



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/9335

### **Исследование состава пигментов (каротиноидов и хлорофиллов) листьев облепихи крушиновидной методом ТСХ**

**Наталья Александровна Ковалева,**

**Ольга Валерьевна Тринеева<sup>✉</sup>, Алексей Иванович Сливкин**

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, trineevaov@mail.ru<sup>✉</sup>

**Аннотация.** Фармакологический эффект листьев облепихи крушиновидной определяется богатым составом биологически активных веществ (БАВ): водо- и жирорастворимые витамины (группа В, С и Е), полифенолы (дубильные вещества и флавоноиды), жирные и органические кислоты (оксикоричные и аминокислоты), каротиноиды (каротины и ксантофиллы) и хлорофиллы. Содержание хлорофиллов и каротиноидов, по разным данным, составляет 160-760 мг% и 35-150 мг% соответственно. Разделением и идентификацией желтых и зеленых пигментов в составе метаболома листьев облепихи методом ТСХ до настоящего времени не занимались. Интересным является также исследование закономерностей накопления данных БАВ листьями в процессе роста и развития – в разных фенологических фазах растения, что необходимо для научного обоснования сроков заготовки листьев облепихи с целью использования в фармации и дальнейшей разработки лекарственных растительных препаратов (ЛРП) на их основе. Целью исследования являлось обоснование выбора условий хроматографического разделения пигментов (каротиноидов и хлорофиллов) листьев облепихи крушиновидной методом ТСХ и изучение их состава на различных сроках заготовки. В качестве объекта исследования использовали листья облепихи крушиновидной, заготовленные от дикорастущих растений на территории Воронежской области в три этапа развития: 1 фаза – в середине июня; 2 фаза – вторая половина июля; 3 фаза – конец августа – начало сентября 2021 года.

Картина разделения для спиртовых, ацетоновых и этилацетатных вытяжек имела одинаковый характер, так как данные растворители способны извлекать как полярные ксантофиллы, так и малополярные каротины и хлорофиллы. Гексановые же экстракты содержали более бедный состав пигментов. Лучшей подвижной фазой по совокупности изученных параметров эффективности хроматографического процесса является система петролейный эфир-этанол (16:1) при использовании пластин типа ПТСХ-П-В. Таким образом, подобраны оптимальные условия разделения пигментов листьев облепихи крушиновидной в тонком слое сорбента. Полученные виды двумерных и одномерных хроматографических профилей пигментов листьев позволили установить наличие 6 БАВ хлорофилловой природы, в т.ч. хлорофиллы а, b и феофитин, и 5 БАВ пигментов группы каротиноидов ( $\beta$ -каротин и ксантофиллы). С точки зрения разнообразия качественного состава и количественного содержания желтых и зеленых пигментов, а, следовательно, ценности для фармации как потенциального сырья для получения ЛРП, могут быть рекомендованы листья, заготовленные в фазу 3.

**Ключевые слова:** листья, облепиха крушиновидная, тонкослойная хроматография, ТСХ-профиль, одномерное и двумерное хроматографирование.

**Для цитирования:** Ковалева Н.А., Тринеева О.В., Сливкин А.И. Исследование состава пигментов (каротиноидов и хлорофиллов) листьев облепихи крушиновидной методом ТСХ // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2022. Т. 22, № 3. С. 284-298. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/9335>



Original article

## Study of the pigment composition (carotenoids and chlorophylls) of sea buckthorn leaves by TLC

Natalya A. Kovaleva, Olga V. Trineeva<sup>✉</sup>, Alexey I. Slivkin

Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, trineevaov@mail.ru<sup>✉</sup>

**Abstract.** The pharmacological properties of sea buckthorn leaves are determined by the abundance of biologically active substances (BAS): water- and fat-soluble vitamins (group B, C, and E), polyphenols (tannins and flavonoids), fatty and organic acids (hydroxycinnamic and amino acids), carotenoids (carotenes and xanthophylls), and chlorophylls. Different data estimate the chlorophyll and carotenoid content at 160-760 mg% and 35-150 mg%, respectively. Until now, there have been no studies on the separation and identification of yellow and green pigments in the metabolome of sea buckthorn leaves by TLC. It was also important to study the patterns of accumulation of these BAS in the leaves at different phenological stages of the plant, during its growth and development. The research is necessary for scientific substantiation of the period of harvesting sea buckthorn leaves for their use in pharmaceuticals and further development of herbal medicines based on them. The aim of the study was to justify the choice of conditions for the chromatographic separation of pigments (carotenoids and chlorophylls) of sea buckthorn leaves by TLC and study their composition at different periods of harvesting. For the study, we used the leaves of wild sea buckthorn harvested in the Voronezh Region during three stages of development: stage 1 was in mid-June, stage 2 was in the second half of July, and stage 3 was from late August to early September 2021.

The separation patterns for alcohol, acetone, and ethyl acetate extracts were similar, because these solvents can extract both polar xanthophylls and low-polar carotenes and chlorophylls. The hexane extracts, by contrast, exhibited a poorer pigment composition. In terms of the combination of the studied parameters of the efficiency of chromatography, the petroleum ether-ethanol system (16:1) was considered the leading mobile phase, when PTSKh-P-V plates were used.

Thus, we chose the optimum conditions for the separation of sea buckthorn leaf pigments using a thin sorbent layer. We obtained the images of two-dimensional and one-dimensional chromatographic profiles of the pigments from the leaves. They revealed the presence of 6 BAS of the chlorophyll type, including chlorophylls a, b, and pheophytin, as well as 5 BAS of carotenoid group ( $\beta$ -carotene and xanthophylls). The leaves harvested during stage 3 had the most diverse composition and the quantitative content of yellow and green pigments. Therefore, they can be recommended as more valuable for pharmaceutical purposes as potential raw materials for the production of herbal medicines.

**Keywords:** leaves, sea buckthorn, thin-layer chromatography, TLC profile, one-dimensional and two-dimensional chromatography.

**For citation:** Kovaleva N.A., Trineeva O.V., Slivkin A.I. Study of the pigment composition (carotenoids and chlorophylls) of sea buckthorn leaves by TLC. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022. 22(3): 284-298. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/9335>

### Введение

Фармакологический эффект, оказываемый лекарственным растительным сырьём (ЛРС), напрямую связан с содержанием различных групп биологически активных веществ (БАВ). В литературе описано, что листья облепихи крушиновидной богаты такими соединениями, как водо- и жирорастворимые витамины (группа В, С и Е), полифенолы (дубильные вещества и флавоноиды), жирные и органические кислоты (оксикоричные и аминокислоты), каротиноиды (каротины

и ксантофиллы) и хлорофиллы [1-4]. Изучением роли желтых и зеленых пигментов в составе метаболома листьев облепихи до настоящего времени по данным литературы не занимались. Однако, содержание хлорофиллов и каротиноидов, по разным данным [1-4], составляет 160-760 мг% и 35-150 мг% соответственно. В зарубежной печати достаточно большое количество работ посвящено изучению антиоксидантной активности извлечений из листьев [5-13], что может быть связано, в частности, с каротиноидами – известными антиоксидантами. Особенно

интересным является также исследование закономерностей накопления данных БАВ листьями в процессе роста и развития – разных фенологических фазах растения. Эти данные необходимы для научного обоснования сроков заготовки листьев облепихи с целью использования в фармации и дальнейшей разработки лекарственных растительных препаратов (ЛРП) на их основе. Поэтому актуальными следует считать исследования по выбору и теоретическому обоснованию оптимальных условий хроматографического разделения пигментов листьев в тонком слое сорбента.

Целью исследования являлось обоснование выбора условий хроматографического разделения пигментов (каротиноидов и хлорофиллов) листьев облепихи крушиновидной методом ТСХ и изучение их состава на различных сроках заготовки.

### Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования использовали облепихи крушиновидной листья, заготовленные от дикорастущих растений на территории Воронежской области в три этапа развития: 1 фаза – в середине июня; 2 фаза – вторая половина июля; 3 фаза – конец августа – начало сентября 2021 года. Сушку проводили воздушно-теневым способом до остаточной влажности не более 10%.

Для оценки пигментного состава облепихи крушиновидной листьев, извлечения готовили по методике ОФС «Определение экстрактивных веществ в ЛРС и ЛРП» ГФ РФ 14 изд. [14]. При этом использован целый ряд растворителей с широким диапазоном значений полярности. Пигменты полученных извлечений разделяли методом ТСХ после нанесения на хроматографические пластины марки «Sorbfil» (Россия, Краснодар) различных типов (ПТСХ-АФ-А-УФ; ПТСХ-П-А-УФ и ПТСХ-П-В-УФ) размерами 10×10 и 10×15 см с помощью микрошприца МШ-

10 в количестве 30-40 мкл (Россия, СПб, ЗАО «Вектон»).

Обзор литературы показал, что для эффективного разделения хлорофиллов и каротиноидов различных зеленых частей растений используют многокомпонентные системы [15-24]. В более ранних работах мы провели изучение и теоретическое обоснование выбора элюента для исследования такого богатого по составу пигментов лекарственного растения, как крапива двудомная [21,25]. Однако, при работе с новым растительным объектом необходимо подбирать экспериментально условия хроматографического разделения. В эксперименте нами изучены элюирующие системы с различными величинами их общей полярности по Л. Снайдеру (таблица 1).

### Обсуждение результатов

Способ «отпечатков пальцев» или «штрихкодирования» – «Fingerprinting» – быстрый и высокопроизводительный метод, направленный на получение профиля метаболитов в суммарных экстрактах. Обычно при использовании данного подхода метаболиты не идентифицируют и не определяют количественно [1]. Вид полученных ТСХ-профилей пигментов листьев, полученных с применением различных по полярности экстрагентов, представлен на рис. 1-2. Следует отметить, что картина разделения для спиртовых, ацетоновых и этилацетатных вытяжек имела одинаковый характер, так как данные растворители способны извлекать как полярные ксантофиллы, так и малополярные каротины и хлорофиллы (рис. 1). Гексановые же экстракты содержали более бедный состав пигментов (рис. 2), поэтому далее в работе не использовались.

В случае работы с объектами комплексного состава – лекарственными растениями, выбор элюента и рекомендации по включению разработанной методики в нормативную документацию (НД) возможны при теоретическом обосновании с

Таблица 1. Исследованные системы для ТСХ (на примере спиртового извлечения)  
 Table 1. The studied systems for TLC (using alcohol extraction as an example)

№ п/п	Состав	Полярность по Снайдеру	Значения величин $R_f \pm 0,02$ разделяемых пигментов				Характеристика картины разделения
			Хлорофилл а	Хлорофилл b	Феофитин	$\beta$ -каротин	
1	Ацетон-петролейный эфир (3:7)	1.62	0.94	0.82	0.24	0.99	Удовлетворительное
2	Бензол-ацетон-петролейный эфир-гексан (10:10:3:10)	2.46	0.99	0.99	-	0.99	Нет разделения
3	Петролейный эфир-этанол (16:1)	0.31	0.28	0.18	0.41	0.97	Удовлетворительное
4	Петролейный эфир-метанол (98:2)	0.13	0.26	0.11	-	0.30	Нет разделения
5	Петролейный эфир-ацетон (95:5)	0.27	0.056	0.02	0.03	0.99	Нет разделения
6	Метанол-ацетон-вода (20:4:3)	6.68	0.99	0.99	0.99	0.99	Нет разделения
7	Петролейный эфир-хлороформ (3:1)	1.10	0.01	0.01	0.05	0.99	Нет разделения
8	Петролейный эфир-бензол-ацетон-кислота уксусная (80:20:2:1)	0.75	0.023	0.124	0.27	0.99	Разделение неполное
9	Петролейный эфир-ацетон (1:1)	2.70	0.99	0.99	0.25	0.99	Нет разделения
10	Этилацетат-лед. уксусная кислота-вода (7,5:1,5:1,5)	5.24	0.99	0.99	0.99	0.99	Нет разделения
11	Петролейный эфир-этанол (16:2)	0.48	0.94	0.75	0.97	0.99	Удовлетворительное

учетом подбора оптимальных условий, приводящих к удовлетворительному хроматографическому разделению. Основное влияние на воспроизводимость результатов разделения, как известно, оказывает подвижная фаза. Поэтому для каждой ТСХ-системы рассчитывали следующие характеристики изучаемых пигментов в тонком слое, рекомендованные

в монографиях Гейсса и др.: величина  $R_f$ , коэффициент распределения ( $K$ ) и величина селективности сорбции ( $L$ ) [26-28] (таблица 2). Обнаружение и идентификацию БАВ на пластинах проводили при просмотре в видимом и УФ-свете по специфической окраске зон и величинам  $R_f$ , приведенных в литературе [5-25].

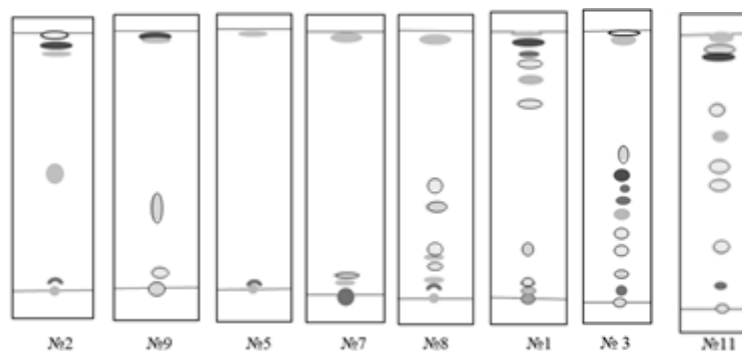


Рис. 1. Вид ТСХ-профилей пигментов листьев облепихи крушиновидной (фаза заготовки 1); (экстрагент – этилацетат, ацетон, этанол), полученных в системах №1-11 (зоны без окраски идентифицировались в УФ-свете)

Fig. 1. TLC profiles of the pigments from the sea buckthorn leaves (harvested during stage 1) (ethyl acetate, acetone, and ethanol were used as the extractants). The profiles were obtained in systems No. 1-11 (the uncoloured areas were identified under UV-light).

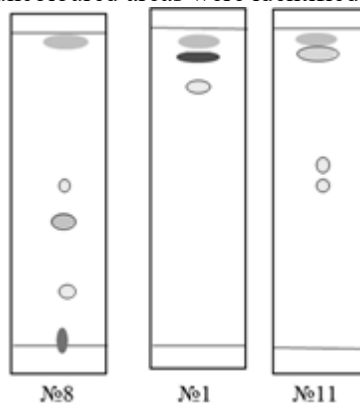


Рис. 2. Вид ТСХ-профилей пигментов листьев облепихи крушиновидной (фаза заготовки 1); (экстрагент – гексан), полученных в системах №1, 8 и 11

Fig. 2. TLC profiles of the pigments from the sea buckthorn leaves (harvested during stage 1) (hexane was used as the extractant). The profiles were obtained in systems No. 1, 8, and 11.

Элюирующие системы № 2, 4-7, 9 и 10 не могут быть использованы для разделения и идентификации пигментов листьев облепихи крушиновидной (рис. 1, таблица 1), поэтому для дальнейших расчетов их не использовали.

Данные рис. 3 показывают, что величина  $R_f$  желтого пигмента  $\beta$ -каротина зависит от полярности элюента в очень узком диапазоне (от 0.1 до 0.4 ед.). При достижении полярности 0.5 и более ед.,  $\beta$ -каротин практически не удерживается сорбентом – величина  $R_f$  стремится к единице (перестает зависеть от полярности). Вид подобной зависимости для зеленых пигментов – феофитина, хлорофиллов а и в имеет отличный характер. Величина  $R_f$  зеленых пигментов (рис. 3) вариабельна в

различных диапазонах полярности, однако, вид кривых сходен между собой, по-видимому, в виду общности структур изучаемых хлорофиллов. При этом хлорофиллы а и в перемещаются с током элюента при достижении величины полярности системы 1.7 и более, тогда как для феофитина это наблюдается только при 5.0 ед. и более. Оптимальные величины  $R_f$  достигнуты для пигментов листьев облепихи в системах № 3 и 11. Однако, максимальное количество разделяемых зон на хроматограммах, проявлялось только в системах №1, 3, 8 и 11, и выбор оптимальной хроматографической системы для многокомпонентных смесей

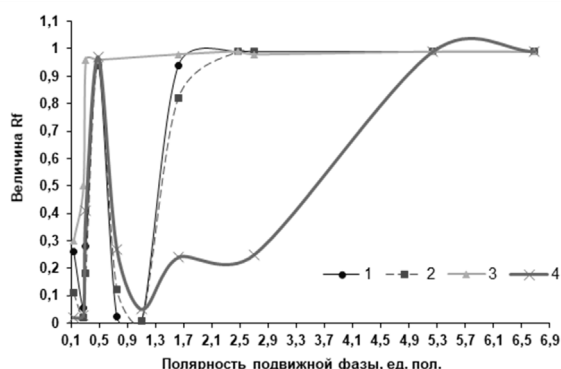


Рис. 3. Влияние полярности элюента на хроматографическую подвижность разделяемых пигментов в тонком слое (на примере 1 – хлорофилла а, 2 – хлорофилла b, 3 –  $\beta$ -каротина и 4 – феофитина)

Fig. 3. The effect of the eluent polarity on the chromatographic mobility of the pigments separated in the thin film (1 – chlorophyll a, 2 – chlorophyll b, 3 –  $\beta$ -carotene, and 4 – pheophytin).

Таблица 3. Характеристика эффективности хроматографических систем  
 Table 3. Characteristics of the efficiency of chromatographic systems

БАВ	H, мм	N	БАВ	H, мм	N
Подвижная фаза №1			Подвижная фаза №8		
хлорофилл b	0.36	224.09	хлорофилл b	1.0	124.0
хлорофилл а	0.45	177.78	хлорофилл а	3.0	41.33
$\beta$ -каротин	0.43	186.05	$\beta$ -каротин	0.20	620.0
феофитин	0.45	177.78	феофитин	0.71	173.67
Подвижная фаза №3			Подвижная фаза №11		
хлорофилл b	1.04	124.04	хлорофилл b	0.347	262.25
хлорофилл а	0.43	298.61	хлорофилл а	0.54	167.28
$\beta$ -каротин	0.19	671.88	$\beta$ -каротин	0.38	240.11
феофитин	0.45	286.67	феофитин	0.53	172.68

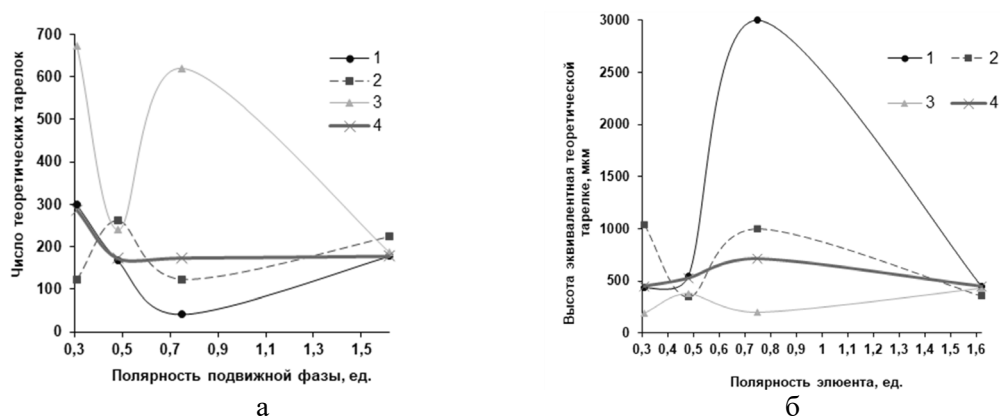


Рис. 4. Зависимость величин N (а) и H (б) от полярности элюента (на примере 1 – хлорофилла а, 2 – хлорофилла b, 3 –  $\beta$ -каротина и 4 – феофитина)

Fig. 4. The dependence of N (a) and H (b) values on eluent polarity (1 – chlorophyll a, 2 – chlorophyll b, 3 –  $\beta$ -carotene, and 4 – pheophytin).

должен основываться на параметрах, характеризующих эффективность хроматографического процесса и степень разделения веществ на пластинке (табл. 3).

Для оценки эффективности хроматографического процесса на хроматограммах были рассчитаны такие хроматографические параметры, как высота, эквивалентная теоретической тарелке (H) и



Таблица 2. Эффективность разделения хроматографических зон пигментов в различных элюентах (на примере спиртового извлечения)

Table 2. Efficiency of the separation of the chromatographic zones of the pigments in different eluents (using the alcohol extraction as an example)

№ зоны	$R_f \pm 0.02$	K	L	Окраска в видимом свете	Окраска в УФ-свете (365нм)	Идентификация вещества [5-25]
Элюирующая система №1						
1	0.24	3.17	6.10	серо-зеленая	розовая	феофитин
2	0.66	0.52		желтая	-	ксантофилл
3	0.82	0.22	2.36	светло-зеленая	розовая	хлорофилл b
4	0.87	0.14	1.57	желтая	-	ксантофилл
5	0.91	0.10	1.4	ярко-зеленая	розовая	неидентифицированный хлорофилл
6	0.94	0.06	1.56	темно-зеленая	розовая	хлорофилл a
7	0.99	0.01	6.4	оранжевая	-	$\beta$ -каротин
Элюирующая система №3						
1	0.01	70.36	2,18	грязно-зеленая	розовая	неидентифицированный хлорофилл
2	0.03	32.33		4.41	желтая	-
3	0.12	7.33				
4	0.13	6.46	1.13	светло-зеленая	розовая	хлорофилл b
5	0.18	4.56	1.42			
6	0.22	3.55	1.28	зеленая	розовая	неидентифицированный хлорофилл
7	0.25	3.00	1.18			
8	0.28	2.57	1.17	темно-зеленая	голубая	хлорофилл a
9	0.41	1.44	1.78	серо-зеленая		феофитин
10	0.97	0.03	46.5	-	голубая	-
11	0.99	0.01	3.10	оранжевая	-	$\beta$ -каротин
Элюирующая система №8						
1	0.02	42.47	1.72	темно-зеленая	розовая	хлорофилл a
2	0.04	24.65		желтая	-	ксантофилл
3	0.12	7.06	3.49	светло-зеленая	розовая	хлорофилл b
4	0.14	6.15	1.15	желтая	-	ксантофилл
5	0.16	5.28	1.16	желтая	-	ксантофилл
6	0.27	2.70	1.96	серо-зеленая	розовая	феофитин
7	0.31	2.23	1.21	желтая	-	ксантофиллы
8	0.33	2.03	1.10			
9	0.99	0.01	203	оранжевая	-	$\beta$ -каротин
Элюирующая система №11						
1	0.06	14.90	4.69	зеленая	розовая	неидентифицированный хлорофилл
2	0.24	3.17		5.28	желтая	-
3	0.63	0.60				
4	0.67	0.50	1.20	светло-зеленая	розовая	хлорофилл b
5	0.75	0.33	1.52	желтая	-	ксантофилл
6	0.84	0.19	1.77	темно-зеленая	розовая	хлорофилл a
7	0.94	0.07	2.66	серо-зеленая		феофитин
8	0.97	0.03	2.33	-	голубая	-
9	0.98	0.02	1.50	оранжевая		
10	0.99	0.01	1.50	оранжевая	-	$\beta$ -каротин

число теоретических тарелок (N) [26-29]. элюента для изучаемых пигментов ли-  
 Данные представлены в таблице 3. Вид стьев облепихи крушиновидной пред-  
 зависимостей N и N от полярности ставлен на рис. 4.

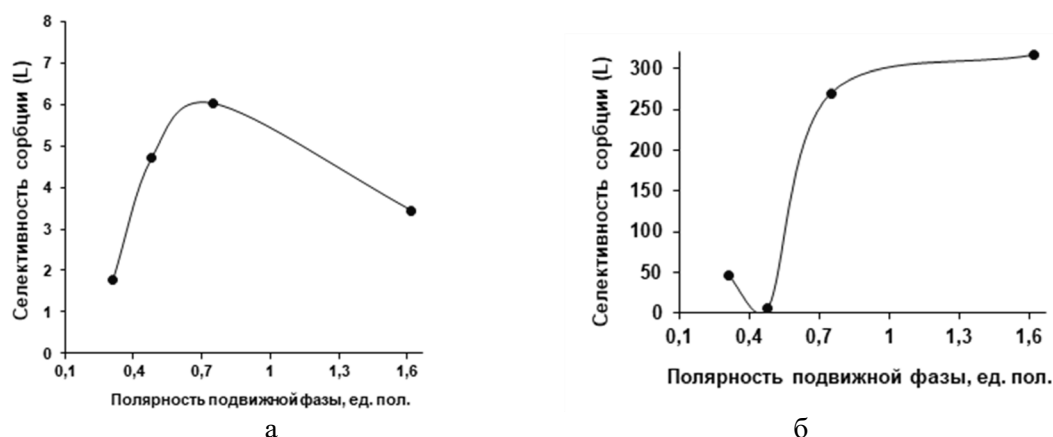


Рис. 5. Влияние полярности системы на разделение:  
 а – хлорофиллов а и b; б – феофитина и β-каротина  
 Fig. 5. The effect of the system polarity on the separation  
 of a – chlorophyll a and b and b – pheophytin and β-carotene.

Таблица 4. Характеристика хроматографических пластин, использованных для разделения пигментов изучаемых объектов  
 Table 4. Characteristics of the chromatographic plates used for the separation of pigments from the studied samples

№ п/п	Характеристика пластины	Тип пластины	
		ВЭТСХ-АФ-В-УФ	ПТСХ-П-В-УФ
1	Тип сорбента	Силикагель СТХ-1ВЭ	
2	Зернение, мкм	8-12	
3	Толщина слоя, мкм	80-100	100
4	Связующее	Силиказоль	
5	Подложка	Алюминиевая фольга	ПЭТФ
6	Размер пластин, см	10×15	

Селективность сорбции (L) определяется отношением коэффициентов распределения двух веществ ( $K_1/K_2$ ). Наилучшая степень разделения пигментов на пластинках была достигнута в системе №8 (рис. 5). Однако, в данной системе удастся разделить только 9 БАВ в отличие от систем №3 и 11.

Таким образом, идентификацию пигментов можно проводить в системах № 3, 8 и 11. Однако, лучшей подвижной фазой по совокупности изученных параметров является система №3, которая далее использована в работе и может быть рекомендована для включения в современную НД.

Тип пластин, как известно, может оказать существенное влияние на качество разделения зон БАВ на хроматограммах.

Поэтому в работе также проведена сравнительная характеристика различных пластин для ТСХ (таблица 4) на основе показателей эффективности с целью выбора наиболее предпочтительных.

Сравнивая параметры Н (ВЭТТ) и приведенной высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ПВЭТТ), возможно провести выбор среди различных сорбентов наиболее эффективных. Величина ПВЭТТ позволяет для двух любых пластин оценить качество сорбента, независимо от длины пластины, зернения сорбента и его природы [28]. Для каждого анализируемого типа пластин (таблица 5) на хроматограммах после разделения были рассчитаны показатели эффективности [25,28].



Таблица 5. Параметры эффективности хроматографического разделения пигментов листьев облепихи крушиновидной на двух типах пластин для ТСХ

Table 5. Parameters of the efficiency of chromatographic separation of sea buckthorn leaf pigments using two types of TLC plates

№ зоны	ВЭТСХ-АФ-В						БАВ
	R <sub>f</sub>	N	ВЭТТ, мм	ПВЭТТ	К	L	
1	0.03	33.67	3.0	300	32.33	2.07	хлорофилл
2	0.06	67.33	1.50	150	15.59		ксантофиллы
3	0.26	269.33	0.38	37.5	2.85		5.47
4	0.30	113.48	0.89	89	2.33	1.22	хлорофилл b
5	0.42	157.81	0.64	64	1.38	1.69	
6	0.53	306.06	0.33	33	0.89	1.55	хлорофилл
7	0.67	250.62	0.40	40.3	0.50	1.78	хлорофилл a
8	0.91	106.32	0.95	95	0.09	5.32	феофетин
9	0.95	88.59	1.14	114	0.06	1.68	-
10	0.99	91.90	1.10	110	0.01	5.60	β-каротин
ПТСХ-П-В							
1	0.03	38.33	3.0	300	32.33	1.71	хлорофилл
2	0.05	43.07	2.67	267	18.91		ксантофиллы
3	0.22	174.24	0.66	66	3.55		5.33
4	0.24	119.79	0.96	96	3.18	1.12	хлорофилл b
5	0.32	251.64	0.46	45.7	2.14	1.49	
6	0.35	179.69	0.64	64	1.84	1.16	хлорофилл
7	0.48	680.47	0.17	16.9	1.08	1.70	хлорофилл a
8	0.72	363.92	0.32	31.6	0.39	2.77	феофетин
9	0.85	1337.21	0.09	8.6	0.18	2.17	ксантофилл
10	0.98	133.72	0.86	86	0.01	15.0	-
11	0.99	161.97	0.71	71	0.01	1.20	β-каротин

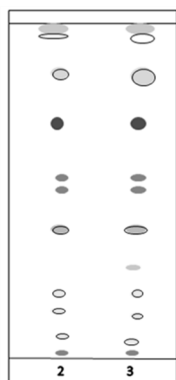


Рис. 6. ТСХ-профили пигментов листьев облепихи крушиновидной различных периодов заготовки сырья (2 и 3 фазы заготовки)

Fig. 6. TLC profiles of the pigments from the sea buckthorn leaves harvested in different periods (harvested during stages 2 and 3)



Рис. 7. Вид двумерной ТСХ извлечения из листьев облепихи крушиновидной (фаза заготовки 3) при просмотре в видимом свете и УФ<sub>365 нм</sub>-свете (тип пластины ВЭТСХ-АФ-В)

Fig. 7. Two-dimensional TLC of the extraction of pigments from sea buckthorn leaves (harvested during stage 3), observed under visible light and UV<sub>365 nm</sub> light (VETSKH-AF-B plate type)

В использованной элюирующей системе наблюдается удовлетворительное

разделение хроматографических зон изучаемых пигментов на всех использован-

ных пластинах, так как значение селективности сорбции, больше 1.0 (таблица 5). Однако, показатели эффективности хроматографического разделения пигментов в тонком слое достигают больших значений при использовании пластин типа ПТСХ-П-В.

Известно, что группа фотосинтетических пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) в зеленых частях растений неоднородна, а их содержание вариабильно в зависимости от различных факторов внешней среды. Так, интересным представлялось изучить состава пигментов листьев в различные фенофазы (рис. 6) с целью научно обоснованного определения оптимального срока заготовки данного ЛРС.

Полученные данные показали, что при заготовке листьев в период с начала июня по конец июля (фазы 1 и 2) качественный состав пигментов не меняется. Однако, при сборе в период технической спелости

плодов (конец августа – начало сентября – фаза 3), в ТСХ-профиле извлечений обнаруживается дополнительная зона ксантофиллов (оранжево-желтое окрашивание в видимом свете) (рис. 6). Кроме того, другие зоны пигментов визуальнo характеризуются большей площадью и интенсивностью окраски, что свидетельствует об их накоплении в процессе жизни листовых пластинок. В связи с чем, с точки зрения разнообразия качественного состава и количественного содержания желтых и зеленых пигментов, а, следовательно, ценности для фармации как потенциального сырья для получения ЛРП, можно считать листья, заготовленные в фазу 3.

При однократном элюировании, даже при высоте пробега растворителя более 13 см, разделение зон изучаемых БАВ на хроматограммах может являться неполным, ввиду богатого состава пигментов в листьях. Одна хроматографическая зона

Таблица 6. Характеристика хроматографического профиля пигментов листьев облепихи крушиновидной (при  $Z_{01}=Z_{02}=5$  мм и  $Z_{f1}=92$  мм;  $Z_{f2}=85$  мм)

Table 6. Characteristics of the chromatographic profile of sea buckthorn leaf pigments (at  $Z_{01}=Z_{02}=5$  mm and  $Z_{f1}=92$  mm,  $Z_{f2}=85$  mm)

№ зоны	$Z_{x1} \pm 2$ , мм	$Z_{x2} \pm 2$ , мм	Окраска зоны		БАВ
			в видимом свете	УФ <sub>365</sub> нм-свете	
1	2-3	1-2	Грязно-зеленая	розовая	хлорофилл
2	4-5	5-6	Желтая	-	ксантофилл
3	15-16	21-22	Желтая	-	ксантофилл
4	18-19	25-26	Желто-оранжевая	-	ксантофилл
5	24-25	25-26	Желтая	-	ксантофилл
6	25-26	30-31	Светло-зеленая	розовая	хлорофилл в
7	35-36	34-35	Темно-зеленая	розовая	хлорофилл а
8	35-36	39-40	Зеленая	розовая	хлорофилл
9	37-38	44-45	Зеленая	Зеленая	хлорофилл
10	56-57	64-65	Серо-зеленая	розовая	феофитин
11	74-75	80-81	-	голубая	-
12	77-78	83-84	Желто-оранжевая	-	$\beta$ -каротин

$Z_{x1}$  – длина пути, пройденного пятном в направлении первого элюирования, мм;  $Z_{x2}$  – длина пути, пройденного пятном в направлении второго элюирования, мм.

может содержать несколько БАВ с похожими параметрами удерживания в данных условиях проведения ТСХ-анализа. Проведение двумерного хроматографирования на завершающем этапе было использовано для оценки полноты разделения выделенных пигментов по средствам однократного элюирования (рис. 7). В отличие от одномерной, двумерная ТСХ сопоставима с колоночной хроматографией по разрешающей способности [28]. На основании ранее полученных результатов, для проведения двумерного хроматографирования исследуемых пигментов в ЛРС третьей фазы заготовки, использовали пластины марки «Sorbfil» ПТСХ-П-В размером 10×10 см при элюировании в системе петролейный эфир-этанол (16:1) в двух направлениях. Вид двумерных хроматограмм извлечения из листьев представлен на рис. 7.

На хроматограммах обнаружено 12 зон БАВ, 11 из которых отнесены к каротиноидам и хлорофиллам по характерному окрашиванию в видимом свете (таблица 6). Природа одной зоны не проявляющейся при дневном свете, имеющая интенсивно-голубую флуоресценцию, не установлена.

В литературе приводится информация о том, что при двумерном хроматографировании целесообразнее использовать координаты зон, в качестве которых могут быть использованы известные в ТСХ величины ( $Z_0$  – расстояние от линии погружения до стартовой линии, мм;  $Z_f$  – путь, пройденный фронтом растворителя, мм;  $Z_x$  – длина пути, пройденного пятном, мм) для оценки их расположения на хроматограммах, что связано со значительным увеличением ошибки расчета привычного для хроматографии в тонком слое сорбента параметра  $R_f$ . Такие хроматографические профили – «fingers print» возможно использовать для оценки подлинности, а также экспресс-метода установления оптимального момента срока

заготовки ЛРС, содержащего целый комплекс БАВ различной природы [21,23,25]. Кроме того, подобные хроматографические паспорта сырья могут быть использованы и для определения района заготовки, так как, вероятнее всего, состав пигментов зависит и от условий произрастания растения.

Методом двумерной ТСХ установлено также наличие 12 зон БАВ в извлечениях из листьев облепихи крушиновидной, поэтому для целей разделения и идентификации пигментов листьев различных фаз заготовки можно применять как двумерное, так и однократное элюирование при высоте пробега подвижной фазы не менее 13 см.

### **Заключение**

Таким образом, подобраны оптимальные условия разделения пигментов листьев облепихи крушиновидной в тонком слое сорбента. Установлено наличие 6 БАВ хлорофилловой природы, в т.ч. хлорофиллы а, b и феофитин, и 5 БАВ пигментов группы каротиноидов ( $\beta$ -каротин и ксантофиллы). Полученные виды двумерных и одномерных хроматографических профилей пигментов листьев могут служить дополнительным критерием их подлинности и доброкачественности, так как каждый вид сырья характеризуется своим уникальным набором каротиноидов и хлорофиллов. С точки зрения разнообразия качественного состава и количественного содержания желтых и зеленых пигментов, а, следовательно, ценности для фармации как потенциального сырья для получения ЛРП, могут быть рекомендованы листья, заготовленные в фазу 3.

### **Конфликт интересов**

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.



### Список литературы

1. 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.
2. Кукина Т.П., Щербаков Д.Н., Генъш К.В. и др. Биоактивные компоненты древесной зелени облепихи *Hippophae rhamnoides* L. // *Химия растительного сырья*. 2016. № 1. С. 37-42.
3. Абдыкаликова К.А., Нечипоренко Л.П. Фитохимический состав надземной части облепихи крушиновидной // *Вестник КГПИ*. 2008. № 4. С. 104-107.
4. Айтуарова А.Ш., Жусупова Г.Е. Качественная и количественная оценка состава биологически активных веществ надземной части растения вида *Hippophae rhamnoides* L. // *Известия научно-технического общества «КАХАК»*. 2015. Т. 4(51). С. 4-10.
5. Dharam P.A., Amrit K.S., Jyoti K., Tanveer N. Pharmacognostical Characterization & Preliminary Phytochemical Investigation of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Leaves. // *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012. Vol. 2(2). P. 108-113.
6. Pop R.M., Weesepeel Y., Socaciu C., Pintea A. et al. Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. // *Food Chem*. 2014. Vol. 147. P. 1-9.
7. Saggu S., Divekar H.M., Gupta V., Sawhney R.C. et al. Adaptogenic and safe-ty evaluation of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf extract: a dose dependent study // *Food Chem Toxicol*. 2007. Vol. 45(4). P. 609-617.
8. Szakova J, Tlustoš P, Goessler W, Pokorný T. et al. The Effect of Soil Contamination Level and Plant Origin on Contents of Arsenic, Cadmium, Zinc, and Arsenic Compounds in *Mentha Aquatica* L. // *Archives of Environmental Protection*. 2011. Vol. 37(2). P. 109-121.
9. Usha T., Middha S.K., Goyal A.K., Karthik M. et al. Molecular docking studies of anti-cancerous candidates in *Hippophae rhamnoides* and *Hippophae salicifolia* // *The Journal of Biomedical Research*. 2014. Vol. 28(5). P. 406-415.
10. Vijayaraghavan R., Gautam A., Kumar O., Pant S.C. et al. Protective effect of ethanolic and water extracts of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) against the toxic effects of mustard gas // *Indian Journal of Experimental Biology*. 2006. Vol. 44(10). P. 821-831.
11. S. Geetha, M. Sai Ram, V. Singh, G. Pavazhagan et al. Anti-oxidant and immunomodulatory properties of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) an in vitro study // *J Ethnopharmacol*. 2002; Vol. 79(3). P. 373-8.
12. Тарасов А.В., Бухаринова М.А., Хамзина Е.И. Определение антиоксидантной активности водных экстрактов некоторых растений Уральского региона // *Индустрия питания*. 2018. Т.3. № 2. С. 31-38.
13. Чукаев С.А., Роднаева О.А. Оценка спектра антиоксидантной активности гипорамина in vitro // *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2009. № 2(66). С. 140-142.
14. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>
15. Лупинская С.М., Орехова С.В., Васильева О.Г. Изучение биологически активных веществ липы, крапивы и душицы и сывороточных экстрактов на их основе // *Химия растительного сырья*. 2010. № 3. С. 143-145.
16. Белякова А.В., Вайнштейн В.А., Маркова К.В. и др. Применение синтетических эфиров высших жирных кислот для экстрагирования листьев крапивы // *Химико-фармацевтический журнал*. 2005. Т. 39. №11. С. 35-39.
17. Землянухин А.А., Землянухин Л.А. Большой практикум по физиологии



и биохимии растений. Воронеж: ВГУ. 1996. 188 с.

18. Струсовская О.Г. Определение пигментного состава *Cochlearia officinalis*, произрастающей на островах соловецкого архипелага // «Фармация и общественное здоровье», материалы V международной конференции, Екатеринбург. 2012. С. 184-187.

19. Лапинская Е.С., Копытько Я.Ф. Изучение состава липофильной фракции настоек гомеопатических матричных крапивы двудомной и крапивы жгучей // *Химико-фармацевтический журнал*. 2008. Т. 42. № 12. С. 26-29.

20. Петухова Н.М., Теслов Л.С., Бобкова Ю.В. Сравнительное фитохимическое изучение надземной части яснотки белой и яснотки пурпурной // «Фармация из века в век», сборник научных трудов, Часть III Анализ и стандартизация лекарственных средств, СПб. 2008. С. 115-118.

21. Тринеева О.В., Воропаева С.С., Сливкин А.И. Выбор оптимальной системы для определения пигментов листьев крапивы двудомной методом ТСХ // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2013. Т. 13. № 2. С. 213-219.

22. Яцюк В.Я., Чалый Г.А., Сошникова О.В. Биологически активные вещества травы крапивы двудомной // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2006. № 1. С. 25-29.

23. Тринеева О.В. Теоретические и методологические подходы к стандартизации и оценке качества лекарственного растительного сырья и масляных экстрактов на его основе. Дисс. докт. фарм. наук. М. 2017. 441 с.

24. Великая Т.В., Кожанова К.К., Жетерова С.К., Дрегерт О.А. Определение качественного состава крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) методом ТСХ // *Международный научно-исследовательский журнал*. 2016. № 1(43). Ч. 3. С. 78-80.

25. Тринеева О.В., Сливкин А.И. Сравнительная характеристика пигментного состава сырья и масляного экстракта листьев крапивы двудомной // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016. № 1 (14). С. 142-148.

26. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. М. Мир. 1981. С. 402-407.

27. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. М. Мир. 1980. Т. 2. С. 610.

28. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии. М. Мир. 1999. 405 с.

29. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В. и др. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. Воронеж. Изд-во «Водолей». 2004. 528 с.

## References

1. Mel'nikov O.M. Vereshchagin A.L., Koshelev Yu.A. Issledovanie mikroelementnogo sostava list'ev i pochk oblepikhi krushinovidnoi *Hippophae rhamnoides* L. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2010; 2: 113-116. (in Russ.)

2. Kukina T.P., Shcherbakov D.N., Gen'sh K.V. et al. Bioaktivnye komponenty drevesnoi zeleni oblepikhi *Hippophae rhamnoides* L. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2016; 1: 37-42. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2016011100> (In Russ.)

3. Abdykalikova K.A., Nechiporenko L.P. Fitokhimicheskii sostav nadzemnoi chasti oblepikhi krushinovidnoi. *Vestnik KGPI*. 2008; 4: 104-107. (In Russ.)

4. Aituarova A.Sh., Zhushupova G.E. Kachestvennaya i kolichestvennaya otsenka sostava biologicheskii aktivnykh veshchestv nadzemnoi chasti rasteniya vida *Hippophae rhamnoides* L. *Izvestiya nauchno-tekhnicheskogo obshchestva «KAKhAK»*. 2015; 4(51): 4-10. (In Russ.)

5. Dharam P.A., Amrit K.S., Jyoti K., Tanveer N. Pharmacognostical Characterization & Preliminary Phytochemical Investigation of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Leaves. *Indo Global Journal of*



- Pharmaceutical Sciences*. 2012; 2(2): 108-113.
6. Pop R.M., Weesepeol Y., Socaciu C., Pinte A. et al. Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Food Chem.* 2014; 147: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.083>
7. Saggi S., Divekar H.M., Gupta V., Sawhney R.C. et al. Adaptogenic and safe-ty evaluation of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf extract: a dose dependent study. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45(4): 609-617. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.10.008>
8. Szakova J, Tlustoš P, Goessler W, Pokorný T. et al. The Effect of Soil Contamination Level and Plant Origin on Contents of Arsenic, Cadmium, Zinc, and Arsenic Compounds in *Mentha Aquatica* L. *Archives of Environmental Protection.* 2011; 37(2): 109-121.
9. Usha T., Middha S.K., Goyal A.K., Karthik M. et al. Molecular docking studies of anti-cancerous candidates in *Hippophae rhamnoides* and *Hippophae salicifolia*. *The Journal of Biomedical Research.* 2014; 28(5): 406-415. <https://doi.org/10.7555/JBR.28.20130110>
10. Vijayaraghavan R., Gautam A., Kumar O., Pant S.C. et al. Protective effect of ethanolic and water extracts of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) against the toxic effects of mustard gas. *Indian Journal of Experimental Biology.* 2006; 44(10): 821-831.
11. S. Geetha, M. Sai Ram, V. Singh, G. Ilavazhagan et al. Anti-oxidant and immunomodulatory properties of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) an in vitro study. *J Ethnopharmacol.* 2002; 79(3): 373-8. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00406-8](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00406-8)
12. Tarasov A.V., Bukharinova M.A., Khamzina E.I. Opredelenie antioksidantnoi aktivnosti vodnykh ekstraktov nekotorykh rastenii Ural'skogo regiona. *Industriya pitaniya.* 2018; 3(2): 31-38. Available at: URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=35234412> (accessed: 13.02.2022). (In Russ.)
13. Chukaev S.A., Rodnaeva O.A. Otsenka spektra antioksidantnoi aktivnosti giporamina in vitro. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk.* 2009; 2(66): 140-142. Available at: URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=15015037> (accessed: 13.02.2022). (In Russ.)
14. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiiskoi Federatsii. XIV izd. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (accessed: 13.12.2021). (In Russ.)
15. Lupinskaya S.M., Orekhova S.V., Vasil'eva O.G. Izuchenie biologicheskii aktivnykh veshchestv lipy, krapivy i dushitsy i syvorotochnykh ekstraktov na ikh osnove. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya.* 2010; 3: 143-145. (In Russ.)
16. Belyakova A.V., Vainshtein V.A., Markova K.V. et al. Primenenie sinteticheskikh efirov vysshikh zhimnykh kislot dlya ekstragirovaniya list'ev krapivy. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal.* 2005; 39(11): 35-39. (In Russ.)
17. Zemlyanukhin A.A., Zemlyanukhin L.A. Bol'shoi praktikum po fiziologii i biokhimmii rastenii. Voronezh. VGU. 1996. 188 P. (In Russ.)
18. Strusovskaya O.G. Opredelenie pigmentnogo sostava *Cochlearia officinalis*, proizrastayushchei na ostrovakh solovetskogo arhipelaga. «Farmatsiya i obshchestvennoe zdorov'e», materialy V mezhdunarodnoi konferentsii. Ekaterinburg. 2012. P. 184-187. (In Russ.)
19. Lapinskaya E.S., Kopyt'ko Ya.F. Izuchenie sostava lipofil'noi fraktsii nastoek gomeopaticeskikh matrichnykh krapivy dvudomnoi i krapivy zhguchei. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal.* 2008; 42(12): 26-29. (In Russ.)
20. Petukhova N.M., Teslov L.S., Bobkova Yu.V. Sravnitel'noe fitokhimiicheskoe izuchenie nadzemnoi chasti yasnotki beloi i yasnotki purpurnoi. «Farmatsiya iz



veka v vek», sbornik nauchnykh trudov, pt III Analiz i standartizatsiya lekarstvennykh sredstv. SPb. 2008. P. 115-118. (In Russ.)

21. Trineeva O.V., Voropaeva S.S., Slivkin A.I. Vybor optimal'noj sistemy dlya opredeleniya pigmentov list'ev krapivy dvudomnoj metodom TSKH. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2013; 13(2): 213-219. (In Russ.)

22. Yatsyuk V.Ya., Chalyi G.A., Soshnikova O.V. Biologicheski aktivnye veshchestva travy krapivy dvudomnoj. *Rossiiskii mediko-biologicheskii vestnik imeni akademika I.P. Pavlova*. 2006; 1: 25-29. (In Russ.)

23. Trineeva O.V. Teoreticheskie i metodologicheskie podhody k standartizatsii i ocnenke kachestva lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ya i maslyanykh ekstraktov na ego osnove. Diss. dokt. farm. nauk. M. 2017. 441 p. (In Russ.)

24. Velikaya T.V., Kozhanova K.K., Zheterova S.K., Dregert O.A. Opredelenie kachestvennogo sostava krapivy dvudomnoj (*Urtica dioica* L.) metodom TSKH. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal*.

2016; 1(43) Ch. 3; 78-80. <https://doi.org/10.18454/IRJ.2016.43.015> (In Russ.)

25. Trineeva O.V., Slivkin A.I. Sravnitel'naya kharakteristika pigmentnogo sostava syr'ya i maslyanogo ekstrakta list'ev krapivy dvudomnoi. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*. 2016; 1(14): 142-148. (In Russ.)

26. Kirchner Yu. Tonkosloinaya khromatografiya. M. Mir. 1981. P. 402-407. (In Russ.)

27. Sharshunova M., Shvarts V., Mikhalets Ch. Tonkosloinaya khromatografiya v farmatsii i klinicheskoi biokhimmii. M. Mir. 1980. pt. 2. 610 P. (In Russ.)

28. Geiss F. Osnovy tonkosloinoi khromatografii. M. Mir. 1999. 405 p. (In Russ.)

29. Rudakov O.B., Vostrov I.A., Fedorov S.V. et al. Sputnik khromatografista. Metody zhidkostnoi khromatografii. Voronezh. Izd-vo «Vodolei». 2004. 528 p. (In Russ.)

### Информация об авторах / Information about the authors

**Н.А. Ковалева** – преподаватель, аспирант 1-ого года обучения кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета, Воронежский государственный университет, Воронеж;

**О.В. Тринева** – д.фарм.н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета, Воронежский государственный университет, Воронеж;

**А.И. Сливкин** – д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии, Воронежский государственный университет, Воронеж.

**N.A. Kovaleva** – teacher, 1st year postgraduate student of the pharmaceutical faculty, department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology of the Pharmaceutical Faculty, Voronezh State University, Voronezh. e-mail: [natali-sewer@yandex.ru](mailto:natali-sewer@yandex.ru)

**O.V. Trineeva** – grand Ph.D (pharmacy), associate professor, department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology of the Pharmaceutical Faculty, Voronezh State University, Voronezh. e-mail: [trineevaov@mail.ru](mailto:trineevaov@mail.ru)

**A.I. Slivkin** – grand Ph.D (pharmacy), professor, manager. chair of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, Voronezh State University, Voronezh. e-mail: [slivkin@pharmvsu.ru](mailto:slivkin@pharmvsu.ru)

Статья поступила в редакцию 24.03.2022; одобрена после рецензирования 11.05.2022; принята к публикации 17.06.2022.

The article was submitted 24.03.2022; approved after reviewing 11.05.2022; accepted for publication 17.06.2022.