

РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС-МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРОТИНОИДОВ В СЫРЬЕ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Д.И. Писарев
О.О. Новиков
Т.А. Романова

*Белгородский государственный
университет*

e-mail: Pisarev@bsu.edu.ru

Данная работа посвящена разработке экспресс-метода идентификации каротиноидов в лекарственном растительном сырье с помощью масс-спектрологии в сочетании с УФ-спектрологией и хроматографией, позволяющей быстро и надёжно идентифицировать каротиноиды в суммарных извлечениях из сырья без предварительного разделения на компоненты.

Ключевые слова: каротиноиды, УФ-спектрология, масс-спектрология, тонкослойная хроматография, плоды шиповника колючейшего.

Из всех классов природных пигментов каротиноиды, по-видимому, наиболее широко распространены и, несомненно, принадлежат к числу наиболее важных соединений. Они обнаружены у всех представителей растительного царства как в фотосинтезирующих, так и в нефотосинтезирующих тканях, а также часто встречаются у микроорганизмов. Каротиноиды и их производные имеют большое значение для животных, поскольку являются основой зрительных пигментов, ответственных за восприятие света и различение цветов.

В медицине каротиноиды используются главным образом для профилактики или лечения авитаминоза А. Большие дозы β -каротина значительно смягчают симптомы эритропоэтической порфирии [1].

Наиболее важными растительными источниками каротиноидов являются корнеплоды моркови, тыква, шиповник, томаты, плоды облепихи, цветки ноготков и т.д.

Для качественной идентификации каротиноидов в растительном сырье используют физико-химические методы, в первую очередь УФ-спектрологию и хроматографию. Нами показана возможность идентификации каротиноидов в сырье помимо вышеназванных методов также с помощью масс-спектрологии, позволяющей быстро и надёжно идентифицировать каротиноиды в суммарных извлечениях из сырья без предварительного разделения на компоненты.

Целью настоящего исследования явилась разработка экспресс-метода определения каротиноидов в объектах растительного происхождения с помощью физико-химических методов, в том числе масс-спектрологии.

Для обнаружения каротиноидов и их идентификации в растительном сырье использовали плоды шиповника колючейшего – *Rosa spinosissima*.

Так как каротиноиды являются липофильными компонентами растений, для их выделения использовали экстракцию гексаном. Для этого воздушно-сухое сырьё плодов шиповника колючейшего в количестве 5,0 г обрабатывали гексаном в аппарате Сокслета в течение 8 часов. Полученное извлечение сгущали в испарителе ротационном ИР-1 до небольшого объёма.

К 0,5 мл полученного сгущенного извлечения прибавляли тройное количество ацетонитрила и взбалтывали на шейкере.

Идентификацию компонентов в полученной смеси проводили с помощью метода масс-спектрологии. Детекцию масс-спектра проводили на приборе масс-спектрометр «Autoflex II» «MALDI TOF/TOF» фирмы Bruker Daltonics – вакуумного прибора, который использует физические законы движения заряженных частиц в магнитных и электрических полях с помощью ионизации лазером.

Пробу полученной суммы в количестве 1 мкл наносили на мишень «MTP 384 target plate matt steel TF», высушивали и сверху наносили каплю матрицы. В качестве матрицы использовали α -цианокоричную кислоту, регистрацию спектров вели с помощью программы «Flex Control», обработку данных осуществляли в программе «Flex Analis». Обнаружение каротиноидов проводили в диапазоне 460–600 Да. В результате получен спектр, на котором наблюдается наиболее интенсивный пик иона с зарядом m/z

= 536,515, соответствующий молекулярной массе некоторых изомерных форм каротиноидов (альфа, бета, гамма), и $m/z = 568,219$, соответствующий молекулярной массе кислородных производных каротиноидов (лютеин, зеаксантин и др.) (рис. 1).

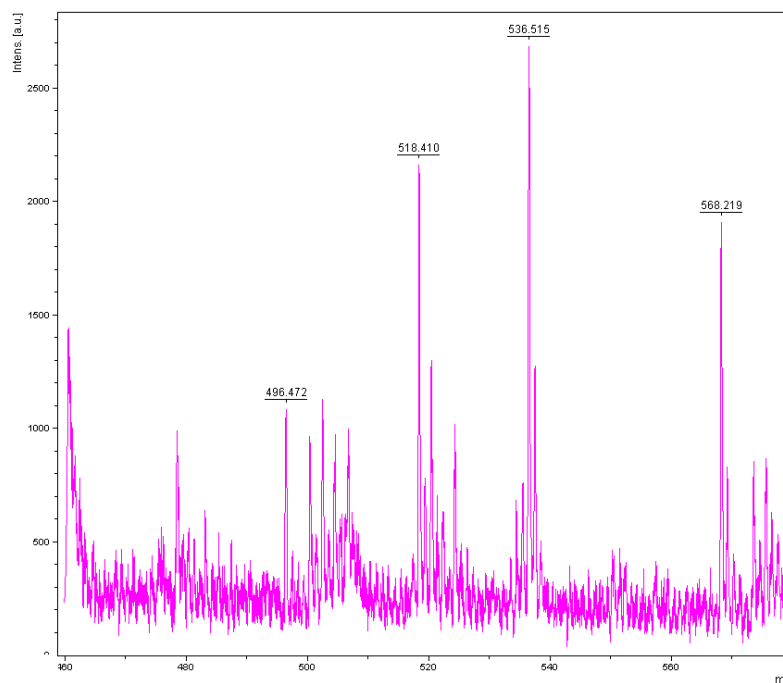


Рис. 1. Масс-спектр каротиноидов гексанового извлечения из плодов *R. spinosissima*

Помимо каротиноидов в извлечении побочно определено присутствие токоферолов в диапазоне 380–480 Да. Обнаружены интенсивные пики с зарядом иона $m/z = 430,374$ и $416,426$, которые по молекулярной массе соответствуют альфа-токоферолу и одному из его изомерных форм (бета или гамма) (рис. 2).

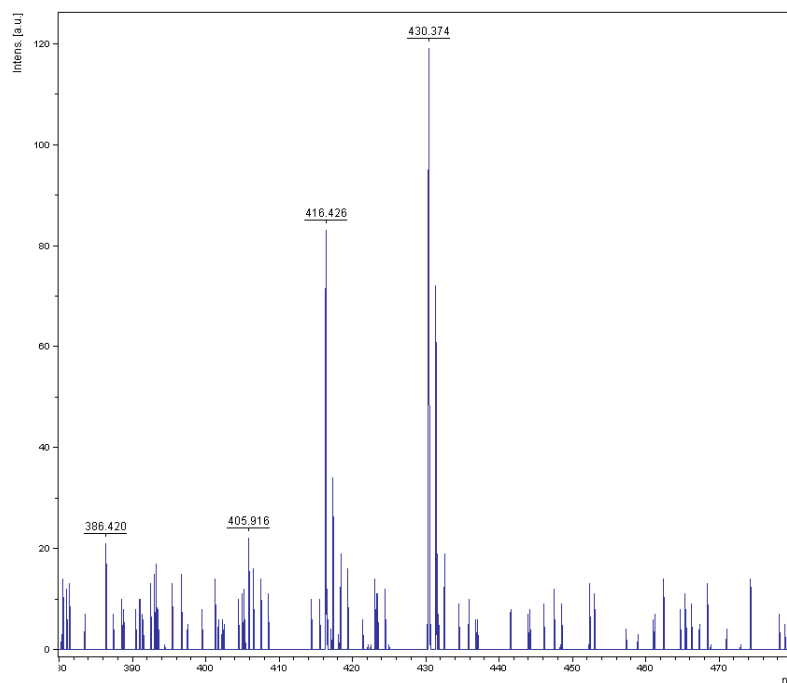


Рис. 2. Масс-спектр токоферолов гексанового извлечения из плодов *R. spinosissima*

Так как каротиноиды образуют изомеры с одинаковой молекулярной массой (альфа, бета, гамма), то для более чёткой их идентификации регистрировали УФ-спектры и использовали метод тонкослойной хроматографии [2].

Каротиноиды имеют, как правило, три максимума поглощения, по которым их можно отличить.

УФ-спектры гексанового извлечения регистрировали на спектрофотометре СФ-56 в гексане в областях 220–550 нм (подтверждение совместного присутствия с токоферолами) (рис. 3) и 350–550 нм (спектры собственно каротиноидов) (рис. 4).

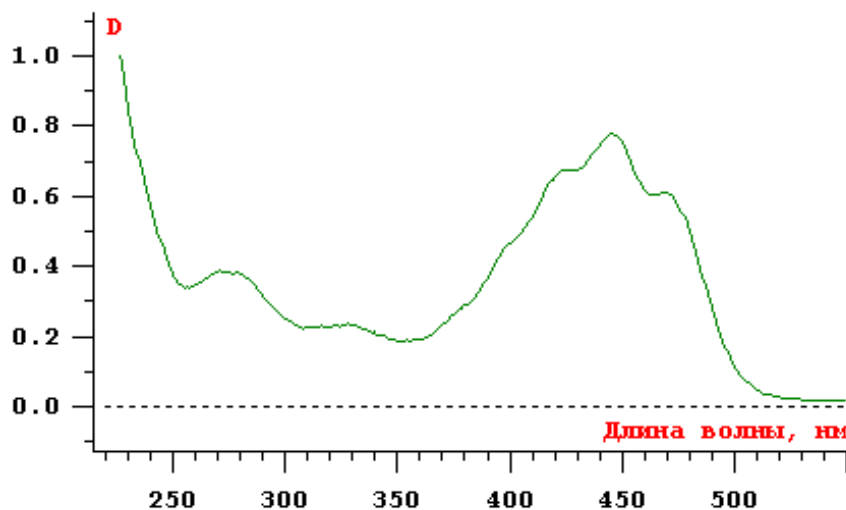


Рис. 3. УФ-спектр гексанового извлечения из плодов *R. spinosissima* шиповника в области 220–550 нм

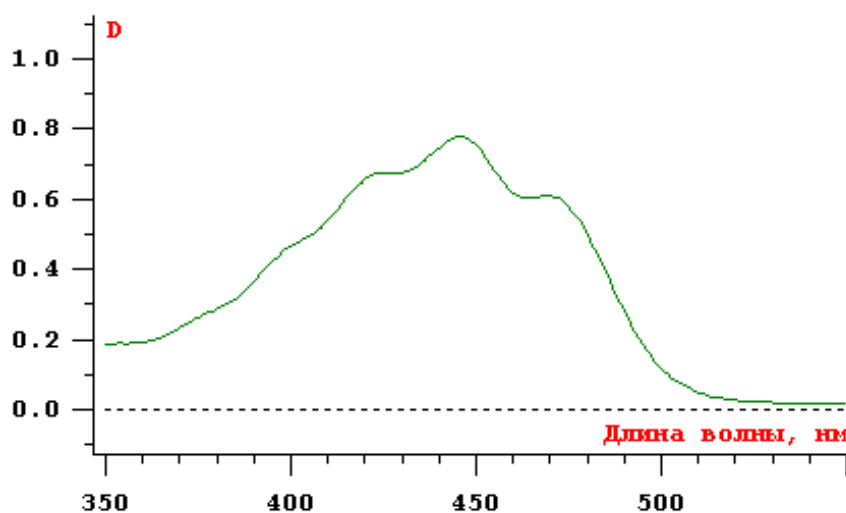


Рис. 4. УФ-спектр гексанового извлечения из шиповника в области 350–500 нм

Наличие максимума поглощения при длине волны 279 нм соответствует максимуму поглощения токоферола.

Присутствие трёх максимумов поглощения при 425, 450 и 480 нм соответствует максимумам поглощения каротиноидов (наиболее совпадающие с бета-каротином и лютеином).

При хроматографировании гексанового извлечения в тонком слое силикагеля с образцами свидетелями каротиноидов в системе гексан – эфир диэтиловый (8:2) удалось обнаружить два компонента, по значениям R_f соответствующие бета-каротину и лютеину.

Таким образом, привлечение метода масс-спектрометрии в сочетании с УФ-спектроскопией и тонкослойной хроматографией позволяет экспрессно и надёжно идентифицировать каротиноиды в сырье растительного происхождения.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг., государственный контракт №П425 от 12.05.2010 г.

Литература

1. Бриттон, Г. Биохимия природных пигментов: пер. с англ. / Г. Бриттон – М.: Мир, 1986. – 422 с.
2. Справочник биохимика: пер. с англ. / Досон Р [и др.]. – М.: Мир, 1991. – 544 с.

DEVELOPMENT OF EXPRESS METHOD FOR THE DETERMINATION OF CAROTENOIDS IN THE RAW MATERIALS OF VEGETABLE ORIGIN

D.I. Pisarev
O.O. Novikov

Belgorod State University

e-mail: Pisarev@bsu.edu.ru

This work is dedicated to developing express method for identification of carotenoids in herbal drugs by mass spectrometry in combination with UV spectroscopy and chromatography quickly and reliably identify the carotenoids in the total extracts from raw materials without prior separation into components.

Key words: carotenoids, UV-spektrosokpiya, mass spektrosokpiya, thin layer chromatography, hips spiny.