

## ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИСТЬЕВ ЛУКА МЕДВЕЖЬЕГО (ALLIUM URSINUM L.) (ЧЕРЕМШИ)

Манукян К.А.<sup>1</sup>, Айрапетова А.Ю.<sup>2</sup>, Шаталова Т.А.<sup>2</sup>, Мазурина М.В.<sup>2</sup>, Кусова Р.Д.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ "Пятигорский государственный научно-исследовательский институт курортологии", г. Пятигорск, Россия, (357500, Пятигорск, бульвар Гагарина, 19), e-mail: asgoodasitgets@mail.ru

<sup>2</sup>Пятигорский медико-фармацевтический институт- филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения России, Пятигорск, Россия (357532, Пятигорск, пр. Калинина, 11), e-mail: shata61@bk.ru

<sup>3</sup>ФГБОУ ВПО «Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова», г. Владикавказ, РСО-Алания (362025, Владикавказ, ул. Ватутина, 46)

Проведен фармакогностический анализ листьев лука медвежьего, в ходе которого выявлены диагностические признаки. Для стандартизации листьев, собранных на Северном Кавказе, определены действующие соединения, разработаны методики их качественного и количественного определения (флавоноиды, аминокислоты и аллиин). Флавоноиды и аминокислоты идентифицировали в порошке сырья с помощью химических качественных реакций. Наличие аллиина в сырье устанавливали методом капиллярного электрофореза по времени миграции аллиина. В ходе товароведческого анализа разработаны числовые показатели для цельного, измельченного сырья и порошка листьев лука медвежьего. Среди них содержание аллиина; влажность; зола общая; зола, нерастворимая в 10% растворе кислоты хлористоводородной; органические и минеральные примеси, пожелтевшие и побуревшие листья и др. Изучены и обоснованы показатели микробиологической чистота сырья.

Ключевые слова: лук медвежий, листья, числовые показатели, стандартизация, электрофорез, микробиологическая чистота.

## PHARMACOGNOSTIC CHARACTERISTICS OF BEAR'S GARLIC LEAVES (ALLIUM URSINUM L.) (RAMSON)

Manukyan K.A.<sup>1</sup>, Ayrapetova A.Y.<sup>2</sup>, Shatalova T.A.<sup>2</sup>, Mazurina M.V.<sup>2</sup>, Kusova R.D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>FSBI "Pyatigorsk Research Institute of balneology of the Federal Medico-Biological Agency", Pyatigorsk, Russia, e-mail: asgoodasitgets@mail.ru

<sup>2</sup>Pyatigorsk medical and pharmaceutical institute, Pyatigorsk branch of the SBEI of HPE Volgograd state medical university, Pyatigorsk, Russia (11, Kalinin ave, Pyatigorsk 357500); e-mail: shata61@bk.ru

<sup>3</sup>FSBI North Ossetian State University After K. L. Khetagurov, Vladikavkaz, Rep. North Ossetia-Alania (362025, Vladikavkaz, Vatutina str., 46)

Pharmacognostic analysis of *Allium ursinum* leaves is carried out, in which diagnostic features are revealed. To standardize the leaves collected in the North Caucasus, active compounds are identified, methods of qualitative and quantitative determination are developed (flavonoids, amino acids and alliin). Flavonoids and amino acids are identified in raw material powder by chemical qualitative reactions. The presence of alliin in raw materials is determined by capillary electrophoresis using time of alliin migration. At the merchandising analysis numerical indicators for solid, powder and chopped leaves is developed. Among them, the content of alliin; humidity; total ash; ash insoluble in 10% hydrochloric acid; organic and mineral impurities, yellowed and browned leaves, etc. Microbiological purity indicators of the raw material are studied and substantiated.

Keywords: *Allium ursinum*, leaves, numerical indicators, standardization, electrophoresis, microbiological purity.

Лук медвежий (черемша), многолетнее травянистое луковичное растение семейства луковые Alliaceae, распространен в европейских равнинных широколиственных лесах, в дубравах Центральной и Южной России. На Кавказе образует заросли в Цейском ущелье, Фиагдоне (республика Северная Осетия), в Чародинском районе республики Дагестан, Ачхой-Мартановском районе Чеченской республики, Эльбрусском и Чегемском районах Кабардино-Балкарии. В настоящее время успешно вводится в культуру [6].

Сырьё имеет разностороннее фармакологическое действие. В Канаде, Австралии, Англии в медицинской практике используют капсулы с порошком высушенной травы лука медвежьего, настойки и экстракты, применяемые как антиоксидантное средство, влияющее на сердечно-сосудистую систему; имеющее антибактериальные и противогрибковые свойства для поддержания иммунной системы [7]. Однако в России растение нашло широкое применение только в народной медицине, не создано БАД и лекарственных средств с луком медвежьим, не разработаны методики анализа, позволяющие объективно оценивать качество свежего и высушенного сырья.

На основании анализа данных литературы можно заключить, что для листьев *Allium ursinum* отсутствуют сведения об углубленных исследованиях биологически активных соединений (БАС) сырья, произрастающего на территории России, а, следовательно, существует необходимость в проведении расширенного изучения состава этого растения с целью создания новых средств с антиоксидантной активностью.

Использование современных методов качественного и количественного анализа основных биологически активных веществ (БАВ) позволит дать научное обоснование возможности использования листьев лука медвежьего, произрастающего на Северном Кавказе, в медицинской практике, что является актуальной задачей фармации и послужит основой для обоснования включения основных БАВ в качестве критериев нормирования качества изучаемого сырья [3].

**Целью настоящей работы** явилось определение числовых показателей, товароведческого анализа, морфолого-анатомических признаков, качественного и количественного состава БАВ листьев, изучение и установление норм микробиологической чистоты с целью создания нормативной документации (НД) на сырье.

**Материалы и методика.** В качестве объектов исследования были выбраны несколько образцов сырья - воздушно-сухие листья лука медвежьего *Allium ursinum* (L.). Массовую заготовку проводили на Северном Кавказе (Чеченская республика Ачхой-Мартановский район (1), Республика Дагестан (2), Чародинский район (3), Ставропольский край (4)) в первую фазу вегетации растения до цветения в местах естественного обитания.

Для установления показателей подлинности сырья использовали макроскопический и микроскопический анализ по фармакопейным методикам [1]. Используя микроскопический метод анализа, нами установлены микродиагностические признаки сырья. Определение проводили согласно методикам, изложенным в ГФ XI изд., вып.1 [1]. Изучение анатомического строения листьев проводили на высушенном материале, размоченном спирто-водно-глицериновой смесью и свежем сырье. Просветляли препараты кипячением в 3% растворе натрия гидроксида и хлоралгидрате. Срезы готовили от руки лезвием. Изучение

препаратов проводили с помощью микроскопа «Микромед-1» с тринокулярной насадкой, с объективами  $\times 4$ ,  $\times 10$ ,  $\times 40$ , окулярами  $\times 10$ . Микрофотосъёмка выполнена с помощью цифровой камеры 3.0mp 3.0mp cmos microscope digital camera eye piece new.

Для определения товароведческих показателей сырья (влажность, содержание золы общей, золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, примесей) использовали фармакопейные методики [1]. Для стандартизации сырья разработаны методики идентификации аллиина (основного серосодержащего соединения) методом капиллярного электрофореза, флавоноидов (химическая реакция с 5% раствором аммиака) и аминокислот (химическая реакция с раствором нингидрина). Для испытания подлинности измеряли УФ-спектр поглощения водного извлечения из сырья (1:250) в диапазоне длин волн от 200 до 380 нм.

Количественное определение аллиина в листьях лука медвежьего проводили методом капиллярного электрофореза на приборе Капель 105. Расчет содержания проводили по стандартному образцу аллиина Sigma 74264-10MG-F. Для методики определения содержания аллиина проведена валидационная оценка по показателям прецизионность, линейность и правильность [5].

Определение микробиологической чистоты образцов лука медвежьего листьев проводили согласно требованиям ГФ XII, предъявляемым к качеству лекарственного растительного сырья (ЛРС). Нестерильные лекарственные средства могут быть контаминированы микроорганизмами. В них допускается лимитированное количество микроорганизмов при отсутствии определенных видов, представляющих опасность для здоровья человека. Испытание «Микробиологическая чистота» включает количественное определение жизнеспособных бактерий и грибов, а также выявление определенных видов микроорганизмов, наличие которых недопустимо в нестерильных лекарственных средствах (субстанциях) [1].

**Результаты.** В результате морфолого-анатомического изучения листьев лука медвежьего, были определены внешние признаки сырья [2, 4].

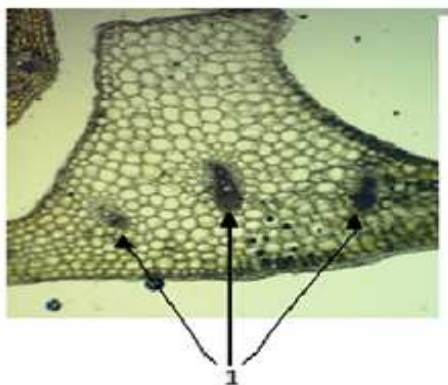
*Цельное сырьё.* Листья цельные, реже изломанные, гладкие, плоские, ланцетной, овальной или эллиптической формы на верхушке заостренные, при основании постепенно суженные в узкий черешок, почти равный по длине листовой пластинке. Край листа цельный. Жилкование дуговое. Главная жилка выступает с нижней стороны листа. Листовая пластинка тонкая, ломкая. Длина листьев до 20 см, ширина 3-8см. Цвет листьев зелёный, реже буровато-зелёный. Запах сильный, чесночный. Вкус сладковато-острый.

*Измельченное сырье.* Кусочки листьев различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм. Цвет зеленый или буровато - зеленый. Запах сильный, чесночный. Вкус сладковато-острый.

*Порошок.* Порошок зеленого, буровато-зелёного цвета, проходящий сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Запах сильный, чесночный. Вкус сладковато-острый.

Анатомическое исследование.

*Цельное сырье.* *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. Сосуды кольчатые (рис. 1). Верхняя эпидерма представлена вытянутыми клетками с прямыми антиклинальными стенками, трихом и устьиц не обнаружено. Имеется складчатость кутикулы.



*Рис. 1. Фрагменты анатомического строения листа  
(увеличение 8×10). Поперечный срез. 1 - Проводящие пучки жилок*

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) (рис. 2), в мезофилле встречаются мелкие рафиды оксалата кальция. Эпидерма содержит слизистые вещества.

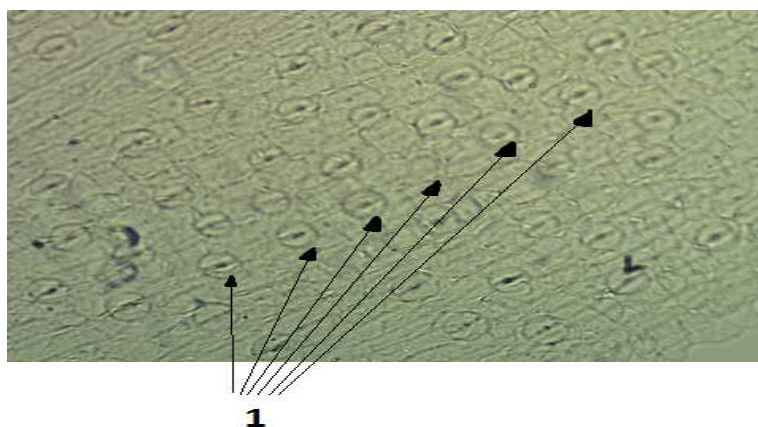


Рис. 2. Препарат листа с поверхности (увеличение  $20\times 10$ ).

Нижняя эпидерма: 1 – устьичные аппараты, расположенные рядами

*Измельченное сырье.* Наблюдаемые анатомические признаки аналогичны признакам цельного сырья. *Порошок лука медвежьего.* В порошке лука медвежьего листьев под микроскопом диагностируются клетки эпидермы, представленные вытянутыми клетками с прямыми антиклинальными стенками, сосуды кольчатые, в мезофилле наблюдается присутствие кристаллов оксалата кальция в виде мелких рафид.

Проведенный товароведческий анализ позволил установить основные показатели для сырья.

*Цельное сырье.* Содержание аллиина не менее 0,80%; влажность не более 10%; золы общей не более 12%; золы, нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной не более 2%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 0,5%, пожелтевших и побуревших листьев не более 5%.

В измельченное сырье добавлен показатель «Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм - не более 8%», а в порошке- «Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм – не более 10%».

Наличие в сырье флавоноидов подтверждается по появлению интенсивно желтого окрашивания, а аминокислот – по окрашиванию порошка в сине-фиолетовый цвет после нагревания его с водой на водяной бане.

Ультрафиолетовый спектр (УФ-спектр) водного извлечения имеет характерные максимумы поглощения в области  $265\pm 2$  нм и  $335\pm 2$  нм (фенольные соединения).

УФ-спектр водного извлечения в диапазоне длин волн от 220 до 380 нм должен иметь характерные максимумы поглощения при  $270\pm 2$  нм и  $335\pm 2$  нм.

Подлинность аллиина, установленная по времени миграции аллиина в извлечении листьев лука медвежьего, должно совпадать с временем миграции СО аллиина (рис. 3).

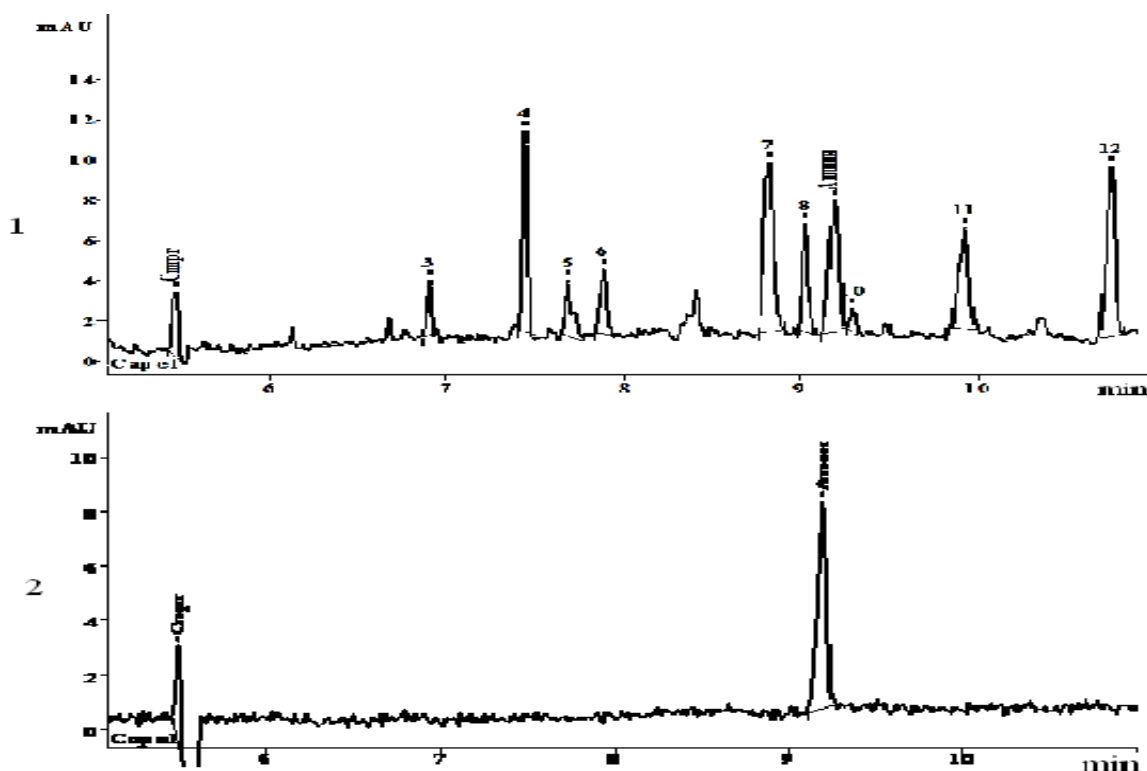


Рис. 3. Электрофореграммы извлечения из листьев лука медвежьего (1) и СО аллиина (2)

Установлено, что содержание аллиина в образцах составляло от 0,89 до 1,51%.

**Таблица 1**

Результаты валидационной оценки методики количественного определения аллиина

Показатель	Норматив	Результат
Линейность	Коэффициент корреляции $\leq 0,99$	0,9997
Правильность	R=97-103% для содержания вещества $\leq 1\%$	99,81
Прецизионность	Относительное стандартное отклонение RSD $\leq 3\%$	2,81%

Определение микробиологической чистоты показало, что сырье относится к категории 4Б «Лекарственные растительные средства или растительное сырье «ангро», приготовленные без использования кипящей воды». Все образцы листьев соответствовали требованиям по показателю «Микробиологическая чистота».

**Таблица 2**

Результаты анализа микробиологической чистоты различных образцов листьев лука медвежьего

Показатели микробиологической чистоты	Номер образца			
	1	2	3	4
Общее число аэробных микроорганизмов - не более $10^5$ КОЕ в 1 г;	$10^3$	$10^2$	$10^3$	$10^2$
Общее число грибов – не более $10^4$ КОЕ в 1 г;	Отсут.	Отсут.	Отсут.	Отсут.
Энтеробактерий, устойчивых к желчи, - не более $10^3$ КОЕ в 1 г	Отсут.	Отсут.	Отсут.	Отсут.

Отсутствие <i>Escherichia coli</i> – в 1 г;	Отсут.	Отсут.	Отсут.	Отсут.
Отсутствие бактерий рода <i>Salmonella</i> в 25 г;	Отсут.	Отсут.	Отсут.	Отсут.

### Выводы

1. Определены основные морфолого-анатомические характеристики листьев лука медвежьего. Результаты исследований позволяют подтвердить подлинность сырья независимо от региона произрастания и заготовки.
2. Установлена совокупность микродиагностических признаков, необходимых для идентификации листьев лука медвежьего цельных, измельченных и порошка.
3. Предложены качественные реакции на основные БАВ сырья.
4. Методом капиллярного электрофореза проведена идентификация и количественное определение аллиина.
5. Установлены числовые показатели порошка, цельных и измельченных листьев лука медвежьего.
3. Разработанные и научно обоснованные нормы качества сырья послужат основой для создания проекта нормативной документации - ФС «Лук медвежьего листа».

### Список литературы

1. Государственная фармакопея Российской Федерации.-12-е изд.- М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008.-Ч.1.- С.160-180.
2. Жизнь растений: в 6 т. / Под ред. А.Л. Тахтаджяна.— М.: Просвещение, 1982.— Т.6.-С.94-102.
3. К вопросу стандартизации лекарственного растительного сырья / Е.Я. Ладыгина и др. // Повышение качества лекарственной помощи больным: тез. докл. 4 Всесоюз. съезда фармацевтов. - Казань, 1986. - С.431.
4. Лук медвежий или черемша. Иллюстрированный определитель растений Средней России: в 3-х т. - Т. 1: Папоротники, хвощи, плауны, голосеменные, покрытосеменные (однодольные)//И.А. Губанов и др. - М.: Т-во науч. изд. КМК; Ин-т технолог. иссл., 2002. - С. 450.
5. 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 Российской академии наук. – 2013.-Т.15, №3 (2). – С.741-743.
6. Савченко О.М. Агробиологические особенности лука победного (*Allium victorialis* L.) и лука медвежьего (*Allium ursinum* L.) в условиях нечернозёмной зоны российской федерации: Автореф. дис. ... канд. сельск. наук. - М., 2013. - 24 с.

7. AIM Bear Paw Garlic [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.aim4health.com/bpgarlic.htm>

**Рецензенты:**

Лазарян Д.С., д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института филиала ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Пятигорск;

Кодониди И.П., д.фарм.н., доцент кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института филиала ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Пятигорск.