

С.В. Ковалев

ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПОФИЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ТРАВЫ ЛЮЦЕРНЫ СЕРПОВИДНОЙ

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Ключевые слова: липофильная фракция, трава, люцерна серповидная, жирные кислоты, хлорофиллы, каротиноиды, токоферолы.

Представлены результаты изучения липофильной фракции из травы люцерны серповидной (*Medicago falcata L.*). Определено количественное содержание липофильной фракции в растительном сырье, которое составило 7,5%. В результате хроматографического анализа и качественных реакций установлено наличие хлорофиллов, каротиноидов и токоферолов. Изучен жирнокислотный состав и определено количественное содержание хлорофиллов (197,55 мг/%), каротиноидов (120,57 мг/%), жирных кислот. В количественном соотношении преобладают пальмитиновая (34,25%), линолевая (15,11%) и β -линоленовая (17,93%) кислоты.

Хімічне дослідження ліпофільної фракції трави люцерни серповидної

С.В. Ковальов

Наведено результати вивчення ліпофільної фракції з трави люцерни серповидної (*Medicago falcata L.*). Визначено кількісний вміст ліпофільної фракції у рослинній сировині, що склав 7,5%. У результаті хроматографічного аналізу і якісних реакцій встановлено наявність хлорофілів, каротиноїдів і токоферолів. Вивчено жирнокислотний склад і визначено кількісний вміст хлорофілів (197,55 мг/%), каротиноїдів (120,57 мг/%) і жирних кислот. У кількісному співвідношенні переважають пальмітинова (34,25%), ліолева (15,11%) та β -ліноленова (17,93%) кислоти.

Ключові слова: ліпофільна фракція, трава, люцерна серповидна, жирні кислоти, хлорофіли, каротиноїди, токоферолі.

Chemical research of lipophilic fraction of sickle alfalfa grass

S.V. Kovalev

The work presents the results of study of lipophilic fraction from sickle alfalfa grass (*Medicago falcata L.*). We have defined the quantitative content of lipophilic fraction in raw material, which made 7,5%. The presence of chlorophylls and carotinoids has been established by means of quality reactions and chromatography. Fatty-acid content was studied and quantitative content of chlorophylls (197,55 mg/%), carotinoids (120,57 mg/%) and fatty acids was found. Palmitic (34,25%), linoleic (15,11%) and β -linolenic (17,93%) fatty acids were prevalent.

Key words: lipophilic fraction, herb, *Medicago falcata L.*, fatty acids, chlorophylls, carotinoids, tocopherols.

Растения остаются мощным и часто единственным источником получения новых оригинальных по структуре и физиологической активности соединений. Синтезированные растениями соединения благодаря своей структуре очень разнообразны и составляют большое количество классов биологически активных веществ (БАВ). Наибольшее внимание исследователей привлекают фенилпропаноиды, которые имеют широкий спектр фармакологического действия и часто встречаются в растительном мире, стероидные соединения карденолидной природы и сопутствующие им липиды, аминокислоты, минеральные вещества. На основе этих соединений создано много лекарственных препаратов, но возможности их использования еще не исчерпаны [2,5,8,10,11,13].

Липофильные фракции (ЛФ) известных лекарственных растений до сих пор остаются менее изученными, несмотря на то, что они имеют уникальные группы БАВ [2,15]. Основными действующими веществами ЛФ являются хлорофиллы, каротиноиды, токоферолы, стеринны, ненасыщенные жирные кислоты, фосфолипиды и др. БАВ, которые проявляют широкий спектр фармакологического действия [2,6,9,12,14,16,20–23].

В связи с этим, комплексное изучение перспективных растений флоры Украины для увеличения ассортимента фитопрепаратов является актуальной проблемой.

Люцерна серповидная – многолетнее травянистое растение с мощной корневой системой, культивируется на

сравнительно небольших площадях в лесной, лесостепной и степной зонах. Урожайность зеленой массы составляет 75–150 ц/га. Для использования в медицине заготавливают всю надземную часть растения в период цветения, подрезая цветущие растения с таким расчетом, чтобы нижние огрубевшие безлистные части не попадали в сырье. В траве люцерны серповидной содержатся сапонины, алкалоиды, каротин, витамины С, В, Е, К, флавоноиды, куместрол. В цветках найдены алкалоиды [4,7]. Липофильные вещества люцерны серповидной практически не изучены.

Растение находит применение в качестве успокаивающего средства при нервных расстройствах. В Забайкалье его применяют при мигрени, воспалении легких, почечных и желудочно-кишечных заболеваниях. В тибетской медицине траву рекомендуют как противовоспалительное средство, при абсцессах, кровохаркании, тахикардии и заболеваниях почек. Обычно назначают в виде настоев и отваров. Люцерна издавна используется в сборах, улучшающих зрение, общеукрепляющих, а так же в сборах для профилактики онкологических заболеваний [8, 9].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Получение и химическое исследование липофильной фракции из травы люцерны серповидной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Траву люцерны собирали на протяжении всего периода вегетации в Харьковской и Полтавской областях в 2011–2012 гг.



Липофильную фракцию получали экстракцией хлороформом в аппарате Сокслета [1,3].

Обнаружение каротиноидов и хлорофиллов проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol» в одномерном и двумерном вариантах в системах растворителей гексан-ацетон (6:2) – I направление, гексан-ацетон (6:4) – II направление. Схема двумерной тонкослойной хроматографии хлороформного экстракта травы люцерны серповидной приведена на *рис. 1*.

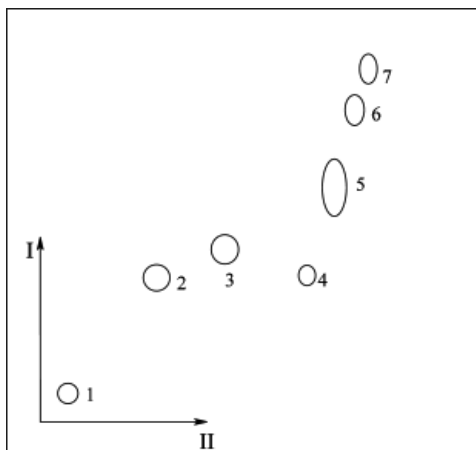


Рис. 1. Схема двумерной тонкослойной хроматограммы липофильной фракции травы люцерны серповидной.

Примечание: система растворителей: I – направление: гексан-ацетон (6:2); II направление – гексан-ацетон (6:4).

Для определения качественного состава липофильной фракции использовали трехмерную флуоресцентную спектроскопию (3DF-спектроскопию), которую используют для анализа смесей, содержащих флуоресцирующие компоненты. 3DF-спектры, которые имеют вид поверхности, характеризующейся функцией $I = f(\lambda_{\text{exc}}, \lambda_{\text{em}})$, регистрировали в ультрафиолетовом и видимом диапазонах [14].

Количественное определение каротиноидов и хлорофиллов проводили спектрофотометрическим методом. Оптическую плотность полученных растворов определяли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 450 и 670 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствором сравнения был хлороформ.

Определение качественного и количественного содержания жирных кислот проводили методом газофазной хроматографии (ГРХ) метиловых эфиров жирных кислот на хроматографе с пламенно-ионизационным детектором «Shimadzu GC-14B».

Пробу для анализа выделяли избытком очищенного диэтилсерного эфира, после чего растворитель отгоняли в токе азота для предотвращения перекисидации ненасыщенных жирных кислот. Затем пробу подвергали немедленной переэтерификации по модифицированной методике Пейснера смесью хлороформ - метанол - концентрированная серная кислота (100:100:1) в запаянных ампулах в течение 3 ч при 100°C. После охлаждения и вскрытия ампул метиловые эфиры жирных кислот извлекали гексаном, а извлечения подвергали ГРХ. Определение проводили при следующих

условиях: колонка капиллярная кварцевая размером 60 м × 0,32 мм, НР-23 0,25 мкм, стационарная фаза цианопропил - метилсилоксан (1:1), газ-носитель – водород, скорость газа-носителя – 1,0 мл/мин, температура колонки – 175°C, инжектора – 240°C, детектора – 250°C.

Идентификацию метиловых эфиров осуществляли по времени удерживания пиков стандартной смесью. Содержание жирных кислот рассчитывали в процентах от их суммы [1,24].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения липофильной фракции 20,0 г измельченной травы люцерны серповидной исчерпывающе экстрагировали хлороформом в аппарате Сокслета. Полученный хлороформный экстракт упаривали до удаления экстрагента и взвешивали. Процентное содержание липофильной фракции в сырье составило 7,5%.

Полученный липофильный экстракт представляет собой густую однородную маслянистую массу темно-зеленого цвета, жирную на ощупь, со специфическим приятным запахом и своеобразным вкусом. Масса практически не растворяется в воде, спирте, хорошо растворима в хлороформе.

В результате хроматографического анализа липофильной фракции установлено наличие каротиноидов, токоферолов и хлорофиллов. Схема ТСХ приведена на *рис. 1*.

Качественное определение каротиноидов на хроматограммах проводили по характерным желтым и ярко-желтым оттенкам, в УФ-свете – по коричневой флуоресценции пятен. Для подтверждения наличия каротиноидов хроматограммы обрабатывали 2% раствором *n*-диметиламинобензальдегида в смеси метанола и хлористоводородной кислоты с последующим выдерживанием хроматограмм в сушильном шкафу при 100°C в течение 5 мин. Пятна, которые отвечали каротиноидам, окрашивались в розовый цвет.

Токоферолы имели голубую флуоресценцию в УФ-свете и характерное сине-фиолетовое окрашивание пятен на хроматограмме при обработке парами йода [24].

Локализацию хлорофиллов определяли по характерному темно-зеленому окрашиванию в видимом свете и по ярко-красной флуоресценции УФ-свете.

В липофильной фракции найдено 7 веществ. Вещества 1–3 отнесены к каротиноидам, 4, 5 – к токоферолам, 6, 7 – к хлорофиллам.

Количественное содержание каротиноидов и хлорофиллов определено спектрофотометрическим методом и составило 120,57 мг/% и 197,55 мг/% соответственно.

Проведен анализ трехмерных спектров флуоресценции и их проекции на плоскость возбуждения/излучения, представленных в логарифмических шкалах интенсивности (*рис. 2*), который способствовал более детальному определению качественного состава исследуемого объекта. Пики в областях возбуждения – 310–450, 500–550, 600–700 нм, излучения – 650–750 нм – это область флуоресценции хлорофиллов.

В результате анализа жирнокислотного состава липофильной фракции травы люцерны серповидной обнаружено 13 жирных кислот, из которых 6 насыщенных (лауриновая,

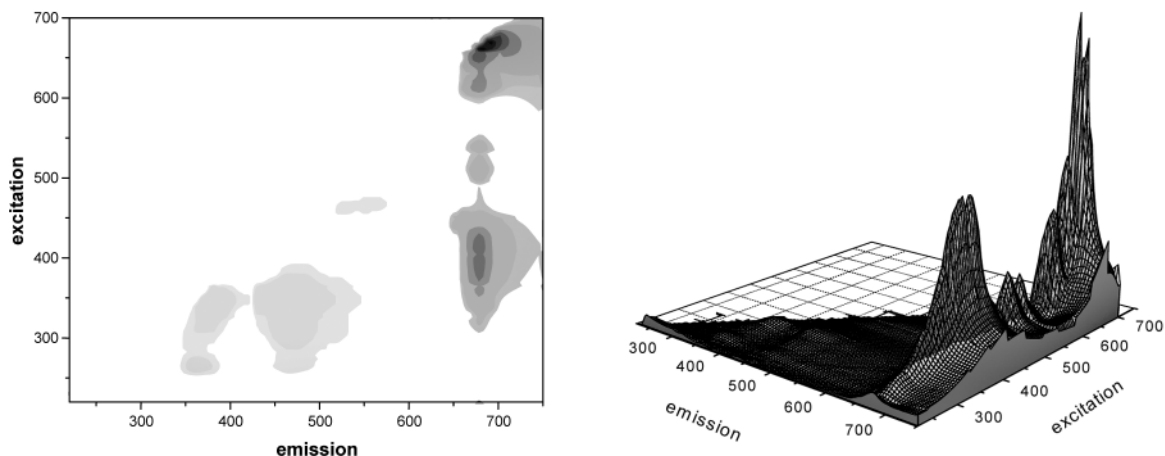


Рис. 2. 3DF-спектры и их проекции на плоскость возбуждения/излучения.

Таблица 1

Результаты качественного и количественного определения жирных кислот в липофильной фракции травы люцерны серповидной

Название кислоты	Содержание, %	Название кислоты	Содержание, %
Лауриновая	0,98	Линолевая	15,11
Миристиновая	2,69	β-Линоленовая	17,93
Пальмитиновая	34,25	Арахидоновая	0,81
Пальмитоолеиновая	2,62	Гондоловая	1,03
Маргариновая	0,65	Эруковая	1,161
Стеариновая	6,24	Лигноцериновая	1,42
Олеиновая	9,25		
Сумма ненасыщенных кислот			49,66
Сумма насыщенных кислот			44,48

миристиновая, пальмитиновая, пальмитоолеиновая, стеариновая, маргариновая) и 7 ненасыщенных (олеиновая, линолевая, β-линоленовая, арахидоновая, гондоловая, эруковая, лигноцериновая) [17–19]. В количественном отношении преобладают пальмитиновая – 34,25%, линолевая – 15,11% и β-линоленовая – 17,93 % (рис. 3, табл. 1).

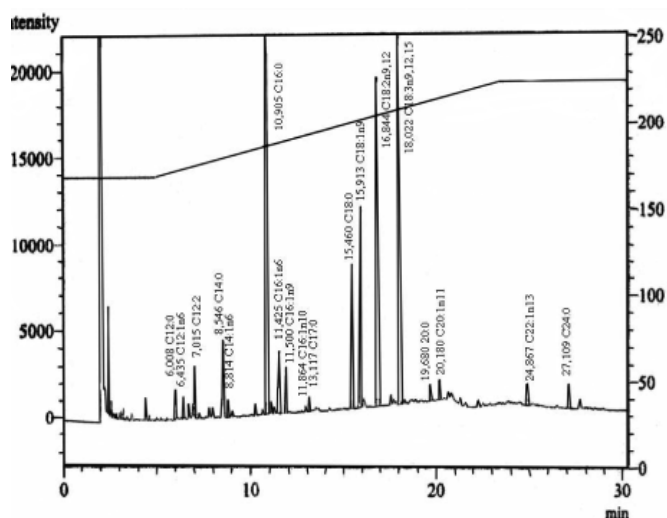


Рис. 3. Схема газожидкостной хроматографии липофильного экстракта травы люцерны серповидной.

Общее содержание ненасыщенных жирных кислот составляет 49,66%, что позволяет предположить F-витаминную активность липофильной фракции.

ВЫВОДЫ

Впервые получена липофильная фракция из травы люцерны серповидной, изучен ее качественный состав и определено количественное содержание каротиноидов (120,57 мг/%) и хлорофиллов (197,55 мг/%). Количественное содержание липофильной фракции составило 7,5%.

Методом газожидкостной хроматографии установлен качественный состав и количественное содержание жирных кислот в липофильном экстракте.

В количественном отношении преобладают пальмитиновая (34,25%), линолевая (15,11%) и β-линоленовая (17,93%) кислоты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственная фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1987. – 335 с.
2. Гусакова С.В. Липофильные экстракты в фитотерапии и фитокосметике, получение и биологические свойства / С.Д Гусакова, Ш.Ш. Сагдулаев, З.А. Хуштакова // ХПС. – 1998. – №4. – С. 437–447.
3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
4. До стандартизації лікарських форм люцерни посівної /



- С.В. Ковальов, А.І. Ткаченко, М.О. Меркулов та ін. // Укр. біофармац. журн. – 2009. – №5 (5). – С. 26–30.
5. Кардиотонические стероиды / И.Ф. Макаревич, И.В. Ковчанко, И.С. Чекман, Г.В. Загорий. – Х.: Оригинал, 2009. – 688 с.
 6. Ковальова А.М. Хімічне дослідження ліпофільних фракцій плодів видів роду *Crataegus* L. / А.М.Ковальова // Вісник фармації. – 2006. – №7. – С. 8–12.
 7. Ковальов С.В. Дослідження фенольного комплексу із трави люцерни посівної / С.В. Ковальов, А.М. Ковальова, Р.Ф. Єременко, Л.М. Малоштан та ін. // Фармацевтичний часопис. – 2008. – №2 (6). – С. 27–30.
 8. Ковальов С.В. Вивчення амінокислотного та елементного складу видів роду *Medicago* L. / С.В.Ковальов // Медична хімія. – 2008. – Т. 10, №4. – С. 49–103.
 9. Ковальов С.В. Хімічне дослідження ліпофільної фракції трави люцерни посівної / С.В.Ковальов // Вісник фармації. – 2008. – №4 (56). – С. 21–24.
 10. Ковальов С.В. Фармакогностичне дослідження представників флори України, як нових джерел фенілпропаноїдів для створення лікарських засобів / С.В. Ковальов, В.М. Ковальов, О.В. Демешко // Сьогодення та майбутнє фармації: тез. доп. Всеукр. конгр. 16–19 квіт. 2008 р., м. Харків. – Х.: Вид-во НФаУ, 2008. – С. 143.
 11. Компендиум. Лекарственные препараты 2008: В 2 т. / под ред. В.М. Коваленко, А.П. Викторова. – К.: Морион. – Т. 2. – 1354 с.
 12. Ксьоев П.А. Полный справочник лекарственных растений / П.А.Ксьоев. – М.: ККСМО-прес, 2008. – 952 с.
 13. Лекарственные препараты в России: справ. – М.: Астрафарм сервис, 1998. – 1600 с.
 14. Мазурець С.І. Фітохімічне вивчення ліпофільної фракції з листя хмелю звичайного / С.І. Мазурець, С.В. Ковальов, А.М. Рудник // Запорожский медицинский журнал. – 2012. – №3 (72). – С. 96–99.
 15. Оптимізація технології екстракції ліпофільних комплексів з лікарської рослинної сировини. 1. Вибір екстрагенту / С.В. Гарна, П.П. Ветров, О.І. Русинов, В.А. Георгіянц // Запорожский медицинский журнал. – 2011. – Т. 12, №3. – С. 92–94.
 16. Соколов С.Я. Фитотерапия и фитофармакология: Руковод. для врачей. – М: Мед. информ. агенство, 2000. – 976 с.
 17. Akoh C.C. Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology / Akoh C.C., Min D.B. – 2 ed. – NY: Marcel Dekker, 2002. – 1014 p.
 18. Ching K. Chow. Fatty Acids in Foods and their Health Implications / Ching K. Chow – 3 ed. – Boca Raton, London, New York: CRC Press, 2007. – 1296 p.
 19. Gunstone F.D. The Lipid Handbook with CD-ROM / Gunstone F.D., Harwood J.L., Dijkstra A.J. – 3 ed. – Boca Raton, London, New York: CRC Press, 2007. – 808 p.
 20. Huong D.T. A new flavone and cytotoxic activity of flavonoid constituents isolated from *Miliusa balansae* (Annonaceae) / Huong D.T., Luong D.V., Thao T.T.P., Sung T.V. // Die Pharmazie. – 2005. – Vol. 60, №8. – P. 627–629.
 21. Livingston A.I.J. Rapid analysis of xanthophylls and carotene in died plant materials / Livingston A.I.J. // Assoc. Offic. Anal. Chem. – 1986. – Vol. 69, №6. – P. 1017–1019.
 22. Moerman D.E. Medicinal plants of Native America // Ann. Arbor. – 1986. – Vol. 1. – P. 531–534; Vol. 2. – P. 535–910.
 23. Vladimirov Yu.A. Natural antioxidant / Vladimirov Yu.A.; Ed. L. Parker. – NY, 1996. – P. 125–241.
 24. Wagner H. Plant drug analysis / Wagner H., Bladt S. – Berlin: Springer, 2001. – 384 p.

Відомості про авторів:

Ковальов С.В. д. фарм. н., доцент каф. фармакогнозії НФаУ.

Поступила в редакцію 19.03.2013 г.