

Рекомендована д-м біол. наук, проф. Л.С. Фірою

УДК 547.979.7/.8:635.25

ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІПОФІЛЬНОЇ ФРАКЦІЇ З ЛУСОК ЦИБУЛИН *ALLIUM SERA* L.

©І.М. Шевцов, І.О. Журавель, В.С. Кисличенко

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: у статті наведені результати вивчення ліпідного складу лусок цибулин *Allium sera* L. За допомогою методу вичерпної екстракції хлороформом в апараті Сокслета одержано ліпофільні фракції лусок цибулі ріпчастої сортів Золотистий та Ред Барон. Якісними реакціями та хроматографічними методами встановлено наявність хлорофілів і каротиноїдів, а також визначено їх кількісний вміст.

Ключові слова: ліпофільна фракція, каротиноїди, хлорофіли, цибуля ріпчаста.

Вступ. Останнім часом багато вчених приділяють все більше уваги дослідженню ліпофільних екстрактів, отриманих з рослинної сировини і розробці на їх основі лікарських препаратів різноманітної біологічної дії [2, 4, 8, 11, 12].

До складу ліпофільних екстрактів входять найважливіші класи біологічно активних сполук, серед них хлорофіли, каротиноїди, токофероли, фітостероли, ліпіди, жирні кислоти та інші. Більшість з цих речовин є біологічними ефекторами, медіаторами і регуляторами, які беруть участь у фізіологічних процесах, таких як розвиток імунітету, регуляція судинного та м'язового тону, передача нейрональної інформації, гемостаз та запальні процеси, які відбуваються в організмі, а також у багатьох біохімічних реакціях, які перебігають у клітинах людського організму [1, 4, 10]. Біологічна цінність ліпофільних екстрактів залежить від вмісту вітаміну Е та каротиноїдів [13], а також від складу жирних кислот.

Найчастіше речовини, які містяться в ліпофільних фракціях, виявляють антисептичну, проти-запальну, репаративну та протиалергічну дію [2, 3, 5, 9, 11, 14]. Добре відомі оригінальні препарати, створені на основі природних ліпофільних комплексів: "Гарбітол", "Тиквеол", "Каротолін", "Олія насіння гарбуза", "Олія шипшини", "Хлорофіліпт", "Ліпохромін 350", "Ліпохромін 800" та інші [6].

Цибуля ріпчаста культивується на всій території України і широко використовується у харчовій промисловості. Проте луски цибулин на цей час майже не досліджені, хоча згідно з даними літератури, вони здавна використовуються у народній медицині як протимікробні засоби, а також для лікування кашлю та хвороб серця. Тому як об'єкти нашого дослідження було обрано луски *Allium sera* L.

Метою нашого дослідження – отримання ліпофільних екстрактів з лусок цибулі ріпчастої сортів

Золотистий та Ред Барон, вивчення їх якісного складу і визначення вмісту в них рослинних пігментів – каротиноїдів та хлорофілів.

Методи дослідження. Ліпофільні екстракти отримували з лусок цибулі ріпчастої. Для цього 5,0 г подрібненої сировини вичерпно екстрагували хлороформом у апараті Сокслета. Отримані хлороформні екстракти випарювали до видалення екстрагенту та зважували. Після цього визначали відсотковий вміст ліпофільної фракції в сировині за формулою:

$$X = \frac{(A - B) \cdot 100}{B},$$

де X – вміст ліпофільної фракції, (%);

A – вага приймача з ліпофільним екстрактом;

B – вага порожнього приймача;

B – наважка сировини.

Для якісного аналізу хлорофілів використовували метод хроматографії в тонкому шарі сорбенту в двомірному варіанті. Локалізацію цих речовин на хроматограмах відмічали за характерним зеленим забарвленням у видимому світлі, яке при фільтрованому УФ-світлі ($\lambda=366$ нм) перетворювалось на яскраво-червону флуоресценцію.

При якісному аналізі каротиноїдів застосовували також метод двомірної тонкошарової хроматографії. Каротиноїди виявляли у видимому світлі за характерним оранжевим забарвленням, яке в УФ-світлі ($\lambda=366$ нм) перетворювалось на коричневе. Для уточнення результатів візуального контролю хроматограми обробляли 2 % розчином диметиламіно-бензальдегіду в суміші з хлороводневою кислотою. В результаті обробки з наступним витримуванням хроматограм у суцільній шафі при 80-90 °С протягом 5-7 хвилин плями, які відповідали каротиноїдам, забарвлювалися в синьо-фіолетовий колір.

Для визначення якісного складу ліпофільних фракцій було також застосовано тривимірну

флуоресцентну спектроскопію, яку останнім часом використовують для аналізу сумішей, що містять флуоресцюючі компоненти. 3DF-спектри, що мають вигляд поверхні, яка характеризується функцією $I = f(\lambda_{\text{exc}}, \lambda_{\text{fl}})$, реєстрували в ультрафіолетовому та видимому діапазонах за допомогою спектрофлуориметру Hitachi F4010. Вимірювання спектра проводили у діапазонах збудження і випромінювання від 220 до 750 нм, кроком 5 нм. Подальшу обробку записів з побудовою тривимірних графіків виконували за допомогою програмного пакета Spectra Data Lab, розробленого в НДІ хімії ХНУ ім. М. Каразіна.

Отримання 3DF-спектрів проводили у кілька етапів. Перший етап включав приготування та розведення розчину ліпофільного екстракту у неполярному розчиннику. Для того, щоб уникнути перепоглинання флуоресценції екстрактом, розведення проводили зі спектрофотометричним контролем оптичної густини: розчинник додавали до тих пір, доки оптична густина розчину екстракту на довжині хвилі 250 нм не знижувалася до 0,1-0,2. Контроль оптичної густини проводили на спектрофотометрі Hitachi F4010.

Другий етап – реєстрація спектра флуоресценції розчинника. Для реєстрування використовували флуориметр Hitachi F4010 перепрограмований для проведення 3DF – вимірювань.

Третій етап – реєстрація спектра флуоресценції розчину, що досліджувався.

Четвертий етап – перекодування 3DF-спектрів з “машинного” в ASCII формат.

П’ятий етап – різниця між спектрами розчинника і розчину, що досліджувався, в програмі Excel. Оскільки 3DF-спектри при реєструванні автоматично нормуються, розрахунки проводять за загальною формулою:

$$I = I_{\text{SOLUT}} - I_{\text{SOLV}} \cdot K,$$

де I – результуюча інтенсивність флуоресценції;

I_{SOLUT} – інтенсивність флуоресценції розчину;

I_{SOLV} – інтенсивність флуоресценції розчинника;

K – константа.

Підбір константи проводиться шляхом порівняння інтенсивності флуоресценції області 3DF-спектрів, де відсутні смуги флуоресценції і поглинання як розчинника, так і розчину. В цій області $K \sim I_{\text{SOLUT}} / I_{\text{SOLV}}$.

Шостий етап – загрузка файлу результуючого 3DF-спектра в програму Origin 6.0 (версія не нижче 5.0). Перегрупування матриці спектра {3,i} (де i – загальна кількість точок спектра) в квадратну матрицю {k,k} (де k – число точок збудження флуоресценції) методом рандомізації. Одно- чи двократне згладження квадратної матриці.

Сьомий етап – побудова тривимірного зображення 3DF-спектра з використанням програ-

ми Origin 6.0. Кут нахилу діаграми, назва, ціна ділення та положення осей залежить від вибору оператора.

Восьмий етап – побудова логарифмічної проєкції 3DF-спектра на площину ($\lambda_{\text{exc}} : \lambda_{\text{fl}}$). Відмінності в інтенсивності флуоресценції в даному випадку виражаються у вигляді градацій сірого кольору або псевдокольорів.

Наступним етапом було безпосереднє отримання масиву інтенсивностей флуоресценції екстракту та чистого розчинника – етилацетату. Вимірювання проводилося кроком 5 нм у інтервалах збудження (λ_{exc}) та сканування випромінювання (λ_{fl}) від 250 до 750 нм.

Останній етап включав конвертування 3DF-спектрів розчинника та екстракту у цифровий формат, одержання різниці між масивами даних для екстракту та розчинника (облік флуоресценції розчинника), конструювання тримірних діаграм та їх проєкцій на площину ($\lambda_{\text{exc}} : \lambda_{\text{fl}}$) за допомогою програми Origin 6.0.

Кількісний вміст хлорофілів визначали фотоелектроколориметричним методом [7]. Для цього брали 0,5 г ліпофільного екстракту з лусок Allium сера L. та розчиняли його в 96 % етанолі в мірній колбі на 50 мл, а потім об’єм розчину доводили до мітки тим же розчинником. Оптичну гуστину визначали на фотоелектроколориметрі КФК-2УХЛ з червоним світлофільтром № 9 при товщині поглинаючого шару 10 мм. Розчином порівняння був 96 % етанол. Одночасно виміряли оптичну гуστину стандартного розчину Гетрі в тих же умовах.

Кількісне визначення вмісту каротиноїдів у ліпофільних фракціях з лусок Allium сера L. проводили наступним чином: 0,5 г ліпофільного екстракту вміщували в мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняли у гексані та доводили об’єм розчину до мітки. Оптичну гуστину отриманого розчину визначали на спектрофотометрі СФ-46 у кюветках з товщиною шару 10 мм при довжині хвилі 450 нм. Як розчин порівняння використовували гексан. Паралельно визначали оптичну гуστину стандартного зразка калію біхромату. Як розчин порівняння використовували воду очищену.

Результати й обговорення. Отримано ліпофільні фракції з лусок цибулі ріпчастої сортів Золотистий та Ред Барон, вихід яких склав 6,40 % та 5,80 % відповідно.

З метою стандартизації ліпофільних фракцій були вивчені їх органолептичні та фізико-хімічні властивості. Одержані ліпофільні екстракти являють собою в’язку масу, буро-коричневого кольору, зі слабким запахом цибулі, практично нерозчинні у воді, але розчинні у спирті, ацетоні, гексані, хлороформі, рослинних та мінеральних оліях.

Аналіз тривимірних спектрів флуоресценції ліпофільних комплексів з цибулин *Allium* сера L. сортів Ред Барон (рис. 1) та Золотистий (рис. 2) дозволив зробити додаткові висновки про якісний вміст об'єктів, що досліджувались. Для ліпофільного комплексу з цибулин *Allium* сера L. сортів Золотистий та Ред Барон

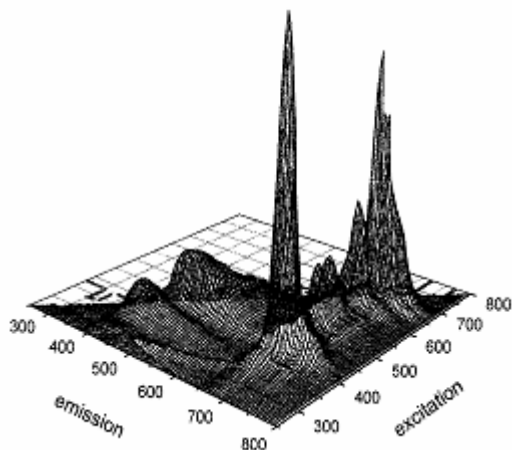


Рис. 1. Тривимірний спектр флуоресценції ліпофільного екстракту лусок цибулі сорту Ред Барон.

Золотистий та Ред Барон встановлена наявність каротиноїдів.

За допомогою методу спектрофотометрії встановлено вміст каротиноїдів, який складав для цибулі сорту Золотистий – 4,94 мг/г; ци-

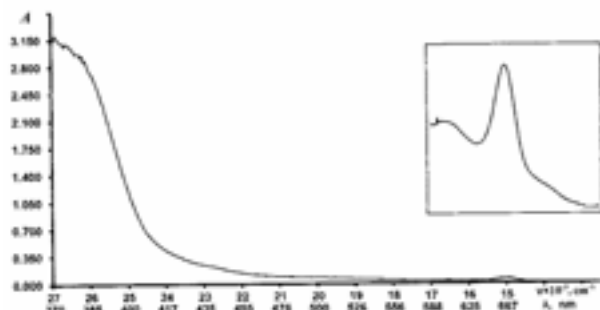


Рис. 3. Спектр поглинання ліпофільного екстракту з лусок цибулі сорту Ред Барон.

Висновки. 1. Методом вичерпної екстракції хлороформом в апараті Сокслета отримано ліпофільну фракцію з лусок цибулі ріпчастої сортів Золотистий та Ред Барон, кількісний вміст яких склав 6,40 % та 5,80 % відповідно.

2. Встановлено наявність хлорофілів у ліпофільних екстрактах лусок цибулі обох досліджуваних сортів методами тонкошарової хроматографії та

притаманна серія піків в області збудження флуоресценції λ_{exc} 270-450, 500-550, 600-680 нм та випромінювання λ_{em} – 660-760 нм, що характерно для суміші хлорофілів а і b (рис. 2.1 та 2.2).

У результаті проведеного аналізу у ліпофільних фракціях з лусок цибулин *Allium* сера L. сортів

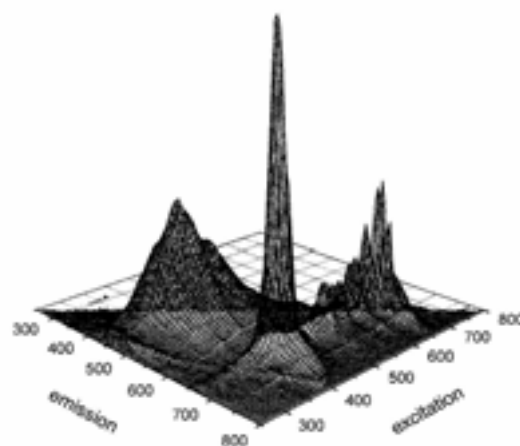


Рис. 2. Тривимірний спектр флуоресценції ліпофільного екстракту лусок цибулі сорту Золотистий.

булі сорту Ред Барон – 4,51 мг/г. Також встановлено кількісний вміст хлорофілів. Він складав для цибулі сорту Золотистий – 4,23 мг/г; цибулі сорту Ред Барон – 3,91 мг/г. (рис. 3 та рис. 4).

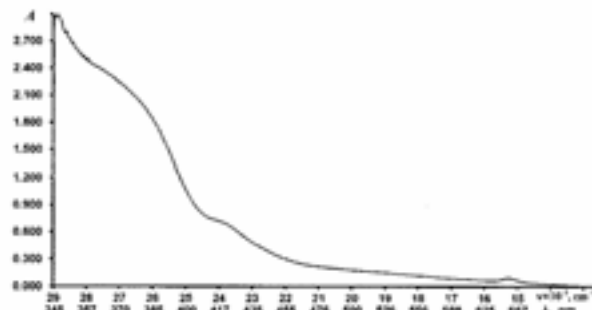


Рис. 4. Спектр поглинання ліпофільного екстракту з лусок цибулі сорту Золотистий.

тривимірної флуоресцентної спектроскопії. Їх кількісний вміст дорівнював 4,23 мг/г для сорту Золотистий та 3,91 мг/г – для сорту Ред Барон.

3. Встановлено наявність у ліпофільних фракціях цибулі обох досліджуваних сортів каротиноїдів та визначено їх кількісний вміст – 4,94 мг/г для сорту цибулі Золотистий, 4,51 мг/г – для сорту Ред Барон.

Література

1. Гарник Т.П., Вихтинская И.Л., Исакова Т.И. // Фітотерапія в Україні. – 1998. – № 1. – С. 10-11.
2. Гусакова С.Д., Сагдулаев Ш.Ш., Хушбакова З.А. // Химия природных соедин. – 1998. – № 4. – С. 437-447.
3. Керимов Ю. Б., Алиев М.Н., Исмаилов Э.С. и др. Изучение некоторых растений, содержащих антрахиноны, кумарины и липофильные фракции. Реализ. науч. достиж. в практ. фармации: Тез. докл. респ. науч. конф., 16-18 окт., 1991. – Х., 1991. – С. 186-187.
4. Ковальов В.М., Бородіна Н.В. // Вісник фармації – 2003. – №4(36). – С. 55-59.
5. Ковальова-Загравська І.В., Ковальов В.М., Журавель І.О. // Вісник фармації. 2002. – №1(29). – С. 24-27.
6. Компендиум 2000-2001 – лекарственные препараты / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. – К.: Морион, 2000. – 1456 с.
7. Попова О.И., Муравьева Д.А. // Фармация. – 1990. – № 36. – С. 15-17.
8. Привалова Э.Г., Никитюк С.Г. // Провизор. – 1999. – №7. – С. 40-42.
9. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям. – Х.: Основа, 1993. – 438 с.
10. Ширшова Т. И., Бурцева С.А., Пшунтлева Е.А. и др. // Растит. ресурсы. – 1999. – № 3. – С. 97-100.
11. Gleason H.A., Cronquist A. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada. 2nded. – New York Botanical Garden, 1991. – 910 p.
12. Goolf B., Lynton J., Segall B. Botanica – Koeneemann, 1999. – 1020 p.
13. Vladimirov Yu.A. Natural antioxidant / Ed. L. Parker. – New York, 1996. – P. 125-241.
14. Moerman D.E. Medicinal plants of Native America. // Ann. Arbor. – 1986. – Vol. 1. – P. 1-534; Vol. 2. – P. 535-910.

ИЗУЧЕНИЕ ЛИПОФИЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ШЕЛУХИ ЛУКОВИЦ ALLIUM CEPA L.**И.Н. Шевцов, И.А. Журавель, В.С. Кисличенко***Национальный фармацевтический университет, Харьков*

Резюме: в работе представлены результаты изучения липидного состава шелухи луковиц *Allium cepa* L. Методом исчерпывающей экстракции хлороформом в аппарате Сокслета получена и исследована липофильная фракция шелухи лука репчатого сортов Золотистый и Ред Барон и определено ее количественное содержание. С помощью качественных реакций и хроматографических методов выявлено наличие хлорофиллов и каротиноидов, а также установлено их количественное содержание.

Ключевые слова: липофильная фракция, хлорофиллы, каротиноиды, лук репчатый.

STUDY OF LIPOPHILIC SUBSTANCES OF OUTER SKIN OF ALIUM CEPA L. BULBS**I.M. Shevtsov, I.O. Zhuravel, V.S. Kyslychenko***National University of Pharmacy, Kharkiv*

Summary: this work deals with the results of study of lipid content of outer skin of *Allium cepa* L. bulbs. Lipophilic fractions of outer skin of onion were received and researched by the method of exhaustive extraction with chlorophorm in Soxlet apparatus. The quantitative content of lipophilic fraction in vegetable raw material has been determined. The presence of chlorophylls and carotenoids has been detected with the help of qualitative tests and chromatographic methods. We have established the quantitative content of chlorophylls and sum of carotenoids in lipophilic fractions.

Key words: lipophilic fraction, carotenoids, chlorophylls, onion.