

БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

С. Я. Золотницкая, Г. О. Акопян и В. Д. Райсин

Витамин Е из герани

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР В. О. Казаряном 10 IV 1965)

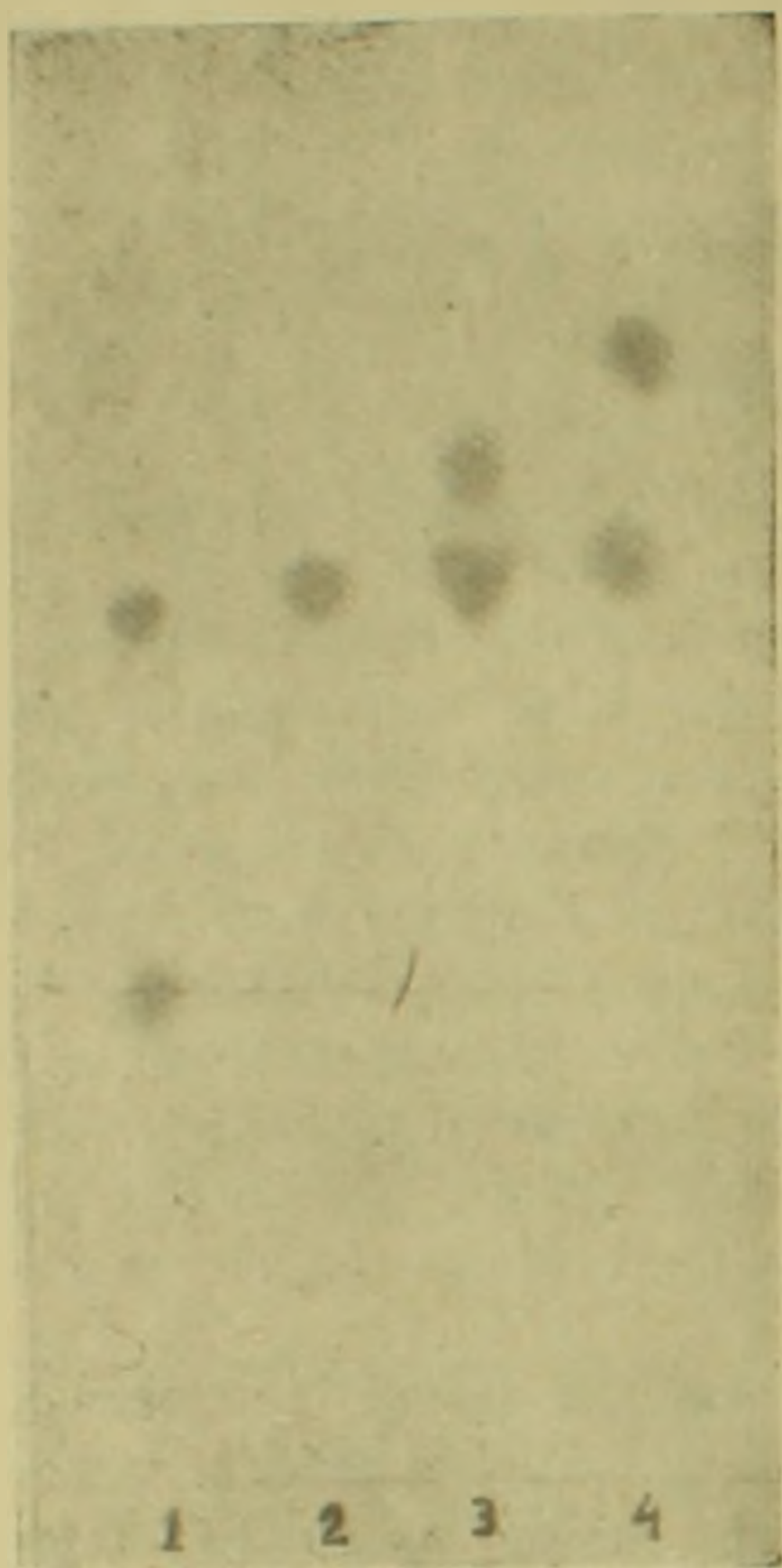
При выяснении возможностей комплексного использования герани, в отходах после отгона эфирного масла были обнаружены липиды, предположительно токоферолы (¹). Содержание липидов, установленное железо-дипиридиловым методом, колебалось от 80 до 60 мг% на воздушно-сухой вес материала. Группа так называемых „не- α -токоферолов“, определенная по Скуди и Бушу (²), составляла от 50 до 30% суммы, причем отмечалось повышение удельного веса фракции в процессе хранения материала до переработки (в течение 3—4 месяцев). Таким образом, на долю наиболее ценной фракции α -токоферола приходится около 70—50% соответственно, т. е. от 50 до 30 мг%.

Содержание и превалирование в сумме вещества, аналогичного по свойствам α -токоферолу, подтверждается хроматографией липида. Значение R_f наиболее крупного по размеру „пятна“ в системе ацетон—вода (80:20) на бумаге, обработанной вазелиновым маслом, равно 0,30, что совпадает с величиной „пятен“ α -токоферола из препарата „Токофарм“, выпускаемого предприятием „Фармазан“ (ГДР, Галле /3), отечественного препарата витамина Е Одесского химфармзавода и синтетического α -токоферола (фиг. 1). Все четыре пятна α -токоферола не окрашиваются диазотированным о-дианизидином.

При тонкослойной хроматографии на закрепленной гилсом окиси алюминия с растворителем бензолом также обнаруживается (при проявлении фосфорномолибденовой кислотой с последующим подогреванием в течение нескольких минут при $T=100^\circ$) наличие синего пятна со значением R_f 0,56, что совпадает с величиной R_f свидетеля. Отчетливо отделяются „пятна“ и не- α -токоферолов.

Наличие α -токоферола в отходах переработки герани подтверждается также биологическим методом. В эксперименте был использован способ Кристенсена, который широко применяется в последние годы для оценки токоферолов и успешно заменяет тест на стерильность (³⁻⁶).

Метод основан на специфической способности α -токоферола, введенного внутрь или „in vitro“, предотвращать вызываемый самоокисляющимися веществами гемолиз крови животных, недостаточных по витамину Е. Определение биологической активности липида проводилось на белых крысах-самках со средним весом 120—140 г содержащихся на Е-авитаминозной диете в течение 15 дней. В состав рациона входили: сахар (70 единиц), обезжиренный творог (20 единиц), топленое сало (6 единиц) и смесь солей (3 единицы), а также витамины А, В₁, В₂, В₄, РР, кальций пантотенат и аскорбиновая кислота. Компоненты диеты предварительно были исследованы и дали отрицательную реакцию на витамин Е.



Фиг. 1. Хроматограмма α -токоферолов (на бумаге). 1—синтетический α -токоферол; 2—липид из отходов герани; 3—витамин Е (Одесса); 4—витамин Е (ГДР).

Липиды извлекались из отходов переработки герани бензолом и очищались от пигментов на колонках с диатомитом, по Б. Г. Савинову и Г. М. Лушевской (⁷). После отгона растворителя под вакуумом липид растворялся в спирте. По вымораживании стеринов при $T = -15^\circ$ растворитель отгонялся, липиды растворялись в бензине (T кипения $60-80^\circ\text{C}$) и фракционировались на колонке с окисью алюминия согласно Кофлеру (⁸). Фракция „ α -токоферола“ по удалении бензина растворялась в оливковом масле с содержанием 1,5 мг в 1 мл. Другая партия была лишь очищена от ос-

новной массы стеринов и после отгона спирта переведена в оливковое масло с содержанием 5 мг токоферолов в 1 мл.

В качестве реагентов, вызывающих гемолиз, использовались диалуровая кислота, цистеин и витамин С (аскорбиновая кислота). Диалуровая кислота приготавливалась нами по прописи Байера (⁹). Ввиду нестойкости препарата использовался свежеприготовленный реактив. Опыт показал, что применение без перекристаллизации препарата 5—6-дневной давности резко снижает % гемолиза. Гемолитическая активность 0,1% раствора диалуровой кислоты, при внесении в пробирки 0,1 мл, по повторностям составляла 92%, 71%, 52%, 45% и 27%, т. е. в среднем 57% от полного гемолиза. Аскорбиновая кислота и цистеин были еще менее активны (⁵), что вполне согласуется с литера-

турными данными (⁵). Процент гемолиза для последних составлял при внесении в пробирки 0,1 мл 5% раствора витамина С 51—24% и цистеина 27% соответственно от полного гемолиза.

Уже первые опыты „*in vitro*“ в пробирках со взвесью эритроцитов, диалуровой кислотой и липидом показали его защитную роль при гемолизе. В дальнейшем липид в оливковом масле принудительно вводился при помощи шприца в желудок животных.

Партия из 30 крыс, дефицитных по витамину Е, была разделена на семь групп, из которых I, II и III получили соответственно 1,5 мг, 2,5 мг и 6,0 мг липида; крысам IV группы было введено по 5,0 мг витамина Е. Животные V и VI группы (по 2 крысы) в опыте с аскорбиновой кислотой и цистеином получили защитную дозу липида в количестве 1,5 мг; крысы VII группы защитных веществ не получали.

Пробы на гемолиз были поставлены 24—26 часов спустя после введения липида. Кровь из надреза кончика хвоста крыс собиралась в центрифужные пробирки со смесью в равных объемах 0,9% раствора поваренной соли и 3% раствора лимоннокислого натрия. После центрифугирования (в течение 15 минут при 2000 об.) и удаления надосадочной жидкости, эритроциты взвешивались в фосфатном буфере рН 7,4, который разливался в пробирки по 0,25 мл. В пробирки в равном объеме добавлялся фосфатный буфер с реагентами. Пробирки взбалтывались и выдерживались в термостате при T° —37° в течение 20 минут, а затем при комнатной температуре в продолжение 3,5 часов.

После инкубации для получения полного гемолиза в несколько пробирок с реагентами добавлялась дистиллированная вода, а во все остальные — буфер (по 5 мл). Пробирки повторно центрифугировались в течение 15 минут при 2000 оборотов. Оптическая плотность жидкости определялась на спектрофотометре СФ-4 при длине волны 5450 Å. Процент гемолиза рассчитан по формуле, приведенной в работе Фридмана с соавторами (⁵).

Результаты экспериментальных определений собраны в табл. 1. Из таблицы видна прогрессивно возрастающая активность липида с увеличением дозы. Исследования ряда авторов показали, что для устранения гемолиза достаточна доза 1,5 мг (^{5,6}), но они работали со специально подобранными по чувствительности к тесту животными и α -токоферолом высокой (94%) чистоты, тогда как последняя для наших препаратов не превышала 50%. При дозе 2,6 мл гемолиз составлял 2,5—3,2%, что близко (учитывая содержание α -токоферола в препарате) подходит к литературным данным, при дозе 5 мг гемолиз в опытных образцах полностью отсутствовал. На фиг. 2 представлены образцы с липидом, витамином Е и контролем после гемолиза.

Защитное влияние наблюдается и в последующий период при спонтанном гемолизе, причем действие липида весьма близко к действию витамина Е (табл. 2).

Из данных таблицы видно, что липид почти в 2—3 раза снижает гемолиз, имеющий место у контроля, аналогично витамину Е, и по продолжительности действия не уступает ему.

Таблица 1

Снижение липидом процента гемолиза под влиянием реагентов

Диалуровая кислота												Аскорбиновая кислота				Цистеин							
Группы крыс и защитные вещества																							
I—1,5 мг липида				II—2,5 мг липида				III—5 мг липида				IV—5 мг вит. Е				V—1,5 мг липида				VI—1,5 мг липида			
Оптич. плотность			% гемолиза	Оптич. плотность			% гемолиза	Оптич. плотность			% гемолиза	Оптич. плотность			% гемолиза	Оптич. плотность			% гемолиза	Оптич. плотность			% гемолиза
буфер	полн. гем.	опытн. образ.		буфер	полн. гем.	опытн. образ.		буфер	полн. гем.	опытн. образ.		буфер	полн. гем.	опытн. образ.		буфер	полн. гем.	опытн. образ.		буфер	полн. гем.	опытн. образ.	
0,085	0,375	0,120	12	0,085	0,700	0,100	2,4	0,080	0,690	0,050	0	0,055	0,890	0,050	0	0,085	0,560	0,165	16,0	0,085	0,465	0,100	3,9
0,085	0,365	0,180	33	0,085	0,700	0,100	3,2	0,060	0,690	0,054	0	0,055	0,890	0,052	0	0,085	0,870	0,125	4,4	—	—	—	—

Таблица 2

Снижение процента спонтанного гемолиза липидом

Г р у п п а ж и в о т н ы х

I — контрольная				II — липид — 2,5 мг				III — липид — 5,0 мг				IV — витамин E — 5,0 мг			
полн. гемолиз		кровь + буфер		полн. гемолиз		кровь + буфер		полн. гемолиз		кровь + буфер		полн. гемолиз		кровь + буфер	
опт. плот.	% гем.	опт. плот.	% гем.	опт. плот.	% гем.	опт. плот.	% гем.	опт. плот.	% гем.	опт. плот.	% гем.	опт. плот.	% гем.	опт. плот.	% гем.

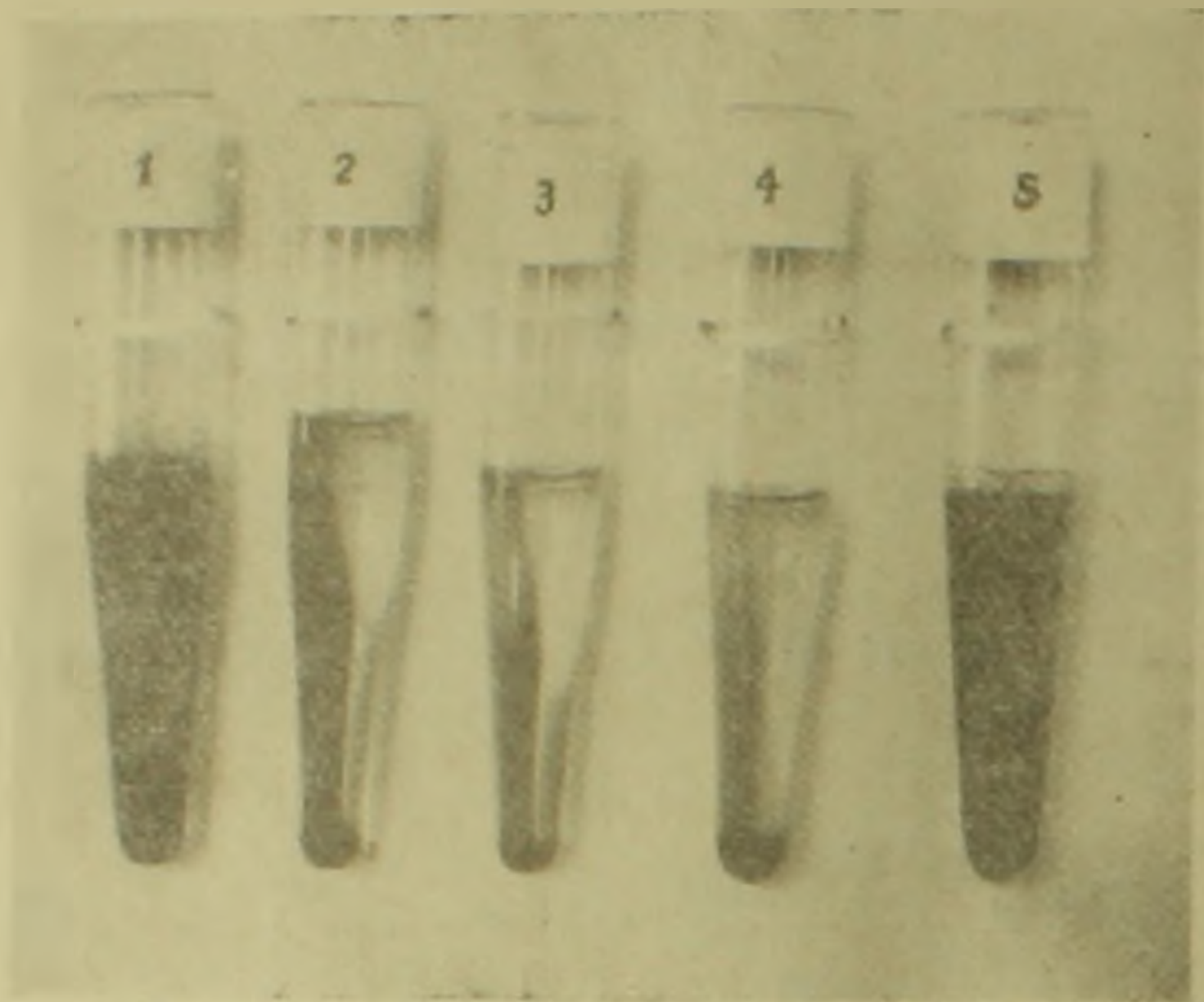
Через 6—8 часов

0,710	100	0,155	22	0,700	100	0,085	12	0,690	100	0,060	8	0,700	100	0,052	8
-------	-----	-------	----	-------	-----	-------	----	-------	-----	-------	---	-------	-----	-------	---

Через 16—18 часов

1,200	100	0,240	20	1,500	100	0,225	15	1,600	100	0,243	9	0,890	100	0,095	10
-------	-----	-------	----	-------	-----	-------	----	-------	-----	-------	---	-------	-----	-------	----

Суммируя данные хроматографического анализа в двух системах и теста на биологическую активность, мы считаем возможным заключить, что в липидах из отходов переработки герани содержится α -токоферол (или весьма близкое к нему вещество, обладающее Е-витаминовой активностью).



Фиг. 2. Снижение гемолиза крови липидом из герани.
1—полный гемолиз, 2—липид в дозе 2,5 мг; 3—липид—5 мг;
4—витамин Е—5 мг, 5—диалуровая кислота (без
защитных веществ).

Принимая во внимание все возрастающие требования на дефицитный в настоящее время препарат, витамина Е, перспективы быстрого роста площадей под геранью в республике, экономический эффект при комплексном использовании растений*, а также тот факт, что природный α -токоферол отличается от синтетического большой биологической активностью, следует проверить возможность и экономическую целесообразность получения витамина Е (а также хлорофиллокаротино-витаминного препарата для нужд животноводства) из отходов переработки герани в крупно-лабораторном масштабе.

Ботанический институт Академии наук
Армянской ССР

* Как показали анализы, проведенные нами в 1953 г., в отходах от переработки герани из Октемберянского района содержится 9,8% дубильных веществ при доброкачественности 34,29, а в погонных водах 1,84%, при доброкачественности 25,11. Кроме того, в процессе извлечения витамина Е из растения в значительном количестве может быть получен хлорофилл.

Է — ՎԻՏԱՄԻՆԻ ԽՈՐԳԵՆՈՑ

Երոմատոգրաֆիայի կեթոդով և Կրիստենսենի կենսաքանական տեսությամբ և տրված տոկոսների առկայությունը խորղենու թափթփուկներում (մինչև 50 մգ¹⁰%)

Հաշվի առնելով վիտամինի պրեպարատների արագ աճող պահանջները, ինչպես նաև ուս-
պուրիկայում խորղենու ջանքատարածությունների աճման հեռանկարները և բույսերի կոմ-
պլեքսային ոգտագործման ժամանակ ստացվող տնտեսական էֆեկտը, անհրաժեշտ է ստուգել
խորղենու թափթփուկներից լարորատոր մեծ մասշտաբներով վիտամինի ստացման տնտեսա-
կան նպատակահարմարությունը:

Հատկապես նկատի ունենալով, որ բնական α-տոկոֆերոլի կենսաքանական ակտիվությունը
դերձառանցում է արհեստական ճանապարհով ստացվածից:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ С. Я. Золотницкая, Г. О. Акопян, „Природа Армении“, № 1, 1962. ² М. Ску-
пи и Р. Буш, J. Biol. Chem., 146, 1—6, 1942. ³ Ф. Кристенсен с соавт. Acta physiol.
Scand., 35, 215, 1956. ⁴ Б. Каулишюу, Н. Пранге, Biochem. et Biophys. Acta, v. 23,
№ 3, 1957. ⁵ Э. Фридман с соавт. J. of Nutrition, v. 65, № 1, 1958. ⁶ С. Розе и
П. Георгу, Am. J. of Physiology, v. 168, № 2, 1952. ⁷ Методы определения вита-
минов, Пишпроминдэт, 1954. ⁸ М. Кофлер, Helv. Chim. Acta, 15, 1169, 1949,
⁹ А. Байер, Untersuchungen über die Harnsäuregruppe, BC XXVII, H-1, 1863.