



К. О. Дегтярьова, В.О. Грудько, Л. І. Вишневська, Є.І. Бісага

Визначення біологічно активних сполук у ліпофільних екстрактах гарбуза методом тонкошарової хроматографії

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: гарбуз, біологічно активні сполуки, каротиноїди, фітостерини, тонкошарова хроматографія.

Каротиноїди є розповсюдженим і важливим класом природних жиророзчинних пігментів, основна дія яких полягає в запобіганні утворення вільних радикалів. Тому одним із завдань на шляху створення лікарських препаратів, що містять каротиноїди, є розробка способу їх виявлення та ідентифікації в рослинних об'єктах.

Мета роботи – вивчити біологічно активні сполуки у ліпофільних екстрактах гарбуза методом тонкошарової хроматографії. У статті експериментально вивчені системи розчинників, досліджені різні проявники, що рекомендовані в літературі, а також підібрані нами самостійно. У результаті встановили біологічно активні сполуки ліпофільного характеру, ідентифікували β-каротин, обрали систему розчинників і реагенти для ідентифікації β-каротину. Це свідчить, що розроблена методика надалі може бути включена в методи контролю якості для визначення β-каротину в ліпофільному екстракті гарбуза.

Определение биологически активных соединений в липофильных экстрактах тыквы методом тонкослойной хроматографии

Е. А. Дегтярёва, В. А. Грудько, Л. И. Вишневская, Е. И. Бисага

Каротиноиды являются распространённым и важным классом природных жирорастворимых пигментов, основное действие которых заключается в предотвращении образования свободных радикалов. Поэтому одной из задач на пути создания лекарственных препаратов, которые содержат каротиноиды, является разработка способа их выявления и идентификации в растительных объектах.

Цель работы – изучить биологически активные соединения в липофильных экстрактах тыквы методом тонкослойной хроматографии. В статье экспериментально изучены системы растворителей, исследованы разные проявители, которые рекомендованы литературой, а также подобраны нами самостоятельно. В результате установлены биологически активные соединения липофильного характера, идентифицирован β-каротин, выбрана система растворителей и реагенты для идентификации β-каротина. Это свидетельствует о том, что разработанная методика в дальнейшем может быть включена в методы контроля качества для определения β-каротина в липофильном экстракте тыквы.

Ключевые слова: тыква, биологически активные вещества, каротиноиды, фитостерини, тонкослойная хроматография.

Актуальные вопросы фармацевтической и медицинской науки и практики. – 2015. – № 2 (18). – С. 45–48

Determination of biologically active compounds in lipophilic extracts of pumpkin using thin layer chromatography

E. A. Degtyaryova, V. A. Grudko, L. I. Vishnevskaya, E. I. Bisaga

Aim. Carotenoids are a common and important class of natural fat-soluble pigments. The prevention of free radicals formation is the carotenoid's primary effect. One of the tasks while creating medicines which contain carotenoids is the identification of them in plant objects.

Methods and results. Our purpose is the determination of biologically active compounds in lipophilic extracts of pumpkin using thin layer chromatography. The article presents the experimental study of solvent systems. Although, different developers which are recommended in literature have been chosen and investigated. As a result biologically active compounds of the lipophilic character have been identified, β-carotene has been identified, solvents and reagents for the identification of β-carotene have been selected.

Conclusion. This method can be included to the quality control methods to determine β-carotene in the lipophilic pumpkins extracts.

Key words: Cucurbita, Biologically Active Connections, Carotenoids, Phytosterols, Thin Layer Chromatography.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2015; № 2 (18): 45–48

З метою виявлення нових природних джерел біологічно активних речовин (БАР) сьогодні все більше уваги приділяється використанню сільськогосподарських, побічних і відходів перероблення харчових продуктів, зокрема вичавків, шроту.

Каротиноїди є одним із важливих класів природних сполук, що містяться в рослинній сировині та відіграють важливу провітамінну та антиоксидантну дію, складаючи невід'ємну частину харчування [5].

Найбільш важливим і поширеним джерелом кароти-

ноїдів є різні рослини (овочі та фрукти). Одним із таких рослинних продуктів є гарбуз (від лат. *Cucurbita L.*). Однак ця рослина має значні відмінності щодо складу поживних речовин залежно від умов зростання, виду та його частин (насіння чи м'якоть) [10,11].

Якісний аналіз каротиноїдів, згідно з даними літературних джерел [2,6–8,9,12,13], найчастіше здійснюють хроматографічними методами.

Тонкошарова хроматографія (ТШХ) посідає особливе місце серед інших хроматографічних методів завдяки

простоті методу та доступності обладнання, широкій області застосування, доволі високій економічності, селективності та чутливості, продуктивності, можливості одночасного поділу декількох зразків, простоті проведення тощо [1,3].

Мета роботи

Розробка ефективних методик контролю вмісту біологічно активних сполук гарбуза методом ТШХ.

Матеріали і методи дослідження

Об'єктами дослідження були: ліпофільний екстракт зі шроту насіння гарбуза, що одержаний після екстракції фреоном-22 (зразок № 1) та гексаном (зразок № 2); ліпофільний екстракт із вичавків м'якоти гарбуза, що одержаний після екстракції фреоном-22 (зразок № 3) та гексаном (зразок № 4); а також олія з насіння гарбуза Науково-виробничого ТОВ «Житомирбіопродукт» (ДСТУ ISO 9001:2009). Для проведення аналізу готували розчини досліджуваних об'єктів у гексані у співвідношенні екстракт-розчинник (для ліпофільних екстрактів 1:25; для олії з насіння гарбуза 1:50).

Якісний аналіз виконали методом тонкошарової хроматографії на пластині із силікагелем марки *Sorbfil* (РФ).

Методика хроматографування: на лінію старту (1,5–2,0 см від краю пластини) тонкою лінією наносили об'єкти дослідження в кількості 10 мкл. Пластину в герметичній камері вміщували в розчинник, який виконував роль рухомої фази. Час експонування становив 20–30 хв (залежно від системи).

Результати та їх обговорення

На першому етапі роботи виконали дослідження щодо вибору елюентів для визначення ліпофільних сполук, зокрема β-каротину (як основна діюча речовина у складі екстрактів гарбуза) (рис. 1) і стеринів (рис. 2).

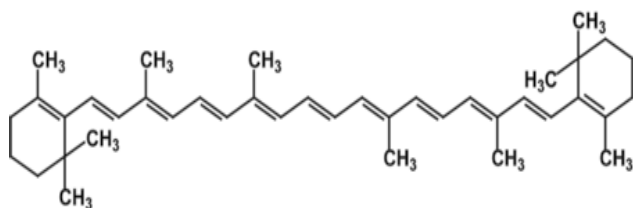


Рис. 1. β-каротин.

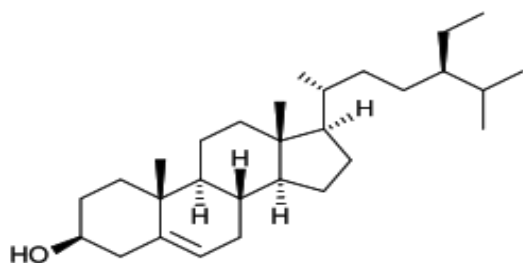


Рис. 2. β-ситостерол.

Експериментально вивчили системи розчинників, запропоновані в літературі, а також нові хроматографічні системи. Використані такі системи розчинників: ацетон Р – гексан Р (3:7), бензол Р – ацетон Р (25:1), гексан Р – хлороформ Р (2:1), бензол Р – етилацетат Р – метанол Р (100:6:0,5).

Обрали систему розчинників бензол – ацетон у співвідношенні (25:1), оскільки система дала найбільшу кількість чітко виражених і розділених плям, що надалі можуть бути виявлені за допомогою різних реагентів.

Далі необхідно було обґрунтувати вибір проявника для ідентифікації β-каротиноїдів. З цією метою дослідили різні проявники, що рекомендовані в літературі, а також підібрані нами самостійно. Критерій вибору проявників – висока чутливість реакції й утворення стійкого інтенсивного забарвлення продуктів взаємодії каротиноїдів і стеринів із певним реагентом.

Таблиця 1

Характеристика реагентів для ідентифікації БАР екстрактів гарбуза

Проявник	Результат виявлення
5% спиртовий розчин фосфорномолібденової кислоти (ФМК) (токофероли, каротиноїди)	Проявляються яскраво-сині плями на жовтому тлі, що довго не зникають.
Йод (стерини, жирні кислоти, каротиноїди)	З'являються яскраво-жовті плями на білому тлі, що поступово зникають.
Хлорид (III) сурми (каротиноїди)	З'являються основні блакитні плями на білому тлі, що поступово зникають.
УФ світло (каротиноїди)	Виявляються декілька жовто-зелених плям.
Без проявника	Спостерігаються блідо-жовті плями на лінії старту.

У таблиці 1 наведені характеристики реагентів, які ми обрали для ідентифікації каротиноїдів і стеринів. Результати спостережень наведені на рис. 3–8.

Як видно з рис. 6, у зразку олії з насіння гарбуза (НВ ТВО «Житомирбіопродукт») у гексані (1:50), ідентифікували β-каротин за допомогою розрахунку R_f, що становило 0,35. Згідно з даними літератури [4,8,13], а також відповідно до R_f β-каротину – 0,36 (рис. 5) – це підтверджує наявність β-каротину в об'єктах, що досліджували.

Далі ми виявили БАР, у тому числі β-каротин, у ліпофільних екстрактах гарбуза, дотримуючись тих самих умов аналізу.

Отже, аналізуючи рис. 5–8, видно, що крім плям β-каротину виявили й інші хроматографічні плями, які ідентифікували за допомогою величини R_f. На хроматограмах виявлені зони, які є однаковими для усіх зразків, що випробовували, однак наявні також зони та групи зон, що характерні для кожного зразка.

У підсумку вдалося ідентифікувати β-каротин на трьох хроматографічних пластиніах (після реакції з 5% спиртовим розчином ФМК та після реакції з йодом в екстракті м'якоти гарбуза). Також в екстрактах гарбуза вдалося виявити інші біологічно активні сполуки, котрі ймовірно належать до ліпофільної природи. Система, яку обрали, дає задовільне розділення хроматографічних плям речовин.

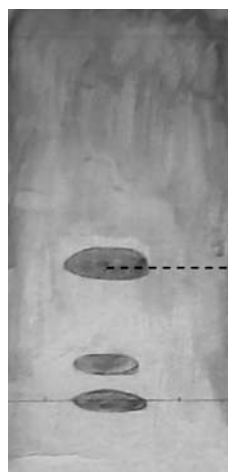


Рис. 3. Хроматограма після обробки спиртовим р-м 5% фосфорномолібденової кислоти; β -каротин.

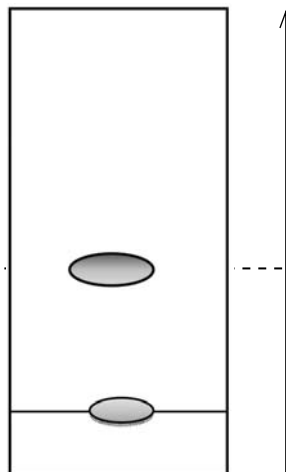


Рис. 4. Хроматограма після обробки спиртовим р-м 5% фосфорномолібденової кислоти; олія з насіння гарбуза (НВ ТВО «Житомирбіопродукт») у гексані (1:50).

Rf	Rf β -каротину	Назва сполуки
0,35	0,36	β -каротин

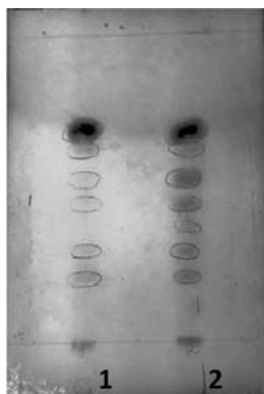


Рис. 5. Хроматограма після обробки спиртовим р-м 5% ФМК; (1) – екстракт №1; (2) – екстракт №2.

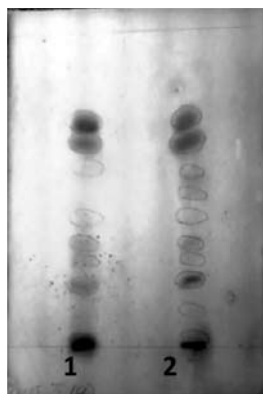


Рис. 6. Хроматограма після обробки спиртовим р-м 5% ФМК; (1) – екстракт №3; (2) – екстракт №4.



Рис. 7. Хроматограма після обробки йодом; (1) – екстракт №1; (2) – екстракт №2.

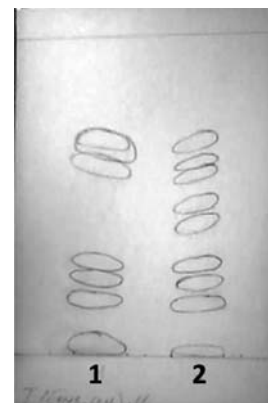


Рис. 8. Хроматограма після обробки йодом; (1) – екстракт м'якоти №3; (2) – екстракт №4.

Висновки

1. Методом тонкошарової хроматографії досліджено вміст біологічно активних сполук гарбуза в ліпофільних екстрактах (насіння та м'якоть).

2. На підставі експериментальних досліджень обрана система розчинників – бензол – ацетон (25:1) і реагенти для ідентифікації β -каротину.

Перспективи подальших досліджень полягають у тому, що розроблена методика може бути включена в методику контролю якості для визначення β -каротину в ліпофільних екстрактах гарбуза або лікарському препараті на його основі для використання в фармацевтичній промисловості.

Список літератури

- Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии / Ф. Гейсс. – М. : Мир, 1999. – Т. 1. – 405 с.
- Дайронас Ж.В. Изучение состава липофильной фракции листьев ореха грецкого, произрастающего в кавказских минеральных водах / Ж.В. Дайронас, И.В. Пшукова // Химия растительного сырья. – 2010. – №4. – С. 91–93.
- Евгеньева И.И. Планарная хроматография и анализ органических веществ / И.И. Евгеньева // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – №11. – С. 50–55.
- Кейтс М. Техника липидологии / М. Кейтс. – М., 1975. – 324 с.
- Воздействие этилендиаминдиянтарной кислоты и ее комплекса с цинком на содержание каротиноидов в растениях / Т.И. Смирнова, Е.Д. Малахаев, И.Н. Барановский // Вестник Тверского государственного университета. Серия «Химия». – 2012. – Вып. 13. – С. 61–65.
- Исследование золя водных извлечений чаги. XI. Липиды водного извлечения чаги / М.А. Сысоева, В.Р. Хабибрахманова,

- В.С. Гамаюрова и др. // Химия растительного сырья. – 2008. – №3. – С. 119–122.
7. Разработка экспрессных методов аналитической экстракции каротиноидов из растительного сырья / Н.В. Ульяновский, Д.С. Косяков, К.Г. Боголицын и др. // Химия растительного сырья. – 2012. – №4. – С. 147–152.
8. Методика определения каротиноидов методом хроматографии в тонком слое сорбента / О.В. Чечета, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т. 8. – Вып. 2. – С. 320–326.
9. Шаповалова Е.Н. Хроматографические методы анали за: методическое пособие для специального курса / Е.Н. Шаповалова, А.В. Пирогов. – М., 2007. – С. 203.
10. Shobha Borhade. Extraction and characterisation of pumpkin (*Cucurbita Mixta*) seed oil / Shobha Borhade // Life sciences Leaflets. – 2012. – Vol. 7. – P. 45–49.
11. Mi Young K., Eun Jin K., Young-Nam K. et al. // Nutrition Research and Practice (Nutr Res Pract). – 2012. – №6(1). – P. 21–27.
12. Okoro I.A. Isolation and identification of lipids from different parts of fluted pumpkin seeds / I.A. Okoro, C.A. Okoro // Research Journal of Applied Sciences. – 2007. – №2(1). – P. 114–116.
13. Application of derivative ratio spectrophotometry for determination of β -carotene and astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* extract / Hui Ni, Guo-qing. Hui Ruan et al. // J Zhejiang Univ Sci B. – 2005. – №6(6). – P. 514–522.
5. Smirnova, T. I., Malakhaev, E. D., Baranovskij, I. N., & Smirnova, O. V. (2012). Vozdejstvie e' tilendiamindiyantarnoj kisloty i ee kompleksa s cinkom na sodержanie karotinoidov v rasteniyakh [Impact etilendiamindiyantarnoy acid and its complex with zinc content of carotenoids in plants]. *Vestnik Tverskogo gosudarstvennogo universiteta Seriya «Khimiya»*, 13, 61–65. [in Russian].
6. Sysoeva, M. A., Khabibrakhmanova, V. R., Gamayurova, V. S., & Tazeeva, A. Kh (2008). Issledovanie zolya vodnykh izvlechenij chagi. XI. Lipidy vodnogo izvlechenija chagi [Investigation of sol water extraction of fungus. XI. Lipids aqueous extract of fungus]. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 3, 119–122. [in Russian].
7. Ulyanovskij, N. V., Kosyakov, D. S., Bogolicin, K. G., Ivakhnov, A. D., & Bogolocin, A. G. (2012). Razrabotka e' kspressnykh metodov analiticheskoy e' kstraktsii karotinoidov iz rastitel'nogo syr'ya [Development of rapid methods of analytical extraction of carotenoids from vegetable raw materials]. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 4, 147–152. [in Russian].
8. Checheta, O. V., Safonova, E. F., & Slivkin, A. I. (2008). Metodika opredeleniya karotinoidov metodom khromatografii v tonkom sloe sorbenta [Method of determination of carotenoids by thin-layer chromatography sorbent]. *Sorbcionnye i khromatograficheskie procesy*, 8(2), 320–326. [in Russian].
9. Shapovalova, E. N., & Pirogov, A. V. (2007). *Khromatograficheskie metody analiza [Chromatographic methods of analysis: a manual for special course]*. Moscow. [in Russian].
10. Shobha Borhade (2012). Extraction and characterisation of pumpkin (*Cucurbita Mixta*) seed oil. *Life sciences Leaflets*, 7, 45–49.
11. Mi Young K., Eun Jin K., Young-Nam K., et al. (2012). *Nutrition Research and Practice (Nutr Res Pract)*, 6(1), 21–27.
12. Okoro, I. A., & Okoro, C. A. (2007). Isolation and identification of lipids from different parts of fluted pumpkin seeds. *Research Journal of Applied Sciences*, 2(1), 114–116.
13. Ni, H., He, G. Q., Ruan, H., Chen, Q. H., & Chen, F. (2005) Application of derivative ratio spectrophotometry for determination of β -carotene and astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* extract. *J Zhejiang Univ Sci B.*, 6(6), 514–522. doi: 10.1631/jzus.2005.B0514.

Відомості про авторів:

Дегтярєва К. О., аспірант каф. аптечної технології ліків, Національний фармацевтичний університет, E-mail: kate.deg@yandex.ru.
Грудько В. О., к. фарм. н., доцент каф. фармацевтичної хімії, Національний фармацевтичний університет.
Вишневська Л. І., д. фарм. н., професор, зав. каф. аптечної технології ліків, Національний фармацевтичний університет.
Бісага Є. І., к. фарм. н., доцент каф. фармацевтичних дисциплін, Ужгородський національний університет.

Сведения об авторах:

Дегтярєва Е. А., аспирант каф. аптечной технологии лекарств, Национальный фармацевтический университет, E-mail: kate.deg@yandex.ru.
Грудько В. А., к. фарм. н., доцент каф. фармацевтической химии, Национальный фармацевтический университет.
Вишневская Л. И., д. фарм. н., профессор, зав. каф. аптечной технологии лекарств, Национальный фармацевтический университет.
Бисага Е. И., к. фарм. н., доцент каф. фармацевтических дисциплин, Ужгородский национальный университет.

Information about authors:

Degtyarova E. A., Postgraduate student of Chemical Technology of Drugs Department, National University of Pharmacy, Ukraine, Kharkiv, E-mail: kate.deg@yandex.ru.
Grudko V. A., Ph.D., Associate Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, National University of Pharmacy, Ukraine, Kharkiv.
Vishnevskaya L. I., Dr.hab., Professor of Chemical Technology of Drugs Department, National University of Pharmacy, Ukraine, Kharkiv.
Bisaga E. I., Ph.D., Associate Professor, Department of Pharmaceutical Sciences, Uzhhorod National University.

Надійшла в редакцію 22.05.2015 р.