

НОВАЯ МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ СТЕВИИ

Аннотация.

Актуальность и цели. Известно, что в листьях стевии *Stevia rebaudiana* (Bert.) содержится различный комплекс биологически активных соединений (флавоноиды, фенолпропаноиды, сапонины, органические кислоты). Ввиду того, что в настоящее время целесообразным является пероральный прием высушенного и измельченного в порошок лекарственного растительного сырья, представляет интерес изучение других биологически активных соединений (БАС), содержащихся в растении, в частности пигментов [1, 2]. Листья стевии содержат комплекс природных пигментов, основными из которых являются производные хлорофилла и каротиноиды, представленные β -каротином и хлорофиллом *a*. Одним из важнейших свойств хлорофилла является противовоспалительное, ранозаживляющее и антибактериальное действие, также он имеет антиоксидантный эффект [3–5]. Каротиноиды обладают широким набором фармакологических свойств, в том числе антиоксидантными, радиопротекторными и антиканцерогенными, которые в совокупности оказывают положительное влияние на иммунитет [5]. В этом отношении большой интерес представляют листья стевии, содержащие данные соединения. В научной литературе имеются противоречивые данные по химическому составу листьев стевии, не представлены также и нормативные документы. Результаты исследования могут быть использованы для разработки нормативной документации на лекарственное растительное сырье из листьев стевии. Цель исследования – разработка методик количественного определения содержания каротиноидов и хлорофилла в листьях стевии.

Материалы и методы. Объектом исследования послужили высушенные листья стевии, заготовленные в Краснодарском крае, Республике Крым, Пензенской и Тверской областях. Качественный анализ суммы каротиноидов и хлорофилла проводили методом тонкослойной хроматографии из ацетоновой фракции, в следующей системе растворителей петролейный эфир – ацетон (6:4). Для количественного определения каротиноидов и хлорофиллов в извлечениях из сырья стевии использовали спектрофотометрический метод. Количественное определение каротиноидов в сырье стевии проводили с использованием 95 % этилового спирта, гексана, ацетона, петролейного эфира и этилацетата. Определение хлорофилла в сырье стевии проводили с использованием 95 % этилового спирта, гексана и ацетона. Измерение оптической плотности проводили в максимумах поглощения каротиноидов (450 нм) и хлорофилла *a* (664 нм).

Результаты. Для исследования качественного содержания пигментов в сырье стевии использовали метод тонкослойной хроматографии, по результатам которой визуально определяются четыре пятна. Одно из них желтого цвета с фактором удерживания (*R_f*) равным 0,93 относится к β -каротину, дру-

гое с $R_f = 0,76$ – α -криптоксантину и β -криптоксантину. Хлорофиллы a и b проявляются как пятна сине-зеленого и желто-зеленого цвета с $R_f = 0,10$ и $0,08$ соответственно.

Выводы. С использованием разработанной методики определения каротиноидов и хлорофилла проанализированы образцы стевии, выращенные в различных регионах России. Было установлено, что содержание каротиноидов в листьях стевии варьирует от 4,33 до 7,15 мг%, хлорофилла от 3,63 до 4,21 мг%.

Ключевые слова: *Stevia rebaudiana*, β -каротин, хлорофилл a , спектрофотометрия, тонкослойная хроматография.

M. M. Fominykh, T. O. Khomutov, E. E. Kurdyukov

A NEW METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF PIGMENTS IN STEVIA LEAVES

Abstract.

Background. It is known that stevia leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) contain a different complex of biologically active compounds (BAC) (flavonoids, phenylpropanoids, saponins, organic acids). In view of the fact that it is currently advisable to take orally dried and powdered medicinal plant raw materials, it is also interesting to study other BAC contained in the plant, in particular pigments [1, 2]. Stevia leaves contain a complex of natural pigments, the main of which are chlorophyll derivatives and carotenoids, represented by β -carotene and chlorophyll a . One of the most important properties of chlorophyll is anti-inflammatory, wound healing and antibacterial action, it also has an antioxidant effect [3–5]. Carotenoids also have a wide range of pharmacological properties, including antioxidant, radioprotective and anti-carcinogenic activity, which together have a positive effect on the immune system [5]. In this case, stevia leaves containing these compounds are of great interest. Stevia Rebo is a poorly studied plant. In the scientific literature, there are conflicting data on the chemical composition of leaf stevia, and regulatory documents are not provided. The results of the study can be used for the development and improvement of standards. Objective – development of methods for quantitative determination of β -carotene and chlorophyll a content in stevia leaves.

Materials and methods. The objects of the study were dried stevia leaves harvested in the Krasnodar territory, the Republic of Crimea, Penza and Tver regions). Qualitative analysis of the sum of carotenoids and chlorophyll was performed by thin-layer chromatography from the acetone fraction in the following solvent system: petroleum ether-acetone (6:4). For quantitative determination of carotenoids and chlorophylls in extracts from stevia raw materials, a spectrophotometric method was used. Quantitative determination of carotenoids in stevia raw materials was performed using 95 % ethyl alcohol, hexane, acetone, petroleum ether, and ethyl acetate. Determination of chlorophyll in stevia raw materials was performed using 95 % ethyl alcohol, hexane, and acetone. Optical density was measured at the maximum absorption of carotenoids (450 nm) and chlorophyll a (664 nm).

Results. The method of thin-layer chromatography was used to study the qualitative content of pigments in stevia raw materials. Visually, 4 spots are identified, one of which is yellow with $R_f = 0,93$ refers to β -carotene, $R_f = 0,76$ α -cryptoxanthin and β -cryptoxanthin. Chlorophylls a and b appear as blue-green and yellow-green spots with $R_f = 0,10$ and $0,08$ respectively.

Conclusions. Samples of stevia grown in different regions of Russia were analyzed using the developed method for determining carotenoids and chlorophyll.

It was found that the content of carotenoids in stevia leaves varies from 4,33 to 7,15 mg%, chlorophyll from 3,63 to 4,21 mg%

Keywords: *Stevia rebaudiana*, β -carotene, chlorophyll *a*, spectrophotometry, thin-layer chromatography.

Введение

В соответствии со стратегией развития фармацевтической отрасли на период до 2020 г., одной из актуальных задач современной фармации является создание и внедрение отечественных лекарственных средств, а также поиск рациональных путей использования лекарственного растительного сырья (ЛРС) и фармацевтических субстанций на их основе в соответствии с принципами доказательной медицины [1, 2]. Фармацевтические субстанции благодаря наличию комплекса биологически активных соединений, взаимодействуя с организмом человека, проявляют минимум побочных эффектов. Одним из перспективных растительных источников получения фармацевтических субстанций являются листья стевии *Stevia rebaudiana*, обладающие широким спектром фармакологической активности, включая гипогликемический, противовоспалительный, адаптогенный, гепатопротекторный и антиоксидантный эффект [3, 4].

В листьях стевии содержится различный комплекс полифенольных соединений, за счет которого листья стевии проявляют перечисленные фармакологические эффекты [3, 4]. В связи с этим актуальным является исследование и липофильной фракции листьев стевии, а именно пигментов: каротиноидов и хлорофиллов. Хлорофилл проявляет противовоспалительное, ранозаживляющее и антибактериальное действие, а также является хорошим антиоксидантом, замедляющим процессы старения [5]. Каротиноиды также обладают широким спектром фармакологических свойств: антиоксидантные, радиопротекторные и антиканцерогенные, которые в совокупности оказывают положительное влияние на иммунитет [5].

Материалы и методы

Объектом исследования послужили высушенные листья стевии, заготовленные в Краснодарском крае, Республике Крым, Пензенской и Тверской областях.

Качественный анализ суммы каротиноидов и хлорофилла в листьях стевии проводили методом тонкослойной хроматографии из ацетоновой фракции, в системе растворителей: петролейный эфир – ацетон (6:4), спирт метиловый – бензол – этилацетат (5:70:25).

Количественное определение суммы каротиноидов и хлорофилла определяли методом прямой спектрофотометрии. Около 5 г листьев стевии помещали в колбу вместимостью 100 мл и экстрагировали с 25 мл экстрагента при перемешивании 1,5 ч. Затем фильтровали через бумажный фильтр 2 мл извлечения в мерную колбу на 25 мл. Определяли оптическую плотность на спектрофотометре СФ-104 при длине волны 450 и 664 нм [5].

Содержание суммы каротиноидов и хлорофилла в сырье стевии (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, BIOSTAT. Все измерения проводили в пятикратной аналитической повторности. В таблицах приведены только средние значения. Определялись основные статистические характеристики: среднее, 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 были обнаружены зоны адсорбции от желтого до ярко-оранжевого цвета. Полученные значения фактора удерживания (R_f) выявленных зон адсорбции сравнивали со значениями, описанными в литературе [5, 6]. В системе петролейный эфир – ацетон (6:4) были обнаружены четыре зоны: зона оранжевого цвета с R_f равной 0,92, которая соответствует β -каротину, зона желтого цвета с $R_f = 0,74$, соответствующая криптоксантину, а также две зоны адсорбции зеленого и желто-зеленого цвета с $R_f = 0,10$ и $R_f = 0,23$, соответствующие хлорофиллу *a* и хлорофиллу *b*. Наиболее яркими были зоны β -каротина и β -криптоксантина (α -криптоксантина).

Количественное определение суммы каротиноидов в листьях стевии проводили методом прямой спектрофотометрии [7–9]. Анализ данных литературы показывает, что каротиноиды растворимы в спирте различных концентраций, ацетоне, гексане, хлороформе и других органических растворителях [1, 10].

Электронные спектры извлечения в диапазоне длин волн 400–500 нм имеют максимум оптической плотности (D) при 450 ± 2 нм. В гексане основные максимумы поглощения находятся при длинах волн 426 ± 2 нм, 450 ± 2 нм и 478 ± 2 нм, характерные для β -каротина (рис. 1). После сравнения максимумов поглощения полученных спектров с литературными сведениями и положениями максимумов оптической плотности на спектре раствора стандартного образца (СО) β -каротина установлено, что гексановое извлечение преимущественно содержит β -каротин [5, 10–12].

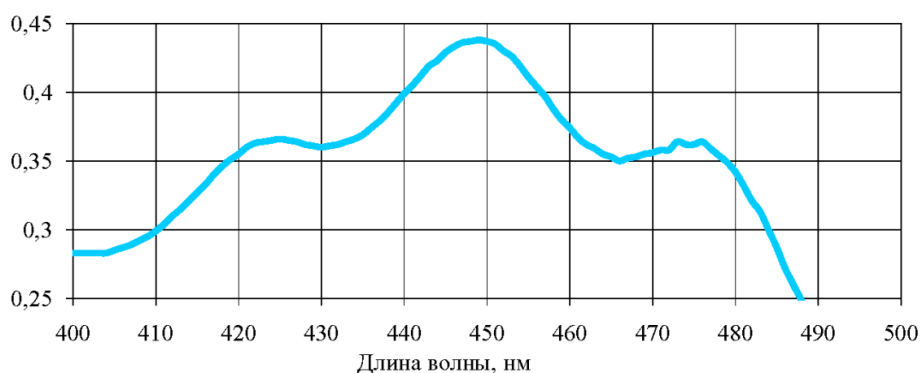


Рис. 1. УФ-спектр гексанового извлечения пигментов листьев стевии

В результате проведенного анализа установили, что лучшим экстрагентом для выделения каротиноидов из высушенных листьев стевии является гексан (табл. 1).

Таблица 1

Влияние экстрагента на выход каротиноидов в листьях стевии

Экстрагент	Содержание, мг%
1. Ацетон	$2,96 \pm 0,16$
2. Гексан	$4,56 \pm 0,10^*$
3. Петролейный эфир	$4,12 \pm 0,08^*$
4. Этилацетат	$3,87 \pm 0,10^*$
5. Спирт 95 %	$1,02 \pm 0,17$
6. Гексан : ацетон (1:2)	$3,70 \pm 0,09^*$

Примечание. *Достоверные различия ($p \leq 0,05$) содержания каротиноидов в гексане, петролейном эфире, этилацетате и гексан-ацетоновой смеси (1:2) относительно 95 % спирта и ацетона.

В результате проведенного исследования проанализировали ряд образцов сырья стевии из разных географических районов России и определили, что в листьях стевии содержание β -каротина варьируется от 4,33 до 7,15 мг% (табл. 2). Результаты статистической обработки результатов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения не превышает значения 1,56 %. Для оценки доброкачественности листьев стевии по содержанию каротиноидов в пересчете на β -каротин минимальное значение должно быть не менее 4 %.

Таблица 2

Результаты количественного определения каротиноидов
в листьях стевии ($M \pm m$)

Источник происхождения сырья	Количество каротиноидов, в пересчете на β -каротин, мг%
1. Россия, Краснодар	$4,56 \pm 0,14$
2. Россия, Пенза	$4,33 \pm 0,15$
3. Россия, Крым	$7,15 \pm 0,09^*$
4. Россия, Тверь	$5,46 \pm 0,08^*$

Примечание. *Достоверные различия ($p \leq 0,05$) содержания каротиноидов в гексане, петролейном эфире, этилацетате и гексан-ацетоновой смеси (1:2) относительно 95 % спирта и ацетона.

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

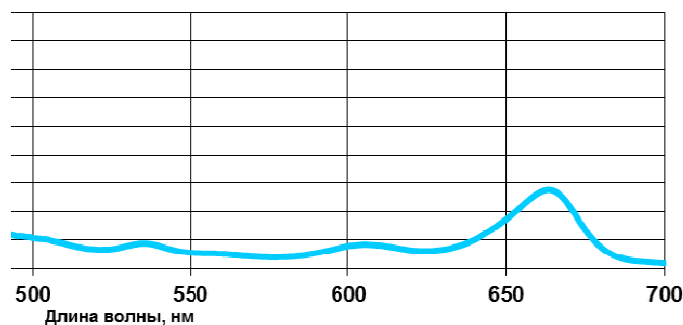


Рис. 2. Электронный спектр спиртового раствора извлечения из листьев стевии

В результате проведенного анализа установили, что лучшим экстрагентом для выделения хлорофилла из высушенных листьев стевии является 95 % спирт (табл. 3).

Таблица 3

Влияние экстрагента на выход хлорофилла в листьях стевии

Экстрагент	Содержание, мг%
1. Ацетон	$2,68 \pm 0,16$
2. Гексан	$3,76 \pm 0,09^*$
5. Спирт 95 %	$3,95 \pm 0,09^*$
6. Гексан : ацетон (1:2)	$3,70 \pm 0,08^*$

Примечание. *Различия достоверны при $p \leq 0,05$. Статистически значимыми результатами можно считать содержание хлорофилла в гексане, спирте 95 %, гексан : ацетон (1:2) относительно ацетона. В остальных пробах статистически значимой разницы не наблюдалось.

Содержание суммы форм хлорофилла в листьях стевии составило от 3,63 мг% (источник происхождения сырья – Краснодарский край) до 4,21 мг% (источник происхождения сырья – Республика Крым) в пересчете на хлорофилл *a* и высушенное сырье (табл. 4). Результаты статистической обработки результатов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения не превышает значения 1,98 %. Доброкачественность листьев стевии как фармацевтического сырья оценивается по содержанию в них хлорофилла. В пересчете на хлорофилл *a* этот показатель не должен иметь значения менее 3,5 %.

Таблица 4

Результаты УФ-спектрофотометрического определения хлорофилла в листьях стевии ($M \pm m$)

Источник происхождения сырья	Количество хлорофилла, в пересчете на хлорофилл <i>a</i> , мг%
1. Россия, Краснодар	$3,95 \pm 0,16$
2. Россия, Пенза	$3,63 \pm 0,09$
3. Россия, Крым	$4,21 \pm 0,09^*$
4. Россия, Тверь	$4,06 \pm 0,11^*$

Примечание. *Достоверные различия ($p \leq 0,05$) содержания каротиноидов в гексане, петролейном эфире, этилацетате и гексан-ацетоновой смеси (1:2) относительно 95 % спирта и ацетона.

Заключение

1. УФ-спектры извлечения каротиноидов и хлорофилла из листьев стевии имеют максимумы длин волн поглощения 450 ± 2 нм и 664 ± 2 нм соответственно.

2. Содержание каротиноидов в сырье стевии варьирует от 4,33 мг% (Пензенская область) до 7,15 мг% (Республика Крым). Содержание хлорофилла варьирует от 3,63 мг% (Пензенская область) до 4,21 мг% (Республика Крым), что является приемлемым для использования этого лекарственного растительного сырья в медицине как источника каротиноидов и хлорофилла.

Библиографический список

1. **Котельников, Г. П.** Доказательная медицина. Научно обоснованная медицинская практика : монография / Г. П. Котельников, А. С. Шпигель. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 242 с.
2. Новый терапевтический справочник / под ред. И. Н. Денисова, Н. А. Мухиной, А. Г. Чучалина. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 608 с. – (Клинические рекомендации).
3. **Семенова, Е. Ф.** Антимикробная активность извлечений из сырья стевии / Е. Ф. Семенова, Е. Е. Курдюков, А. И. Шпичка // Актуальные проблемы медицинской науки и образования (АПМНО–2017) : сб. ст. VI Междунар. науч. конф. (г. Пенза, 14–15 сентября 2017 г.) / редкол.: А. Н. Митрошин, С. М. Геращенко. – Пенза : Изд-во ПГУ, 2017. – С. 144–146.
4. **Курдюков, Е. Е.** Макро- и микроморфологические особенности листьев стевии Ребо *Stevia rebaudiana* Bertoni при интродукции в Среднем Поволжье / Е. Е. Курдюков, Е. Ф. Семенова // Научные ведомости. Сер.: Медицина. Фармация. – 2017. – № 26. – С. 137–145.
5. Методики идентификации различных пигментов и количественного спектрофотометрического определения суммарного содержания каротиноидов и белка в фитомассе *S. platensis* (Nords.) Geilt. / С. В. Первушкин, В. А. Куркин, А. В. Воронин, А. А. Сохина, И. Ф. Шаталаев // Растительные ресурсы. – 2002. – Т. 38, № 1. – С. 112–119.
6. **Арзамасцев, А. П.** Государственные стандартные образцы лекарственных веществ (проект общей фармакопейной статьи) / А. П. Арзамасцев, В. Л. Дорофеев, Н. П. Садчикова // Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств Минздрава России. – 2000. – № 3. – С. 24–26.
7. **Гергель, А. В.** Спектрофотометрическое определение количественного содержания хлорофиллов и каротиноидов в некоторых растениях представителей рода *Moreseae* при использовании разных экстрагентов / А. В. Гергель // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. – 2010. – Вып. 64. – С. 25–27.
8. **Ульяновский, Н. В.** Разработка экспрессных методов аналитической экстракции каротиноидов из растительного сырья / Н. В. Ульяновский, Д. С. Косяков, К. Г. Боголицын // Химия растительного сырья. – 2012. – № 4. – С. 147–152.
9. **Писарев, Д. И.** Разработка экспресс-метода определения каротиноидов в сырье растительного происхождения / Д. И. Писарев, О. О. Новиков, Т. А. Романова // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Сер.: Медицина. Фармация. – 2010. – № 22 (93). – С. 119–122.
10. **Печинский, С. В.** Структура и биологические функции каротиноидов / С. В. Печинский, А. Г. Курегян // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 9. – С. 4–15.

11. **Karnjanawipagul, P.** Analysis of β -carotene in carrot by spectrophotometry / P. Karnjanawipagul, W. Nittayanuntawech, P. Rojsanga, L. Suntornsuk // Mahidol University Journal of pharmaceutical science. – 2010. – Vol. 37, № 1-2. – P. 8–16.
12. **Чечета, О. В.** Стабильность каротиноидов в растительных маслах при хранении / О. В. Чечета, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин // Фармация. – 2008. – № 2. – С. 12–14.

References

1. Kotel'nikov G. P., Shpigel' A. S. *Dokazatel'naya meditsina. Nauchno obosnovannaya meditsinskaya praktika: monografiya* [Evidence-based medicine. Evidence-based medical practice: monograph]. 2nd ed., rev. and suppl. Moscow: GEOTAR-Media, 2012, 242 p. [In Russian]
2. *Novyy terapevticheskiy spravochnik* [New therapeutic guide]. Eds. I. N. Denisov, N. A. Mukhina, A. G. Chuchalin. Moscow: GEOTAR-Media, 2005, 608 p. [In Russian]
3. Semenova E. F., Kurdyukov E. E., Shpichka A. I. *Aktual'nye problemy meditsinskoy nauki i obrazovaniya (APMNO–2017): sb. st. VI Mezhdunar. nauch. konf. (g. Penza, 14–15 sentyabrya 2017 g.)* [Actual problems of medical science and education (APMNO–2017: proceedings of the VI International scientific conference (Penza, September 14–15, 2017)]. Penza: Izd-vo PGU, 2017, pp. 144–146. [In Russian]
4. Kurdyukov E. E., Semenova E. F. *Nauchnye vedomosti. Ser.: Meditsina. Farmatsiya* [Scientific bulletin. Series: Medicine. Pharmacy]. 2017, no. 26, pp. 137–145. [In Russian]
5. Pervushkin S. V., Kurkin V. A., Voronin A. V., Sokhina A. A., Shatalaev I. F. *Rastitel'nye resursy* [Plant resources]. 2002, vol. 38, no. 1, pp. 112–119. [In Russian]
6. Arzamastsev A. P., Dorofeev V. L., Sadchikova N. P. *Vedomosti nauchnogo tsentra ekspertizy i gosudarstvennogo kontrolya lekarstvennykh sredstv Minzdrava Rossii* [Bulletin of Scientific Center for Expertise and State Control of Medicines of the Ministry of Health of Russia]. 2000, no. 3, pp. 24–26. [In Russian]
7. Gergel' A. V. *Razrabotka, issledovanie i marketing novoy farmatsevticheskoy produktsii* [Development, research and marketing of new pharmaceutical products]. 2010, iss. 64, pp. 25–27. [In Russian]
8. Ul'yanovskiy N. V., Kosyakov D. S., Bogolitsyn K. G. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* [Chemistry of plant raw materials]. 2012, no. 4, pp. 147–152. [In Russian]
9. Pisarev D. I., Novikov O. O., Romanova T. A. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Ser.: Meditsina. Farmatsiya* [Bulletin of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacy]. 2010, no. 22 (93), pp. 119–122. [In Russian]
10. Pechinskiy S. V., Kuregyan A. G. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii* [Issues of biological, medical and pharmaceutical chemistry]. 2013, no. 9, pp. 4–15. [In Russian]
11. Karnjanawipagul P., Nittayanuntawech W., Rojsanga P., Suntornsuk L. *Mahidol University Journal of pharmaceutical science*. 2010, vol. 37, no. 1-2, pp. 8–16.
12. Checheta O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. *Farmatsiya* [Pharmacy]. 2008, no. 2, pp. 12–14. [In Russian]

Фоминых Максим Михайлович
студент, Пензенский государственный
университет (Россия, г. Пенза,
ул. Красная, 40)

E-mail: gagarinka1122@gmail.com

Fominykh Maksim Mikhaylovich
Student, Penza State University
(40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Хомутов Тимофей Олегович

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

E-mail: Timofei_homutov@mail.ru

Khomutov Timofey Olegovich

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

Курдюков Евгений Евгеньевич

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

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

Kurdyukov Evgeniy Evgen'evich

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

Образец цитирования:

Фоминых, М. М. Новая методика количественного определения пигментов в листьях стевии / М. М. Фоминых, Т. О. Хомутов, Е. Е. Курдюков // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. – 2020. – № 2 (30). – С. 23–31. – DOI 10.21685/2307-9150-2020-2-3.