

УДК 615.1: 615.322: 615.036
doi:10.21685/2307-9150-2021-1-2

Методика количественного определения пигментов в листьях моринги

Е. А. Кутихина¹, Е. Е. Курдюков², И. Я. Моисеева³,
Л. Н. Бибякова⁴, Н. В. Финаёнова⁵

¹Пензенский государственный аграрный университет, Пенза, Россия

^{2,3,4,5}Пензенский государственный университет, Пенза, Россия

¹guschina.v.a@pgau.ru, ^{2,4,5}e.e.kurdyukov@mail.ru, ³moiseeva_pharm@mail.ru

Аннотация. *Актуальность и цели.* Перспективным лекарственным сырьем моринги масличной являются листья. Листья содержат комплекс биологически активных соединений: белки, минералы, каротиноиды, витамины (тиамин, рибофлавин, аскорбиновая кислота), гликозиды, флавоноиды (рутин, кверцетин) [1, 2]. Основными комплексами природных пигментов в листьях моринги являются производные хлорофилла и каротиноиды, представленные хлорофиллом *a* и β -каротином [3, 4]. Каротиноиды обладают антиоксидантной, радиопротекторной и антиканцерогенной активностью [5–8]. Хлорофиллы оказывают противовоспалительное, ранозаживляющее и антибактериальное действие, также обладают антиоксидантным эффектом [5, 9]. В настоящее время актуальным является изучение биологически активных соединений (БАС), в частности пигментов, обладающих антибактериальными и противовоспалительными свойствами. В настоящее время на сырье моринги не разработаны методики количественного определения каротиноидов и хлорофилла, в данной работе представлен вариант методики количественного определения. Результаты исследования могут быть использованы для разработки нормативной документации на перспективное лекарственное растительное сырье. Цель исследования – разработка методики количественного определения содержания каротиноидов и хлорофилла в листьях моринги. *Материалы и методы.* Объектами исследования служили высушенные листья моринги. Качественный анализ пигментов проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) из ацетоновой фракции, используя систему растворителей: петролейный эфир – ацетон (6:4) [5, 9]. Для количественного определения каротиноидов и хлорофиллов в извлечениях из сырья моринги использовали спектрофотометрический метод [10–13]. Количественное определение каротиноидов и хлорофиллов в сырье моринги проводили с использованием спирта этилового 95 %, гексана, ацетона и смеси ацетона-гексана (1:2). Измерение оптической плотности проводили в максимумах поглощения каротиноидов (450 нм), хлорофилла *a* (664 нм). *Результаты.* С помощью ТСХ визуально определяются три пятна, одно из которых желтого цвета с $R_f = 0,91$ относится к β -каротину, пятна сине-зеленого и желто-зеленого цвета с $R_f = 0,9$ и $0,08$ относятся к хлорофиллам *a* и *b* соответственно. *Выводы.* Представлена концепция методики определения каротиноидов и хлорофилла. Было установлено, что лучшим экстрагентом для извлечения каротиноидов (66,31 мг%) является смесь ацетона-гексана (1:2); хлорофилла (0,23 %) – смесь ацетона-гексана (1:2).

Ключевые слова: *Moringa oleifera*, β -каротин, хлорофилл *a*, спектрофотометрия, тонкослойная хроматография

Для цитирования: Кутихина Е. А., Курдюков Е. Е., Моисеева И. Я., Бибякова Л. Н., Финаёнова Н. В. Методика количественного определения пигментов в листьях

Quantitative determination of pigments in moringa leavesE.A. Kutihina¹, E.E. Kurdjukov², I.Ja. Moiseeva³,
L.N. Bibjakova⁴, N.V. Finajonova⁵¹Penza State Agrarian University, Penza, Russia^{2,3,4,5}Penza State University, Penza, Russia¹guschina.v.a@pgau.ru, ^{2,4,5}e.e.kurdyukov@mail.ru, ³moiseeva_pharm@mail.ru

Abstract. *Background.* Moringa oleifera leaves are promising medicinal raw materials. Leaves contain a complex of biologically active compounds: proteins, minerals, carotenoids, vitamins (thiamine, riboflavin, ascorbic acid), glycosides, flavonoids (rutin, quercetin) [1, 2]. The main complexes of natural pigments in moringa leaves are chlorophyll derivatives and carotenoids represented by chlorophyll *a* and β -carotene [3, 4]. Carotenoids have antioxidant, radioprotective and anti-carcinogenic activity [5–8]. Chlorophylls have anti-inflammatory, wound-healing and antibacterial effects, and also have an antioxidant effect [5, 9]. Currently, it is important to study biologically active compounds (BAC), in particular pigments that have antibacterial and anti-inflammatory properties. Currently, methods for the quantitative determination of carotenoids and chlorophyll have not been developed on the moringa's raw materials, and a variant of the quantitative determination method is provided in this paper. The results of the study can be used to develop regulatory documentation for promising medicinal plant raw materials. The purpose of the study is to develop methods for quantitative determination of carotenoids and chlorophyll content in Moringa leaves. *Materials and methods.* The objects of research were dried Moringa leaves harvested in the Penza region. Qualitative analysis of pigments was performed by TLC from the acetone fraction using a system of solvents: petroleum ether-acetone (6:4) [5, 9]. For the quantitative determination of carotenoids and chlorophylls in extracts from raw materials of Moringa used spectrophotometric method [10–13]. Quantitative determination of carotenoids and chlorophylls in Moringa raw materials was performed using 95 % ethyl alcohol, hexane, acetone, and a mixture of acetone-hexane (1:2). Optical density was measured at the maximum absorption of carotenoids (450 nm) and chlorophyll *a* (664 nm). *Results.* 3 spots are visually determined, one of which is yellow with $R_f = 0,91$ refers to β -carotene, and blue-green and yellow-green spots with $R_f = 0,9$ and $0,08$ refer to chlorophylls *a* and *b*, respectively. *Conclusions.* The concept of a method for determining carotenoids and chlorophyll is presented. It was found that the best extractant for carotenoid extraction (66,31 mg%) is a mixture of acetone-hexane (1:2), chlorophyll (0,23 %) a mixture of acetone-hexane (1:2).

Keywords: *Moringa oleifera*, β -carotene, chlorophyll *a*, spectrophotometry, thin-layer chromatography

For citation: Kutihina E.A., Kurdjukov E.E., Moiseeva I.Ja., Bibjakova L.N., Finajonova N.V. Quantitative determination of pigments in moringa leaves. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Estestvennyye nauki = University proceedings. Volga region. Natural sciences.* 2021;1:16–23. (In Russ.). doi:10.21685/2307-9150-2021-1-2

Введение

Моринга масличная (*Moringa oleifera* Lam.) семейства моринговых (Moringaceae) является небольшим, быстро растущим листопадным деревом, высотой до 10–12 м [1, 2].

Листья моринги являются перспективным лекарственным растительным источником получения биологически активных соединений для получения фармацевтических субстанций, обладающих широким спектром фармакологической активности, включая противовоспалительный, антибактериальный, антиоксидантный эффект. В листьях моринги содержится комплекс различных полифенольных соединений, за счет которого листья моринги проявляют перечисленные фармакологические эффекты [3, 4].

Материалы и методы

Объектами исследования служили высушенные листья моринги. Качественный анализ суммы каротиноидов и хлорофилла в листьях моринги проводили методом тонкослойной хроматографии из ацетоновой фракции в системе растворителей: петролейный эфир-ацетон (6:4), спирт метиловый-бензол-этилацетат (5:70:25) [5, 6, 9].

Количественное определение суммы каротиноидов и хлорофилла проводили методом прямой спектрофотометрии [10–13]. Масса сырья – 3 г (точная навеска), для извлечения использовали колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 25 мл экстрагента, в течение 90 мин перемешивали. Полученный экстракт фильтровали через бумажный фильтр. Отбирали 1 мл извлечения и помещали в мерную колбу на 25 мл, доводили экстрагентом до метки. Определяли оптическую плотность на спектрофотометре СФ-104 при длине волны 450 и 664 нм.

Содержание суммы каротиноидов и хлорофилла в сырье моринги (X) в пересчете на β -каротин и хлорофилл a (мг%) вычисляли по стандартной формуле [5].

Статистическую обработку результатов экспериментального исследования проводили с помощью пакета статистических программ: русифицированная версия программы Statistica 6.0 (StatSoft – Russia, 1999), BIOSTAT (S. A. Glantz, McGrawHill, 1998), Microsoft Office (Microsoft Office Pro Plus 2019, договор № 028-20-223 от 25.05.2020 – бессрочный). Все измерения проведены в пятикратных аналитических повторностях, в таблицах приведены средние значения. Определялись основные статистические характеристики: среднее значение, ошибка среднего. Достоверность различий рассчитана с помощью T -критерия Стьюдента. Критическая величина уровня значимости принята равной 0,05. Во всех данных, приведенных в статье, количественные показатели выражены в виде $M \pm m$.

Результаты и обсуждение

На хроматографических пластинках обнаружили зоны адсорбции от желтого до ярко-оранжевого цвета. Полученные значения коэффициента замедления (R_f) сравнивали со стандартными значениями, описанными в литературе [5, 9, 14]. В системе петролейный эфир-ацетон (6:4) обнаружили зону оранжевого цвета с $R_f = 0,91$, которая соответствует β -каротину, две зоны адсорбции зеленого и желто-зеленого цвета с $R_f = 0,9$ и $R_f = 0,08$, соответствующие хлорофиллу a и хлорофиллу b .

Исходя из литературных данных, каротиноиды хорошо растворимы в 95 % этаноле, ацетоне, гексане, хлороформе [9–13].

Электронные спектры извлечения в диапазоне длин волн 400–500 нм имеют максимум оптической плотности при 450 ± 2 нм (рис. 1), характерные для β -каротина. В результате сравнения максимума поглощения на полученных УФ-спектрах из извлечения сырья моринги с литературными данными выяснилось, что полученное извлечение преимущественно содержит β -каротин [9–13].

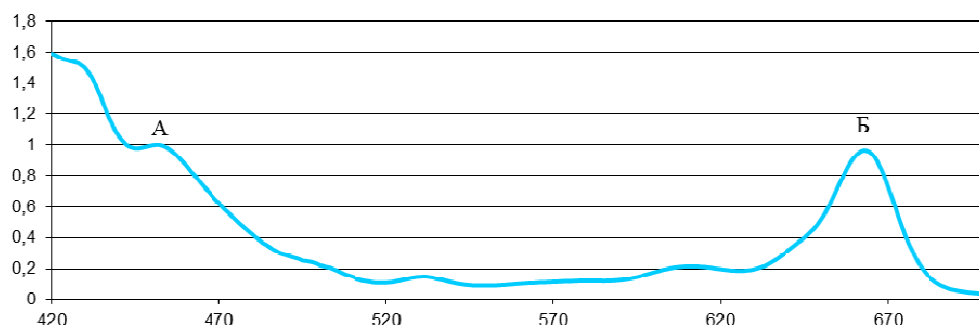


Рис. 1. УФ-спектр ацетон-гексанового (1:2) извлечения из листьев моринги:
 а – максимум поглощения каротиноидов (β -каротин) при 450 нм;
 б – максимум поглощения хлорофиллов (хлорофилл *a*) при 664 нм

В результате проведенного анализа установили, что лучшим экстрагентом для выделения каротиноидов из высушенных листьев моринги является ацетон-гексан (1:2), так как извлекается больше каротиноидов, по сравнению с другими экстрагентами (табл. 1).

Таблица 1

Влияние экстрагента на выход каротиноидов в листьях моринги

Экстрагент	Количество каротиноидов в пересчете на β -каротин, мг%
1. Ацетон	$55,90 \pm 0,87$
2. Гексан	$21,46 \pm 0,52^*$
3. Спирт 95 %	$32,65 \pm 0,37^*$
4. Ацетон-гексан (1:2)	$66,31 \pm 0,98^*$

Примечание. * Различия достоверны при $p \leq 0,05$.

Содержание каротиноидов в листьях моринги в пересчете на β -каротин составило 66,31 мг%. Результаты статистической обработки данных свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения не превышает значения 1,31 %.

Количественное определения хлорофилла в листьях моринги проводили методом УФ-спектрофотометрии [5, 9]. Важной особенностью спектра поглощения хлорофилла *a* служит наличие ярко выраженного максимума при 664 нм (рис. 2).

В результате проведенного анализа установили, что лучшим экстрагентом для выделения хлорофилла из высушенных листьев моринги является

ацетон-гексан (1:2), так как извлекается больше хлорофиллов, по сравнению с другими экстрагентами (табл. 2).

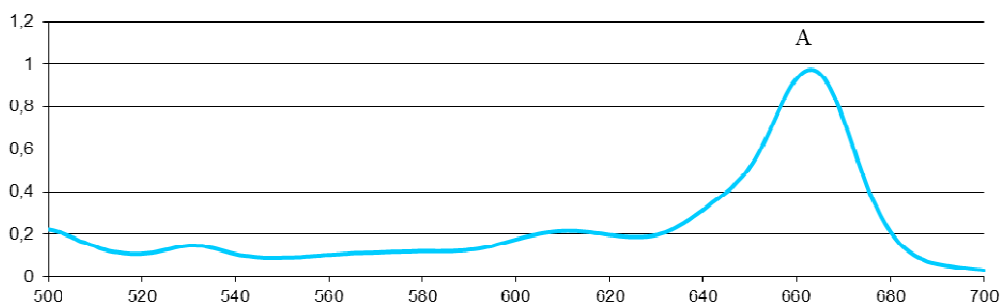


Рис. 2. УФ-спектр ацетон-гексанового (1:2) извлечения из листьев моринги:
а – максимум поглощения хлорофиллов (хлорофилл а) при 664 нм

Таблица 2

Влияние экстрагента на выход хлорофилла в листьях моринги

Экстрагент	Количество хлорофилла в пересчете на хлорофилл а, %
1. Ацетон	0,19 ± 0,04
2. Гексан	0,12 ± 0,02*
3. Спирт 95 %	0,14 ± 0,03*
4. Ацетон-гексан (1:2)	0,23 ± 0,02*

Примечание. * Различия достоверны при $p \leq 0,05$.

Содержание суммы хлорофилла в листьях моринги составило 0,23 % в пересчете на хлорофилл а и высушенное сырье. Результаты статистической обработки данных свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения не превышает значения 4,55 %.

Заключение

1. Определены максимумы поглощения извлечения, при $\lambda = 450 \pm 2$ нм, $\lambda = 664 \pm 2$ нм для каротиноидов и хлорофилла соответственно.

2. Определено, что среднее значение содержания каротиноидов в сырье моринги составляет 66,31 мг%, содержания хлорофилла составляет 0,23 %.

Список литературы

1. Foidl N., Makkar H. P. S., Becker K. The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses // *The Miracle Tree: The Multiple Attributes of Moringa* / ed. L. J. Fuglie. Dakar, Senegal : Church World Service, 2001. P. 45–76.
2. Ndhala A. R., Mulaudzi R., Ncube B. [et al.]. Antioxidant, antimicrobial and phytochemical variations in thirteen *Moringa oleifera* Lam. cultivars // *Molecules*. 2014. Vol. 19, № 7. P. 10 480–10 494. URL: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules190710480>
3. Amaglo N. K., Bennet R. N., Curto B. L. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana // *J. of Food Chem.* 2010. Vol. 122, № 4. P. 1047–1054.

4. Bennett R. N., Mellon F. A., Foidl N. [et al.]. Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish Tree) and *Moringa stenopetala* L. // *J. Agri Food Chem.* 2003. Vol. 51. P. 3546–3553.
5. Санникова Е. Г., Компанцева Е. В., Попова О. И., Айрапетова А. Ю. Определение пигментов в сырье ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L.) методами тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии // *Химия растительного сырья.* 2019. № 2. С. 119–127. doi:10.14258/jcrpm.2019024077
6. Фоминых М. М., Хомутов Т. О., Курдюков Е. Е. Новая методика количественного определения пигментов в листьях стевии // *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки.* 2020. № 2. С. 23–31. doi:10.21685/2307-9150-2020-2-3
7. Печинский С. В., Курегян А. Г. Структура и биологические функции каротиноидов // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2013. № 9. С. 4–15.
8. Чечета О. В., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И. Стабильность каротиноидов в растительных маслах при хранении // *Фармация.* 2008. № 2. С. 12–14.
9. Первушкин С. В., Куркин В. А., Воронин А. В. [и др.]. Методики идентификации различных пигментов и количественного спектрофотометрического определения суммарного содержания каротиноидов и белка в фитомассе *S. platensis* (Nords.) Geilt. // *Растительные ресурсы.* 2002. № 1. С. 112–119.
10. Гергель А. В. Спектрофотометрическое определение количественного содержания хлорофиллов и каротиноидов в некоторых растениях представителей рода *Moringa* при использовании разных экстрагентов // *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции.* 2010. № 64. С. 25–27.
11. Ульяновский Н. В., Косяков Д. С., Боголицын К. Г. Разработка экспрессных методов аналитической экстракции каротиноидов из растительного сырья // *Химия растительного сырья.* 2012. № 4. С. 147–152.
12. Писарев Д. И., Новиков О. О., Романова Т. А. Разработка экспресс-метода определения каротиноидов в сырье растительного происхождения // *Научные ведомости Белгородского государственного университета.* 2010. № 22. С. 119–122.
13. Karnjanawipagul P., Nittayanuntawech W., Rojsanga P., Suntornsuk L. Analysis of β -carotene in carrot by spectrophotometry // *Mahidol University Journal of pharmaceutical science.* 2010. Vol. 37, № 1-2. P. 8–16.
14. Арзамасцев А. П., Дорофеев В. Л., Садчикова Н. П. Государственные стандартные образцы в лекарственных веществах // *Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств Минздрава России.* 2000. № 3. С. 24–26.

References

1. Foidl N., Makkar H.P.S., Becker K. The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. *The Miracle Tree: The Multiple Attributes of Moringa.* Dakar, Senegal: Church World Service, 2001:45–76.
2. Ndhlala A.R., Mulaudzi R., Ncube B. [et al.]. Antioxidant, antimicrobial and phytochemical variations in thirteen *Moringa oleifera* Lam. cultivars. *Molecules.* 2014; 19(7):10 480–10 494. Available at: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules190710480>
3. Amaglo N.K., Bennet R.N., Curto B.L. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. *J. of Food Chem.* 2010;122(4):1047–1054.
4. Bennett R.N., Mellon F.A., Foidl N. [et al.]. Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish Tree) and *Moringa stenopetala* L. *J. Agri Food Chem.* 2003;51:3546–3553.

5. Sannikova E.G., Kompantseva E.V., Popova O.I., Ayrapetova A.Yu. Determination of pigments in *Salix triandra* L. raw by thin-layer chromatography and spectrophotometers. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* = Chemistry of plant raw materials. 2019;2:119–127. doi:10.14258/jcprm.2019024077 (In Russ.)
6. Fominykh M.M., Khomutov T.O., Kurdyukov E.E. New method for quantitative determination of pigments in stevia leaves. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Estestvennye nauki* = University proceedings. Volga region. Natural sciences. 2020;2:23–31. doi:10.21685/2307-9150-2020-2-3 (In Russ.)
7. Pechinskiy S.V., Kuregyan A.G. Structure and biological functions of carotenoids. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoj i farmatsevticheskoy khimii* = Issues of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2013;9:4–15. (In Russ.)
8. Checheta O.V., Safonova E.F., Slivkin A.I. Storage stability of carotenoids in vegetable oils. *Farmatsiya* = Pharmacy. 2008;2:12–14. (In Russ.)
9. Pervushkin S.V., Kurkin V.A., Voronin A.V. [et al.]. Methods for the identification of various pigments and quantitative spectrophotometric determination of the total protein content in *S. platensis* (Nords.) Geilt phytomass. *Rastitel'nye resursy* = Plant resources. 2002;1:112–119. (In Russ.)
10. Gergel' A.V. Spectrophotometric determination of the quantitative content of chlorophylls and carotenoids in some Moreceae plants using different extractants. *Razrabotka, issledovanie i marketing novoy farmatsevticheskoy produktsii* = Development, research and marketing of new pharmaceutical products. 2010;64:25–27. (In Russ.)
11. Ul'yanovskiy N.V., Kosyakov D.S., Bogolitsyn K.G. Development of express methods for the analytical extraction of carotenoids from plant materials. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* = Chemistry of plant raw materials. 2012;4:147–152. (In Russ.)
12. Pisarev D.I., Novikov O.O., Romanova T.A. Development of an express method for the determination of carotenoids in raw materials of plant origin. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta* = Bulletin of Belgorod State University. 2010;22:119–122. (In Russ.)
13. Karnjanawipagul P., Nittayanuntawech W., Rojsanga P., Suntornsuk L. Analysis of β -carotene in carrot by spectrophotometry. *Mahidol University Journal of pharmaceutical science*. 2010;37(1-2):8–16.
14. Arzamastsev A.P., Dorofeev V.L., Sadchikova N.P. State standard samples in medicinal substances. *Vedomosti nauchnogo tsentra ekspertizy i gosudarstvennogo kontrolya lekarstvennykh sredstv Minzdrava Rossii* = Bulletin of Scientific Centre for Expert Evaluation and State Control of Medical Products of the Ministry of Health of the Russian Federation. 2000;3:24–26. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

Елена Алексеевна Кутихина

аспирант, Пензенский государственный аграрный университет (Россия, г. Пенза, ул. Ботаническая, 30)

E-mail: guschina.v.a@pgau.ru

Elena A. Kutihina

Postgraduate student, Penza State Agrarian University (30 Botanicheskaya street, Penza, Russia)

Евгений Евгеньевич Курдюков

кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры общей и клинической фармакологии, Пензенский государственный университет (Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: e.e.kurdyukov@mail.ru

Evgeny E. Kurdyukov

Candidate of pharmaceutical sciences, associate professor of the sub-department of general and clinical pharmacology, Penza State University (40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Инеcса Яковлевна Моисеева

доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой общей
и клинической фармакологии, декан
лечебного факультета, Пензенский
государственный университет
(Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: moiseeva_pharm@mail.ru

Inessa Ja. Moiseeva

Doctor of medical sciences, professor, head
of the sub-department of general and
clinical pharmacology, dean of the faculty
of medicine, Penza State University
(40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Лилия Наилевна Бибякова

студентка, Пензенский государственный
университет (Россия, г. Пенза,
ул. Красная, 40)

E-mail: e.e.kurdyukov@mail.ru

Lilija N. Bibjakova

Student, Penza State University
(40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Надежда Валерьевна Финаёнова

студентка, Пензенский государственный
университет (Россия, г. Пенза,
ул. Красная, 40)

E-mail: e.e.kurdyukov@mail.ru

Nadezhda V. Finaenova

Student, Penza State University
(40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Поступила в редакцию / Received 14.12.2020

Поступила после рецензирования и доработки / Revised 15.01.2021

Принята к публикации / Accepted 18.01.2021