



УДК 615.322:615.074

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНОИДОВ ПЛОДОВ ОБЛЕПИХИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ¹

В.И. Дейнека
Р.В. Подкопайло
Л.А. Дейнека
В.Н. Сорокопудов
И.А. Гостищев

Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет, 308015 Белгород,
Россия, ул. Победа.85

e-mail: deineka@bsu.edu.ru
prizract@yandex.ru
Dejneka@bsu.edu.ru
sorokopudov@bsu.edu.ru
dzelu@yandex.ru

В работе исследован каротиноидный комплекс плодов 20 сортов облепихи из Ботанического сада БелГУ методом ВЭЖХ в ортогональном варианте – с использованием обращенно-фазовой и нормально-фазовой ВЭЖХ. Установлено, что изученные плоды содержат 5.5 – 24.0 мг % каротиноидов, представленных каротинами и ксантофиллами в различном соотношении; из ксантофиллов основными являются лютеин и зеаксантин – в различных формах: неэтерифицированной и в виде моно- и диэфиров. Показано присутствие β- и γ-каротинов и ликопина.

Ключевые слова: *Hippophae rhamnoides*, каротиноиды, ВЭЖХ, ортогональное разделение

Упоминание об использовании облепихи крушиновидной (*Hippophaë rhamnoides* L.) в медицине обнаружено в древнегреческих текстах, приписываемых Теофрасту и Диоскориду и в прописях классической Тибетской медицины [1]. В официальную фармакопею СССР было внесено облепиховое масло [2], добываемое не из семян, а из мякоти плодов, где его уровень накопления достигает 8-9 масс. %, и которое рекомендуется для лечения ожогов, пролежней, обмороживания, старческой катаракты, гастритов, диабета, малокровия, гипертонии, различных язв, атеросклероза. Лекарственное значение продуктов переработки плодов этого растения признано во всем мире [1, 3].

Масло плодов облепихи обладает уникальным набором биологически активных соединений [4, 5], среди которых можно выделить каротиноиды. Исследованию каротиноидов плодов облепихи посвящено большое число работ [4 - 9]. В обзоре узбекских исследователей [4] отмечается, что в свежих плодах содержание каротиноидов может достигать 20.76 мг% (до 425 мг% - для сушеных плодов); при этом на β-каротин может приходиться 14.7 – 36.9 % от суммы каротиноидов, что свидетельствует о высокой провитаминной А активности плодов облепихи. В масле плодов облепихи содержание каротиноидов заметно выше – 168 – 1089 мг%. Кроме β-каротина в плодах обнаружено около сорока других каротиноидов, - ликопина и других каротинов и разнообразных ксантофиллов, присутствующих в различных количествах. Поскольку уровень накопления любых биологически активных веществ может существенно различаться для плодов различных видов, сортов и условий выращивания, то сведения о соотношении между накоплением индивидуальных каротиноидов заметно различаются. Например, в плодах трех сортов облепихи, выращенных в условиях Белоруссии [5], обнаружены α-, β- и γ-каротины, ликопин, поли-цис-ликопин и зеаксантин. В плодах облепихи сорта «Обильная» [6] к качеству основных каротиноидов найдены β-криптоксантин (18.4 %), β-каротин (15.8 %), лютеин (14.2 %) и тараксантин (12.4 %), несколько меньше содержание β-зеакаротина (7.3 %), ликопина (6.0 %) и ауроксантина (5.8 %).

Изначально для определения состава каротиноидного комплекса использовали комбинацию колоночной хроматографии с тонкослойной. Существенное увеличение надежности определения индивидуальных каротиноидов в сложной смеси было достигнуто благодаря развитию высокоэффективной жидкостной хроматографии, особенно при использовании диодно-матричного и масс-спектрометрического детекторов.

¹ Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, ГК П-174.

По результатам исследования экстракта плодов облепихи, выращенной в Румынии [7], каротиноидный комплекс плодов содержит зеаксантин, ликопин, β -, и γ -каротины и эфиры β -криптоксантина и зеаксантина. В другой работе румынских исследователей [8] указывается, что кроме диэфиров зеаксантина в плодах содержатся и диэфиры лютеина. Исследование накопления каротиноидов в плодах по мере созревания, выполненное шведскими учеными [9], показало, что концентрация не этерифицированного зеаксантина несколько повышается, а лютеина, присутствующего всегда в меньших количествах – уменьшается, так что их сумма изменяется лишь незначительно; уровень накопления β -каротина возрастает за полтора месяца в 2.5 раза, а наибольший рост концентрации получен для этерифицированных ксантофиллов (в 6.5 раза), которые в конце концов оказываются доминирующими компонентами.

Внимание на присутствие в плодах облепихи лютеина и зеаксантина (и их эфиров) акцентировано по той причине, что современные исследования показывают необходимость этих двух ксантофиллов для предотвращения возрастной макулярной дистрофии [10]. Соответственно, существует проблема поиска природных источников зеаксантина, для решения которой, в частности, предлагают и использование плодов облепихи [11].

Наши предварительные результаты исследования каротиноидов плодов облепихи показали, что для многих сортов облепихи, выращиваемых в Ботаническом саду БелГУ, характерно накопление и лютеина и зеаксантина, причем чаще – с преимущественным накоплением первого из них [12]. Отметим, что каротиноидный состав облепихового масла может быть использован для установления его подлинности.

Материалы и методы исследования

Облепиху собирали в стадии технической спелости в ботаническом саду БелГУ, замораживали в морозильной камере где и хранили до исследования. Ягоды (0.5 г) размораживали, отделяли от семян и растирали в фарфоровой ступке с прокаленным сульфатом натрия под слоем ацетона (5-10 мл). После отстаивания ацетоновый экстракт отфильтровывали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 25 см³. К остатку в ступке добавляли новую порцию ацетона и экстракцию повторяли несколько раз – до обесцвечивания экстракта. Объединенные фильтраты доводили до метки ацетоном и перед записью спектров (спектрофотометр СФ-56, кварцевые кюветы) профильтровывали через одноразовые пластиковые фильтры для ВЭЖХ. Этот раствор использовали и для определения каротиноидов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ после концентрирования в вакуумном ротационном испарителе. Перед определением каротиноидов методом нормально-фазовой ВЭЖХ экстракт реэкстрагировали в *n*-гексан добавлением к ацетоновому экстракту водного раствора хлорида натрия.

Условия ВЭЖХ определения. В работе использовали хроматограф Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектором (диапазон спектра 370 – 600 нм) с записью хроматограмм при 450 нм. В случае обращенно-фазовой хроматографии применяли колонку 250x4 мм Reprosil-Pur C18-AQ, 5 мкм; подвижную фазу: 20 об.% ацетонитрила (для ВЭЖХ) в ацетоне, 1 мл/мин. В случае нормально-фазовой ВЭЖХ применяли колонку 250x4 мм Силасорб 300, 5 мкм; подвижную фазу 30 об.% ацетона в *n*-гексане, 1 мл/мин.

Результаты исследования и их обсуждение

Возможные компоненты каротиноидного комплекса плодов облепихи охватывают широкий диапазон липофильности (ALOGPs от 8.30 до 11.01, [13]), поэтому полный спектр может быть проанализирован только в градиентных условиях, которые нежелательны для целого ряда задач. В настоящей работе было решено использовать ортогональное разделение [14] (разделение по взаимодополняющим независимым свойствам аналитов) – методами нормально-фазовой и обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Хроматограмма экстракта каротиноидов плодов облепихи сорта «Бочонок», записанная в условиях нормально-фазовой ВЭЖХ, представлена на рис.1.



Рис.1. Разделение компонентов каротиноидного комплекса плодов облепихи сорта «Бочонок» в условиях нормально-фазовой ВЭЖХ. Колонка: 250x4 мм Силасорб 300, 5 мкм, подвижная фаза: 30 об.% ацетона в гексане, 1 мл/мин; детектор 450 нм

На хроматограмме обнаруживается несколько групп относительно слабо удерживаемых каротиноидов (пики №1 - 5), лютеин (пик №6), зеаксантин (пик №7) и небольшое количество более полярного ксантофилла (пик №8). Отнесение пиков №6 и №7 к лютеину и зеаксантину, соответственно, выполнено сопоставлением их спектров с литературными данными, рис.2, и совпадением их времен удерживания со временами удерживания основных компонентов каротиноидного комплекса яичного желтка [15].

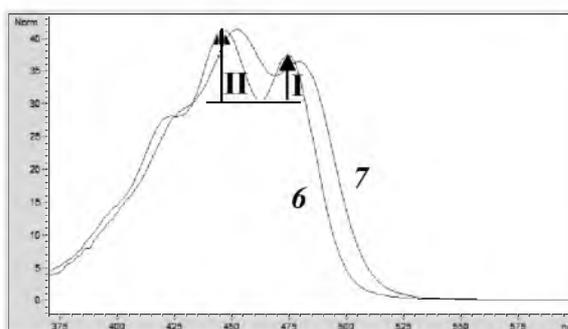


Рис.2. Спектр пиков №6 и №7 на рис.1. Спектр записан в подвижной фазе, содержащей 30 об.% ацетона в н-гексане

Положение второго (по энергии перехода) максимума пика №7 – 452 нм и относительно большое соотношение II/I, рис.2, (около 2.5) характерно для симметричных сопряженных структур типа β -каротина, к которым относится и зеаксантин. Гипсохромное смещение второго максимума на 5 – 7 нм характерно для удаления кольцевой (т.е. не копланарной с остальной системой двойных связей) двойной С=С-связи из цепи сопряжения хромофора, характерное для структур с хромофорами типа α -каротина, что соответствует лютеину, что подтверждается заметным снижением соотношения II/I до 1.5. Отметим, что по площадям пиков в комплексе превалирует лютеин – при соотношении к зеаксантину 1,6:1.

Спектр пика №8 подобен спектру ликопина, и может относиться либо к *цис*-изомеру ликопина, либо, что более вероятно, к 5,6-эпоксизеаксантину.

Пик №1 – принадлежит к наиболее неполярному компоненту каротиноидного комплекса. Однако, при небольших временах удерживания рассчитывать на гомогенность пиков сложно. И действительно, спектры пика в различных его точках различаются, рис.3.

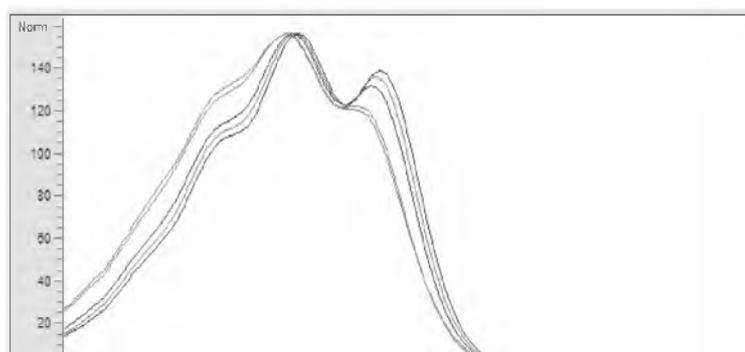


Рис.3. Спектр пика №1 на рис.1. Спектр записан в подвижной фазе, содержащей 30 об.% ацетона в н-гексане

Вначале спектр относится к α -каротиновому типу, но при перемещении от начала пика к его тылу положение второго максимума немного смещается влево, а первого максимума – также влево со смещением вниз. Т.е. в данном пике нет β -каротина, вообще не содержащего полярных групп. Следовательно, следует предположить присутствие в этом пике диэфиров лютеина, возможно, и зеаксантина и продуктов эпоксицирования. Такое неожиданно слабое удерживание может быть связано с эксклюзивным механизмом, при котором доступная к сорбции поверхность силикагеля уменьшается при добавлении больших углеводородных радикалов в сложноэфирных группировках диэфиров.

Не является гомогенным также пик №2, рис.4.

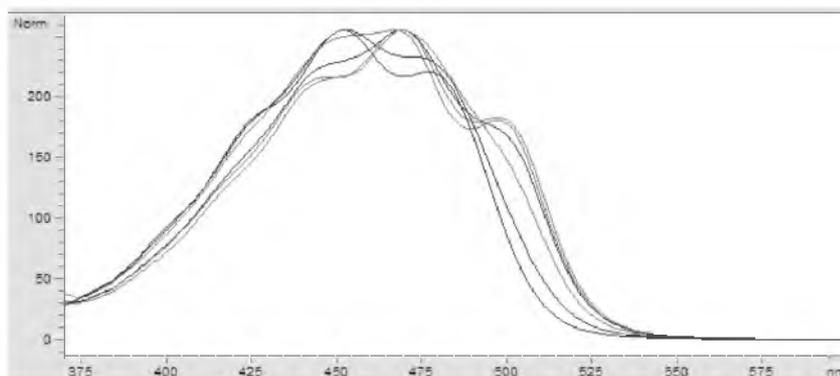


Рис.4. Спектр пика №2 на рис.1

В этом случае начало пика имеет спектр, характерный для β -каротиина, который затем начинает искажаться, переходя в пик ликопина. Следовательно, в данном случае пик №2 содержит соединения, не относящиеся к ксантофиллам.

Диффузная группа пиков №5 может быть разделена на две группы по спектральным параметрам, рис.5.

Судя по спектрам и по диффузности пиков, можно предположить, что это – группа моноэфиров лютеина и зеаксантина. Пики 3 и 4 должны соответствовать несколько менее полярным соединениям – изомерным криптоксантинам и другим моногидроксилированным структурам, включая (судя по спектру) ликоксантин, рис.6.

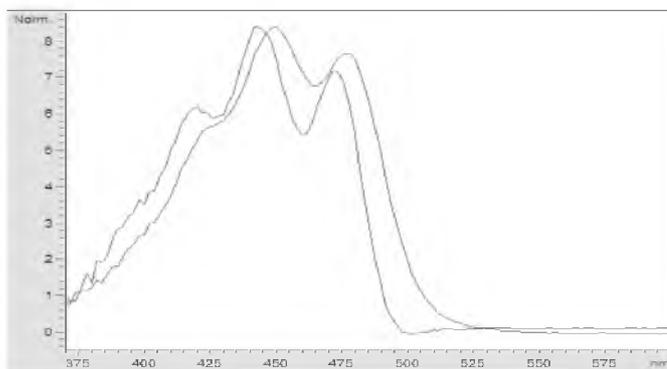


Рис.5. Спектры группы пиков №5 на рис. 1

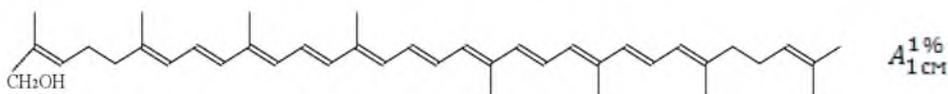


Рис.6. Ликоксантин

Расчет состава каротиноидного комплекса плодов исследованных в данной работе сортов облепихи, выращенных в Ботаническом саду БелГУ в сезоне 2010 года, представлен в табл.1

Таблица 1

Каротиноидный комплекс плодов 20 сортов облепихи из Ботанического сада БелГУ

№	Название сорта	Сар.	ксантофиллы			Ост.	всего ксантофиллов			С, мг.%
			*	**	***		%	Lu	Ze	
1	С1	13.8	55.8	11.2	17.4	1.8	84.3	12.1	5.3	5.8
2	Масличная	15.2	70.9	5.2	5.9	2.8	82.0	1.8	4.1	7.5
3	Юбилейная1	17.6	69.7	5.2	5.8	1.8	80.7	1.51	4.3	6.5
4	Юбилейная 2	19.3	69.7	5.1	4.8	1.1	79.6	1.61	3.2	6.6
5	Неизвестная 2	21.5	68.4	10.0	4.5	1.5	77.0	1.63	2.9	5.5
6	Золотой каскад	22.2	32.9	10.4	27.5	7.0	70.8	12.8	14.7	9.3
7	Бессемянная	28.9	40.8	10.0	15.5	4.8	66.3	9.3	6.2	10.7
8	Зырянка	28.7	38.2	10.0	17.8	5.4	66.0	9.3	8.5	10.9
9	Неизвестная1	30.5	41.5	7.5	15.0	5.4	64.0	8.8	6.2	8.9
10	С2	37.5	34.8	5.2	18.1	4.4	58.1	7.9	10.2	15.4
11	Дружина	40.8	21.1	4.3	29.1	4.6	54.6	14.2	14.9	11.1
12	Бочонок	44.8	26.5	5.3	17.5	5.9	49.3	10.6	6.9	12.4
13	Щелкунчик	48.6	26.7	4.2	16.2	4.3	47.1	9.5	6.7	15.5
14	Красный факел	48.2	32.5	3.5	10.1	5.7	46.1	6.0	4.0	18.2
15	Огненная	50.4	26.1	4.2	13.7	5.6	44.0	8.5	5.3	13.7
16	Сибирский румянец	51.7	16.5	2.2	24.1	5.4	42.9	13.7	10.5	24.0
17	Перчик	55.3	33.6	2.4	3.9	4.8	39.9	1.54	2.3	16.6
18	Брат красного	58.0	19.5	5.0	11.4	6.0	35.9	7.1	4.3	12.6
19	Любительская	60.4	28.2	2.2	4.1	5.1	34.4	1.6	2.5	19.0
20	№ 278439	60.1	17.4	6.0	10.3	6.3	33.7	7.1	3.2	12.2

Сар. – сумма каротинов и ликопина; * - диэферы; ** - моноэферы; *** - не этерифицированные; Ост. – остальные, % - моль доля ксантофиллов (лютеина и зеаксантина); неэтерифицированные Lu –лютеин и Ze – зеаксантин; с – суммарная концентрация каротиноидов в плодах.

В таблице содержание каротиноидов пересчете на β-каротин выполнено с использованием литературных данных об его удельной абсорбции = 2592 [16].

В соответствие с представленными данными, в плодах значительной части исследованных в работе сортов облепихи преобладают ксантофиллы, причем преимущественно в этерифицированной форме, т.е. облепиха и облепиховое масло являются хорошими источниками ксантофиллов для профилактики возрастной макулярной дистрофии. Для не этерифицированных ксантофиллов соотношение между лютеином и зеаксантином заметно различны – имеются сорта с преобладанием как лютеина, так и зеаксантина. Однако контроль каротиноидного состава методом нормально-фазовой ВЭЖХ в изократическом режиме не позволяет оценить соотношение между концентрациями диэфиров лютеина и зеаксантина, поскольку нет оснований рассчитывать на эквивалентное соотношение между не этерифицированными, моно- и диэферами ксантофиллами. По этой причине желателен контроль каротиноидов в ортогональных условиях – методом обращено-фазовой ВЭЖХ. Кстати, использование градиентного режима, не отличающегося ни идеальной воспроизводимостью, ни возможностью ис-



пользовать закономерности изменения удерживания, приводило к тому, что зона этерифицированных ксантофиллов оставалась обычно не идентифицированной.

Хроматограмма переведенного в ацетон экстракта плодов облепихи сорта «Масличная», приведена на рис.7.

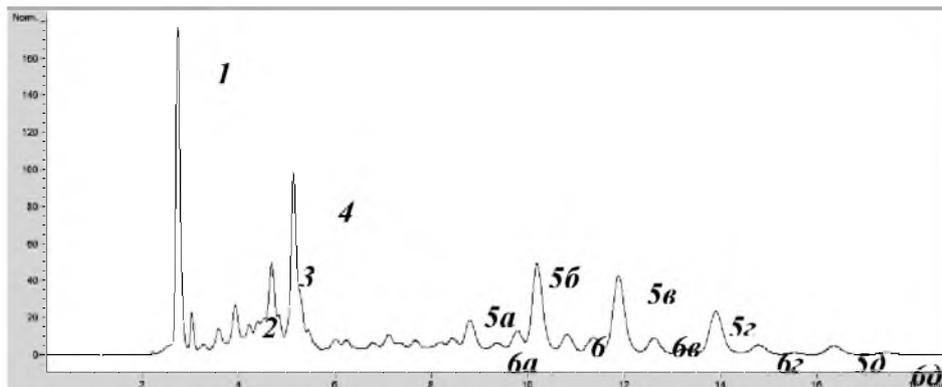


Рис.7. Разделение каротиноидов плодов облепихи сорта «Масличная» в условиях ОФ ВЭЖХ. Колонка 250x мм Reprosil-Pur C18-AQ; подвижная фаза 20 об.% ацетонитрила в ацетоне, 1 мл/мин; детектор 450 нм

На хроматограмме, рис.7, обнаруживается большое количество пиков, среди которых по спектральным параметрам и по сопоставлению с хроматограммой экстракта лепестков цветков бархатцев [17] обнаруживаются диэфиры лютеина 5а – лаурат-миристанат; 5б – димиристанат, 5в – миристанат-пальмитат; 5г – дипальмитат; 5д – пальмитат-стеарат; аналогичные диэфиры зеаксантина (6а – 6д), моноэфиры ксантофиллов (пик №3), неэтерифицированные ксантофиллы (пик №1), β-каротин (пик №4), ликопин (пик №2) и целый ряд неидентифицированных компонентов различной липофильности.

Сопоставление соотношения сумм площадей диэфиров лютеина и зеаксантина (5.2:1) с аналогичным соотношением для неэтерифицированных ксантофиллов (0.4:1) свидетельствует о том, что степень этерификации этих ксантофиллов различна и судить о составе комплекса необходимо отдельно – по соединениям каждого типа этерификации.

Хроматограммы экстрактов плодов облепихи с меньшей долей диэфиров ксантофиллов интересны тем, что они несколько упрощаются и большую роль играют компоненты, скрывающиеся за ксантофиллами, рис. 8.

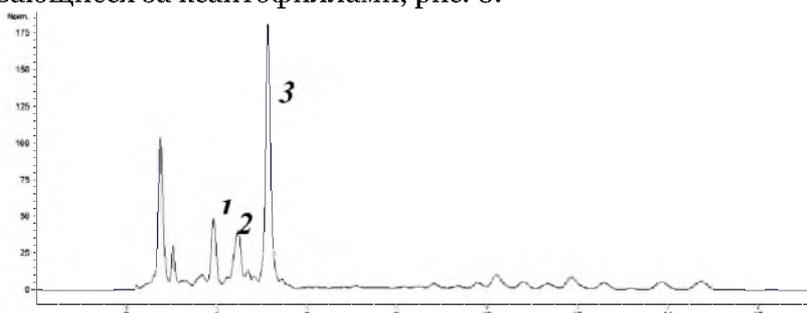


Рис.8. Разделение каротиноидов плодов облепихи сорта «Огненная» в условиях ОФ ВЭЖХ

Так на хроматограмме экстракта плодов облепихи сорта «Огненная» идентифицируется пик ликопина (№1) и β-каротина (№3), но в области элюирования моноэфиров ксантофиллов появляется уширенный пик (№2), вторая часть которого имеет характеристичный спектр для соединения, только на одном конце которого произошла циклизация – γ-каротин, рис.9.

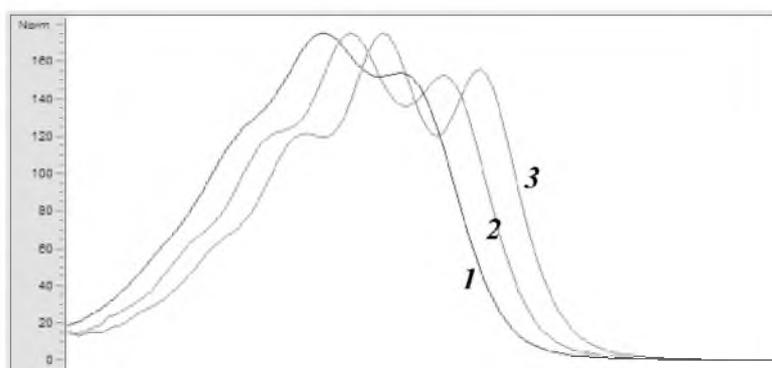




Рис.9. Спектры компонентов экстракта плодов облепихи сорта «Масличная». Номера на спектрах – номер пика на рис. 8

Использование диодно-матричного детектора позволяет составить таблицу спектральных характеристик идентифицированных веществ, которая может быть использована для идентификации соединений в дальнейших исследованиях, табл.2.

Таблица 2

Спектральные параметры каротиноидов, записанные в ячейке диодно-матричного детектора

№	Название каротиноида	Спектральные параметры соединений в растворах*, нм	
		30% ацетона в n-гексане	20% ацетонитрила в ацетоне
1	зеаксантин		452,5; 479,3
2	диэфиры зеаксантина	453,5; 481,2	
3	бета-каротин	453, 478	
4	гамма каротин	462, 491,3	
5	лютеин		446,2; 474,3
6	диэфиры лютеина	447,7; 475,5	
7	ликопин	446; 472,5; 504	

* - приведены максимумы абсорбции двух переходов электронов с наименьшей энергией.

Список литературы

- Zeb A. Important Therapeutic Uses of Sea Buckthorn (*Hippophae*): A Review // J. Biol. Sci. – 2004. – V.4. – P. 687-693.
- Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая Волна, 2005. – 1200 с.
- Kumar R., Kumar G.P., Chaurasia O.P., Singh S.B. Phytochemical and Pharmacological Profile of Seabuckthorn Oil: A Review // Res. J. Med. Plant. – 2011. – V.5. – P. 491-499.
- Bekker N.P., Glushenkova A.I. Components of certain species of the *Elaeagnaceae* family // Chem. Nat. Comp. – 2001. - V.37. – P. 97-116.
- Sergeeva N.V., Shapiro D.K., Bandyukova V.A., Anikhimovskaya L.V., Narizhnaya T.I. Carotenoids of the fruit of some varieties of *Hippophae rhamnoides* // Chem. Nat. Prod. – 1979. – V.5. – P.87-88.
- Kudritskaya S.E., Zagorodskaya L.N., Shishkina E.E. Carotenoids of the sea buckthorn, variety *Obil'naya* // Chem. Nat. Comp. – 1989. – V.25. – P. 724-725.
- Pintea A., Varga A., Stepnowski P., Socaciu C., Culea M., Diehl H.A. Chromatographic Analysis of Carotenol Fatty Acid Esters in *Physalis alkekengi* and *Hippophae rhamnoides* // Phytochem. Anal. – 2005. – V.16. – P. 188-195.
- Parlog R.M., Vodnar D.C., Dulf F.V., Leopold L., Socaciu C. HPLC-PDA and UV-VIS spectrometry analysis used to fingerprint sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries comparatively with leaves and seeds extracts // Bull. UASVM. Agric. -2099. – V.66. – P. 409-414.
- Andersson S.C., Olsson M.E., Johansson E., Rumpunen K. Carotenoids in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries during Ripening and Use of Pheophytin a as a Maturity Marker // J. Agric. Food Chem. – 2009. – V.57. – P. 250-258.
- Krinsky N.I., Landrum J.T., Bone R.A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye // Annu. Rev. Nutr. - 2003. – V.23. – P. 171-201.
- Weller P., Breithaupt D.E. Identification and Quantification of Zeaxanthin Esters in Plants Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry // J. Agric. Food Chem. – 2003. – V.51. – P. 7044-7049.
- Дейнека Л.А., Подкопайло Р.В., Третьяков М.Ю., Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н. О стандартизации облепихового масла по каротиноидному составу / Разработка, исследование и маркировка новой фармацевтической продукции: сб. научн. тр. / под ред. М.В. Гаврилина. – Пятигорск: Пятигорская ГФА, 2009. – Вып. 64. - С. 272-274.



13. Tetko I. V., Gasteiger J., Todeschini R., Mauri A., Livingstone D., Ertl P., Palyulin V. A., Radchenko E.V., Zefirov N.S., Makarenko A.S., Tanchuk V.Y., Prokopenko V.V. Virtual computational chemistry laboratory - design and description // *J. Comput. Aid. Mol. Des.* – 2005. – V.19. – P. 453-63.

14. Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Шаркунова Н.А. Инкрементные соотношения при анализе удерживания каротиноидов. использование ортогонального разделения // Сорбц. хром. процесс. – 2009. – Т.9, Вып.3. – С. 374-382.

15. Дейнека В.И., Шапошников А.А., Дейнека Л.А., Вострикова С.М., Закирова Л.Р., Олейникова И.Е. Спектральный и хроматографический анализ ксантофиллов в различных растительных добавках и их влияние на накопление лютеина и зеаксантина в желтке перепелиных яиц // *Научные ведомости БелГУ. Серия Естественные науки.* - 2010. - № 21 (92), Вып.13. – С. 143-148.

16. Rodriguez-Amaya D.B., Kimura M. HarvestPlus handbook for carotenoid analysis. HarvestPlus Technical Monograph Series, 2. 2005. - 57 p.

17. Гостищев И.А., Третьяков М.Ю., Анисимович И.П., Дейнека Л.А., Дейнека В.И. Оценка высушенных цветков бархатцев в качестве доступного источника диэфиров лютеина для целей хроматографической идентификации ксантофиллов // *Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки.* 2010. №15(86). Вып.12. С. 140-144

DETERMINATION OF CAROTENOIDS OF SEA BUCKTHORN FRUITS BY HPLC

V.I. Deineka

R.V. Podkopaylo

L.A. Deineka

V.N. Sorokopudov

I.A. Gostyshchev

Belgorod National Research University, 308015 Belgorod, Russia, Pobeda str.85

*e-mail: deineka@bsu.edu.ru
prizraci@yandex.ru
Deyneka@bsu.edu.ru
sorokopudov@bsu.edu.ru
dzelu@yandex.ru*

In the paper carotenoid complex of sea buckthorn fruits of 20 varieties harvested in BSU Botanical Garden has been under investigation by means of orthogonal separation technique – reversed-phase as well as normal-phase modes. The fruits accumulate 5.5-24.0 mg % sum of carotenoids, including carotenes and xanthophylls with different ratios; the main xanthophylls being lutein and zeaxanthin as free alcoholic derivatives as well as esters. Lycopene, β - and γ -carotene were found also.

Key words: *Hippophae rhamnoides*, carotenoids, HPLC, orthogonal separation.