

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

DOI - 10.32743/UniChem.2021.85.7.11971

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ S-АЛЛИЛЦИСТЕИНА И АЛЛИИНА
В ПРЕПАРАТАХ ЧЕСНОЧНОГО ПОРОШКА**Рахимова Гулнора Рахим кизи***канд. фарм. наук, доцент,
Ташкентский фармацевтический институт,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: rakhimova.gulnara@bk.ru***Рахимова Ойгул Рахим кизи***канд. фарм. наук, доцент,
Ташкентский фармацевтический институт,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: rakhimova.gulnara@bk.ru*QUANTITATIVE DETERMINATION OF S-ALLYLCYSTEINE AND ALLIIN
IN GARLIC POWDER PREPARATIONS**Gulnora Rakhimova***Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor
Tashkent Pharmaceutical Institute,
Republic of Uzbekistan, Tashkent***Oygul Rakhimova***Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor
Tashkent Pharmaceutical Institute,
Republic of Uzbekistan, Tashkent*

АННОТАЦИЯ

Биологическая активность чеснока определяется присутствием ряда сероорганических соединений. Первичным, содержащим серу компонентом чеснока является гамма-глутамил-S-аллил-L-цистеин, из которого ферментативно образуется S-аллилцистеин («S-АЦ») и далее аллиин. В настоящей работе изучена возможность стандартизации данного препарата путем анализа таких характерных, нелетучих компонентов как S-АЦ и аллиин.

ABSTRACT

The biological activity of garlic is determined by the presence of a number of organosulfur compounds. The primary sulfur-containing component of garlic is gamma-glutamyl-S-allyl-L-cysteine, from which S-allylcysteine ("S-AC") and further alliin are enzymatically formed. In this work, we studied the possibility of standardizing this drug by analyzing such characteristic, nonvolatile components as S-AC and alliin.

Ключевые слова: S-аллилцистеин, аллиин, дегидратированный порошок чеснока, аллилбромид, центрифугирование, стандартный образец, таблетка, субстанция, экстрагирование.

Keywords: S-allylcysteine, alliin, dehydrated garlic powder, allyl bromide, centrifugation, standard sample, tablet, substance, extraction.

Препараты чеснока (*Allium sativum*) успешно применяются как эффективные антиоксидантные, антимикробные, противовоспалительные и противоопухолевые средства. Биологическая активность

чеснока определяется присутствием ряда сероорганических соединений. Первичным, содержащим серу компонентом чеснока является гамма-глутамил-S-аллил-L-цистеин, из которого ферментативно образуется S-аллилцистеин («S-АЦ») и далее аллиин.

В свою очередь аллиин с участием аллииназы конвертируется в нестабильный летучий аллицин, который распадается в десятки других летучих компонентов. Так как технология получения таблеток чеснока основана на использовании сухого порошка чеснока, в настоящей работе изучена возможность стандартизации данного препарата путем анализа таких характерных, нелетучих компонентов как S-АЦ и аллиин. В литературе описано определение S-АЦ и аллиина обращено фазной ВЭЖХ, детектированием при 210 нм [1, 2]. Желая увеличить чувствительность и специфичность определения, принимая во внимание возможные экранирующие эффекты множества сероорганических компонентов чеснока было решено испытать способ определения изучаемых компонентов в виде фенилтиокарбамоильных (ФТК) производных. Предколониная модификация аминокислот в виде ФТК-производных успешно применяется в аминокислотном анализе [3, 4]. Наряду с повышением чувствительности анализа этот подход упрощает количественный анализ разных аминокислот: молярный коэффициент поглощения ФТК-аминокислот при 280 нм равна 16000 (исключение составляет ФТК-лизина для которого молярный коэффициент два раза выше).

Целью работы являлась разработка анализа количественного определения S-АЦ и аллиина методом ВЭЖХ в таблетках чесночного порошка.

Экспериментальная часть. В настоящей работе использованы свежечесночные дольки чеснока («сырой чеснок»), дегидратированный порошок чеснока, высушенный с помощью сублимационной установки и такой же порошок, полученный после

предварительной термообработки горячей водой, а также таблетки – полученные из двух видов высушенных порошков чеснока. Стандартный образец S-аллилцистеина (S-АЦ) получали S-алкилированием цистеина аллилбромидом как описано [5] с заменой аллилхлорида в оригинальной методике на аллилбромид. 1 г цистина растворяли в 10 мл 0.1 М натрий цитратного буфера pH 9.0 и прибавляли 0.5 мл 2-меркаптоэтанола, для окончательного восстановления дисульфидных связей смесь нагревали 2 мин в кипящей водяной бане. Реакционную смесь затем замораживали жидким азотом и высушивали лиофильно. Полученный таким образом цистеин растворяли в 10 мл 0.05M NaOH без контроля pH и при перемешивании, небольшими порциями добавляли раствор 1 мл аллилбромида в 3 мл ацетонитрила. Аллилбромид должен быть свежеперегнанным, однако обработка вышеупомянутого раствора аллилбромида активированным углем также может быть использован для удаления продуктов окисления/осмоления. После прибавления последней капли раствора аллилбромида смесь перемешивали при комнатной температуре еще 30 мин, затем охлаждали в ледяной бане и прибавляли ледяную уксусную кислоту до появления не исчезающего белого осадка S-аллилцистеина. Продукт отделяли центрифугированием, промывали холодным 10%-ным водным раствором уксусной кислоты и высушивали лиофильно. Стандартный образец аллиина получали из синтезированного как описано выше S-АЦ путем его окисления в 0.05M натрий ацетатном буферном растворе pH 5.5, содержащем 3% переокси водорода, при комнатной температуре в течение 5 часов.

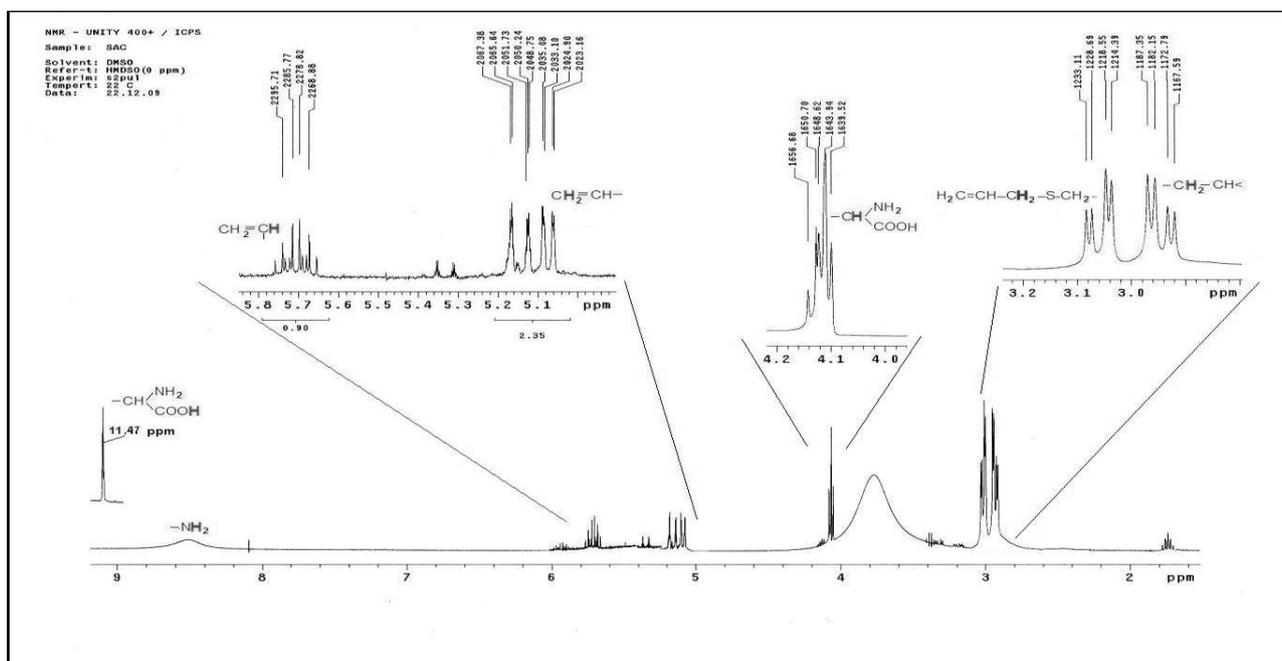


Рисунок 1. ^1H -ЯМР спектр S-аллилцистеина. Спектры сняты в растворе дейтерированного диметилсульфоксида с помощью спектрометра Unity 400+ (Varian, США) при 400 МГц



№	¹ H, δ (м. д.)
1	11,47 (м. д, с, 1H, COOH)
2	4,11 (т; 1H, 4,4 Гц, <u>CH</u> (NH ₂)COOH)
3, 5	2,94 (дд, 2H, 14,6; 5,2 Гц, <u>CH</u> ₂ CH(NH ₂)COOH)
3 ¹ , 5 ¹	3,06 (дд, 2H, 14,6; 5,2 Гц, CH ₂ CH <u>CH</u> ₂ SCH ₂)
6	5,71 (дкт, 1H, 16,0; 10; 5,2 Гц, CH ₂ <u>CH</u>)
7	5,07 (дд, 2H, 10,0; 2,0 Гц, <u>CH</u> ₂ CH)
7 ¹	5,15 (дд, 16,0; 1,7 Гц)
NH ₂	8,5 (уш. с, 2H)

В спектре S-аллилцистеина выявляются сигналы, соответствующие протонам метиленовой (квартет при 5.1 – 5.2 м.д.) и метиновой (квартет при 5.7 – 5.8 м.д.) групп винильного остатка. В спектре аллиина по сравнению со спектром S-аллилцистеина, из которого аллиин получен окислением, сигналы, соответствующие протонам CH₂ (мультиплет при 2.9 – 3.2 м.д.) и CH (квартет при 5.7 – 5.8 м.д.) групп цистеинового остатка претерпели некоторые изменения в характере расщепления, а также несколько смещены в слабое поле – которые объясняются эффектом SO группы.

Стандартные образцы S-АЦ и аллиина превращали в ФТК-производные аналогично получению ФТК-аминокислот [3]. S-АЦ и аллиин растворяли в очищенной воде в концентрации 0,1 мг/мл и к 50 мкл аликвоты этого раствора прибавляли 350 мкл ацетонитрила, 250 мкл пиридина, 50 мкл триэтиламина и 50 мкл фенилизотиоцианата («ФИТЦ», Sigma, США) смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин и высушивали с помощью спидвак системы (SpidVac, Eppendorf, США) при 45 °С в течение 30 мин. ФТК- S-АЦ растворяли в 0.5 мл 50%-ного водного ацетонитрила и перед нанесением на ВЭЖХ колонку фильтровали через фильтр. Из сырого чеснока, сухих субстанций, а также из готовых таблеток для анализа S-АЦ и аллиина перед получением ФТК-производных готовили депротеинизированный экстракт. Дольки сырого чеснока (5 г, точная навеска) растирали в ступке с 10%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ) в соотношении 1 г чеснока: 1 мл ТХУ, гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и выжимку еще 2 раза экстрагировали с ТХУ. Объединенный гомогенат центрифугировали 10 тыс об/мин, 3 мин. Супернатант переносили в мерную посуду, измерили объем экстракта. Из полученного экстракта отобрали аликвоту, соответствующую 1/100 части по объему. К аликвоте депротеинизированного кислотного экстракта прибавляли 150 мкл ацетонитрила, по 10 мкл пиридина и триэтиламина (ТЭА), в случае появления осадка смесь центрифугировали и удаляли осадок. Осветленную смесь затем высушивали с помощью спидвак системы (60 °С, 40 мин). Высушенный и обработанный экстракт чеснока заново растворяли в 350 мкл смеси ацетонитрила-пиридина-воды-ТЭА (7:1:1:1) и прибавляли 10 мкл ФИТЦ для получения ФТК-производного S-АЦ/аллиина. Реакционную

смесь высушивали в спидвак системе, растворяли в исходном объеме взятой для анализа аликвоты экстракта и проводили ВЭЖХ как описано для стандарта. Депротеинизированные экстракты из сухих субстанций, предназначенных для получения таблеток готовили как описано для сырого чеснока с изменением пропорции субстанция: экстрагент = 1 г: 3 мл для первичной экстракции, последующие экстракции - как описано для сырого чеснока. ФТК-производные получали как описано в деталях для сырого чеснока. Депротеинизированный экстракт готовых таблеток готовили следующим образом: 10 таблеток измельчали в ступке до состояния гомогенного порошка и отобрали точную навеску, равную средней массе одной таблетки (403 мг). Навеску измельченных таблеток экстрагировали как описано для сухой субстанции с пропорцией 1 г таблеток: 1 мл экстрагента. ФТК-производные из экстракта таблеток получали, как описано в деталях для экстракта сырого чеснока.

ВЭЖХ проводили на хроматографе Beckman System Gold: программируемый насос - 126-2, УФ-детектор - 166, программа - Gold V.3.1, колонка – 25 x 0.46 см Ultrasphere C₁₈. Подвижная фаза: «А»- 0.014 М Na-ацетат pH 6.7, с 5% ацетонитрила; «В»- 60% ацетонитрил в воде; скорость потока 1 мл/мин. Программа насоса: с 0 до 1 мин - 2% «В»; с 1 до 16 мин градиент «В» от 2 до 50%; 16 до 17 мин градиент «В» от 50 до 98%; с 17 мин в течение 2 мин 98% «В»; с 19 мин обратный градиент «В» от 98 до 2%; Время анализа 20 мин; Детектирование при 280 нм.

Расчет содержания S-АЦ/аллиина в сыром чесноке и субстанциях проводили по формуле:

$$\text{Содержание S-АЦ/аллиина \%} = \frac{(S_{\text{smp}} \times C_{\text{std}} \times V \times 100\%)}{(S_{\text{std}} \times M \times 1000)};$$

где: S_{smp} - Площадь пика S-АЦ/аллиина в хроматограмме испытуемого образца экстракта чеснока, субстанции или таблеток;

C_{std} - Концентрация S-АЦ/аллиина в растворе стандарта, мг/мл;

S_{std} - Площадь пика S-АЦ/аллиина в хроматограмме соответствующего стандарта;

V - объем полученного депротеинизированного экстракта, мл;

M - масса долек чеснока, субстанции или таблеток г;

100% - Фактор для пересчета данных на 100 г материала;

1000 - Фактор для пересчета данных на г;

Расчет содержания S-АЦ/аллиина в готовых таблетках чеснока проводили по формуле:

$$\text{Содержание S-АЦ/аллиина, мг/таблетку} = \frac{(S_{\text{smp}} \times C_{\text{std}} \times V)}{(S_{\text{std}})}$$

где: S_{smp} - Площадь пика S-АЦ/аллиина в хроматограмме экстракта таблеток чеснока;

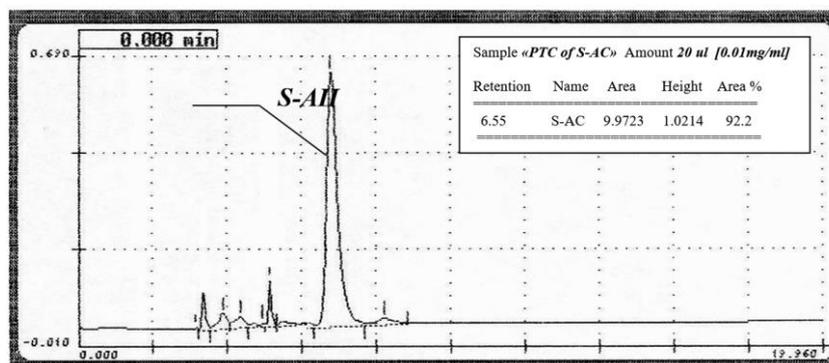
C_{std} - Концентрация S-АЦ/аллиина в растворе стандарта;

S_{std} - Площадь пика S-АЦ/аллиина в хроматограмме стандарта;

V - объем полученного депротеинизированного экстракта таблеток, мл;

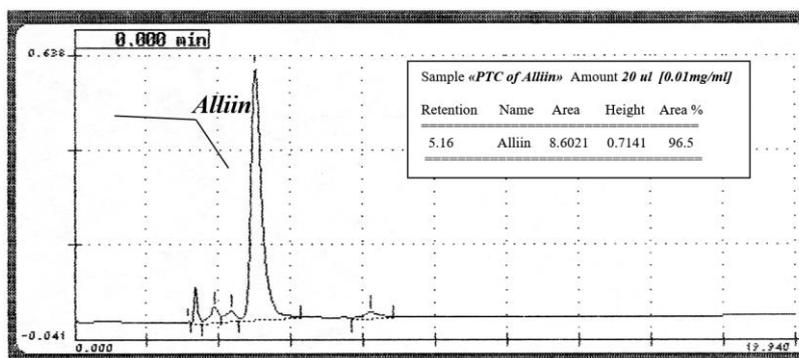
Результаты и их обсуждение. В вышеописанных условиях хроматографии (рис. 2 и 3) ФТК - S-АЦ имеет время удерживания 6.5 – 6.6 мин, а аллиин 5.1-5.2 мин, в аналогичных условиях ФТК- производные свободных аминокислот не совпадают с временем выхода S-АЦ и аллиина (например аспарагиновая и глутаминовая кислоты соответственно 2.6 и 3.4 мин,

серин и глицин 7.8 и 8.3 мин). Время удерживания S-АЦ и аллиина находятся между пиками глутаминовой кислоты и серина, что не мешает определению S-АЦ и аллиина в присутствии свободных аминокислот. Идентификацию и количественное определение S-АЦ в сыром чесноке, в дегидратированных субстанциях и в готовых таблетках также проводили в виде ФТК-производного. Так как свободные аминокислоты пептидов и белков связывают фенилизотиоцианат и уменьшают эффективность реакции, их перед получением ФТК-производного удаляли из анализируемых объектов путем экстракции в депротеинизирующих условиях. Как видно из рис.4, главные компоненты в депротеинизированном экстракте чеснока представлены пиками, соответствующими S-АЦ и аллиину. Профиль хроматограммы ФТК-производных депротеинизированных субстанций чеснока и таблеток на их основе также были близки. Данные по количественному определению S-АЦ и аллиина представлены в таблице. При сравнении содержания исследуемых компонентов оказалось, что количество аллиина и S-АЦ в дегидратированном порошке существенно зависит от способа сушки.



Во встроенной рамке приведены данные интегрирования

Рисунок 2. ВЭЖХ ФТК-производного S-аллилцистеина (S-АЦ)

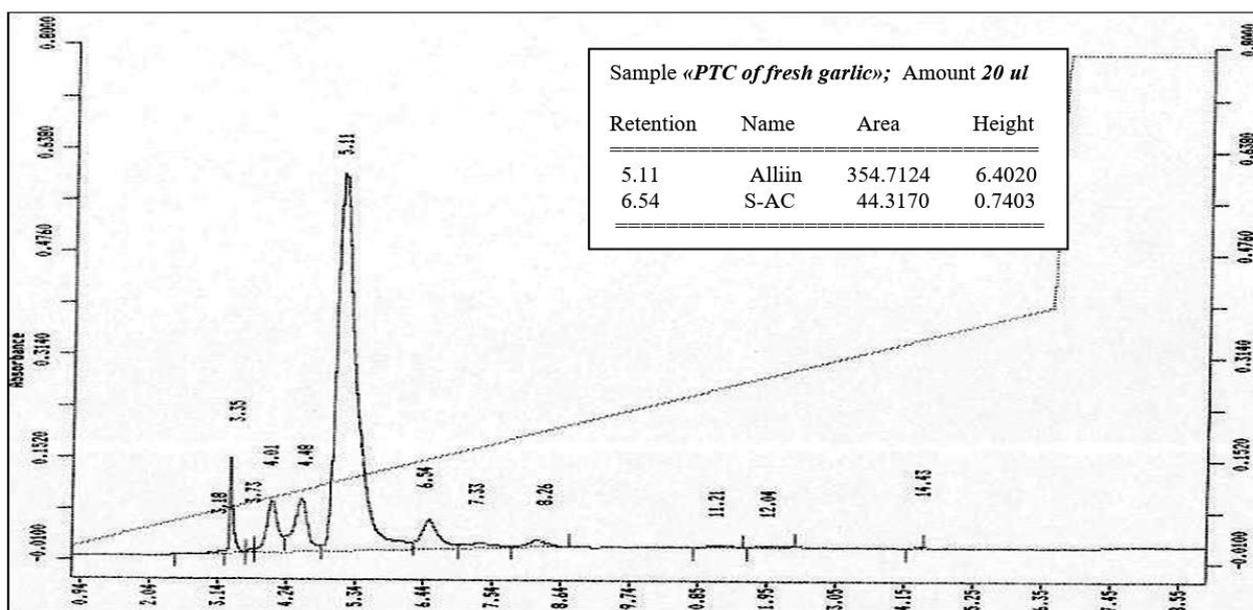


Во встроенной рамке приведены данные интегрирования

Рисунок 3. ВЭЖХ ФТК-производного аллиина

Так, при тщательном высушивании чеснок теряет 40-45% влаги и ожидаемые количества аллиина и S-АЦ в дегидратированном образце должны составлять 1.5% и 0.15% соответственно. Субстанция 1

содержит приблизительно два раза меньшее количество аллиина от ожидаемого и 4 раза меньшее количество S-АЦ.



Во встроенной рамке приведены данные интегрирования.

Рисунок 4. ВЭЖХ ФТК-производного депротеинизированного экстракта долек сырого чеснока

Уменьшение компонентов можно объяснить их потерей при обработке горячей водой. Наиболее близкие к ожидаемым показателям по содержанию исследуемых компонентов получены в случае, когда дегидратированный порошок получен немедленным замораживанием измельченного чеснока жидким азотом с последующей лиофильной сушкой. Другая закономерность наблюдается при сравнении количества испытуемых компонентов в готовых таблетках, полученных из субстанций, приготовленных двумя способами. Так, содержание аллиина в обоих типах таблеток составлял 30-35% от ожидаемых значений

(исходя из содержания аллиина в использованной субстанции). Содержание S-АЦ в таблетках из субстанции 1 (предварительно обработанная горячей водой) составлял около 30%, в то время как в таблетках из субстанции 2 (замораживание азотом и лиофильная сушка) около 15%. Такая существенная разница объясняется тем, что в данной субстанции, в отличие от термообработанной субстанции, сохраняются ферменты метаболизирующие S-АЦ. В процессе получения таблеток нативные ферменты могут уменьшить содержание S-АЦ, которое попадает в таблетки.

Таблица 1.

Количественное определение S-аллилцистеина и аллиина в субстанции и таблетках чеснока и в исходном сырье

Испытуемый материал	Содержание	
	Аллиин	S-аллилцистеина
Дольки сырого чеснока, % на сырую массу	0.820 ± 0.025	0.088 ± 0.005
Предварительно кипяченая дегидратированная субстанция (Субстанция 1), % на воздушно-сухую массу	0.790 ± 0.020	0.042 ± 0.002
Дегидратированная субстанция, полученная немедленной лиофилизацией гомогената долек чеснока (Субстанция 2), % на воздушно-сухую массу	1.224 ± 0.040	0.142 ± 0.008
Готовые таблетки из субстанции 1, мг на одну таблетку	0.677 ± 0.020	0.031 ± 0.002
Готовые таблетки из субстанции 2, мг на одну таблетку	0.966 ± 0.035	0.057 ± 0.003

Заключение: Таким образом, результаты данной работы подтверждают возможность использования количественного определения аллиина и S-

аллилцистеина с помощью ВЭЖХ путем их предколлоидной модификации фенилизотиоцианатом для стандартизации таблеток чеснока.

Список литературы:

1. Al-Dulimy E.M.K., Abid F.M., Abid Al-Gani M.J., 2013. Determination of active ingredients (Alliin & Allicin) in different species of garlic extracts by using high performance liquid chromatography. *Dyala J. Pure Sci.* 9, 70–81.
2. Amagase H., Petesch B.L., Matsuura H., Kasuga S., Itakura Y., 2001. Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supplement intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.* 131, 955–962.
3. Alizaden R. Theoretical study of structure, stability and infrared spectra of hydrogen bonding complexes pairing N-nitrosodietanolamine and one to five water molecules / R. Alizaden, N.M. Najafi // *Journal of Structural Chemistry.* – 2008. – Vol. 49, № 4 – С. 649 – 654.
4. Стрельникова О.Ю. Исследование концентрационных зависимостей и энергий активации молярных электропроводностей водных растворов аминокислот / О.Ю. Стрельникова, И.В. Аристов // *Труды молодых ученых.* – 2000. – № 2. – С. 92 – 95.
5. Yoo M.Y. Lee S.H. Validation of high performance lipid chromatography methods for determination of bioactive sulfur compounds in garlic bulbs, *Food Science and Biotechnology*, 2010, vol. 19 (pg. 1619-1626).