

ИЗУЧЕНИЕ КАРОТИНОИДОВ ТЫКВЫ МЕТОДАМИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ И ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Курегян А.Г.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск (357532, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11), e-mail: Kooreguan@mail.ru

Каротиноиды – это растительные пигменты, фармакологическая активность которых наиболее широко используется в профилактических и терапевтических целях. Выбор доступного источника получения каротиноидов, экстрагента и режима их экстракции является актуальной задачей. В статье представлены данные по анализу каротиноидного состава извлечений из мякоти плодов *CucurbitamaximaDuch.* методами спектрофотометрии и тонкослойной хроматографии. Изолирование суммы каротиноидов проводили гексаном, хлороформом и ацетоном. Результаты спектрофотометрического исследования полученных извлечений показали присутствие в них суммы каротиноидов, при этом спектры поглощения гексанового и ацетонного экстрактов имели профили, характерные для каротиноидов. Методом ТСХ установлено, что качественный состав гексанового извлечения значительно шире, при этом составы ацетонного и хлороформного извлечений можно считать практически идентичными. Сравнение результатов анализа извлечений методом спектрофотометрии и ТСХ показал, что необходимо повысить очистку получаемых извлечений.

Ключевые слова: каротиноиды, *Cucurbitamaxima Duch.*, спектрофотометрия, ТСХ.

STUDY CAROTENIDS PUMPKIN BY SPECTROPHOTOMETRY AND TLC

Kuregyan A.G.

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of SEI HPE Volgograd state medical university MH RF, Pyatigorsk. (357532, Stavropoliskiyregion, Pyatigorsk, Kalininst., 11), e-mail: Kooreguan@mail.ru

Carotenoids – plant pigments, the pharmacological activity of which is most widely used for prophylactic and therapeutic purposes. Selection of available source of carotenoids, extracting and mode of extraction is an urgent task. The article presents data on the analysis of the carotenoid composition of extracts from the pulp of the fruit *Cucurbita maxima Duch.* spectrophotometry methods and flash chromatography. Insulating amount of carotenoids was carried out with hexane, chloroform and acetone. Results Spectrophotometric investigations showed the presence of extracts obtained in which the amount of carotenoids, thus the absorption spectra of hexane, chloroform and acetone extracts were profiles characteristic of carotenoids. TLC revealed that the qualitative composition of the hexane extraction is much wider, and the compositions of the acetone and chloroform extractions can be considered almost identical. Comparison of the analysis of extracts by spectrophotometry and TLC showed that greater cleaning extracts obtained.

Keywords: carotenoids, *Cucurbita maxima Duch.*, spectrophotometry, TLC.

Каротиноиды наравне с антоцианами являются наиболее распространенным классом растительных пигментов, который применяется для профилактики заболеваний и имеет широкие перспективы использования в клинической практике. Физиологическая роль каротиноидов достаточно разнообразна, кроме того, эти биологически активные вещества (БАВ) обладают обширным перечнем фармакологических свойств, например, антиоксидантной, радиопротекторной, провитаминовой, антиканцерогенной и другими видами активности [2,3, 8]. Актуальной задачей является выбор источника получения этих БАВ и экстрагента, позволяющего экстрагировать каротиноиды в режиме с наименьшим количеством стадий, извлекая эти соединения с минимальным количеством сопутствующих соединений.

Цель исследования – сравнительный качественный анализ извлечений из плодов *Cucurbitamaxima Duch.* для дальнейшего выбора органического растворителя с целью экстракции каротиноидов.

Объекты и методы. В качестве источника каротиноидов была использована мякоть плодов *Cucurbitamaxima Duch.* Основываясь на физико-химических свойствах этого класса БАВ и учитывая их растворимость [4, 6], в качестве экстрагентов были выбраны гексан, хлороформ и ацетон. Для выделения каротиноидов из сырья применили метод жидкостной экстракции с соотношением сырье:экстрагент – 1:5.

Методика получения извлечения. Мякоть плодов *Cucurbitamaxima Duch.* предварительно измельчали, добавляя гидрокарбонат натрия с целью нейтрализации органических кислот. Около 5,0 г измельченного сырья (точная навеска) трижды экстрагировали гексаном или хлороформом, или ацетоном порциями по 25 мл при постоянном помешивании в делительной воронке при комнатной температуре до обесцвечивания сырья. Полученные порции извлечений объединяли и подвергали качественному анализу.

В связи с тем, что каротиноиды являются светочувствительными соединениями, на всех этапах изолирования уменьшали воздействия света, оборачивая колбы и делительные воронки фольгой, а промежуточные продукты хранили в банках оранжевого стекла в темном месте.

Разделение суммы каротиноидов и качественный анализ полученных экстрактов проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), дополнительно для идентификации изолированных БАВ применяли метод УФ-спектрофотометрии.

Методика спектрофотометрического анализа. По 1 мл гексанового или хлороформного, или ацетонового извлечения помещали в мерные колбы вместимостью 25 мл и доводили объемы растворов до метки гексаном, хлороформом и ацетоном соответственно.

Для полученных растворов регистрировали спектры поглощения на спектрофотометре СФ-2000 в диапазоне от 250 до 700 нм в кюветах с толщиной рабочего слоя 10 мм, в качестве растворов сравнения использовали гексан, хлороформ и ацетон соответственно.

Методика ТСХ анализа. На линию старта хроматографической пластинки «Sorbfil» размером 10×20 см наносили по 5 мкл гексанового или хлороформного, или ацетонового извлечений и раствора стандартного образца β-каротина, сушили при комнатной температуре в течение 5 мин, предохраняя пластинки с нанесенными образцами от действия света.

Пластинку помещали в хроматографическую камеру, насыщенную парами подвижной фазы.

В качестве подвижных фаз использовали следующие смеси растворителей:

- диэтиловый эфир – петролейный эфир (3:1) – система I;
- петролейный эфир – диэтиловый эфир – кислота уксусная (85:15:1) – система II;
- петролейный эфир – гексан (10:1) – система III.

Когда фронт подвижной фазы проходил около 15 см, пластинку вынимали из камеры, сушили при комнатной температуре.

Детекцию пятен первоначально проводили по окраске зон адсорбции. Далее хроматограммы обрабатывали 10 % раствором кислоты фосфорномолибденовой и нагревали до 60 °С в течение 10 мин. Зоны адсорбции, соответствующие каротиноидам, проявлялись в виде синих пятен на зелено-желтом фоне [1].

Результаты и их обсуждение. Согласно литературным данным основной каротиноидный состав плодов *Cucurbitamaxima Duch.* представлен β-каротином, виолаксантином, кукурбитаксантином, α-крипоксантином, β-крипоксантином, лютеином, зеаксантином, неоксантинами следовыми количествами других каротиноидов [8,9].

Электронные спектры поглощения растворов производных каротина характеризуются, как правило, тремя максимумами или двумя максимумами и плечом в интервале длин волн от 270 до 550 нм. Антоциановые красители поглощают около 549 нм [4,5].

Спектры поглощения полученных гексанового и ацетонового извлечений имели по три максимума поглощения, которые находились в области, присущей каротиноидным соединениям: 429, 448, 474 нм в ацетоне и 426, 447, 472 нм в гексане. Спектр раствора хлороформного извлечения не имел выраженного «каротиноидного профиля», однако имелись максимумы поглощения при 408, 433 нм и плечо около 455 нм. На спектрах всех извлечений отсутствовали максимумы поглощения около 550 нм, характерные для антоцианов.

В соответствии с данными литературы спектр поглощения раствора β-каротина в ацетоне имеет максимумы при 429, 452, 478 нм, в тех же условиях для α-каротина – 424, 448, 476 нм, для зеаксантина – 430, 452, 479 нм, для неоксантина – 416, 440, 470 нм.

Растворы в гексане имеют следующие максимумы поглощения: для β-каротина – 425, 450, 477 нм; для α-каротина – 422, 445, 473 нм; для зеаксантина – 424, 449, 476 нм, неоксантина – 416, 438, 467 нм, для кукурбитаксантина – 427, 453, 483 нм.

Растворы в хлороформе: спектр раствора β -каротина – максимумы при 435,461, 485 нм; α -каротина – 433, 457, 484 нм; зеаксантина – 433, 462, 493 нм, неоксантина – 423, 448, 476 нм.

Кроме положений максимумов для идентификации каротиноидов методом спектрофотометрии используется расчет соотношения высот максимумом поглощения, в частности отношение третьего максимума ко второму, выраженное в процентах – III/II [7, 8, 10].

После сравнения максимумов поглощения полученных спектров с литературными сведениями и положениями максимумов оптической плотности на спектре раствора СО β -каротина установлено, что гексановое извлечение преимущественно содержит β -каротин, что подтверждается величиной соотношения III/II – 25,9 %, согласно данным литературы этот параметр должен составлять – 25 % [7, 8]. Наиболее вероятным сопутствующим каротиноидом является α -каротин, однако соотношение III/II для этого каротиноида должно быть 55 %.

Анализ характера спектра поглощения ацетонового экстракта показал, что по положению первого максимума (428 нм) он наиболее близок к спектру поглощения β -каротина, второго (448 нм) и третьего (476 нм) – к спектрам поглощения α -каротина и зеаксантина. Соотношение III/II для спектра раствора β -каротина в ацетоне должно быть – 15 %, расчетное значение составило – 9 %.

Далее все извлечения были проанализированы методом ТСХ в системах растворителей: диэтиловыйэфир-петролейный эфир (3:1) – I; петролейный эфир-диэтиловый эфир-кислота уксусная (85:15:1) – II, петролейный эфир-гексан (10:1) – III.

Система I позволила разделить шесть соединений каротиноидного типа в гексановом извлечении с коэффициентами подвижности: 0,024; 0,065; 0,230 (β -криптоксантин); 0,336 (зеаксантин); 0,451 (лютеин); 0,746 (β -каротин).

По четыре соединения были зафиксированы в хлороформном извлечении: 0,065; 0,230 (зеаксантин); 0,443 (лютеин); 0,750(β -каротин) и ацетоновом экстракте – 0,066; 0,123; 0,234 (зеаксантин); 0,750 (β -каротин).

В системе растворителе II были разделены по два соединения в гексановом извлечении: 0,284; 0,850 (β -каротин); в хлороформном: 0,31; 0,845 (β -каротин); и ацетоновом: 0,284; и 0,845 (β -каротин).

Смесь растворителей III разделить компоненты всех трех извлечений не позволила, т.к. нанесенные извлечения в виде зон адсорбции находились на линии страта.

Таким образом, результат анализа извлечений в хроматографической системе I показал, что качественный состав гексанового извлечения значительно шире, при этом

составы ацетонового и хлороформного извлечений можно считать практически идентичными. Система II показала наличие двух каротиноидов в каждом из извлечений, причем, для всех трех экстрактов был идентифицирован β -каротин. Система растворителей III не дала разделения каротиноидов.

Выводы. По результатам спектрофотометрического анализа для дальнейшей работы в качестве экстрагентов были выбраны гексан и ацетон. В ходе исследования извлечений методом ТСХ установлено, что наибольшее число каротиноидных соединений содержит гексановое извлечение из сырья. Сравнение результатов анализа извлечений методами спектрофотометрии и ТСХ, показал, что необходимо повысить очистку всех получаемых извлечений.

Список литературы

1. Оленников Д.Н., Зилфикаров И.Н., Ибрагимов Т.А. Исследование химического состава алоэ древовидного (*Aloe arborescens* Mill.) // Химия растительного сырья. 2010. № 3. С.77-82.
2. Печинский С.В., Курегян А.Г. Влияние каротиноидов на иммунитет // Хим.-фармац. журн. – 2013. – Т. 47. – № 10. – С. 3–8.
3. Печинский С.В., Курегян А.Г. Структура и биологические функции каротиноидов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 9. – С. 4–15.
4. Писарев Д.И., Новиков О.О., Романова Т.А. Разработка экспресс-метода определения каротиноидов в сырье растительного происхождения // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. – 2010. – № 22 (93). – Вып. 12/2. – С. 119–122.
5. Саввин П.Н. Исследование натуральных каротиноидно-антоциановых красителей / П.Н. Саввин, Е.В. Комарова, В.М. Болотов и др. // Химия растительного сырья. – 2010. – № 4. – С. 135–138.
6. Рудаков О.Б. Хроматографическое определение натуральных и искусственных каротиноидов в пищевых продуктах / О.Б. Рудаков, Л.И. Перикова, В.М. Болотов и др. // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2004. – №4. – С. 78–84.
7. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids Handbook. Basel.: Springer Basel AG, 2004. – 646 p.
8. Handbook for Carotenoid Analysis Delia B. Rodriguez-Amaya and Mieko Kimura. – Washington.: Copyright HarvestPlus, 2004. – 59 p.
9. Muntean E. Quantification of carotenoids from pumpkin juice by HPLC-DAD / Scientifical Researches. Agroalimentary Processes and Technologies. – 2005. – №1 (11). – P. 123–128.

10. Rosdina Rahiman, Mohd Alauddin Mohd Ali, Mohammad Syuhaimi Ab-Rahman Carotenoids Concentration Detection Investigation: A Review of Current Status and Future Trend // International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics. – 2013. – № 5 (3). – P. 446 – 472.

Рецензенты:

Оганесян Э.Т., д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой органической химии
Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ МЗ,
г. Пятигорск;

Компанцев В.А., д.фарм.н., профессор, профессор кафедры неорганической химии
Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ МЗ,
г. Пятигорск.