. E-mail: martynovann@ya.ru

Ширшова Татьяна Ивановна, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник

Эльбрусском и Чегемском районе Кабардино-Балкарии, Боргустанском районе Карачаево-Черкессии. В России черемша издавна используется в народной медицине при атеросклерозе, различных инфекционных заболеваниях, ревматизме, гнойных воспалениях. Из луковиц растения был получен препарат «Урзалл», предложенный для лечения трихомонадных кольпитов, и эфирное масло «Урзалин» - для лечения гнойных ран, трофических язв, пролежней, однако в настоящее время эти препараты не выпускаются. В состав лука медвежьего входит широкая по разнообразию группа серосодержащих соединений, основными из которых являются алиин и алицин, а также флавоноиды, оксикоричные кислоты, эфирное масло и др. [3]. Химический состав листьев изучен недостаточно, в отечественной литературе не приведены методики по идентификации и стандартизации данного вида сырья. Кроме того, на основе данных литературы можно заключить, что для листьев лука медвежьего отсутствуют сведения об углубленных исследованиях биологически активных соединений (БАС), не разработано норм качества, следовательно, существует необходимость в проведении расширенного исследования данного вида лекарственного сырья.

Цель работы: привести исследования по выявлению показателей подлинности и доброкачественности сырья – лука медвежьего листьев, заготовленных на Северном Кавказе.

Методики исследования. Для выявления морфолого-диагностических признаков, характеризующих подлинность лука медвежьего листьев,

применяли методы макроскопического и микроскопического анализов. Устанавливали характерные внешние и анатомо-диагностические признаки [1]. Морфологическое и анатомическое изучение сырья проводится согласно общим правилам [2]. Для разработки показателей доброкачественности сырья лука медвежьего листьев использовали товароведческий метод анализа, применяя фармакопейные методики. Изучение

элементного состава (в кислотно-растворимой форме) проводилось атомно-эмиссионным методом. Содержание аллиина устанавливали методом капиллярного электрофореза [3].

Экспериментальная часть. При исследованиях по стандартизации лука медвежьего листьев были использованы образцы сырья, заготовленные в регионах Северного Кавказа в фазу весеннего отрастания (табл. 1).

Таблица 1. Изучаемые образцы лука медвежьего

№ образца	Место и год сбора
1	Республика Дагестан, Чародинский район, 2012 г.
2	Северная Осетия, Цейское ущелье, 2013 г.
3	Чеченская республика, Ачхой-Мартановский район, 2013 г.
4	Ставропольский край, Нефтекумский район, 2014 г.

Заготовленные листья сушили до воздушно-сухого состояния в условиях естественной воздушно-теневого сушки при температуре 18-20°C. Анализ проводили для высушенного цельного, измельченного сырья и порошка. Внешние признаки устанавливали путем визуального осмотра, с помощью лупы (x10) и бинокля. Пробы осуществляли линейкой; отмечалась окраска, запах и вкус. Для измельченного сырья устанавливали степень измельченности и содержание допустимых примесей [2,5].

Изучение анатомического строения листьев проводили на высушенном материале и свежем сырье. Просветляли препараты кипячением в 3% растворе натрия гидроксида и хлоралгидрате. Изучение препаратов проводили с помощью микроскопа «МИКРОМЕД-1» с тринокулярной насадкой. Результаты документировали микрофотографиями. Микрофотосъемку выполняли с помощью цифровой камеры 3.0mp stos microscop edigital camera eueriece new. Определение числовых показателей ЛРС проводили в соответствии с требованиями ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в ЛРС» «Определение золы»[2].

Определение элементного состава (в кислотно-растворимой форме) проводилось на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой Spectro Analytical Instruments GmbH (Германия). Концентрацию селена определяли флуориметрически, используя мокрое сжигание образцов смесью азотной и хлорной кислот. При этом происходит восстановление Se^{+6} до Se^{+4} и последующая конденсация образовавшейся селенистой кислоты с 2,3-диаминонафталином. Флуоресцирующий комплекс пиазоселенола определяли при $\lambda_{возб}$ – 376 нм, длина волны эмиссии – 519 нм. В качестве референс-стандарта использовали образец лиофилизованной белокочанной капусты с регламентированным содержанием селена соответственно 150 мкг/кг с.м. Статистическую обработку

результатов осуществляли с использованием критерия Стьюдента.

Оценка содержания радионуклидов проводилась в соответствии с СанПиН 2.3.2.1078-01 Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» [6]. Для идентификации некоторых групп биологически активных соединений использовали качественные реакции и УФ-спектр водного извлечения. Для установления содержания аллиина снимали электрофореграммы аллиина в водных извлечениях черемши и стандартного образца (\pm)-L-аллиина(Sigma 74264-10MG-F), расчет проводили по площадям полученных пиков, время миграции которых совпадало [3].

Анализ, обобщение и разъяснение полученных результатов. С целью внедрения ЛРС лука медвежьего листьев в широкую медицинскую практику необходимо проведение исследований по их стандартизации и составлению проекта нормативной документации (НД), где будут представлены научно-обоснованные нормы качества по основным показателям, включаемым в НД на лекарственное растительное сырьё. Одним из этапов стандартизации сырья является определение его подлинности с помощью макро- и микроскопических исследований [1, 2, 4]. Внешние признаки установленные для сырья *Allium ursinum* (L.): листья цельные, реже изломанные, гладкие, плоские, ланцетной, овальной или эллиптической формы на верхушке заостренные, при основании постепенно суженные в узкий черешок, почти равный по длине листовой пластинке. Край листа цельный. Жилкование дуговое. Главная жилка выступает с нижней стороны листа. Листовая пластинка тонкая, ломкая. Длина листьев до 20 см, ширина 3-8 см. Цвет листьев зелёный, реже буровато-зелёный. Измельченное сырьё: кусочки листьев различной формы, цвет зелёный или буровато-зелёный. Вкус сладковато-острый. Порошок зеленого, буровато-зелёного

цвета. Сырьё характеризует сильный, чесночный запах и сладковато-острый вкус.

Микроскопическим методом анализа определено, что *Allium ursinum* (L.) образует инвертированные листья (обратнобифациальные), когда анатомически верхняя часть листа обращена к почве. Лист дорзовентрального типа. Диагностическим признаком является расположение палисадного мезофилла, который располагается только под нижней эпидермой в один слой. В мезофилле наблюдается присутствие кристаллов оксалата кальция в виде мелких рафид. Проводящие пучки жилок закрытые, коллатеральные, мелкие. Верхняя эпидерма представлена вытянутыми клетками с прямыми антиклинальными стенками, трихом и устьиц не обнаружено.

Имеется складчатость кутикулы. Нижняя эпидерма представлена вытянутыми клетками с извилистыми антиклинальными стенками, устьичные аппараты тетрацитного типа. Устьица диагностируются только на нижней стороне (анатомически верхней). Наблюдается их обилие, расположены рядами (диагностический признак), в мезофилле встречаются мелкие рафиды оксалата кальция. Эпидерма содержит слизистые вещества.

В настоящее время для всех видов ЛРС необходимо проводить контроль содержания радионуклидов. Особенно это важно для региона Северного Кавказа, который ввиду особенностей геологического строения является радиационно-опасной территорией [5, 6].

Таблица 2. Результаты анализа образцов на радионуклиды

Наименование радионуклида	Предельно допустимый уровень (не более), Бк/кг	Результаты измерений, образцы			
		1	2	3	4
Цезий-137	400	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
Стронций-90	200	12,0	14,0	11,0	12,0

Примечание: < - меньше порога обнаружения

Можно констатировать, что в образцах уровень содержания свинца и других токсичных металлов не превышает допустимых значений (табл. 2). Результаты анализов образцов доказывают, что можно судить о радиологической чистоте листьев лука медвежьего, заготовленных на Северном Кавказе. Учитывая, что макро- и микроэлементы, наряду с первичными и вторичными метаболитами, являются одной из важных характеристик пищевой и фармакологической ценности растения, было проведено их изучение

в образцах. Полученные результаты показывают, что во всех объектах обнаружено 4 макро- (калий, фосфор, магний, кальций) и 16-микроэлементов. Известно, что все представители рода луковых способны аккумулировать Se-метил селеноцистеин и γ -глутамилселен-метил селеноцистеин, обладающие антиканцерогенным действием. Поэтому все исследуемые образцы исследовали на содержание селена. Уровень содержания свинца и других токсичных металлов в образцах не превышал допустимых значений (табл. 3).

Таблица 3. Результаты спектрального анализа образцов листьев

Элемент	Содержание в сырье, мг/кг			
	№ образца			
	1	2	3	4
Фосфор	9600±2900	5700±1800	9800±2900	9300±2800
Кобальт	0,05	0,17	0,18	0,06
Алюминий	130±30	310±80	430±110	140±40
Молибден	0,9±0,3	2,1±0,8	4,2±1,7	1,0±0,4
Свинец*	0,16	0,46	0,37	0,17
Мышьяк*	0,04	0,03	0,07	0,03
Железо	150±40	260±70	310±90	150±40
9. Никель	3,2±1,1	1,3±0,5	4,4±1,5	6,2±2,2
10. Кальций	2700±800	5900±1800	2400±700	3100±900
11. Хром	0,79±0,16	1,31±0,26	1,8±0,40	0,79±0,16
12. Ванадий	0,29	0,58±0,14	0,74±0,19	0,29
13. Магний	2200±700	2800±800	2000±600	2200±700
14. Барий	3,0±0,9	4,1±1,2	3,9±1,2	3,9±1,2
15. Кадмий*	0,006	0,007	0,0021	0,021
16. Калий	30000±12000	36000±16000	28000±11000	33000±13000
17. Кадмий	0,006	0,007	0,022	0,021
18. Селен, мкг/кг	80±7	111±8	94±8	95±8
19. Ртуть*	0,0002	0,002	0,002	0,001

Примечание: * норматив содержания (для токсичных элементов) по СанПин 2, мг/кг: свинец - 6, мышьяк - 0,5, кадмий - 2, ртуть - 0,1.

Таблица 4. Результаты определения числовых показателей образцов

Показатель, %	Образцы, результаты (n=6)			
	цельное сырье	измельчен-ное сырье	порошок	норма
влажность	8,62±0,39	8,65±0,37	8,75±0,39	не более 10%
	9,12±0,40	9,15±0,38	9,23±0,39	
	8,16±0,37	8,11±0,39	8,28±0,39	
	6,67±0,30	6,73±0,33	6,75±0,39	
зола общая	11,63±0,25	11,68±0,25	11,64±0,25	не более 12%
	9,56±0,27	9,52±0,26	9,59±0,27	
	9,14±0,25	9,18±0,25	9,11±0,25	
	10,22±0,25	10,29±0,25	10,28±0,26	
зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты	1,87±0,04	1,85±0,04	1,84±0,04	не более 2%
	1,43±0,05	1,45±0,05	1,41±0,05	
	1,47±0,05	1,43±0,05	1,44±0,06	
	0,89±0,05	0,86±0,05	0,88±0,05	
пожелтевших и побуревших листьев	3,53±0,17			не более 5%
	4,77±0,16			
	3,69±0,17			
	2,81±0,18			
кусочков пожелтевших и побуревших листьев		3,67±0,18		не более 5%
		4,73±0,16		
		3,71±0,17		
		2,83±0,18		
органическая примесь	0,55±0,02	0,57±0,02		не более 1%
	0,40±0,03	0,43±0,03		
	0,87±0,02	0,83±0,03		
	0,89±0,02	0,86±0,02		
минеральная примесь	0,25±0,01	0,26±0,01		не более 0,5%
	0,12±0,01	0,13±0,01		
	0,45±0,01	0,44±0,01		
	0,25±0,01	0,26±0,01		
частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм		7,63±0,31		не более 8%
		6,54±0,32		
		5,28±0,31		
		7,28±0,31		
частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм			3,57±0,18	не более 5%
			4,85±0,18	
			3,81±0,17	
			2,83±0,18	
частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм		4,68±0,32		не более 8%
		6,54±0,32		
		7,28±0,32		
		5,43±0,32		
частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм	0,50±0,15			не более 3%
	0,60±0,15			
	0,63±0,15			
	0,55±0,15			

В табл. 4 представлены числовые показатели, которые были определены для цельного, измельченного сырья *Allium ursinum* (L.) и порошка, что позволило установить предварительные нормы, характеризующие доброкачественность сырья.

Качественные реакции. Наличие в листьях лука медвежьего аминокислот подтверждали химической реакцией, в результате которой порошок сырья при смачивании раствором нингидрина окрашивался в сине-фиолетовый цвет. Наличие в сырье флавоноидов подтверждали химической реакцией с 5% раствором аммиака, в результате которой при смачивании порошка сырья появляется интенсивно желтое окрашивание.

Ультрафиолетовый спектр (1:250) водных извлечений всех образцов в диапазоне длин волн

от 220 до 380 нм имел характерный максимумы поглощения в области 265±2 нм и 335±2 нм (фенольные соединения).

Учитывая, что основными действующими соединениями лука медвежьего являются разнообразная группа серосодержащих соединений, основными из которых являются аллиин и аллицин, нами было установлено количественное содержание аллиина методом капиллярного электрофореза [3]. Проведена валидационная оценка методики по показателям правильность, линейность, прецизионность (табл. 5). Разработанная методика позволила установить содержание аллиина в образцах сырья, которое составляло от 0,84 до 1,50%.

Таблица 5. Результаты валидационной оценки методики количественного определения аллиина

Показатель	Норматив	Результат
специфичность	однородность пика	пик аллиина однороден, площадь его возрастает пропорционально количеству добавленного стандарта, при этом сохраняется его асимметрия
линейность	коэффициент корреляции $\leq 0,99$	0,9997
правильность	R=97-103% для содержания вещества $\leq 1\%$	99,81
прецизионность	относительное стандартное отклонение RSD $\leq 3\%$	2,8%

Выводы и рекомендации.

1. В результате проведенных исследований лука медвежьего листьев, заготовленных в различных регионах Северного Кавказа, были установлены показатели подлинности ЛРС: внешние и микробиодиагностические признаки, позволяющие диагностировать данное сырьё и исключить его фальсификацию при использовании. Содержание свинца и других токсичных металлов не превышало допустимых значений. Результаты анализов образцов доказывают радиологическую чистоту образцов.

2. С целью стандартизации сырья в ходе товароведческого анализа разработаны числовые показатели сырья. Предложены качественные реакции на флавоноиды и аминокислоты, установлен характерный максимум поглощения УФ-спектра. Методом капиллярного электрофореза установлено содержание основного серосодержащего соединения лука медвежьего - аллиина. Проведена валидационная оценка методики. Установленные показатели являются основой для разработки нормативной документации на листья лука медвежьего (черемши) с целью использования, как отдельный вид растительного лекарственного сырья, так и для создания лекарственных форм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Вдовенко-Мартынова, Н.Н. Морфолого-анатомическое исследование листьев мушмулы (*Mespilus germanica* L.) флоры Северного Кавказа // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2013. Вып. 24, №25 (168). С. 222-226.
2. Государственная фармакопея СССР: Вып.2: Общие методы анализа. Лекарственное раст. сырьё / МЗ СССР. 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1990. 400 с.
3. Манукян, К.А. Определение аллиина в надземной части лука медвежьего (*Allium ursinum* L.) методом капиллярного электрофореза / К.А. Манукян, С.П. Сенченко, Е.В. Компанцева // Известия Самарского научного центра РАН. 2013. Т. 15, №3(2). С. 741-743.
4. Шаталова, Т.А. Морфолого-анатомическое исследование органов кизила обыкновенного *Cornus mas* L. семейства кизилевые (*Cornaceae* dumort.) / Т.А. Шаталова, Е.Н. Хромцова, А.Ю. Айрапетова и др. // Известия Самарского научного центра РАН. 2013. Т. 15, № 3(2). С. 2004-2007.
5. ОФС 42-0013-03. Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб. – Введ. 16.06.2003. Б.м., 2003. 8 с.
6. Попова, О.И. Чистота лекарственного растительного сырья – показатель безопасности применения / О.И. Попова, Н.Н. Вдовенко-Мартынова, А.А. Круглая и др. // Известия Самарского научного центра РАН. 2012. Т. 14, № 5(3). С. 748-750.

DETERMINING THE IDENTITY AND GOOD QUALITY INDICATORS OF HERBS – ALLIUM URSINUM LEAVES

© 2015 K.A. Manukyan¹, A.Y. Ayrapetova², N.N. Vdovenko-Martynova², T.I. Shirshova³

¹Pyatigorsk State Scientific Research Institute of Balneology

²Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute – Branch of the Volgograd State Medical University

³Institute of Biology Komi Scientific Center UB RAS, Syktyvkar

Allium ursinum leaves collected in the North Caucasus region are analyzed and the main morphological and anatomical characteristics are determined. The results allow to confirm the identity of raw materials irrespective of the growth and harvesting region. A set of microdiagnostic features necessary to identify the intact, crushed and powder leaves of *Allium ursinum* is discovered. At the merchandising analysis numerical indicators characterizing the purity of medicinal plant – *Allium ursinum* leaves is developed. Macro- and microelements analysis is carried out in samples of *Allium ursinum* leaves, the content of heavy metals and radionuclides is determined. It is shown that *Allium ursinum* leaves accumulate potassium, magnesium, selenium, zinc, and iron. The analysis results indicate the ecological cleanliness and safety of the material.

Key words: *Allium ursinum* leaves, anatomical and morphological characteristics, standardization, microelements, ecological purity

Karina Manukyan, Candidate of Pharmacy, Translator the Technical Literature. E-mail: asgoodasitgets@mail.ru; Asya Ayrapetova, Candidate of Pharmacy, Associate Professor at the Pharmaceutical Chemistry Department. E-mail: asyapgf@mail.ru; Nataliya Vdovenko-Martynova, Candidate of Pharmacy, Associate Professor at the Pharmacognosy Department. E-mail: martynovann@ya.ru; Tatiana Shirshova, Candidate of Chemistry, Leading Research Fellow