

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КАРОТИНОИДОВ ОБЛЕПИХОВОГО МАСЛА МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Курегян А.Г.<sup>1</sup>, Печинский С.В.<sup>1</sup>, Карандеева Е.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск (357532, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11), e-mail: Kooreguan@mail.ru

Ведущая роль в пилотных исследованиях любых природных растительных объектов и лекарственных средств на их основе принадлежит тонкослойной хроматографии. В статье приведены результаты сравнительного ТСХ-анализа пяти образцов облепихового масла, полученных по традиционным и экспериментальным технологическим схемам. В качестве подвижных фаз в эксперименте использовали следующие смеси растворителей: гексан- ацетон (6:2), петролейный эфир-диэтиловый эфир-кислота уксусная (85:15:1), диэтиловый эфир-петролейный эфир (3:1), петролейный эфир- бензол (10:1). Идентификацию каротиноидов проводили по стандартным образцам β-каротина, ликопина, лютеина. В результате эксперимента было установлено, что наиболее насыщенными каротиноидами являются образцы облепихового масла, полученные по экспериментальным технологиям. Промышленные образцы двух различных производителей имеют сходный каротиноидный состав. Предварительно был сделан выбор в пользу экспериментальных технологий получения облепихового масла.

Ключевые слова: облепиховое масло, каротиноиды, β-каротин, лютеин, ликопин, зеаксантин, виолаксантин, тонкослойная хроматография, ТСХ, качественный анализ.

## COMPARATIVE ANALYSIS CAROTENOIDS SEA BUCKTHORN OIL TLC

Kuregyan A.G.<sup>1</sup>, Pechinsky S.V.<sup>1</sup>, Karandeeva E.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of SEI HPE Volgograd state medical university MH RF, Pyatigorsk, e-mail: Kooreguan@mail.ru

The leading role in the paid research any natural plant facilities and drugs based on their owned by TLC. In the article presents results of the comparative TLC analysis of five samples of sea buckthorn oil, obtained by traditional and experimental technological schemes. As mobile phases were used in the experiment following a mixed solvent of hexane-acetone (6: 2), petroleum ether-diethyl ether-acetic acid (85: 15: 1), ether-petroleum ether (3: 1), petroleum ether-benzene (10: 1). Identification of carotenoids was carried out according to standard samples β-carotene, lycopene, lutein. The result of the experiment it was established that the most saturated carotenoids are sea buckthorn oil samples obtained from experimental techniques. Designs two different manufacturers have similar carotenoid composition. Previously the choice was made in favor of the experimental technologies for the production of sea buckthorn oil.

Keywords: Sea buckthorn oil, carotenoids, β-carotene, lutein, lycopene, zeaxanthin, violaxanthin, thin layer chromatography, TLC, qualitative analysis.

На современном этапе развития фармацевтической науки исследователи, изучающие природные соединения и лекарственные средства на их основе, имеют возможность решать любые аналитические задачи, применяя современные физико-химические методы. Как правило, на предварительном этапе разделения суммы каротиноидов на индивидуальные вещества применяют тонкослойную хроматографию (ТСХ) [1-4].

При проведении ТСХ-анализа каротиноидов отечественные исследователи идентифицируют эти БАВ по величине коэффициента подвижности или по величине относительного коэффициента подвижности в случае наличия стандартных образцов индивидуальных каротиноидов [5-9].

**Цель исследования** – сравнительный качественный анализ каротиноидов образцов облепихового масла методом ТСХ.

#### **Объекты и методы исследования**

*Объектами исследования* являлись экспериментальные образцы облепихового масла, полученные по различным технологическим схемам, – образец 1, образец 2, образец 3 и образцы облепихового масла производства ЗАО «Алтайвитамины» – образец 4 и ЗАО «Вифитех» – образец 5, реализуемые в розничной аптечной сети.

*Методика ТСХ-анализа каротиноидов.*

*Приготовление испытуемого раствора.* Навеску каждого образца облепихового масла 0,100 г растворяли в 50 мл гексана в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

*Приготовление растворов стандартных образцов (СО) β-каротина, лютеина, ликопина.* Точную навеску СО β-каротина 0,10000 г помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл гексана и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

Точную навеску СО лютеина – 0,10000 г помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл гексана и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

Точную навеску СО ликопина – 0,10000 г помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл гексана и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

*Методика проведения испытания.* На хроматографическую пластинку 10x15 см «Sorbfil» наносили по 10 мкл растворов образцов облепихового масла и по 10 мкл растворов СО образцов β-каротина, лютеина, ликопина.

Образцы хроматографировали восходящим способом в соответствующей подвижной фазе. Составы подвижных фаз:

I – гексан-ацетон (6:2);

II – петролейный эфир-диэтиловый эфир-кислота уксусная (85:15:1);

III – диэтиловый эфир-петролейный эфир (3:1);

IV – петролейный эфир-бензол (10:1).

После продвижения подвижной фазы до края пластинки, пластинку вынимали и сушили. Детекцию зон адсорбции проводили визуально по их окраске. Далее хроматографические пластинки опрыскивали 10% раствором фосфорно-молибденой кислоты с последующим нагреванием до 60°C в течение 2 мин. Зоны адсорбции всех каротиноидов окрашивались в ярко синий цвет.

Идентификацию каротиноидов проводили по сравнению со СО  $\beta$ -каротина, лютеина и ликопина. Остальные каротиноиды идентифицировали по величинам коэффициентов подвижности, сравнивая их с опубликованными в периодической литературе [1, 5, 6, 7] коэффициентами подвижности для данных хроматографических условий.

### **Результаты и их обсуждение**

ТСХ-анализ с использованием подвижной фазы I показал, что образец облепихового масла 1 содержит 6 соединений класса каротиноидов, которые были идентифицированы как виолаксантин ( $R_f=0,114$ ), зексантин (0,314), лютеин (0,371),  $\beta$ -криптаксантин (0,614), ликопин (0,800) и  $\beta$ -каротин (0,971) [1, 2, 10-14].

В образце облепихового масла 2 было подтверждено наличие зеаксантина (0,300), лютеина (0,357),  $\beta$ -криптоксантина (0,600), ликопина (0,829) и  $\beta$ -каротина (0,957). Виолаксантин в этом образце идентифицирован не был [1, 2, 10 – 14].

Установлено, что образец облепихового масла 4 содержит зеаксантин (0,300), ликопин (0,800),  $\beta$ -каротин (0,929) и один не идентифицированный каротиноид. При этом для этого образца облепихового масла не было подтверждено присутствие виолаксантина и лютеина. Экспериментальные данные согласуют с данным Г. Бриттона [10], который констатирует, что эта система растворителей не способна разделять лютеин и зеаксантин. Вероятно, что не идентифицированная зона адсорбции со значением  $R_f=0,675$  соответствует сумме нескольких каротиноидов.

В образцах облепихового масла 3 и 5 был идентифицирован только  $\beta$ -каротин с коэффициентом подвижности 0,929.

Результаты анализа образцов облепихового масла в системе растворителей гексан – ацетон (6:2) показали, что наиболее разнообразный состав каротиноидов имеет образец 1, близким к нему по составу является образец 2. Для промышленного образца производства ЗАО «Алтайвитамины» подтверждено присутствие 3 каротиноидов. Промышленный образец облепихового масла 5 и экспериментальный образец 3 имеют идентичный качественный состав каротиноидов.

При изучении образцов облепихового масла с использованием подвижной фазы II установлено, что каротиноидный состав образца 1 представлен виолаксантином (0,180), зеаксантином (0,410), лютеином (0,484), ликопином (0,672),  $\beta$ -каротином (0,746). Последовательность расположения зон адсорбции виолаксантина, зеаксантина и лютеина дополнительно подтверждается данными литературы. В частности согласно данным Г. Бриттона [10] зеаксантин, представляющий собой  $\beta,\beta$ -каротин-3,3'-диол, имеет большее сродство к неподвижной фазе и прочнее удерживается на ней, чем лютеин ( $\beta,\epsilon$ -каротин-3,3'-диол). Кроме того, зексантин является менее полярным соединением, чем виолаксантин и

имеет большее сродство в подвижной фазе, следовательно, его зона адсорбции (около 0,410) ожидаемо находится выше зоны адсорбции виолаксантина (около 0,2). Дополнительно в образце было установлено присутствие одного не идентифицированного каротиноида с коэффициентом подвижности 0,098. Природа соединения не вызывает сомнений, т.к. зона адсорбции была изначально окрашена в желтый цвет, а после ее обработки проявителем, окрасилась в синий цвет. Кроме того, хроматографическая подвижность этого соединения позволяет предположить, что это – производное каротина, т.к. зона около 0,2 соответствует производным три- и тетрагидрокаротиноидам [1, 2].

В образце 2 были идентифицированы лютеин (0,475) и  $\beta$ -каротин (0,738) и дополнительно детектированы два не идентифицированных каротиноида с коэффициентами подвижности 0,09 и 0,631.

На хроматограмме образца 3 нанесенная проба осталась на линии старта хроматографической пластинки.

После хроматографирования образца 4 в нем были идентифицированы зеаксантин (0,410), лютеин (0,492), ликопин (0,658) и  $\beta$ -каротин (0,732). Пятый не идентифицированный каротиноид имел коэффициент подвижности около 0,08.

Как показали данные эксперимента, каротиноидный состав образца облепихового масла 5 представлен тремя соединениями:  $\beta$ -каротином (0,746) и двумя не идентифицированными каротиноидами с коэффициентами подвижности 0,110 и 0,630.

Таким образом, ТСХ-анализ пяти образцов облепихового масла в системе растворителей петролейный эфир-диэтиловый эфир-кислота уксусная (85:15:1) свидетельствует, что наиболее широкий каротиноидный состав у экспериментальных образцов 1 и 2 – это 6 и 4 соединения соответственно. Промышленный образец облепихового масла 4 содержит 5 каротиноидов, качественный состав образца 5 представлен 3 веществами этого класса. Отсутствие зон адсорбции на хроматограмме образца 3 позволяет предположить, что в данных хроматографических условиях разделить каротиноиды этого образца не представляется возможным.

Анализ образцов облепихового масла в системе растворителей III позволил установить, что образец масла 1 содержит наибольшее количество идентифицированных каротиноидов:  $\beta$ -криптоскантин (0,197), лютеин (0,620), ликопин (0,660) и  $\beta$ -каротин (0,756), кроме того в этом образце в отличие от образца 2 идентифицирован зеаксантин (0,399). Один каротиноид с коэффициентом подвижности 0,087 не был идентифицирован.

Шесть веществ из класса каротиноидов были обнаружены в образце 2. При этом идентифицированы  $\beta$ -криптоскантин (0,203), лютеин (0,630), ликопин (0,659) и  $\beta$ -каротин

(0,761), кроме того, в образце присутствуют два вещества с коэффициентами подвижности 0,123 и 0,464.

Следует отметить, что для образцов 4 и 5 было установлено содержание  $\gamma$ -каротина (0,725) и оба образца показали наличие  $\beta$ -каротина – 0,754 и 0,761, соответственно. Кроме того, образец 4 содержит не идентифицированный каротиноид с коэффициентом подвижности около 0,130.

Данные хроматографические условия позволили зафиксировать наличие  $\beta$ -криптоксантин (0,210), лютеин (0,620) и ликопин (0,670) в экспериментальном образце облепихового масла 3.

Результаты анализа доказывают сходство основного каротиноидного состава экспериментальных образцов облепихового масла 1 и 2. Оба промышленных образца облепихового масла 4 и 5 содержат  $\gamma$ - и  $\beta$ -каротин.

В результате хроматографического анализа образцов облепихового масла в системе растворителей IV установлено, что образец 1 характеризуется присутствием  $\beta$ -каротина (0,028; ярко-оранжевая окраска пятна), ликопина (0,056; красно-розовая окраска пятна),  $\beta$ -криптоксантина (0,066; зелено-желтая окраска пятна), рубиксантина (0,151; розовая окраска пятна). Два соединения не были идентифицированы, однако окраска зон адсорбции до обработки проявительным реактивом – желтая и желто-оранжевая, а после – синяя, позволяют предположить, что это производные каротина (0,189; 0,208). Кроме того, хроматографическая подвижность этих соединений в данной системе растворителей, которая является специфической для каротиноидов, позволяет отнести эти вещества к этому классу БАВ.

Для образца 2 установлено присутствие  $\beta$ -каротина (0,028; ярко-оранжевая окраска пятна),  $\beta$ -криптоксантина (0,063; зелено-желтая окраска пятна), лютеина (0,179; ярко розовая окраска пятна), виолаксантина (0,198; розово-желтая окраска пятна) и зеаксантина (0,340; оранжевая окраска пятна).

Анализ образца 3 показал наличие в нем 3 каротиноидов:  $\beta$ -каротина (0,02; ярко-оранжевая окраска пятна), ликопина (0,058; красно-розовая окраска пятна), виолаксантина (0,197; розово-желтая окраска пятна).

Промышленные образцы 4 и 5 имеют сходный состав, представленный идентифицированными каротиноидами:  $\beta$ -каротином (0,028; ярко-оранжевая окраска пятна), ликопином (0,057; красно-розовая окраска пятна), рубиксантином (0,151; розовая окраска пятна) и зеаксантином (0,340; оранжевая окраска пятна). Кроме того образец 4 дополнительно содержит лютеин (0,170; ярко розовая окраска пятна) и виолаксантин (0,198; розово-желтая окраска пятна), которые не были обнаружены в образце 5. Образец

облепихового масла 5 содержит не идентифицированный каротиноид с коэффициентом подвижности 0,189.

ТСХ-анализ в системе растворителей петролейный эфир – бензол (10:1) образца 1 показал присутствие 6 каротиноидов, в образце 2 – наличие 5 производных каротина, в образце 3 – наличие 3 каротиноидных соединений. Кроме того, анализ в этой подвижной фазе подтвердил сходный основной качественный состав промышленных образцов 4 и 5.

#### **Выводы:**

1. Максимально широкий качественный каротиноидный состав имеют образцы облепихового масла 1 и 2, полученные по экспериментальным технологиям.
2. Промышленные образцы 4 и 5 имеют сходный качественный состав каротиноидов.
3. Наиболее эффективными для качественного анализа каротиноидов методом ТСХ можно считать подвижные фазы I, II, IV.
4. Предварительно в качестве оптимальных можно выбрать экспериментальные технологии, по которым были получены образцы облепихового масла 1 и 2.

#### **Список литературы**

1. Дороднева В.И. Идентификация каротиноидов листьев грецкого ореха (*Juglans regia* L.) методами спектрофотометрии и тонкослойной хроматографии // Растительные ресурсы. – 1967. – №2. – С. 266 – 268.
2. Ершова И.В. Оценка Алтайских сортов и гибридов облепихи по биохимическому составу // Достижения науки и техники АПК. – 2009. – №7. – С. 11 – 12.
3. Кисличенко В.С., Упыр Л.В., Пузан О.А. Анализ липофильных фракций листьев и веток *Armeniaca vulgaris* // Химия природных соединений. – 2007. – № 6. – С. 571.
4. Мельников О.М., Верещагин А.Л., Кошелев Ю.А. Исследование биологически активных соединений почек и листьев мужских растений облепихи крушиновидной // Химия растительного сырья. – 2010. – №2. – С. 113 – 116.
5. Первушкин С.В. Методики идентификации различных пигментов и количественного спектрофотометрического определения суммарного содержания каротиноидов и белка в фитомассе *S.platensis* (Nords.) Geilt. / С.В. Первушкин, В.А.Куркин, А.В. Воронин и др. // Растительные ресурсы. – 2002. – №1. – С. 112 – 119.
6. Сергеева Н.В., Захарова Н.Д. Качественное и количественное изучение каротиноидов в некоторых галеновых препаратах // Фармация. – 1977. – №1. – С. 34 – 38.
7. Усмонова Ш.Х., Ибрагимов Д.Э., Халиков Ш.Х. Каротиноиды семян *Bunium persicum* (Voiss.) В. Fedtsch., произрастающего в Таджикистане // Доклады Академии наук Республики

Таджикистан. – 2010. – №5. – С. 377 – 381.

8. Юнусова Ф.М., Рамазанов А.Ш., Юнусов К.М. Эколого-географическая изменчивость плодов *Hippophae Rhamnoides* L. по содержанию токоферолов и каротиноидов // Вестник Дагестанского государственного университета. – 2012. – Вып. 1. – С. 191 – 196.

9. Яковлева Т.П., Фролкова А.А., Филимонова Е.Ю. Влияние метеорологических условий на биохимические процессы в плодах облепихи в период созревания // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. – № 11. – С. 28 – 31.

10. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids Handbook. Basel AG.: Springer, 2004. 646 p.

11. Monika Waksmundzka-Hajnos, Joseph Sherma, Teresa Kowalska Thin Layer Chromatography in Phytochemistry Boca Raton, London, New York .: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008. 875 p.

**Рецензенты:**

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

Кайшева Н.Ш., д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.