

Министерство образования и науки Российской Федерации

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)

Химический факультет  
Кафедра органической химии

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК



Руководитель ООП  
канд. хим. наук, доцент  
В. В. Шелковников  
« 13 » 06 \_\_\_\_\_ 2017 г.

**ДИПЛОМНАЯ РАБОТА**  
ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНОИДОВ И ХЛОРОФИЛЛА В НАТУРАЛЬНОМ МЫЛЕ С  
РАСТИТЕЛЬНЫМИ ДОБАВКАМИ

по основной образовательной программе подготовки специалистов  
специальность

04.05.01 – Фундаментальная и прикладная химия

Мария Петровна Санду

Зав. каф. органической химии  
канд. хим. наук, доцент  
Ю. Г. Слизов  
« 13 » 06 \_\_\_\_\_ 2017 г.

Руководитель ВКР  
канд. хим. наук, доцент  
С. С. Кравцова

Автор работы  
студент группы № 08203  
М. П. Санду

Томский государственный университет  
Химический факультет  
Кафедра органической химии (ОХ)

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель ООП, к.х.н., доцент  
уч. степень, звание

  
подпись В. В. Шелковников  
инициалы, фамилия

« 15 » 01 2017г.

ЗАДАНИЕ НА ДИПЛОМНУЮ РАБОТУ СПЕЦИАЛИСТА

Студенту Санду Марии Петровне группы № 08203 .  
фамилия, имя, отчество

**1. Тема выпускной работы** Определение каротиноидов и хлорофилла в натуральном мыле с растительными добавками.

**2. Цели и задачи исследования** Цель: оценка полноты перехода каротиноидов и хлорофилла из растительного сырья в мыло. Задачи: исследование содержания каротиноидов и хлорофилла в растительном сырье и в мыле с добавлением этого сырья в зависимости от срока хранения мыла.

**3. Объекты, методы исследования и оценка достоверности результатов**

Объекты: мыло марки «BAZITEL» со следующими растительными добавками: плоды шиповника, зелёный чай, кипрей, клевер, хвоя, манжетка, крапива (свежее мыло, 7 месяцев, 10 месяцев); методы исследования: спектрофотометрический метод, ТСХ, ИК-, КР-спектроскопия; оценка достоверности проводилась путём статистической обработки, сравнения со стандартными образцами и на основании литературных данных.

**4. Перечень основных этапов работы (сроки выполнения), ожидаемые результаты 1)**

Литературный обзор (15.01.17 - 15.04.17); 2) Экспериментальная часть включает в себя количественное определение каротиноидов и хлорофилла в образцах мыла с растительными добавками свежеприготовленного и 7 и 10 месяцев хранения (14.02.17 – 15.05.17); 3) Результаты исследования представлены в виде таблиц (15.03.17-20.05.17). Ожидаемые результаты: полнота перехода БАВ и определение сроков хранения мыла по наличию каротиноидов и хлорофилла.

**5. Предприятие, организация, по заданию которого выполняется работа**

Выполнено в сотрудничестве с бизнес-инкубатором НИ ТГУ.

Зав. кафедрой ОХ, к. н. х., доцент

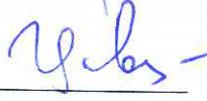
Руководитель ВКР

Доцент кафедры ОХ, НИ ТГУ

должность, место работы

Задание принял к исполнению

  
подпись

  
подпись

12.01.2017  
дата

Ю.Г. Слижов  
инициалы, фамилия

С.С. Кравцова  
инициалы, фамилия

  
подпись студента

## РЕФЕРАТ

**Определение каротиноидов и хлорофилла в натуральном мыле с растительными добавками.** 04.05.01 – Фундаментальная и прикладная химия. М. П. Санду. – 60 с., 19 рис., 13 табл., 46 источников.

Объектом исследования являются образцы мыла марки «BAZITEL» с растительными добавками кипрея, крапивы, клевера, хвои пихты, манжетки, зеленого чая, плодов шиповника.

В процессе исследования методом спектрофотометрии было определено количественное содержание каротиноидов и хлорофилла в свежеприготовленном мыле и мыле различного срока хранения. Качественное определение пигментов проводилось методом ТСХ. Для подтверждения результатов ТСХ хлорофиллы «а», «b» и феофитин были исследованы методом колебательной и ЯМР-спектроскопии. Достоверность результатов проводилась методом статистической обработки, сравнения со стандартными образцами и на основании литературных данных.

В результате работы определена полнота перехода биологически активных веществ из растительного сырья в мыло с добавлением этого сырья, а также определены сроки хранения мыла по наличию каротиноидов и хлорофилла.

Актуальность работы обусловлена недостаточной изученностью перехода БАВ из лекарственного сырья в мыло.

Ключевые слова: каротиноиды, хлорофилл «а», хлорофилл «b», феофитин, натуральное мыло, растительные добавки, сроки хранения мыла.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	6
1 Литературный обзор	8
1.1 Химические реакции, лежащие в основе получения натурального мыла	8
1.2 Полезные добавки к мылу	8
1.2.1 Консерванты	9
1.2.2 Гелеобразующие агенты	9
1.2.3 Отдушки для косметики	9
1.2.4 Лечебно-профилактические компоненты	10
1.3 Каротиноиды	13
1.3.1 Биологическая активность	13
1.3.2 Строение и классификация каротиноидов	17
1.3.3 Способы извлечения	20
1.3.4 Качественное определение каротиноидов	22
1.3.4.1 Тонкослойная хроматография	22
1.3.4.2 Масс-спектрометрия	23
1.3.4.3 ЯМР-спектрометрия	24
1.3.5 Методы количественного определения каротиноидов	27
1.3.5.1 Методы УФ-спектрометрии	27
1.3.5.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография	27
1.4 Хлорофилл	28
1.4.1 Биологическая активность	30
1.4.2 Способы извлечения хлорофилла	32
1.4.3 Качественное определение хлорофиллов	33
1.4.3.1 Тонкослойная хроматография	33
1.4.3.2 Инфракрасная спектроскопия	33
1.4.4 Количественное определение хлорофилла	34
1.4.4.1 Методы УФ-спектрометрии	34
1.4.4.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография	35
2 Экспериментальная часть	36
2.1 Техника безопасности при работе в лаборатории органической химии	36
2.2 Количественное определение каротиноидов и хлорофилла в растительном сырье и мыле различного срока хранения	37

2.3 Качественное определение каротиноидов и хлорофилла в растительном сырье и мыле с добавлением этого сырья методом ТСХ	40
2.4 Определение строения молекул хлорофилла «а», хлорофилла «b» и феофитина методами колебательной и ЯМР-спектроскопии	43
3 Обсуждение результатов	45
Выводы	48
Приложения	49
Список использованной литературы	57

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время всё большую популярность приобретает натуральное мыло с различными добавками, в том числе и с растительными. Оно не только очищает кожу от загрязнений, но и помогает снять раздражение, освежить, тонизировать её и придать коже здоровый и ухоженный вид. Мыло с натуральными добавками отлично подойдёт для любого типа кожи, так как растительные добавки содержат биологически активные вещества, такие как флавоноиды, углеводы, каротиноиды, хлорофилл, органические кислоты и другие БАВ, которые благотворно влияют на кожу человека.

Например, каротиноиды, благодаря наличию сопряжённой полиеновой системы, обладают антиоксидантным действием, поглощая свободные радикалы и оберегая кожу от вредного воздействия. Добавление каротиноидов в рецептуры косметических средств способствует увеличению срока хранения продукции, предотвращая перекисное окисление масел, в состав которых входят полиненасыщенные жирные кислоты. Также каротиноиды, обладая провитаминной активностью, способствуют заживлению ран и царапин, восстановлению эпителия. Каротиноиды проявляют противовоспалительное и иммуностропное действие в очаге поражения, снимая воспаление. Введение хлорофилла в косметические средства обеспечивает бактерицидный, дезодорирующий эффект, способствует образованию и регенерации соединительных тканей, что помогает в заживлении ран, эрозий, язв. Также хлорофилл предотвращает появление гнойничков и сыпи. Такое действие связано с тем, что хлорофилл имеет структуру, сходную со строением гемоглобина, участвующего в кроветворении живых организмов. При этом повышается уровень кислорода, происходит ускорение азотистого обмена в организме.

Добавление растительных компонентов в мыло имеет ряд преимуществ перед синтетическими добавками: биодоступность, малая вероятность побочных эффектов, низкая токсичность. Но зная полезное действие растительных добавок, нельзя говорить о том, что лечебные свойства полностью переносятся из растительной добавки в мыло с добавлением этого сырья. В процессе производства и при дальнейшем хранении мыла биологически активные вещества могут терять некоторые свои лечебные свойства. Например, остаточная щелочность в мыле, воздействие температуры, света, атмосферный воздух способствуют более быстрой деструкции биологических активных веществ, что может повлиять на эффективность действия растительной добавки на кожу. Для определения срока действия биологически активных веществ, перешедших из растительного сырья в мыло, целесообразно проводить экспертизу свежесобранного лекарственного сырья, свежеприготовленного мыла и мыла различного срока хранения.

В данной работе было проведено исследование образцов натурального мыла марки «BAZITEL» со следующими растительными добавками: кипрей, крапива, клевер, хвоя пихты, манжетка, зеленый чай, плоды шиповника. Были взяты образцы свежеприготовленного мыла, мыла, хранящегося 7 и 10 месяцев.

Целью данной работы является оценка полноты перехода каротиноидов и хлорофилла из растительного сырья в мыло с добавлением этого сырья.

В работе поставлены следующие задачи:

- исследование качественного и количественного содержания каротиноидов и хлорофилла в растительном сырье и в мыле с добавлением этого сырья;
- определение сроков хранения мыла по наличию каротиноидов и хлорофилла.

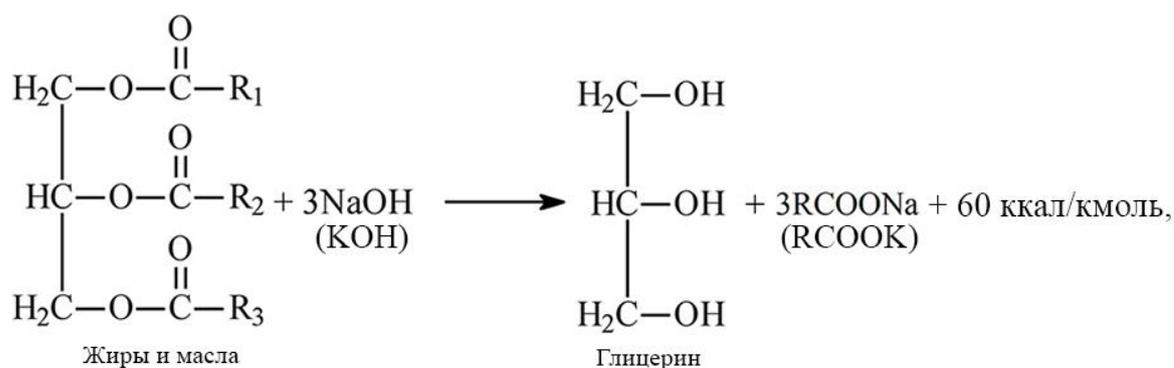
## 1 Литературный обзор

### 1.1 Химические реакции, лежащие в основе получения натурального мыла

Современные технологии производства мыл основаны на физико-химических знаниях о них как поверхностно-активных веществах (ПАВ). Мыло состоит из смеси солей высших насыщенных и ненасыщенных карбоновых кислот C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>. Натриевые соли относят к твёрдым сортам мыла, а калиевые – к жидким (медицинским). В настоящее время сырьём для получения мыла являются нейтральные жиры, растительные масла, смеси жирных кислот, метиловых эфиров жирных кислот, продукты переработки нефти [1,2].

В основе получения натурального мыла лежит химическая реакция омыления едкими щелочами натрия и калия нейтральных жиров и растительных масел. Большинство жиров и растительных масел являются триглицеридами жирных кислот, поэтому щелочной гидролиз протекает с образованием мыла и глицерина. Реакция омыления происходит по стадиям: сначала отщепляется одна молекула кислоты, затем вторая и третья, при этом образуется одна молекула глицерина. В результате отщепления молекулы жирных кислот взаимодействуют со щелочью, образуя соли (мыла). Омыление – экзотермический процесс, сопровождающийся выделением теплоты в 60 ккал.

Суммарная реакция омыления описывается следующим уравнением:



где R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> - углеводородные цепи от C<sub>10</sub> до C<sub>20</sub>

### 1.2 Полезные добавки к мылу

Для улучшения свойств и товарного вида продукта к моющим средствам добавляют вспомогательные ингредиенты различного происхождения и химического состава. Например, консерванты, эмульгаторы, гелеобразующие агенты, отдушки, антиоксиданты, БАВ и др.

### 1.2.1 Консерванты

При длительном хранении возникает порча мыла, вызванная химическими процессами окисления его кислородом воздуха, обезвоживанием и действием микробов [3]. Вредные микроорганизмы могут не только привести к заражению продукта, но и нанести вред здоровью потребителя. Консерванты являются биоцидами, т.е. проявляют антимикробное действие, уничтожая микроорганизмы и подавляя развитие патогенной микрофлоры. Также они препятствуют окислению кислородом воздуха, продлевая срок хранения косметических средств. Косметические продукты должны содержать такие концентрации консервантов, чтобы обеспечить сохранность свойств продукта, но при этом не вызвать аллергических реакций и раздражения на коже потребителя. В качестве консервантов могут выступать различные классы органических соединений:

- Кислоты и их соли (бензойная, 4-гидроксibenзойная, пропионовая, салициловая, сорбиновая, муравьиная)
- Спирты (бензиловый, 2-хлорбутанол, этанол)
- Фенолы (бифенил-2-ол, триклозан, 4-изо-пропил-м-крезол)
- Альдегиды (формальдегид, параформальдегид)
- Сложные эфиры (парабены)
- Галогенсодержащие вещества (бронопол, хлогексидин, 2-хлорацетамид) и др.

### 1.2.2 Гелеобразующие агенты

Если моющее средство имеет недостаточную вязкость, применяют различные загустители, образующие в молекулярно связанной жидкой среде пространственную структуру диспергированного вещества посредством молекулярных или водородных связей. К классическим гелеобразователям, изменяющим текучесть в водных средах, относят полимеры, в структуру которых входят полярные функциональные группы. Природными полимерами являются пектин, альгин, желатин, ксантан, каррагинан, гуммиарабик, водорастворимые эфиры целлюлозы. К синтетическим полимерам относятся: карбомер, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон.

### 1.2.3 Отдушки для косметики

Для придания аромата косметическим средствам используют натуральные (эфирные масла) и синтетические душистые вещества. Наиболее используемыми в промышленности являются синтетические отдушки, обладающие низкой стоимостью и высокой доступностью сырьевой базы (эфирные масла ромашки, мяты лимона, ванилина).

Помимо стойкого приятного запаха отдушка должна быть устойчива к воздействию света и воздуха и не должна химически взаимодействовать с другими компонентами моющего средства. Считается, что для мыла хорошего качества достаточно до 3% содержания отдушек. Добавление большего их количества в косметические продукты приводит к снижению моющего эффекта, т.к. отдушки начинают вести себя подобно жировым «загрязнителям», на эмульгирование которых расходуется часть мыла [4].

#### 1.2.4 Лечебно-профилактические компоненты

Добавление БАВ в косметические средства расширило спектр и направление их производства, т.к. БАВ управляют многими химическими реакциями, протекающими в организме и тканях. БАВ выделяют в основном экстракцией из сырья растительного происхождения. К таким БАВ относят витамины, микроэлементы, ферменты, флавоноиды, фитогормоны, которые значительно улучшают внешний вид и общее состояние кожи, а также оказывают благотворное влияние на организм в целом. Содержание БАВ в экстрактах некоторых растений и их фармакологические свойства приведены в таблице 1.

Таблица 1 - БАВ и фармакологические свойства некоторых растительных добавок

№	Растительная добавка	Биологическая активность растительной добавки	Фармакологические свойства
1	Кипрей	Каротиноиды (5,2-14,8 мг%): $\alpha$ -, $\beta$ -каротин, ликопин, лютеин, зеаксантин, виолаксантин, неоксантин, криптоксантин; Хлорофиллы (цветки – 25,7 мг%, листья – до 165,2 мг%); дубильные вещества 0,1%; витамин С (до 660 мг%); Флавоноиды (листья – 43,52 мг/г, цветки – 82,58 мг/г, стебли – 10,74 мг/г); Таннины (листья – 203,86 мг/г, цветки – 135,97 мг/г, стебли – 64,02 мг/г); Антоцианы (листья – 229,84 мкг/г, цветки – 2073,21 мкг/г, стебли – 147,73 мкг/г); общие липиды - 8,37%.	В народной медицине применяется как ранозаживляющее, противовоспалительное, антиоксидантное и общеукрепляющее средство. Нормализует обменные процессы, оказывает седативное и болеутоляющее действие.

Продолжение таблицы 1

№	Растительная добавка	Биологическая активность растительной добавки	Фармакологические свойства
2	Манжетка	Каротиноиды (8,37 мг%): лютеин, виолаксантин; Хлорофиллы а и b; Витамины К (0,17 мг%), С (0,33 мг%); Дубильные вещества (7,2 – 11,3%); Флавоноиды (2,21-5,2%); Кумарины (0,11%); углеводы (22,67%).	В традиционной медицине используют в качестве антисептического, ранозаживляющего, противовоспалительного, вяжущего средства.
3	Крапива	Каротиноиды (до 40 мг%): β-каротин, ксантофилл, ксантофилл-эпоксид, виолаксантин; Хлорофиллы (16-32 мг%); Витамины К1 (218,63 мг%), Р (24,50 мг%), С (до 600 мг%); Дубильные вещества (3,22%); Флавоноиды (1,55%); Органические кислоты (8,30%); Аминокислоты (1,83%); Пектиновые вещества (16,69%).	Применяется как общеукрепляющее, кровоостанавливающее, ранозаживляющее, антисептическое средство. Способствует восстановлению пораженных тканей эпителия.
4	Плоды шиповника	Каротиноиды (17,51-34,53 мг%): α-каротин, β-каротин, ζ-каротин, рубиксантин, фитофлуен, β-криптоксантин, тараксантин, ликопин; Хлорофиллы (5,20-7,80 мг%); Антоцианы (877-1370 мг%); Витамины С (1007,63-1901,47 мг%), Р (0,73-0,90 мг%), В1 (1,40-2,00 мг%), К (0,09-1,23 мг%), Е (48,8 мг/кг); Флавоноиды (3,28-4,20 мг%); Флавонолы (62-76 мг%); Дубильные вещества (5,71-9,1%); Катехины (740-857 мг%).	Усиливает регенерацию тканей, используется как общеукрепляющее, противовоспалительное средство, восполняет дефицит витаминов в организме.

Продолжение таблицы 1

№	Растительная добавка	Биологическая активность растительной добавки	Фармакологические свойства
5	Хвоя пихты	Каротиноиды (14-46 мг%): $\beta$ -каротин, неоксантин, виолаксантин, лютеин, зеаксантин, родоксантин; Хлорофиллы (до 111,5 мг%); Эфирное масло (до 4,75%); Дубильные вещества (10-13%); Кислородосодержащие производные терпенов (20,84%); Витамин E (23,6-25,3 мг%);	Способствует восстановлению тканей, обладает ранозаживляющим, антисептическим и противовоспалительным действием.
6	Клевер	Каротиноиды (4,07 мг%): $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -каротин, лютеин, зеаксантин; Хлорофиллы (22,9-37,4 мг%); Сапонины до 10%; углеводы, азотсодержащие соединения, стероиды, липиды, кислоты, цианогенные гликозиды, витамины, флавоноиды: изофлавоны 0,43 %; флавонолы 1,42%; флавоны 2,92%;	Обладает кровоостанавливающим, противовоспалительным, ранозаживляющим и болеутоляющим действием.
7	Зелёный чай	Каротиноиды: $\beta$ -каротин, лютеин, зеаксантин, ксантофилл; Хлорофиллы (60-200,4 мг%); Кофеин до 4%; Таннин (до 20 мг%); Эфирные масла 0,02%; Флавонолы (до 6%); Белковые вещества (16-25%); Органические кислоты (1,5%); Катехины (80-170 мг%); Свободные аминокислоты (1-1,5%).	Обладает тонизирующим эффектом, проявляет антиоксидантную защиту против действия свободных радикалов

Окончание таблицы 1

№	Растительная добавка	Биологическая активность растительной добавки	Фармакологические свойства
8	Календула	Каротиноиды (до 91 мг%): $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -каротин, лютеин, ликопин, зеаксантин, рубиксантин, флавоксантин, $\beta$ -криптоксантин, виолаксантин; Хлорофиллы (12,80 мг%); Флавоноиды (1,76 мг%); Дубильные вещества (4,19%); Витамин С (242 мг%); Эфирное масло (0,015%).	Заживляет раны, связывает свободные радикалы, обладает бактерицидным и противомикробным действием, оказывает иммуномодулирующее, общеукрепляющее действие.
9	Ромашка	Хлорофиллы (17,00 мг%); Флавоноиды (1,96 мг%); Витамин С (17,30 мг%); Эфирное масло (0,60%).	Оказывает противовоспалительное, антисептическое действие, стимулирует процессы регенерации тканей, снимает раздражение, ослабляет аллергические реакции.
10	Чистотел	Эфирное масло (0,01%); Витамин С (до 170 мг%); Алкалоиды (до 1,8%); Хелидоновая, яблочная, лимонная и янтарные кислоты; флавоноиды, сапонины.	Обладает противовоспалительным, антимикробным действием. Применяется для прижигания бородавок, воспалений кожи и лечения прыщей.

[5-19].

### 1.3 Каротиноиды

#### 1.3.1 Биологическая активность

Каротиноиды представляют собой группу природных пигментов, нерастворимых в воде и растворимых в органических растворителях. Они распространены главным образом в растительных организмах, наземных и морских, а также встречаются в организме животного и человека. Они продуцируются в основном фотосинтезирующими

организмами: растениями, водорослями, грибами, бактериями и цианобактериями. В организмах, не участвующих в фотосинтезе, каротиноиды накапливаются, поступая с питанием, при этом зачастую происходят определенные химические модификации. В растениях эти пигменты имеют окраску от жёлтого до красного цвета и аккумулируются в значительных количествах в плодах, цветках, корнях. В различных концентрациях они распределены по всем органам растения. В силу своей гидрофобности (липофильности) каротиноиды внутри клеток локализованы в мембранах, а также могут быть связаны со специфическими белками, которые тоже являются липофильными.

Главным структурным признаком каротиноидов считается полиеновая сопряжённая система. Для эффекта сопряжения характерно синхронное повышение ВЗМО и понижение НСМО, что приводит к увеличению числа  $\pi$ -компонент в сопряжённой системе (рис. 1). Следовательно, каротиноиды могут легко отдавать и принимать электроны, т.е. обладают высокими электронодонорными и электроноакцепторными свойствами, а также малой энергией перехода в возбуждённое состояние (электрон легко переходит с ВЗМО на НСМО). Таким образом, каротиноиды легко окисляются и восстанавливаются, способны поглощать свет в ультрафиолетовой и видимой области, что обуславливает их окраску.

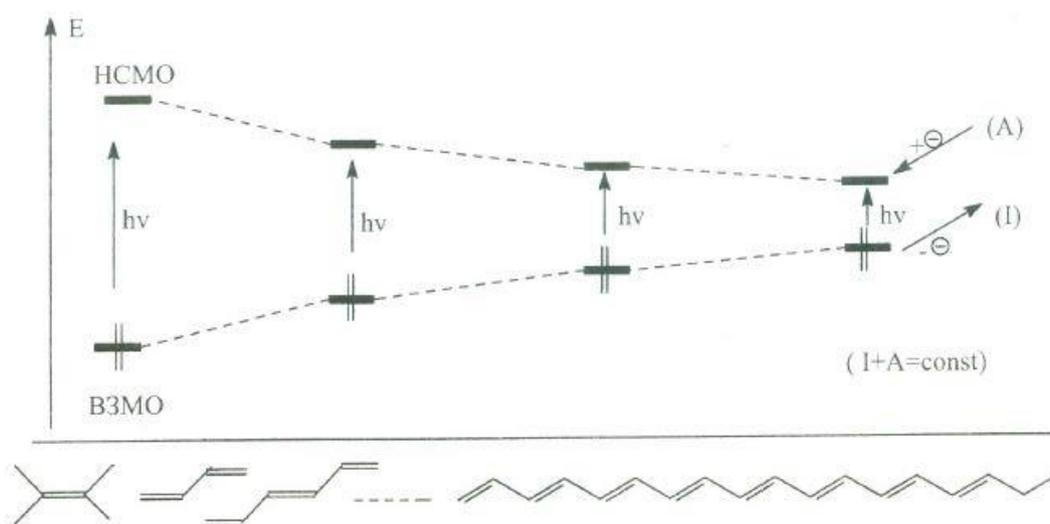


Рисунок 1 - Электронные переходы каротиноидов с ВЗМО на НСМО

Отсюда вытекают биологические свойства каротиноидов:

- 1) В процессах фотосинтеза каротиноиды принимают участие в переносе электронов и поглощении света.
- 2) Светозащитная функция связана со способностью каротиноидов поглощать свет без структурного изменения скелета. Каротиноиды поглощают избыток фотонов, что уменьшает вероятность образования свободных радикалов [20].

### 3) Антиоксидантная функция

Каротиноиды нейтрализуют пероксил-радикалы и подавляют синглетный кислород через образование нестабильного радикального аддукта. Далее аддукт связывается с другой молекулой каротиноида, образуется нереакционноспособное соединение и новый радикал, способный улавливать синглетный кислород. Каротиноиды частично или полностью защищают клетки от окислительного повреждения мембранных липидов (например, от образования опухолевых клеток печени человека НерG2) [21].

### 4) Противоканцерогенное действие

Свободные радикалы приводят к образованию рака. Недавние исследования на животных показали, что  $\beta$ -каротин может задержать или предотвратить образование злокачественных опухолей различной локализации (саркома, рак кожи, пищевода, молочных желез, печени) у мышей, которым были введены канцерогенные вещества. При этом не только происходит ингибирование роста раковых клеток, но также увеличивается общая продолжительность жизни животных на 24-42%. У людей, больных лейкозом, при приёме добавок, содержащих большие концентрации  $\beta$ -каротина, происходило разрушение раковых клеток за счёт вмешательства в метаболизм синтеза ДНК и РНК.

Антиканцерогенным действием обладают также и другие каротиноиды (ликопин, кантаксантин, фукоксантин и др.). Зеаксантин подавляет разрастание нейробластомных клеток, не затрагивая при этом активность монооксигеназы, принимающей участие в защите здоровых клеток. Наиболее полно было изучено влияние каротиноидов на рак лёгких. При введении  $\beta$ -криптоксантина лабораторным мышам, получающим дозу канцерогена 4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанола, выделенного из табака, происходило снижение раковых клеток на 50-60%.

Точных данных о механизме противоракового действия каротиноидов нет, но предполагается, что каротиноиды встраиваются в мембраны опухолевых клеток, фиксируя при этом их подвижность, уменьшая текучесть и увеличивая вязкость, благодаря чему мембраны становятся хрупкими, и происходит ингибирование разрастания клеток.

Таким образом, употребление в пищу фруктов и овощей, богатых каротиноидами, поможет в профилактике появления раковых опухолей.

### 5) Витаминная активность

$\beta$ -каротин,  $\alpha$ -каротин и  $\beta$ -криптоксантин являются провитамином, который в организме расщепляется с образованием витамина А.  $\beta$ -каротин – наиболее распространённая форма витамина А в овощах и фруктах, он также используется как

эффективный источник витамина А в пищевых добавках.  $\alpha$ -каротин и  $\beta$ -криптоксантин не распространены в пищевых продуктах.

Конверсия  $\beta$ -каротина в витамин А происходит в тонком слое кишечника, печени, жировой ткани и крови. Распадаясь,  $\beta$ -каротин образует две молекулы ретинола. Другими словами, 2 мг  $\beta$ -каротина эквивалентно 1 мг витамина А. Однако, было показано, что увеличение потребления  $\beta$ -каротина не приводит к образованию избыточного количества витамина А. Регулирующие механизмы ограничивают производство витамина А из каротиноидов.  $\beta$ -каротин, не преобразованный в витамин А, поглощается лимфатическими сосудами как в виде неповреждённой молекулы, так и в виде других продуктов невитаминного расщепления [22].

#### б) Влияние каротиноидов на кожу

Человеческая кожа, как орган, граничащий между телом и средой, находится под постоянным воздействием свободных радикалов как с внешней стороны, так и внутри организма. Свободные радикалы – очень реакционноспособные молекулы, сформированные в результате метаболических процессов. Они играют важную сигнальную функцию в человеческом организме, а также действуют против вирусов и бактерий.

Кроме того, существует множество внешних факторов, приводящих к формированию свободных радикалов, в особенности активных кислородных разновидностей. Последние результаты исследований показали, что не только солнечная ультрафиолетовая радиация приводит к образованию агрессивных форм кислорода в коже человека, но и видимый и инфракрасный диапазон спектров, а также различного рода загрязнители. Если концентрация свободных радикалов в ткани превышает критическое значение, то компоненты клеток разрушаются. Такое воздействие не только приводит к повреждению ткани, но и может спровоцировать рак. Благодаря антиокислительной защитной системе, человеческий организм выработал сложный механизм защиты от неблагоприятных эффектов этих реактивных радикалов.

В коже содержатся такие антиоксиданты как витамины, каротиноиды и множество ферментов. Большинство этих веществ не может вырабатываться организмом, поэтому они поступают с пищей, овощами и фруктами, богатыми витаминами и каротиноидами. Существует два основных способа накопления каротиноидов в эпидермисе:

а) диффузия из жировой ткани, крови и лимфотокков

б) секреция через потовые и/или сальные железы с последующим проникновением в кожу

В коже содержатся  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -каротин, ликопин, лютеин, зеаксантин и их изомеры. Они известны как мощные гасители синглетного кислорода и других свободных радикалов в биологических системах. Каротиноиды могут служить веществами-маркерами для всей антиокислительной системы кожи. Это связано с тем, что антиоксиданты формируют защитные цепи в коже, действуя синергически, чтобы защитить друг друга от деструктивного действия свободных радикалов и в особенности активной формы кислорода. Если какое-либо из веществ в этой цепочке будет обнаружено, информация о других компонентах антиоксидантной защитной системы предоставляется автоматически. Тем не менее, следует принять во внимание, что кинетика каждого индивидуального компонента антиоксидантов может отличаться в процессе накопления и деградации.

Обладая А-витаминной активностью, каротиноиды активируют ретиновые рецепторы, способствуя заживлению ран и царапин, восстановлению эпителия. Каротиноиды проявляют противовоспалительное и иммуностропное действие в очаге поражения, снимая воспаление [23].

Методом Рамановской спектроскопии было обнаружено, что каротиноиды, находящиеся в коже, характеризуются тремя заметными линиями Стокса в области  $1005\text{ см}^{-1}$  (колебательное движение метильной группы),  $1156\text{ см}^{-1}$  (валентное колебание одинарной связи углерод-углерод),  $1523\text{ см}^{-1}$  (валентное колебание двойной связи углерод-углерод). Именно, связи  $\text{C}=\text{C}$  ответственны за действие каротиноидов как антиоксидантов [24].

### 1.3.2 Строение и классификация каротиноидов

Каротиноиды относятся к классу тетратерпеноидов (изопреноидов), строение углеродного скелета которых ( $\text{C}_{40}$ ) варьируется в незначительной степени. Основным структурным химическим признаком каротиноидов является полиеновая сопряженная система, состоящая из семи-пятнадцати олефиновых связей, т.е. это мощные делокализованные  $\pi$ -цепи. Большое количество сопряженных двойных связей образуют хромофорные группы, обуславливающие окраску пигментов.

Другим важным химическим признаком каротиноидов можно назвать селективность последующих биосинтетических превращений ключевых ациклических каротинов, фитина или ликопина, которые осуществляются на концевых изопренильных фрагментах – циклизация, гидроксילирование [20].

Классифицировать каротиноиды можно по наличию в структуре кислорода, а также по длине цепи:

1) Каротины – каротиноиды чисто углеводородной природы, не имеющие в составе кислород. В растениях они обычно окрашены в оранжевый цвет.

2) Ксантофиллы – оксигенированные каротиноиды с одной или более кислородных функций: гидрокси-, оксо-, эпокси-, карбоксипроизводные). Ксантофиллы в растениях имеют различную окраску от жёлтой до красной [25].

3) Деградированные или мини-каротиноиды содержат в своей структуре менее 40 атомов углерода, но имеют то же электронное строение, что и каротиноиды  $C_{40}$ , соответствуя им структурно и функционально. К деградированным терпеноидам также относят апокаротиноиды, т.е. каротиноиды, «потерявшие» только один или два изопреновых звена, и каротиноиды, от которых осталось только два-три изопреновых фрагмента. Образованию деградированных каротиноидов способствуют реакции окисления по двойной связи.

Внутри каждой из этих групп можно провести деление по наличию цикла в цепи:

1) Ациклические каротиноиды образуются при помощи реакций функционализации из ликопина или его более насыщенного предшественника – нейреспорина. Обычно они представлены в виде соответствующих им спиртов и кетоспиртов.

2) Циклогексановые каротины и ксантофиллы являются соединениями каротиноидной структуры с циклогексановыми фрагментами на концах цепи. Зачастую к кольцу присоединены кислородные функциональные группы (спиртовые, карбонильные, эпоксидные). Здесь могут происходить некоторые модификации углеродной цепи. Например, в сопряжённой системе фукоксантина и неоксантина появляется алленовый фрагмент.

Образование циклогексанового звена происходит путём циклизации концевой фрагмента цепи из ациклических каротиноидов по механизму, описанному рис. 1. При протонировании концевой двойной связи ликопина образуется карбокатион при  $C^2$ , который атакует ближайшую  $C=C$  связь по правилу Марковникова. Далее происходит отщепление протона от интермедиата (рис. 2).

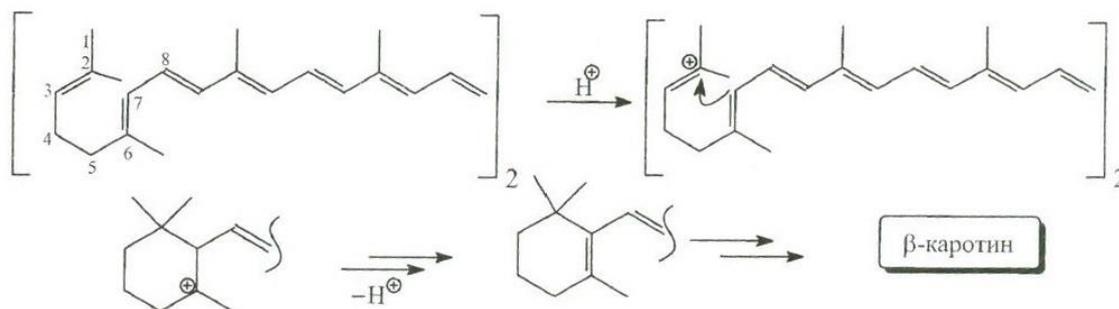


Рисунок 2 - Механизм образования циклогексановых каротинов и ксантофиллов

Согласно квантово-химическим расчётам, пространственное строение молекулы ликопина в конформации, когда олефиновые фрагменты  $C^6=C^7$  и  $C^8=C^9$  представлены цис-структурой, имеет минимум энергии, что благоприятствует образованию шестичленного углеродного цикла.

Дальнейшие функционализации, ведущие от каротинов к ксантофиллам, происходят при помощи ферментов, обладающих окислительными свойствами, - гидроксимирующими, эпоксилирующими, дегидрирующими. Происходят они в основном тоже на концевых участках молекул этих терпеноидов.

3) Циклопентановые каротиноиды отличаются наличием циклопентанового кольца, сопряжённого с основной цепью. Могут быть образованы двумя основными путями:

а) Окисление циклогексеновых участков  $C_{40}$ -цепи нормальных каротиноидов с последующими перегруппировками. В результате деградации образуется укороченная цепь состава  $C_{38}$ , имеющая кислородные функциональные группы, т.е. относящаяся к ксантофиллам.

Циклопентановые  $C_{38}$ -каротиноиды формируются из астаксантина в результате окисления циклогексенового участка через промежуточные стадии образования трикетона и  $\alpha$ -гидроксикарбонильного интермедиата, который декарбоксилирует с потерей углерода на каждом циклогексеновом фрагменте цепи (рис. 3 а).

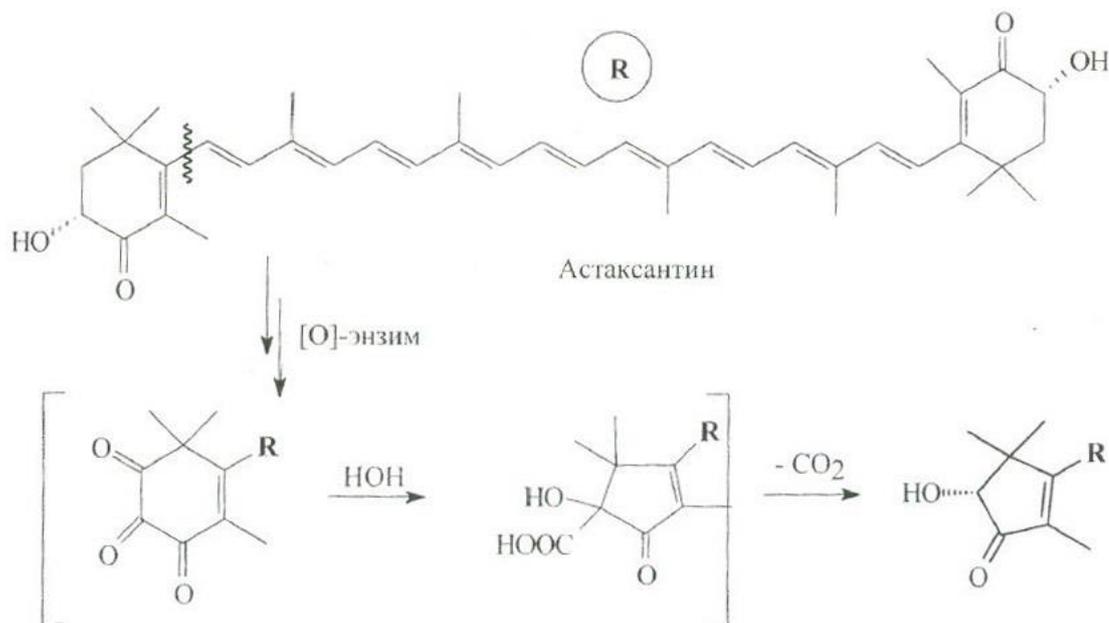


Рисунок 3 а - Механизм образования циклопентановых структур из астаксантина

б) Перегруппировка циклогексенового участка без потери углерода, т.е. с сохранением состава цепи  $C_{40}$ . Двойная связь в циклогексеновом кольце эпоксируется, затем протоны катализируют процесс раскрытия оксиранового цикла с образованием карбокатиона. Происходит  $\sigma$ - $p^+$ , сопровождающийся сужением цикла (рис. 3 б) [20].

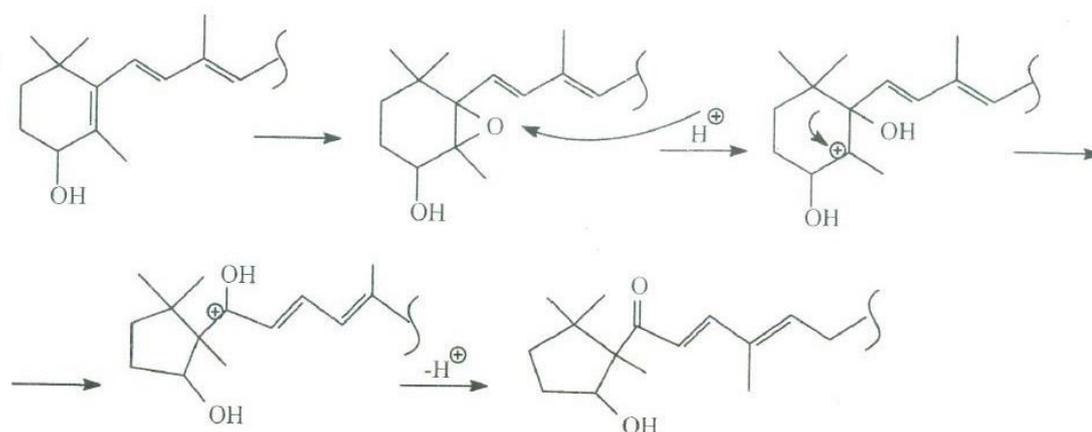


Рисунок 3 б - Механизм образования циклопентановых каротиноидов через перегруппировку циклогексанового фрагмента в циклопентановый без изменения углеродного состава

### 1.3.3 Способы извлечения

Чтобы минимизировать окислительную или ферментативную деструкцию каротиноидов, для их извлечения используют свежее высушенное растительное сырьё. Листья предварительно измельчают с помощью ступки и пестика, в то время как другие ткани растения могут быть механически разрушены только с помощью электрического блендера. Добавление небольшого количества твёрдого  $\text{CO}_2$  помогает свести к минимуму воздействие кислорода. Для извлечения каротиноидов используют растворители или смеси растворителей, в которых они хорошо растворимы (гексан, ацетон, гексан-ацетон (1:1), этанол, хлороформ, петролейный эфир и др.).

Незначительная кислотность многих растительных тканей может вызвать изомеризацию эпоксидных групп (например, у виолаксантина и неоксантина) с образованием фураноидных форм и других производных, что делает количественную оценку анализа пигментов особенно затруднительной. Процесс изомеризации можно предотвратить путём добавления небольшого количества  $\text{NaHCO}_3$  во время проведения экстракции.

После фильтрации измельчённое сырьё повторно экстрагируют до тех пор, пока новая порция экстракта не станет прозрачной (как правило, 2-3 раза).

Для полной изоляции каротиноидов зачастую проводят омыление. Это необходимо для удаления хлорофиллов, которые могут маскировать присутствие каротиноидов, или для удаления больших количеств нейтральных липидов, которые мешают в хроматографическом анализе. При этом омыление не оказывает вредного действия на каротиноиды. Небольшие потери каротиноидов неизбежны во время омыления, но их можно снизить до минимума, удалив весь кислород из сосуда с реагентом.

Перед омылением необходимо удалить все следы ацетона, чтобы избежать получения побочных продуктов за счёт полимеризации ацетона или при альдольно-кетоновой конденсации между апокаротиноидами и ацетоном. Омыление экстрактов проводят 6% этанольным раствором КОН при комнатной температуре в темноте в атмосфере N<sub>2</sub>. Для полного разрушения хлорофиллов достаточно 1-2 ч, но можно оставить раствор омыляться на более длительное время (например, в течение ночи) без вреда для каротиноидов. Затем экстракт переносят в делительную воронку, добавляют равный объём воды и диэтилового эфира, аккуратно встряхивают. Происходит образование двух фаз – органический и водный слой. Каротиноиды остаются в органическом слое, а щёлочь переходит в водный раствор. Органическую фазу сливают, а водную повторно экстрагируют диэтиловым эфиром. Извлечения объединяют и промывают водой до устранения щелочной среды.

Эти экстракты затем испаряют и анализируют либо подвергают дальнейшему фракционированию каротиноидов на хроматографической колонке. Для этого колонку длиной 20 см и шириной 1 см заполняют активированной окисью алюминия. Общий экстракт каротиноидов растворяют в небольшом объёме бензина и пропускают через колонку. Происходит фракционирование ациклических каротинов, которые можно заметить визуально по появлению окраски элюата. Элюирование бензином продолжают до тех пор, пока элюат не станет бесцветным.

Затем колонку промывают 5%-ым диэтиловым эфиром (в бензине), элюируются каротиноиды, содержащие эпоксидные и сложноэфирные группы, которые не растворяются в чистом бензине. Дальнейшее фракционирование продолжают с использованием диэтилового эфира более высокой концентрации и другие растворители, представленные в таблице 2.

Таблица 2 - Растворители и группы элюируемых ими каротиноидов

Растворитель	Группы элюируемых каротиноидов
Бензин	Углеводородные каротины
5%-ый диэтиловый эфир (в бензине)	Каротиноиды, содержащие эпоксидные и сложноэфирные группы
10%-ый диэтиловый эфир (в бензине)	Эфиры ксантофиллов
20-30%-ый диэтиловый эфир (в бензине)	Монооксокаротиноиды, монометокси- и диметоксикаротиноиды
50-60%-ый диэтиловый эфир (в бензине)	Моногидрокси- и диоксокаротиноиды

## Продолжение таблицы 2

Диэтиловый эфир или 5%-ый этанол (в диэтиловом эфире)	Ди- и тригидроксикаротиноиды, эпоксиды ксантофиллов
20%-ый этанол (в диэтиловом эфире)	Тетрагидроксикаротиноиды и гликозиды каротиноидов

Во время хроматографии колонка должна быть защищена от попадания света, её необходимо обернуть алюминиевой фольгой, тканью или бумагой так, чтобы можно было легко открыть колонку для контроля процесса фракционирования [26].

### 1.3.4 Качественное определение каротиноидов

#### 1.3.4.1 Тонкослойная хроматография

Тонкослойная хроматография возникла в 1950-ые годы и вскоре стала универсальным и эффективным методом очистки и разделения, который применяется даже в лабораториях, имеющих хорошее оборудование для ВЭЖХ. ТСХ широко используется для очистки каротиноидов при спектроскопическом анализе, а также для частичной идентификации в сравнении с подлинными стандартами или литературными данными. Особое преимущество ТСХ в анализе каротиноидов состоит в том, что, кроме промежуточных биосинтетических продуктов – фитоена и фитофлуена, каротиноиды обладают цветом и могут быть визуально определены на пластинах ТСХ с большой чувствительностью. Фитоеен, фитофлуен и их производные определяются путём изучения хроматограммы в УФ-свете. Фитофлуен интенсивно флуоресцирует зеленовато-белым свечением. Слабую фиолетовую флуоресценцию фитоена не так легко заметить, поэтому зачастую для его обнаружения пластинку опрыскивают флуоресцентным красителем, таким как Родамин 6G. Т.к. помимо каротиноидов существуют и другие цветные пигменты, которые могут помешать идентификации (хлорофилл, флавоноиды), то пластинку сбрызгивают 10%-ым спиртовым раствором фосфорно-молибденовой кислоты, нагревают в течение десяти минут при температуре 60-80 °С. Детекцию каротиноидов проводят по наличию синих пятен на жёлтом фоне.

Силикагель – наиболее широко используемый адсорбент для определения каротиноидов методом ТСХ. Его чаще всего наносят тонким слоем на алюминиевую пластинку. Для анализа обычно используют пластинки размером 5 x 15 см. Разделение каротиноидов зависит от их полярности. Самые полярные компоненты наиболее хорошо

адсорбируются. Также в качестве адсорбента может использоваться смесь кизельгура и оксида магния, нанесённая на стеклянную подложку в соотношении 1:1 и др.

Наиболее эффективными элюентами для хроматографического разделения каротиноидов являются смеси гексана с ацетоном, бензина с ацетоном и/или толуолом [26, 27].

#### 1.3.4.2 Масс-спектропия

Метод масс-спектропии позволяет быстро и надёжно провести идентификацию каротиноидов в суммарных извлечениях без предварительного разделения. Для этого навеску (около 5 г) высушенного свежего сырья измельчают пестиком в ступке и обрабатывают гексаном в аппарате Сокслета в течение 8 часов. Полученный экстракт упаривают в ротационном испарителе до небольшого объёма, прибавляют тройной объём ацетонитрила, взбалтывают и наносят 1 мкл пробы на мишень, а сверху каплю  $\alpha$ -цианокоричной кислоты, используемой в качестве матрицы. Обнаружение каротиноидов проводят в области 460-600 Да по наиболее интенсивным пикам с зарядом  $m/z$ .

Например, в плодах шиповника (рис. 4) наблюдаются наиболее интенсивные пики ионов с зарядом  $m/z = 536,515$ , что соответствует молекулярным массам изомерных форм каротинов ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), и с зарядом  $m/z = 568,219$ , которые относятся к молекулярным массам кислородсодержащих каротиноидов (лютеин, зеаксантин и др.) [28].

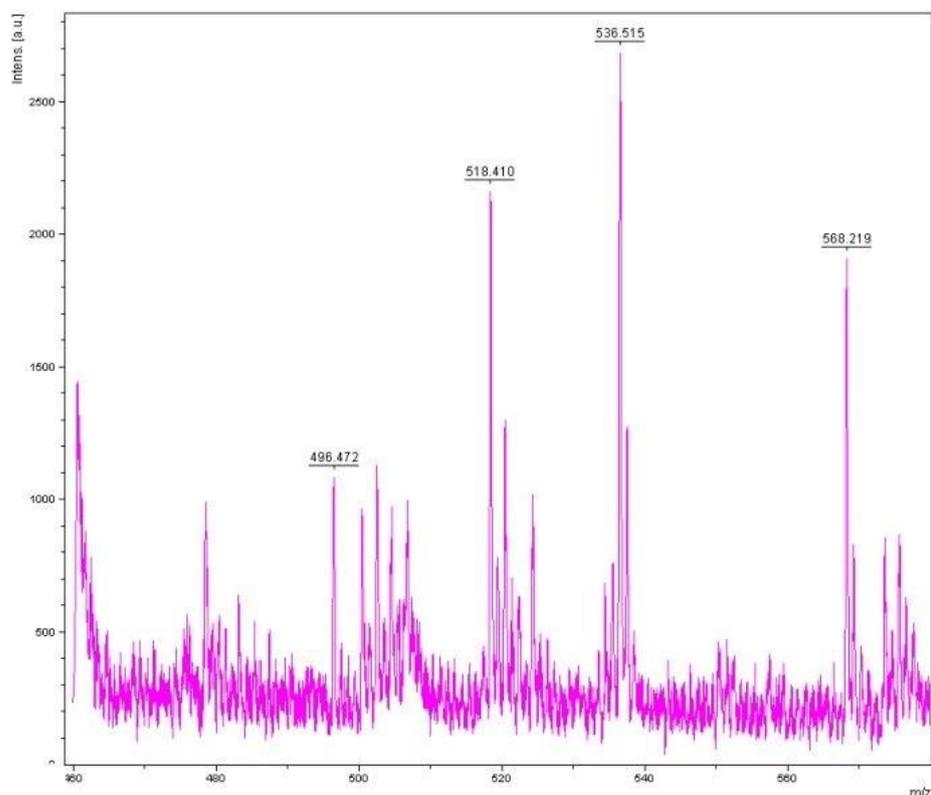


Рисунок 4 - Масс-спектр каротиноидов гексанового извлечения из плодов шиповника

### 1.3.4.3 ЯМР-спектроскопия

Метод ЯМР – один из самых информативных методов, позволяющий более полно описать структуру каротиноидов и определить строение концевых функциональных групп. Предварительно каротиноиды подвергают разделению методом ТСХ. Важно, чтобы образцы каротиноидов для ЯМР-анализа были тщательно очищены, т.к. существенные количества примесей, содержащихся в адсорбенте, могут оставаться в образце и мешать дальнейшему анализу. После разделения хроматографические пластины промывают полярным растворителем, по возможности эфиром, т.к. ацетон или этанол извлекают большее количество загрязнителей, поэтому, если требуются именно эти растворители, то их используют в минимальном количестве. Далее образцы каротиноидов фильтруют, пропуская через небольшую колонку, заполненную нейтральной окисью алюминия (3-4 см адсорбента в пипетке Пастера будет достаточным количеством). Активация оксида алюминия происходит путём добавления воды. Аналогичным образом можно использовать колонку с диоксидом кремния для каротиноидов, которые не стабильны на оксиде алюминия. Каротиноиды элюируют диэтиловым эфиром или смесью диэтилового эфира с бензином, которая является недостаточно полярной, чтобы удалить каротиноиды. Этот элюат отбрасывают, и затем каротиноид элюируют более полярным растворителем. Образец выпаривают и сушат в вакууме до полного удаления следов растворителя. Далее растворяют каротиноид в хлороформе или дейтерохлороформе (либо в любом другом растворителе, сигналы которого не накладываются на основные) и отправляют на анализ. По полученным сигналам соотносят пики к функциональным группам в соответствии с литературными данными.

Для получения хорошего спектра методом  $^1\text{H}$  ЯМР достаточно 100-200 мг образца, тогда как для спектра  $^{13}\text{C}$  ЯМР требуется 2-5 мг образца каротиноида.

Интерпретация спектров ЯМР каротиноидов является такой сложной и специализированной областью. Г. Бриттон приводит рассмотрение  $^1\text{H}$  ЯМР-спектра  $\beta$ -каротина (рис. 5) [26].

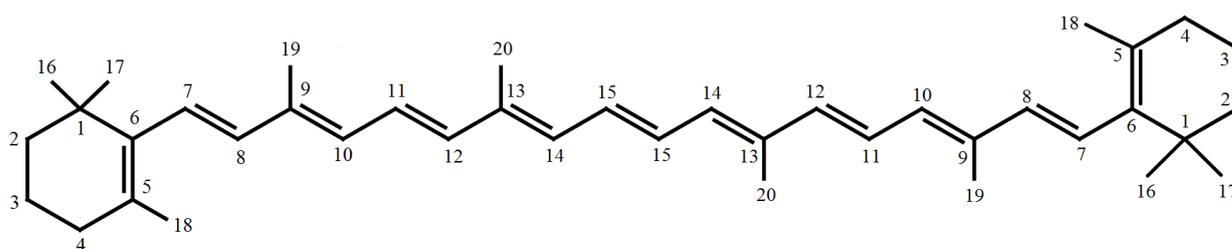


Рисунок 5 - Структура  $\beta$ -каротина

Олефиновая часть спектра (положения 7, 8, 10-12, 14, 15) хорошо проявляется в области 6,16 – 6,63 м. д. Концевые группы –CH<sub>3</sub> (положения 16-20) имеют химические сдвиги в интервале 1,03-1,98 м. д. Протоны циклогексенового кольца у насыщенного атома углерода (положение 2-4) проявляются при 1,46-2,02 м. д. Химические сдвиги от протонов насыщенного атомов углерода, стоящих рядом с двойной связью, находятся в более слабом поле. В таблице 3 представлены основные химические сдвиги протонов β-каротина в спектре <sup>1</sup>H ЯМР.

Таблица 3 – Значения химических сдвигов концевых групп молекулы β-каротина в спектре <sup>1</sup>H ЯМР (растворитель – CDCl<sub>3</sub>)

Положение протона	Значение химического сдвига, м. д.	Положение протона	Значение химического сдвига, м. д.
2	1,46	14	6,25
3	1,62	15	6,63
4	2,02	16	1,03
7	6,16	17	1,03
8	6,14	18	1,72
10	6,16	19	1,98
11	6,65	20	1,98
12	6,35		

Методом ЯМР изучено строение не только каротинов, но и кислородсодержащих ксантофиллов. В статье Э. Лафонтэн и др. [29] рассматривается анализ спектра <sup>1</sup>H ЯМР 3-метокси-β,β-каротин-4,4'-диона, структурная формула и строение которого представлены на рис. 6. Вещество растворено в метил-трет-бутиловом эфире. Спектр данного соединения представлен на рис. 7. Сигнал при 2,8 м. д. относится к сигналу от водорода, находящегося в положении 2'. Пик в области 3,8 м. д. относится к сигналу от метокси-группы –OCH<sub>3</sub>. В области 4,2 м. д. находится сигнал от протона, сильно раздвинутого метокси-группой. Химические сдвиги олефиновых фрагментов смещены в более слабое поле и обнаруживаются в области 6,5-7,5 м. д. Это обусловлено наличием большого количества сопряжённых кратных связей. Помимо основных сигналов имеются также сигналы от воды (1,95 м. д.) и сигналы от растворителя (3,5 м. д.).

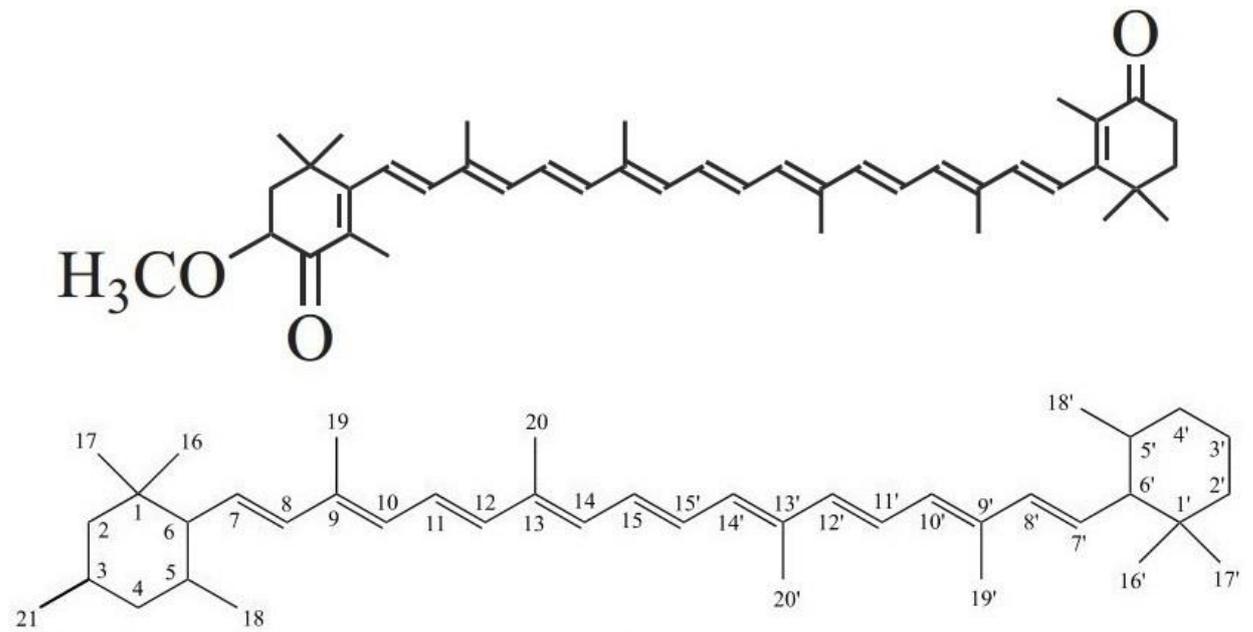


Рисунок 6 - Структура 3-метокси- $\beta,\beta$ -каротин-4,4'-диона

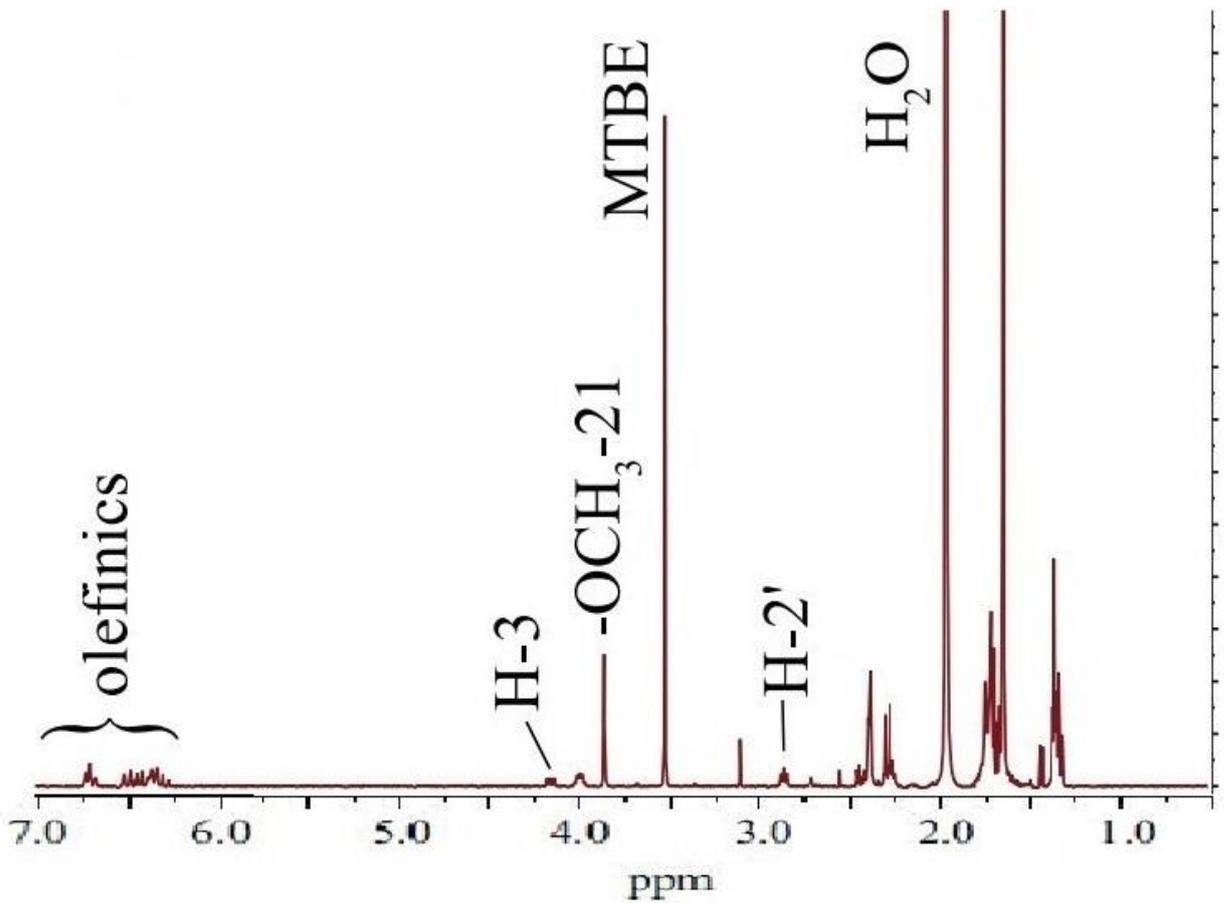


Рисунок 7 - Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР 3-метокси- $\beta,\beta$ -каротин-4,4'-диона

### 1.3.5 Количественное определение каротиноидов

#### 1.3.5.1 Методы УФ-спектрофотометрии

Для спектрофотометрического определения содержания каротиноидов в биомассе берут точную навеску свежесушенного растительного сырья (около 1 г) и измельчают пестиком в ступе. Затем проводят двойную исчерпывающую экстракцию органическим растворителем, хорошо растворяющим каротиноиды (гексан, хлороформ, ацетон, петролейный эфир, этанол). Полученные извлечения объединяют, берут аликвоту и доводят её до метки. Далее измеряют оптическую плотность экстракта на спектрофотометре при длине волны 450 нм, в качестве раствора сравнения используют растворитель. Количество каротиноидов в пересчёте на  $\beta$ -каротин в мг% (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100 \cdot 1000}{2773 \cdot V_3 \cdot m}, \text{ где } D - \text{оптическая плотность экстракта; } V_1 - \text{общий}$$

объём гексановых извлечений, мл;  $V_2$  – объём, до которого доведена аликвота, мл; 2773 – удельный показатель поглощения  $\beta$ -каротина при 450 нм;  $V_3$  – объём аликвоты, мл;  $m$  – навеска растительного сырья, г [30].

#### 1.3.5.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография

Метод ВЭЖХ используют для разделения и количественного определения каротиноидов. Экстракцию проводят системой растворителей гексан – ацетон (3:2) в присутствии антиоксиданта ионола, затем упаривают экстракт до 2 мл и растворяют в 2 мл хлороформа. Для того чтобы очистить экстракт от жирных кислот и хлорофилла, проводят предварительное омыление 30%-ым метанольным раствором КОН. Экстракт растворяют в 10 мл диэтилового эфира, вносят 1 мл 30%-го раствора КОН. Раствор оставляют омыляться на 12 ч в отсутствии света.

Затем экстракт вводят в колонку, на хроматограмме происходит разделение каротиноидов в виде пиков [17, 31]. Идентификацию каротиноидов проводят в диапазоне длин волн от 370 до 600 нм.

Для количественного определения содержания каротиноидов измеряют площадь хроматографического пика и по градуировочному графику рассчитывают концентрацию каротиноидов в смеси. Также можно провести качественную идентификацию каротиноидов, используя стандартные растворы. Сравнение проводится по времени удерживания хроматографического пика в исходной смеси и в стандартном растворе [32].

В статье П. К. Лаптинской и др. [17] приводится качественное содержание каротиноидов, найденных в цветках календулы, методом ВЭЖХ. Хроматограмма извлечения из цветков календулы приведена на рис. 8. Использование стандартных образцов показало, что сигнал с временем удерживания 7,3 мин принадлежит флавоксантину. Узкий сигнал с временем удерживания 8,5 мин относится к двум изомерным структурам – лютеину и зеаксантину. Сигнал от рубиксантина обнаруживается при времени удерживания 9,1 мин. Пик со временем удерживания 10,1 мин принадлежит ликопину. «Плечо» в области 11,4 мин является сигналом от  $\alpha$ -каротина.  $\beta$ -каротин обнаруживается в виде широкого сигнала с временем удерживания 12,5 мин. Помимо каротиноидов, обнаруженных с помощью стандартных образцов, в хроматограмме присутствует ряд не идентифицированных каротиноидов в области времени удерживания 5-7 мин, 8,5 мин, 9,5 мин, а также 10,7 мин.

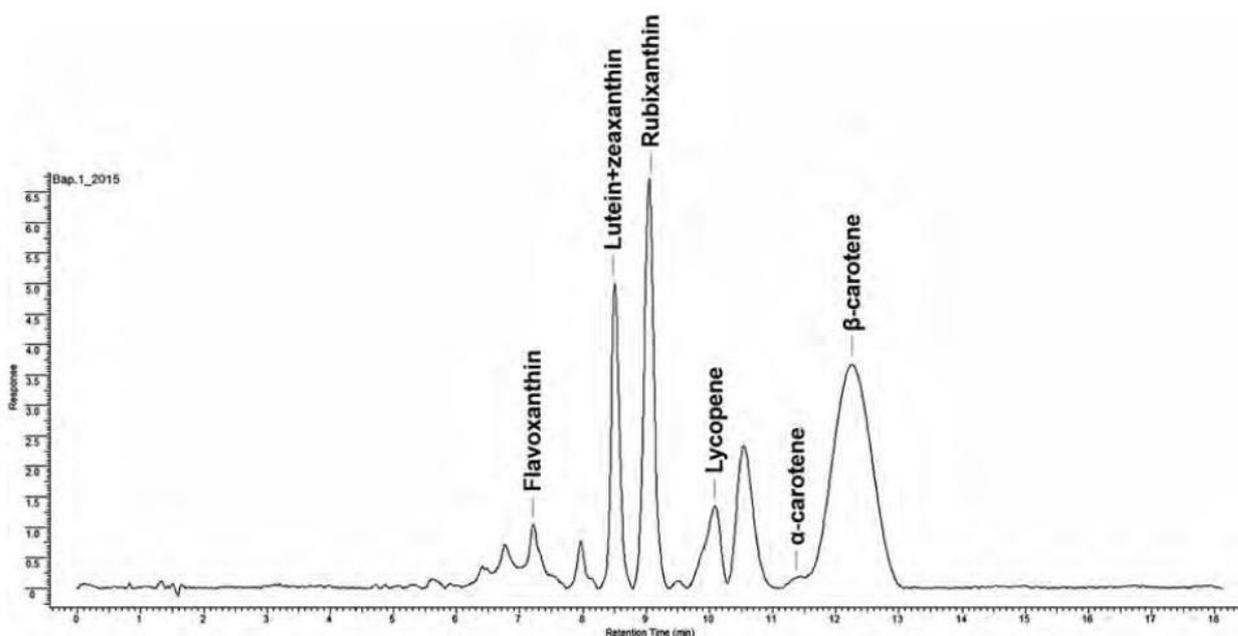


Рисунок 8 - Хроматограмма извлечения из цветков календулы

#### 1.4 Хлорофилл

Хлорофилл относится к классу порфиринов и является природным пигментом, ответственным за зелёную окраску растений. Хлорофилл представляет собой комплекс в виде четырех пиррольных колец, связанных с магнием.

В хлоропластах высших растений обнаружены два хлорофилла а и b, незначительно отличающиеся по строению бокового радикала. У хлорофилла а в боковом радикале находится метильная группа, а у хлорофилла b – альдегидная (рис. 9) [33]. В общем случае хлорофилл является сложным эфиром двухосновной кислоты и остатков метилового спирта  $-OCH_3$  и фитола  $-OC_{20}H_{39}$ , наличие которого придает хлорофиллу

липофильные (гидрофобные) свойства. Само порфириновое ядро обладает липофильными (гидрофильными) свойствами. Фитол является производным изопрена, конденсация которого приводит к образованию многих веществ растительного происхождения: каротиноидов, витаминов, терпенов, гуттаперчи.

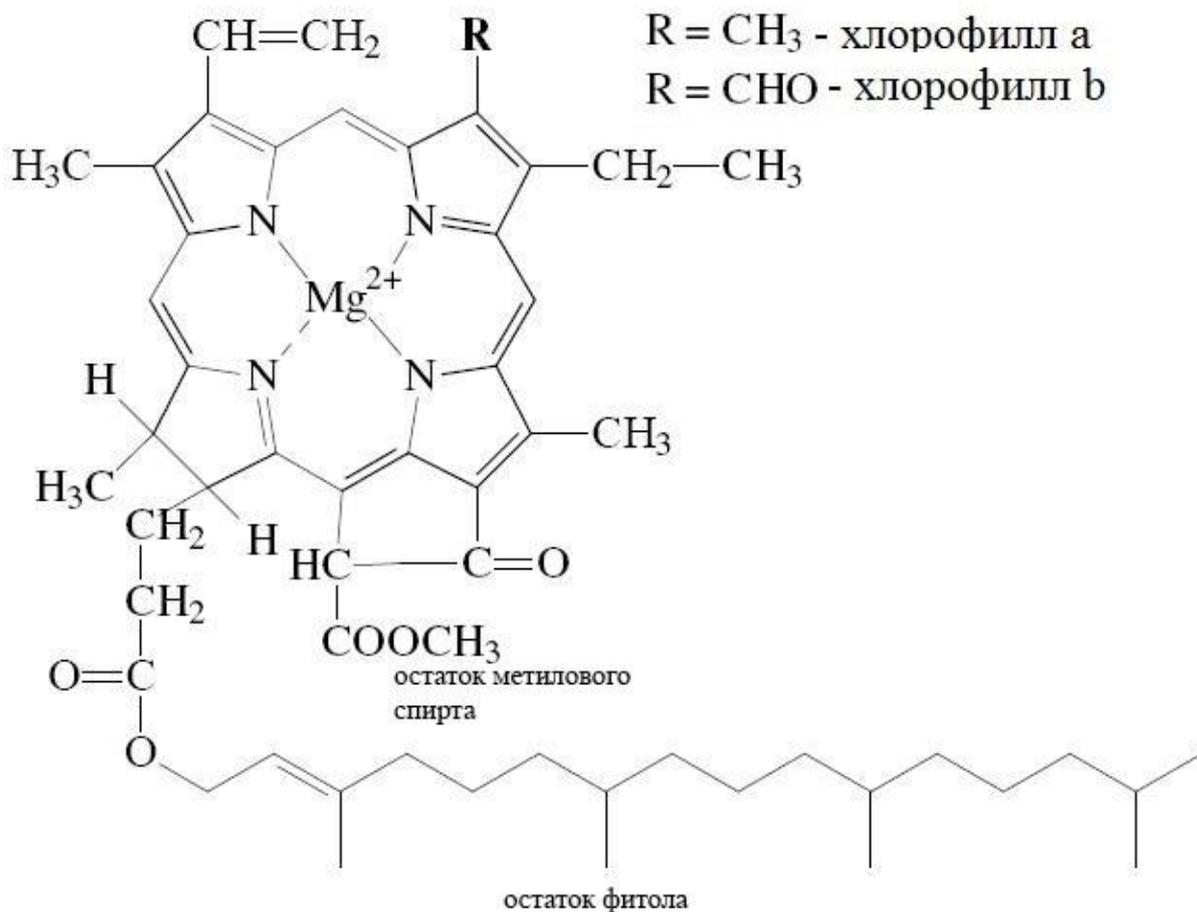
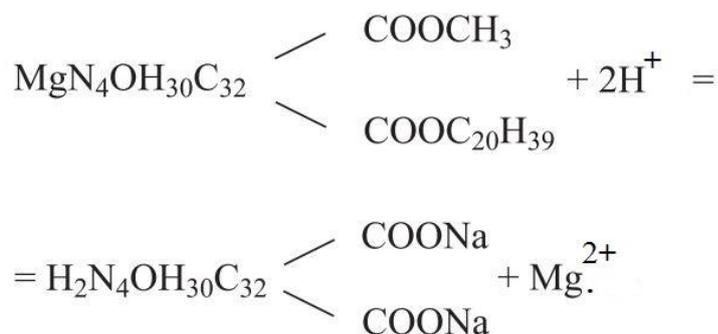


Рисунок 9 - Структурное строение хлорофиллов а и б

При взаимодействии органических кислот, находящихся в некотором количестве в растениях, и хлорофилла происходит замещение магния в порфириновом ядре на два водорода с образованием феофитина:



В зависимости от вида хлорофилла существуют феофитин а и феофитин b (рис. 10) [34].

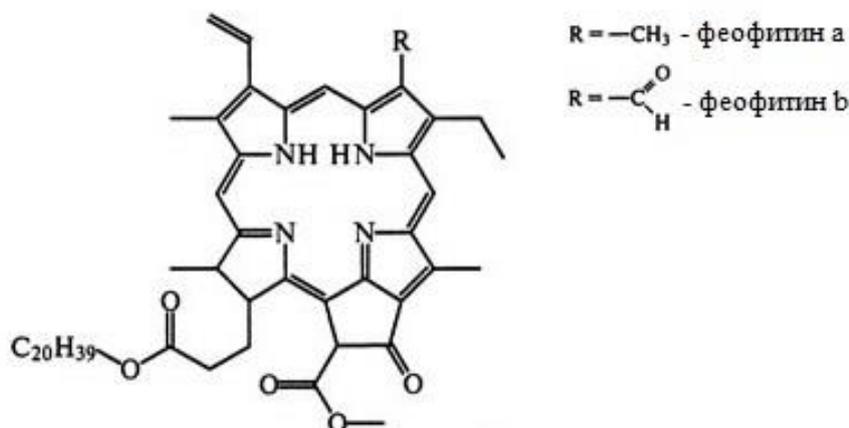


Рисунок 10 - Структурное строение феофитинов а и b

#### 1.4.1 Биологическая активность

Хлорофиллы представляют собой класс природных пигментов, нерастворимых в воде, но растворимых в органических растворителях, жирах и маслах. Они обнаружены у зелёных растений, водорослей и фотосинтезирующих бактерий. Установлено, что хлоропластах растений хлорофилл находится не в виде простого раствора, а связан с белками и липоидами добавочными валентностями магния. Об этом свидетельствуют данные из спектров поглощения простого раствора хлорофилла и экстракта живого листа, которые существенно различаются между собой [35].

Хлорофилл способен поглощать кванты энергии, что обуславливает его биологические свойства:

##### 1) Участие в процессах фотосинтеза растений

При поглощении энергии в красной области спектра хлорофилл переходит в синглетное возбуждённое состояние  $S_1^*$ , а при поглощении в синей области спектра – в более высокое возбужденное состояние электрона  $S_2^*$  (рис. 11). Время жизни синглетного возбужденного состояния  $10^{-13} - 10^{-9}$  с. Возвращение молекулы из возбужденного состояния в основное  $S_0$  может происходить тремя путями:

- а) флуоресценция
- б) переход в метастабильное триплетное состояние с последующей фосфоресценцией

в) фотохимическая реакция с отдачей или принятием электрона, т.е. в возбужденном состоянии хлорофилл может быть как донором, так и акцептором электронов [36].

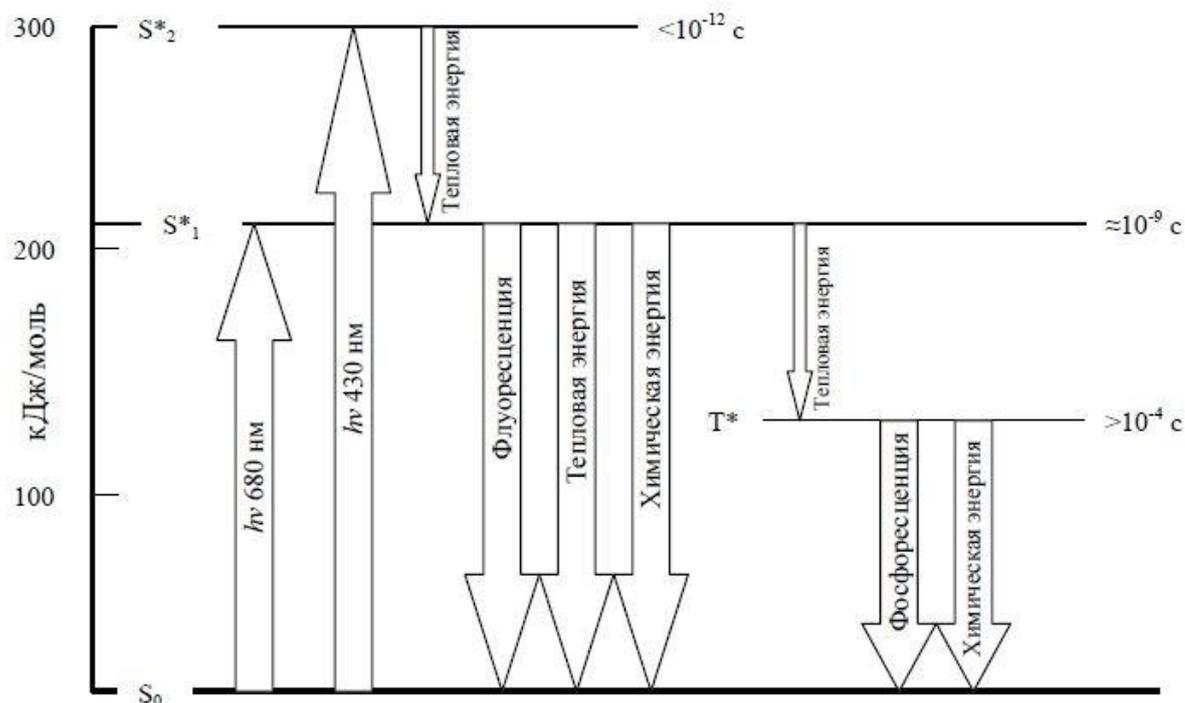
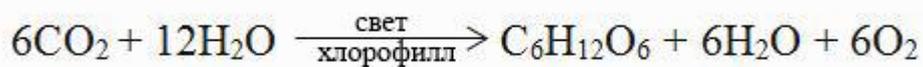


Рисунок 11 - Энергетическое состояние молекулы хлорофилла

Основная роль хлорофилла в природе – преобразование световой энергии, поступающей в растение с водой, в химическую, которая затрачивается на превращение воды и углекислого газа, поглощенного из воздуха, в гексозу и кислород.

Суммарное уравнение фотосинтеза имеет следующий вид:



Для образования 1 грамма молекулы гексозы требуется 686 ккал световой энергии [35].

2) Хлорофилл облегчает перенос зарядов при рекомбинации свободных радикалов, оказывая антиоксидантное действие. Также хлорофилл участвует в переносе БАВ на имеющуюся мишень или рецептор.

3) Благодаря сходству химического строения хлорофилла «а» и гема - небелковой части гемоглобина, содержащей железо (рис. 12), хлорофилл «а» применяют в медицине в качестве компонента, усиливающего процессы кроветворения, при этом стимулируется выработка антимикробных антител, повышается фагоцитарная и биоцидная активность лейкоцитов крови.

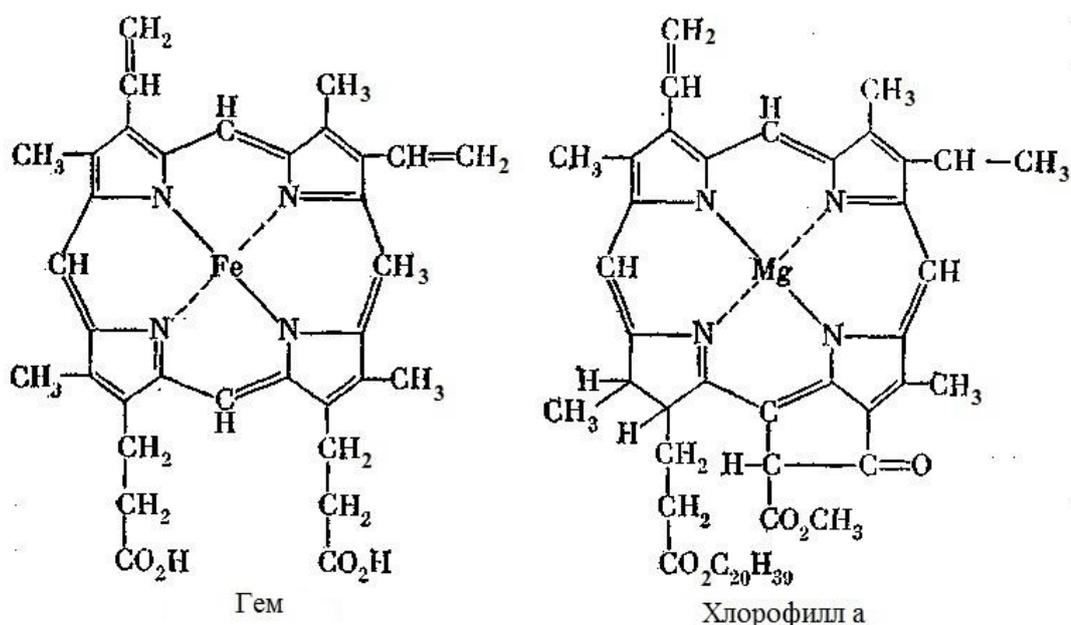


Рисунок 12 - Сходство химического строения гема и хлорофилла а

4) Хлорофилл обладает антимикробным действием, сравнимым с антибиотиками, применяется для лечения ран, ожогов, а также оказывает тонизирующее действие на организм, стимулирует работу сердца, дыхательного центра и нервно-мышечной системы [37, 38].

#### 1.4.2 Способы извлечения хлорофилла

Чтобы минимизировать окислительную или ферментативную деструкцию хлорофиллов, для их извлечения используют свежее высушенное растительное сырьё. Листья предварительно измельчают с помощью ступки и пестика с добавлением небольшого количества  $\text{CaCO}_3$ , чтобы нейтрализовать выделившийся клеточный сок. Для извлечения хлорофилла используют растворители или смеси растворителей, в которых они хорошо растворимы (гексан, ацетон, гексан-ацетон (1:1), этанол, метанол, хлороформ, петролейный эфир, сероуглерод и др.). После фильтрации измельчённое сырьё повторно экстрагируют до тех пор, пока новая порция экстракта не станет прозрачной (как правило, 2-3 раза) [39].

В полученном извлечении, помимо хлорофилла, присутствуют и другие пигменты – каротины и ксантофиллы. Для дальнейшего разделения проводят хроматографирование на колонке. В качестве адсорбента используют окись магния, тальк, углекислый кальций, сахарную пудру и др. Экстракт пропускают через вертикальную колонку, заполненную адсорбентом. Через некоторое время в различных слоях адсорбента появляются разноокрашенные зоны. В верхней части колонки появляются окрашенные в зелёный цвет

хлорофиллы, посередине – желтые ксантофиллы, внизу оказываются каротины, которые слабо удерживаются адсорбентом. Затем пигменты элюируют с помощью какого-либо другого органического растворителя.

Разделение хлорофиллов а и b на компоненты проводят в бензольном растворе на колонке, заполненной крахмалом. Хлорофилл а, окрашенный в светло-зелёный цвет, адсорбируется в верхней части колонки, а тёмно-зелёный хлорофилл b – в нижней. Пигменты вымывают смесью бензина и бензола в соотношении 10:1, каждую фракцию собирают в отдельный приемник [35, 40].

### 1.4.3 Качественное определение хлорофиллов

#### 1.4.3.1 Тонкослойная хроматография

ТСХ широко используется для очистки хлорофиллов при спектроскопическом анализе, а также для частичной идентификации в сравнении с подлинными стандартами или литературными данными. Особое преимущество ТСХ в анализе хлорофиллов состоит в том, что хлорофиллы обладают цветом и могут быть визуально определены на пластинках ТСХ с большой чувствительностью. Хлорофилл а адсорбируется в виде темно-зеленого пятна, хлорофилл b – в виде светло-зеленого пятна, а феофитин (хлорофилл, имеющий в своей структуре вместо магния два атома водорода) проявляется в виде серо-зеленого пятна. Т.к. помимо хлорофиллов существуют и другие пигменты, которые могут помешать идентификации (например, каротиноиды и др.), то детекцию хлорофиллов проводят в УФ-свете (365 нм), где пятна флуоресцируют красным цветом.

Силикагель – наиболее широко используемый адсорбент для определения хлорофиллов методом ТСХ. Его чаще всего наносят тонким слоем на алюминиевую пластинку. Для анализа обычно используют пластинки размером 5 x 15 см.

Наиболее эффективными элюентами для хроматографического разделения хлорофиллов являются смеси гексана с ацетоном, петролейного эфира с ацетоном, петролейного эфира с метанолом или этанолом [41].

#### 1.4.3.2 Инфракрасная спектроскопия

Метод ИК-спектроскопии используется для определения строения концевых функциональных групп молекул хлорофилла. Предварительно хлорофиллы подвергают разделению методом ТСХ. Разделенные на хроматографической пластинке пятна заново элюируют хлороформом, отправляют на анализ или дожидаются испарения растворителя, запечатывают в таблетку KBr и снимают спектр. По характеристическим частотам

соотносят пики к функциональным группам в соответствие с литературными данными (таблица 4) [42].

Таблица 4 – Колебания, проявляющиеся в ИК-спектре хлорофилла

Функциональная группа и тип колебания	Область колебания, см <sup>-1</sup>
$\nu_{C-H}$	3095-2860
$\nu_{C=O}$	1850-1650
$\nu_{C=C}$	1680-1620
$\delta_{C-C}, \delta_{C-N}$ в пиррольном кольце	1570-1520
$\delta_{C-H}$ (ножничные)	1470—1430
$\delta_{C-H}$ (веерные)	1350—1280
$\delta_{C-H}$ (маятниковые)	800—700

#### 1.4.4 Количественное определение хлорофилла

##### 1.4.4.1 Методы УФ-спектрофотометрии

Для спектрофотометрического определения содержания хлорофилла в биомассе берут точную навеску свежесушенного растительного сырья (около 1 г) и измельчают пестиком в ступе. Затем проводят двойную исчерпывающую экстракцию органическим растворителем, хорошо растворяющим хлорофилл (гексан, хлороформ, ацетон, петролейный эфир, этанол). Полученные извлечения объединяют, берут аликвоту и доводят её до метки. Далее измеряют оптическую плотность экстракта на спектрофотометре при длине волны 667 нм, в качестве раствора сравнения используют растворитель. Количество хлорофилла в пересчёте на хлорофилл а в мг% (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100 \cdot 1000}{944,5 \cdot V_3 \cdot m}, \text{ где } D - \text{оптическая плотность экстракта; } V_1 - \text{общий}$$

объём гексановых извлечений, мл;  $V_2$  – объём, до которого доведена аликвота, мл; 944,5 – удельный показатель поглощения хлорофилла а при 667 нм;  $V_3$  – объём аликвоты, мл;  $m$  – навеска растительного сырья, г [30, 43].

#### 1.4.4.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография

Метод ВЭЖХ используют для разделения и количественного определения каротиноидов. Экстракцию проводят гексаном в течение 3 суток, затем извлечение упаривают и растворяют в 10 мл 96%-го этанола.

Далее экстракт вводят в колонку, на хроматограмме происходит разделение хлорофиллов в виде пиков. Обнаружение хлорофиллов проводят при длинах волн от 190 до 360 нм. Максимум поглощения наблюдается при длине волны около 210 нм [37].

Для количественного определения содержания хлорофиллов измеряют площадь хроматографического пика и по градуировочному графику рассчитывают концентрацию хлорофиллов в смеси. Также можно провести качественную идентификацию хлорофиллов, используя стандартные растворы. Сравнение проводится по времени удерживания хроматографического пика в исходной смеси и в стандартном растворе [32].

## 2 Экспериментальная часть

### 2.1 Техника безопасности при работе в лаборатории органической химии

- При работе с химическими веществами и установками в лаборатории должно присутствовать не менее двух человек.

- Прежде чем приступить к работе, необходимо осмотреть рабочее место, освободить его от ненужных вещей, надеть средства индивидуальной защиты: хлопчатобумажный халат, при необходимости перчатки, очки, респиратор.

- Перед работой с электрическими приборами необходимо проверить их исправность, наличие заземления. Нельзя оставлять без присмотра включенные электроприборы, прикасаться к открытым частям установок, перегружать электросеть.

- Каждый сотрудник лаборатории должен изучить технику пожарной безопасности, знать, где находятся огнетушитель, асбест, медицинская аптечка.

- Вытяжную вентиляцию необходимо включать за 30 минут до начала и после окончания работы. Работу в вытяжном шкафу ведут так, чтобы в шкафу были только руки, а наблюдение за экспериментом ведут через стекло шкафа.

- Нельзя пробовать на вкус, набирать химические реактивы ртом через пипетку. Для этого используют резиновую грушу. Чтобы понюхать вещество или газ, необходимо направить его пары рукой от сосуда в свою сторону, не наклоняясь к самому сосуду.

- Смешивание и разбавление реактивов необходимо вести в вытяжном шкафу в фарфоровой посуде. Разбавление концентрированных кислот проводят постепенно, осторожно приливая их к воде.

- Измельчение твердых едких веществ, работа с кислотами, щелочами, легковоспламеняющимися жидкостями, нагревание стеклянной посуды и приборов проводятся в вытяжных шкафах. Запрещается нагревать летучие вещества на открытом огне, для этого используют водяную баню.

- Для слива органических жидкостей, концентрированных кислот и щелочей должна быть отведена бутылка из темного стекла, хранящаяся в вытяжном шкафу.

- Нагревание жидкостей должно проводиться в тонкостенных сосудах и установках, сообщающихся с атмосферой.

- Запрещено проводить нагревание в закупоренных сосудах или закрывать нагретую колбу до тех пор, пока она не охладится до температуры атмосферы.

- Во избежание ожогов, травм запрещено наклоняться над посудой, в которой греется какая-либо жидкость.

- Стеклопосуду можно греть на открытом огне только при наличии асбестовой сетки.

- Нагревание жидкости в пробирке следует проводить, наклонив пробирку отверстием от себя и других сотрудников [44, 45].

## 2.2 Количественное определение каротиноидов и хлорофилла в растительном сырье и мыле различного срока хранения

Точную навеску растительного сырья (около 1 г) измельчали в ступе пестиком, далее проводили исчерпывающую экстракцию гексаном. Извлечения объединяли, отбирали аликвоту, доводили раствор до метки пикнометра 25 мл (раствор А) и спектрофотометрически определяли содержание каротиноидов и хлорофилла. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре при длине волны 450 нм - для определения каротиноидов и 667 нм – для определения хлорофилла. В качестве раствора сравнения использовали гексан.

Далее определяли количественное содержание БАВ в мыле с 5%-ной добавкой растительного сырья. Для этого точную навеску мыла, содержащую около 1 г сырья, (20 г мыла) измельчали, проводили исчерпывающую экстракцию гексаном. Содержание каротиноидов и хлорофилла в мыле также определяли спектрофотометрически, используя гексановые извлечения мыла. Для эксперимента были взяты образцы свежего мыла, а также мыла, хранившегося 7 и 10 месяцев.

Количественное содержание суммы каротиноидов (X) в мг% в пересчете на β-каротин рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 1000}{2773 \cdot m \cdot V_3},$$
 где D – оптическая плотность исследуемого раствора, V1 –

общий объем экстракта (30 мл), V2 – объем раствора А, V3 – объем аликвоты, 2773 – удельный показатель поглощения β-каротина при длине волны 450 нм в гексане.

Количественное содержание хлорофилла (X) в мг% в пересчете на хлорофилл «а» рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 1000}{944,5 \cdot m \cdot V_3},$$
 где D – оптическая плотность исследуемого раствора, V1 –

общий объем экстракта, V2 – объем раствора А, V3 – объем аликвоты, 944,5 – удельный показатель поглощения хлорофилла при длине волны 667 нм в гексане [30, 43].

Результаты количественного определения каротиноидов представлены в таблицах 5-7, хлорофилла – в таблицах 5, 8, 9.

Таблица 5 – Массы взятых образцов, объём аликвоты, значение оптической плотности

Название образца		Масса растительной добавки, г	Объём, мл		Значение оптической плотности	
			Аликвоты	Экстракта	При 450 нм	При 667 нм
Кипрей	Лекарственное сырьё	1,0319	10	60	0,425	0,585
	Мыло свежее	0,9836	20	90	0,232	0,066
	Мыло 7 мес.	0,9951			0,062	0,052
	Мыло 10 мес.	1,0211			0,032	0,036
Крапива	Лекарственное сырьё	1,0489	10	60	0,341	0,529
	Мыло свежее	0,9862	20	90	0,180	0,084
	Мыло 7 мес.	1,0231			0,102	0,075
	Мыло 10 мес.	1,0152			0,038	0,045
Клевер	Лекарственное сырьё	1,0143	10	60	0,150	0,149
	Мыло свежее	0,9972	20	90	0,088	0,044
	Мыло 7 мес.	1,0115			0,039	0,024
	Мыло 10 мес.	0,9883			0,004	0,012
Хвоя пихты	Лекарственное сырьё	1,0306	10	60	0,412	0,622
	Мыло свежее	1,0221	20	90	0,227	0,056
	Мыло 7 мес.	1,0178			0,124	0,045
	Мыло 10 мес.	1,0125			0,028	0,030
Манжетка	Лекарственное сырьё	1,0574	10	60	0,427	0,708
	Мыло свежее	1,0108	20	90	0,220	0,018
	Мыло 7 мес.	0,9926			0,132	0,014
	Мыло 10 мес.	1,0204			0	0,006
Зелёный чай	Лекарственное сырьё	1,0023	10	60	0,265	0,975
	Мыло свежее	1,0042	20	90	0,176	0,042
	Мыло 7 мес.	1,0238			0,124	0,014
	Мыло 10 мес.	0,9952			0,010	0,010
Плоды шиповника	Лекарственное сырьё	1,0412	10	60	0,805	0
	Мыло свежее	1,0394	20	90	0,521	
	Мыло 7 мес.	1,0247			0,408	
	Мыло 10 мес.	1,0146			0,136	

Таблица 6 – Сумма каротиноидов в пересчёте β-каротин, мг%

Название образца	Лекарственное сырьё	Мыло свежее	Мыло 7 мес.	Мыло 10 мес.
Кипрей	11,14	9,65	2,53	1,27
Крапива	8,79	7,40	4,04	1,52
Клевер	4,00	3,58	1,56	0,16
Хвоя пихты	10,81	9,01	4,94	1,12
Манжетка	10,92	8,83	5,40	0
Зелёный чай	7,15	7,11	4,91	0,41
Плоды шиповника	20,91	20,34	16,15	5,44

Таблица 7 – Содержание каротиноидов в мыле

Название добавляемого лекарственного сырья	Полнота перехода из лекарственного сырья в мыло, %	Изменение содержания при хранении, %	
	Мыло свежее	Мыло 7 мес.	Мыло 10 мес.
Кипрей	86,64	22,69	11,41
Крапива	84,24	46,01	17,28
Клевер	89,50	39,10	4,10
Хвоя пихты	83,35	45,72	10,38
Манжетка	80,86	49,40	0
Зелёный чай	99,45	68,72	5,70
Плоды шиповника	97,25	77,25	26,01

Таблица 8 – Количество хлорофилла в пересчёте на хлорофилл «а», мг%

Название образца	Лекарственное сырьё	Мыло свежее	Мыло 7 мес.	Мыло 10 мес.
Кипрей	45,02	7,99	6,22	4,20
Крапива	40,04	10,14	8,73	5,28
Клевер	11,66	5,26	2,83	1,45
Хвоя пихты	47,92	6,53	5,27	3,53
Манжетка	53,17	2,12	1,68	1,40
Зелёный чай	77,24	4,98	1,63	1,20
Плоды шиповника	-	-	-	-

Таблица 9 - Содержание хлорофилла в мыле

Название добавляемого лекарственного сырья	Полнота перехода из лекарственного сырья в мыло, %	Изменение содержания при хранении, %	
		Мыло свежее	Мыло 7 мес.
Кипрей	17,75	13,82	9,33
Крапива	25,34	21,81	13,19
Клевер	45,07	24,24	12,40
Хвоя пихты	13,62	10,99	7,36
Манжетка	3,99	3,16	2,63
Зелёный чай	6,45	2,11	1,55
Плоды шиповника	-	-	-

Графики, отражающие зависимость изменения каротиноидов и хлорофилла с течением времени, представлены в Приложении А (рис. А. 1 - А. 7). По оси абсцисс отложены координаты длин волн в нм, по оси ординат буквой D обозначена оптическая плотность раствора.

### 2.3 Качественное определение каротиноидов и хлорофилла в растительном сырье и мыле с добавлением этого сырья методом ТСХ

Точную навеску растительного сырья (около 1-2 г) измельчали в ступе пестиком, далее проводили экстракцию гексаном, концентрировали полученный экстракт упариванием на ротационном испарителе под вакуумом.

Для определения качественного содержания каротиноидов и хлорофилла в мыле с 5%-ной добавкой растительного сырья точную навеску мыла, содержащую около 1 г сырья, (20 г мыла) измельчали, проводили экстракцию гексаном, концентрировали раствор.

Для проведения анализа методом тонкослойной хроматографии на хроматографическую пластинку «Sorbfil» 10x15 см капилляром наносили концентрированные гексановые извлечения образцов лекарственного сырья и мыла с добавлением этого сырья. Затем опускали пластинку в элюирующую систему гексан – ацетон (3 : 1). После продвижения подвижной фазы до края пластинки пластинку вынимали и сушили. Детекцию зон адсорбции хлорофилла проводили визуально по красной флуоресценции пятен в УФ-свете (365 нм). Далее хроматографические пластинки

опрыскивали 10%-ным спиртовым раствором фосфорно-молибденой кислоты с последующим нагреванием до 60 °С в течение 10 мин. Детекцию каротиноидов проводили по наличию синих пятен на жёлтом фоне пластинки. Оценка достоверности проводилась путём сравнения со стандартным образцом β-каротина и литературными данными.

Результаты качественного анализа каротиноидов и хлорофилла приведены в таблицах 10 и 11.

Таблица 10 - Качественное определение каротиноидов в лекарственном сырье и мыле с добавлением этого сырья

Название образца	R <sub>f</sub>	Каротиноиды
Кипрей	0,346	Лютеин
	0,700	Рубиксантин
	0,777	Ликопин
	0,869	α-каротин
	0,931	β-каротин
Крапива	0,237	Ксантофилл-эпоксид
	0,700	Рубиксантин
	0,805	Ликопин
	0,924	ζ-каротин
	0,962	β-каротин
Клевер	0,791	Ликопин
	0,853	α-каротин
	0,955	β-каротин
Хвоя	0,039	Неоксантин
	0,116	Виолаксантин
	0,186	Тараксантин
	0,287	Зеаксантин
	0,403	Лютеин
	0,519	Ксантофилл
	0,690	Рубиксантин
	0,729	Родоксантин
	0,798	Ликопин
	0,860	α-каротин
	0,930	β-каротин

## Окончание таблицы 10

Название образца	R <sub>f</sub>	Каротиноиды
Манжетка	0,177	Тараксантин
	0,246	Ксантофилл-эпоксид
	0,331	Зеаксантин
	0,384	Лютеин
	0,469	Ксантофилл
	0,615	β-криптоксантин
	0,746	Фитофлуен
	0,846	α-каротин
Зелёный чай	0,971	β-каротин
	0,477	Ксантофилл
	0,715	Рубиксантин
	0,823	Ликопин
	0,908	ζ-каротин
Плоды шиповника	0,962	β-каротин
	0,297	Зеаксантин
	0,680	Рубиксантин
	0,828	Ликопин
	0,922	ζ-каротин
	0,969	β-каротин

Таблица 11 - Качественное определение хлорофилла в лекарственном сырье и мыле с добавлением этого сырья

Название образца	R <sub>f</sub>	Хлорофилл
Кипрей	0,585	Хлорофилл «b»
	0,756	Хлорофилл «a»
Крапива	0,748	Хлорофилл «a»
Клевер	0,575	Хлорофилл «b»
	0,767	Хлорофилл «a»
Хвоя	0,569	Хлорофилл «b»
Манжетка	0,742	Хлорофилл «a»
	0,960	Феофитин

## Окончание таблицы 11

Зелёный чай	0,585	Хлорофилл «b»
	0,754	Хлорофилл «a»
Плоды шиповника	-	-

## 2.4 Определение строения молекул хлорофилла «a», хлорофилла «b» и феофитина методами колебательной и ЯМР-спектроскопии

Предварительно хлорофиллы «a», «b» и феофитин разделяли методом ТСХ. Разделенные на хроматографической пластинке пятна с Rf, принадлежащим хлорофиллам (0,585, 0,756) и феофитину (0,960) элюировали хлороформом, концентрировали экстракт упариванием на роторном испарителе под вакуумом и снимали колебательные спектры хлорофилла «a» и «b» и ПМР спектр феофитина, представленные в Приложении Б (рис. Б. 1 - Б. 5). Характеристические частоты ИК-спектров хлорофиллов представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Результаты ИК-спектроскопического исследования

Частота колебаний, см <sup>-1</sup>		Отнесение частот колебаний, см <sup>-1</sup>
Хлорофилл «a»	Хлорофилл «b»	
3040-2870	3040-2900	$\nu_{\text{CH}_2}, \nu_{\text{CH}_3}$
1725	1728	$\nu_{\text{C=O}}$
1645	1643	$\nu_{\text{C=C}}$
1518	1536	$\delta_{\text{C-C}}, \delta_{\text{C-N}}$ в пиррольном кольце
1440-1420	1470-1420	$\delta_{\text{CH}_2}$ (ножничные)

В хлорофиллах присутствует координационная связь магния с азотом. Для обнаружения колебания Mg-N был снят спектр КР, в котором присутствует колебание при 466 см<sup>-1</sup>, относящееся к колебанию Mg-N (рис. Б. 3).

Химические сдвиги ЯМР-спектра феофитина представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Результаты ЯМР-спектроскопического исследования

№	Химический сдвиг, м. д.	Положение протона	№	Химический сдвиг, м. д.	Положение протона
1	0,90	-CH <sub>3</sub> у насыщенного атома углерода	8	3,69	-O-CH <sub>3</sub>

## Окончание таблицы 13

2	1,28	-CH <sub>2</sub> у насыщенного атома углерода	9	4,30	-COO-CH <sub>2</sub> -C=
3	1,60	CH <sub>3</sub> -C= + -CH у нас. атома углерода	10	5,37	CH <sub>2</sub> =
4	2,04	-C=C-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	11	7,47	-C=CH-C=
5	2,33	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COO-	12	7,57	NH
6	2,64	O-CH <sub>2</sub> -CH=	13	7,74	NH пиррольного кольца
7	2,79	=C-H	14	9,79	-COH

### 3 Обсуждение результатов

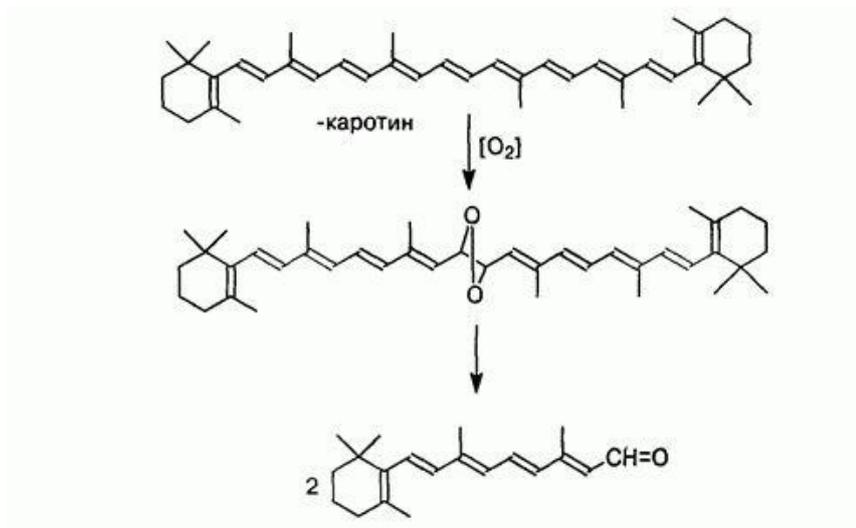
Благодаря разнообразию фармакологического и лечебного действия на кожу, в последнее большое распространение получили косметические средства, в состав которых входят различные растительные добавки. Наиболее популярным моющим средством является мыло. Многие производители презентуют натуральное мыло, содержащее лечебно-профилактические компоненты, обладающие широким спектром воздействия на кожу.

Например, кипрей применяется как ранозаживляющее, противовоспалительное, антиоксидантное и общеукрепляющее средство. Крапива обладает кровоостанавливающим и антисептическим действием, предотвращает появление угрей, выравнивает тон кожи. Добавление в косметические средства шиповника предотвращает раннее старение, способствует регенерации кожи, снимает воспаление. Такое лечебное действие растительных добавок обусловлено высоким содержанием БАВ. Одними из представителей БАВ являются каротиноиды и хлорофилл. Каротиноиды относятся к антиоксидантам, способным улавливать свободные радикалы кислорода, оберегая кожу от их вредного воздействия и преждевременного старения. Хлорофилл оказывает противовоспалительный тонизирующий и дезодорирующий эффект, нормализует работу сальных желёз, предотвращает появление гнойничков и сыпи, усиливает регенерацию кожи, снимает воспаление.

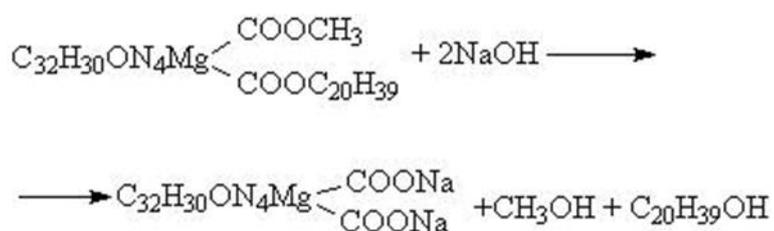
Для достоверности результатов определяли количественное содержание хлорофилла и каротиноидов в растительном сырье, добавляемом в мыло, так как в зависимости от времени и места сбора их содержание меняется.

Исходя из литературных данных, лекарственное сырьё содержит от 4 до 91 мг% каротиноидов [5-19]. В цветах и плодах происходит большее накопление каротиноидов в сравнении с вегетативной частью растения, т.к. при созревании плодов хлоропласты модифицируются, превращаясь в хромопласты. Происходит изменение окраски с зелёной на красную. Количественное содержание каротиноидов определяли спектрофотометрически (табл. 6). В растительном сырье каротиноиды содержатся от 4 до 21 мг% каротиноидов, что согласуется с литературными данными. Из растительного сырья каротиноиды переходят в мыло на 80-100% (табл. 7). Спустя 7 месяцев хранения мыла количество каротиноидов значительно уменьшается. А через 10 месяцев остаётся незначительное количество каротиноидов, в некоторых случаях лишь следы. Это связано с тем, что каротиноиды крайне неустойчивы к воздействию света, кислорода и температуры, под воздействием которых происходят процессы изомеризации,

дегидратации структуры каротиноидов, что приводит к изменению их активности. Также может происходить окисление по двойным связям на свету с образованием циклического пероксида [46]:



По литературным данным в лекарственном сырье содержится от 5 до 200 мг% хлорофилла [5-19]. Накопление хлорофилла в природе зависит от интенсивности освещения, питания, времени и места произрастания растительного сырья. Вегетативная часть растения обычно содержит большее количество хлорофилла, чем цветки и плоды. Спектрофотометрическое определение (табл. 8) показывает, что в растительном сырье содержится от 11 до 77 мг% хлорофилла, что соответствует интервалу литературных данных. Хлорофилл из растительного сырья переходит в мыло не более чем на 10-45% (табл. 9) и затем со временем уменьшается. Это связано с тем, что растительное сырье добавляют при варке мыла за 10-15 минут до окончания. При этом, кроме температуры в интервале 70-75 градусов, на хлорофилл действует щелочная среда. В этих условиях идет омыление хлорофилла с образованием натриевой соли двухосновной кислоты, метилового спирта и фитола. И затем при хранении мыла остаточная щелочность способствует дальнейшему омылению хлорофилла [34].



Качественное определение пигментов методом ТСХ показывает, что наибольший спектр каротиноидов содержится в растительном сырье и в мыле с хвоей пихты: неоксантин, виолаксантин, тараксантин, зеаксантин, лютеин, ксантофилл, рубиксантин,

родоксантин, ликопин,  $\alpha$ -каротин,  $\beta$ -каротин. Наименьшее содержание каротиноидов найдено в клевере: ликопин,  $\alpha$ -каротин,  $\beta$ -каротин (табл. 10).

Методом ТСХ было установлено, что лекарственное сырьё и мыло содержат хлорофилл «а», хлорофилл «b» и феофитин (табл. 11).

Для подтверждения результатов ТСХ пятна с  $R_f$  0,585 и 0,756, отнесённые к хлорофиллам «а» и «b», были исследованы методом колебательной спектроскопии. Пятна с  $R_f$  0,960, отнесённые к феофитину, были исследованы методом ЯМР-спектроскопии. С этой целью пятна, принадлежащие феофитину и хлорофиллам, были элюированы хлороформом, и сняты их ИК-, КР- и ЯМР-спектры.

В ИК-спектрах (табл. 12) в области 3040-2870  $\text{см}^{-1}$  обнаружены валентные колебания  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-$  связей. Колебание при 2358  $\text{см}^{-1}$ , относится к абсорбированному из атмосферного воздуха  $\text{CO}_2$ . В области 1720-1730  $\text{см}^{-1}$  находится колебание карбонильной группы  $\text{C}=\text{O}$ . Колебание двойной связи  $\text{C}=\text{C}$  обнаруживается в области 1640-1645  $\text{см}^{-1}$ . В области 1518-1540  $\text{см}^{-1}$  наблюдается полоса, принадлежащая валентно-деформационным колебаниям  $\text{C}-\text{C}$  метиновых мостиков, а также  $\text{C}-\text{C}$  и  $\text{C}-\text{N}$  связям пиррольных колец, что согласуется с квантово-химическими расчётами авторов [42]. Колебание, принадлежащее 1420-1470  $\text{см}^{-1}$ , относится к ножничным колебаниям заместителей. В области 1059  $\text{см}^{-1}$  происходит наложение пиков от растворителя (хлороформа) и деформационных колебаний связей  $\text{C}-\text{H}$ . Полосы в области 960-800  $\text{см}^{-1}$  относятся к делокализованным деформационным маятниковым колебаниям  $\text{CH}_2-$  группы. Колебания в области 300-500  $\text{см}^{-1}$ , принадлежащие связи  $\text{Mg}-\text{N}$ , запрещены по симметрии в ИК-спектроскопии. Колебание связи  $\text{Mg}-\text{N}$  проявляется в КР-спектре при 466  $\text{см}^{-1}$ .

Методом  $^1\text{H}$  ЯМР подтверждено отнесение пятна с  $R_f$  0,960 к феофитину, относящегося к классу хлорофиллов. В ПМР-спектре присутствуют сигналы протонов метильных, метиленовых и метиновых групп при  $sp^3$  и  $sp^2$ -гибридизованных атомах углерода и кислороде. Отчётливо виден сигнал метокси-группы при 3,69 м. д. и альдегидной группы при 9,79 м. д. Результаты отнесения сигналов представлены в таблице 13.

## ВЫВОДЫ

1. Проведена количественная оценка содержания каротиноидов и хлорофиллов в растительном сырье и мыле с добавлением этого сырья. Показано, что каротиноиды переходят из растительного сырья в мыло на 80-100%, а хлорофиллы – не более чем на 45%.
2. Установлено, что при хранении мыла с растительными добавками содержание каротиноидов и хлорофиллов уменьшается, практически через 10 месяцев остаются лишь следы.
3. Методом колебательной спектроскопии подтверждено отнесение пятен с  $R_f$  0,585, 0,756 к «а» и «b» хлорофиллам.
4. Методом ЯМР подтверждено отнесение пятна с  $R_f$  0,960 к феофитину.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

### Кипрей

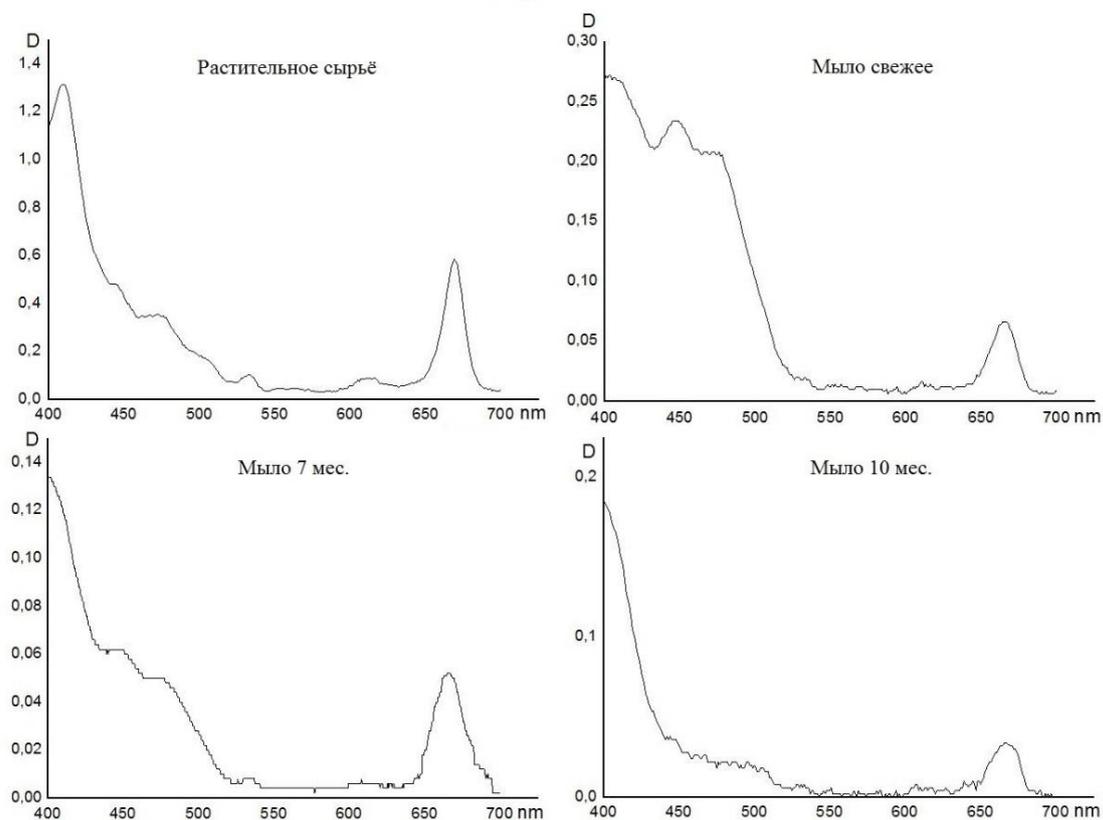


Рисунок А. 1 – УФ-спектры экстракта кипрея и мыла с добавлением кипрея

### Крапива

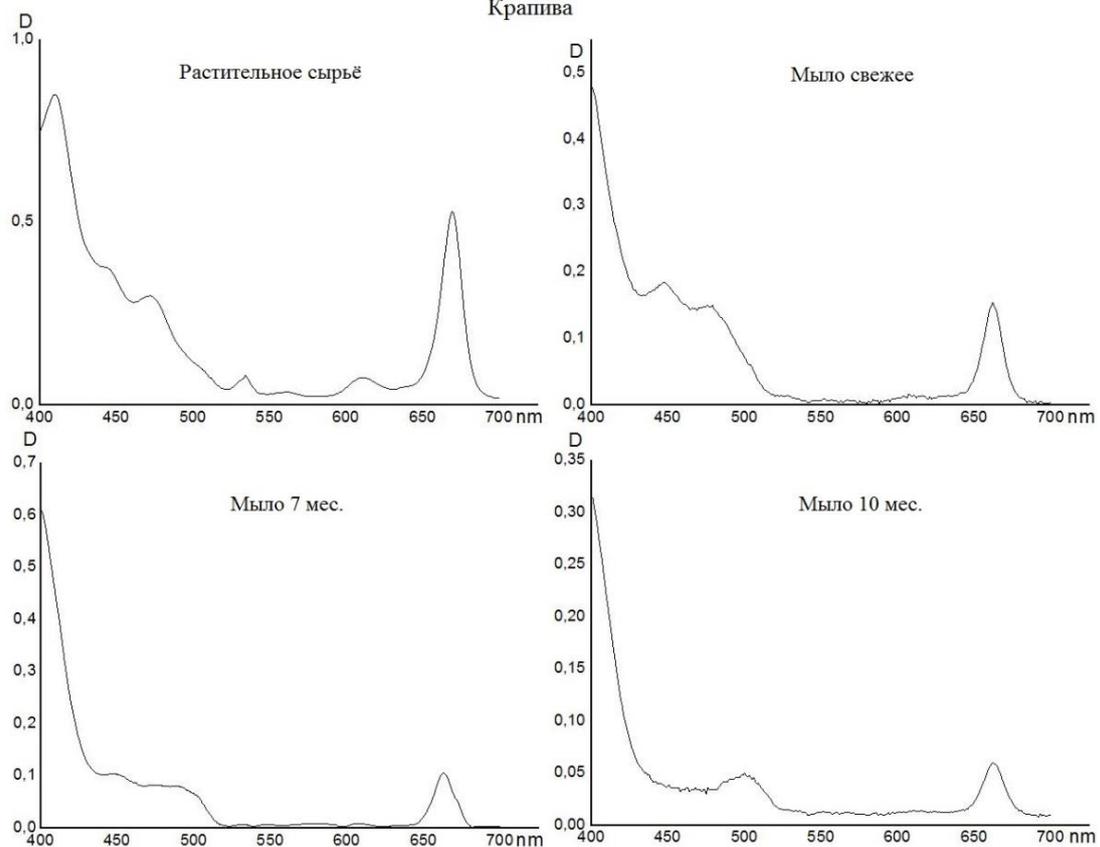


Рисунок А. 2 – УФ-спектры экстракта крапивы и мыла с добавлением крапивы

Продолжение Приложения А

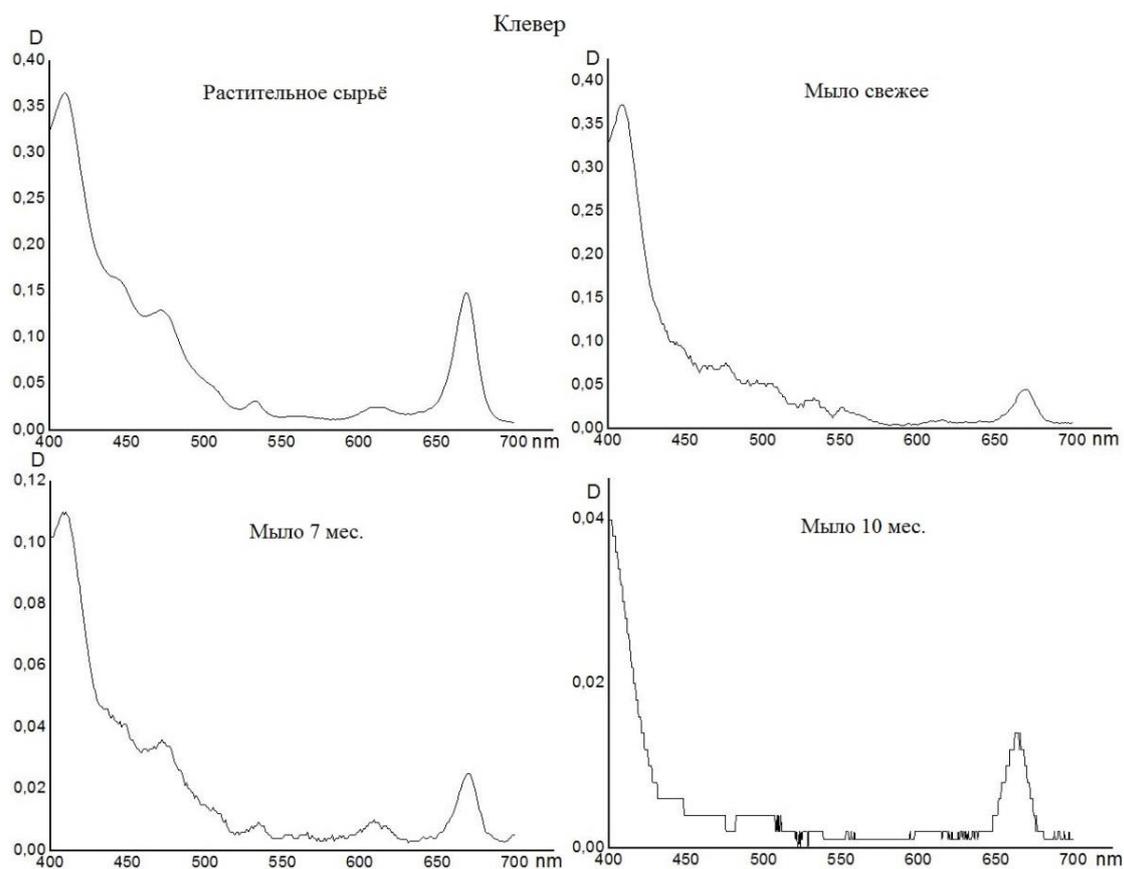


Рисунок А. 3 – УФ-спектры экстракта клевера и мыла с добавлением клевера

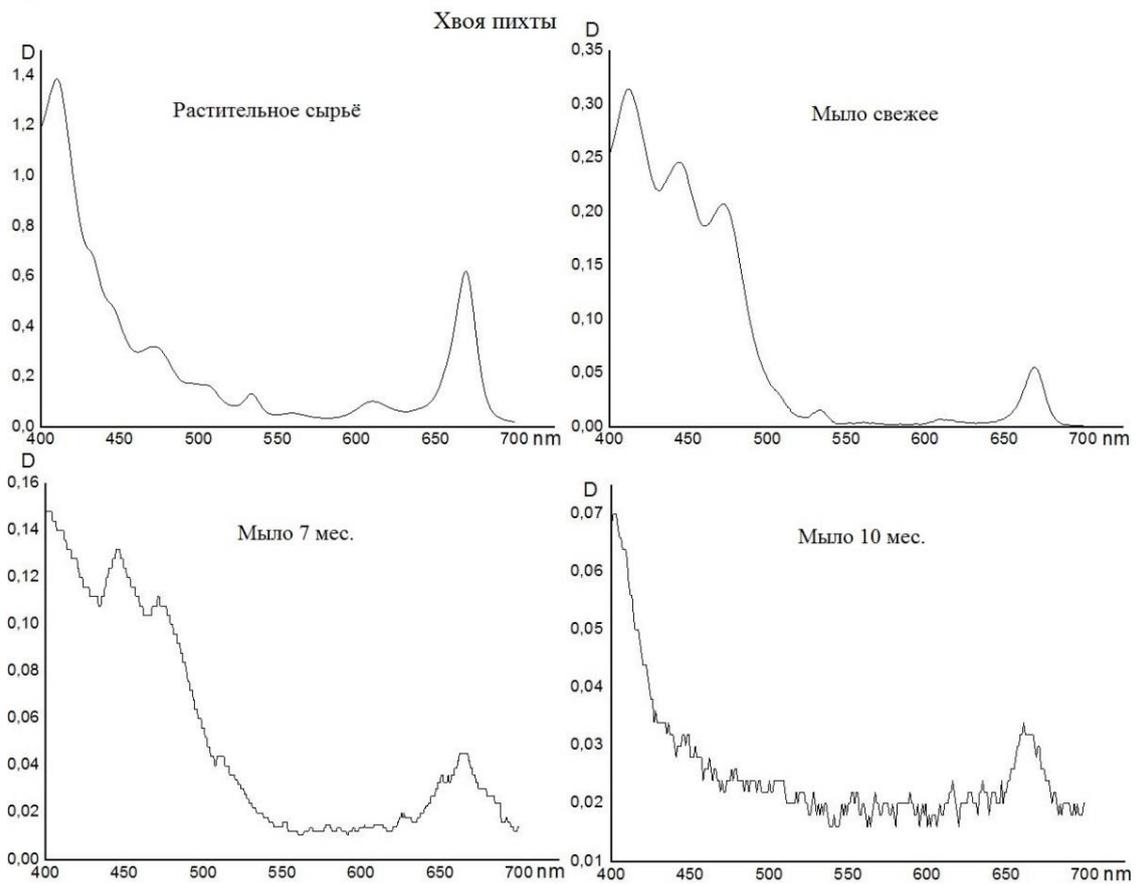


Рисунок А. 4 – УФ-спектры экстракта пихты хвоя и мыла с добавлением хвои

Продолжение Приложения А

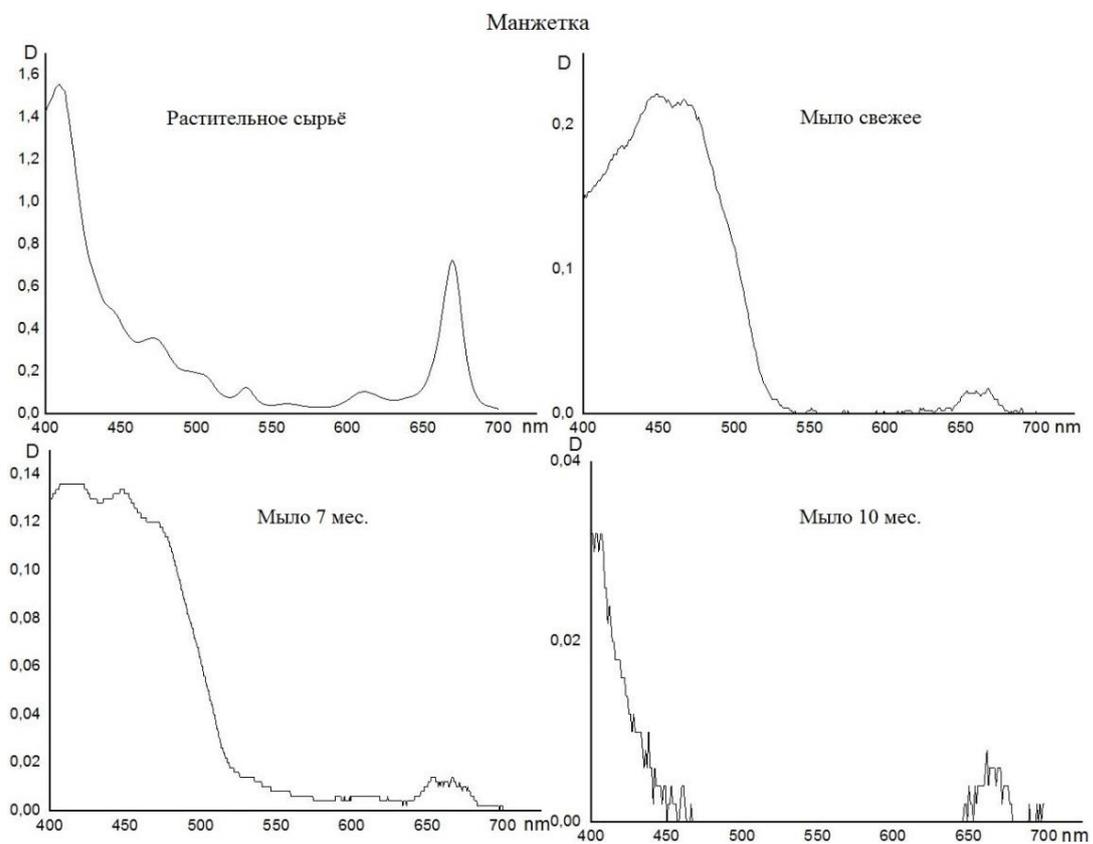


Рисунок А. 5 – УФ-спектры экстракта манжетки и мыла с добавлением манжетки

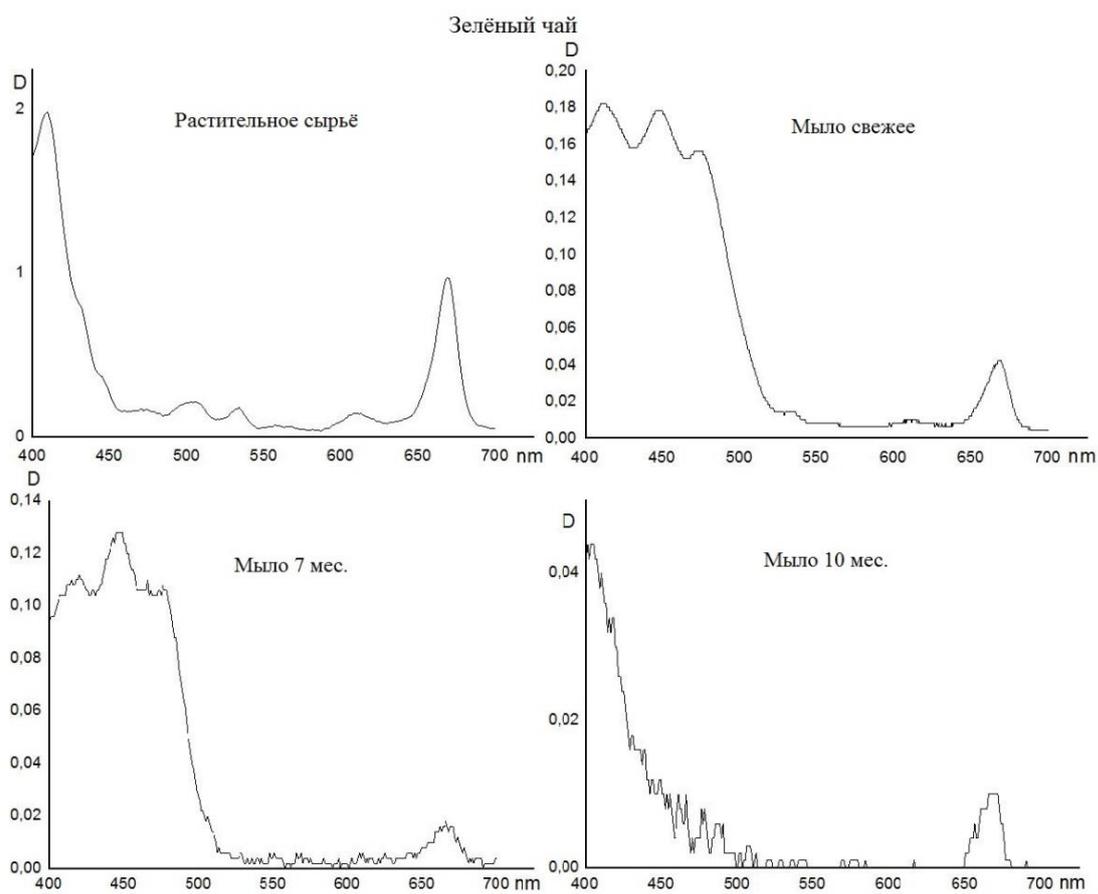


Рисунок А. 6 – УФ-спектры экстракта зелёного чая и мыла с добавлением зелёного чая

Продолжение Приложения А

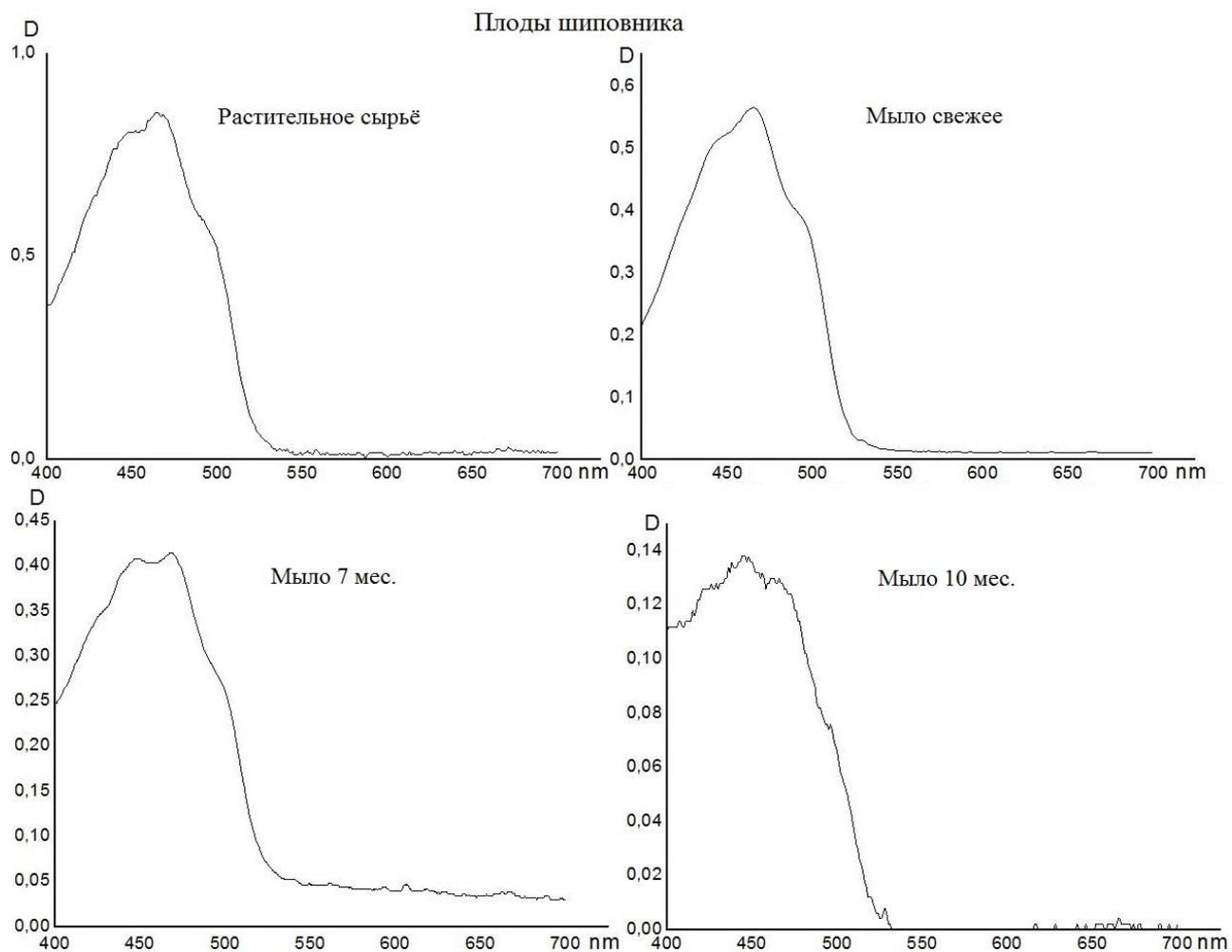


Рисунок А. 7 – УФ-спектры экстракта плодов шиповника и мыла с добавлением шиповника

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

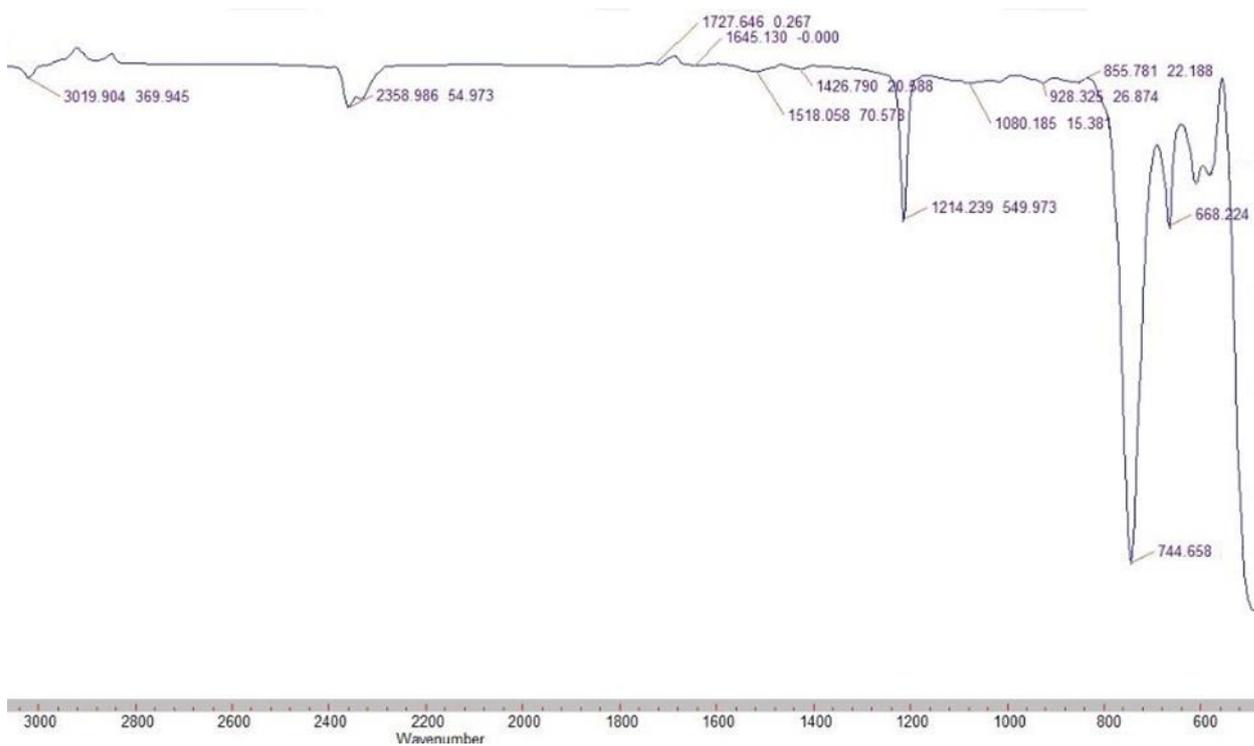


Рисунок Б. 1 – ИК-спектр хлорофилла «а»

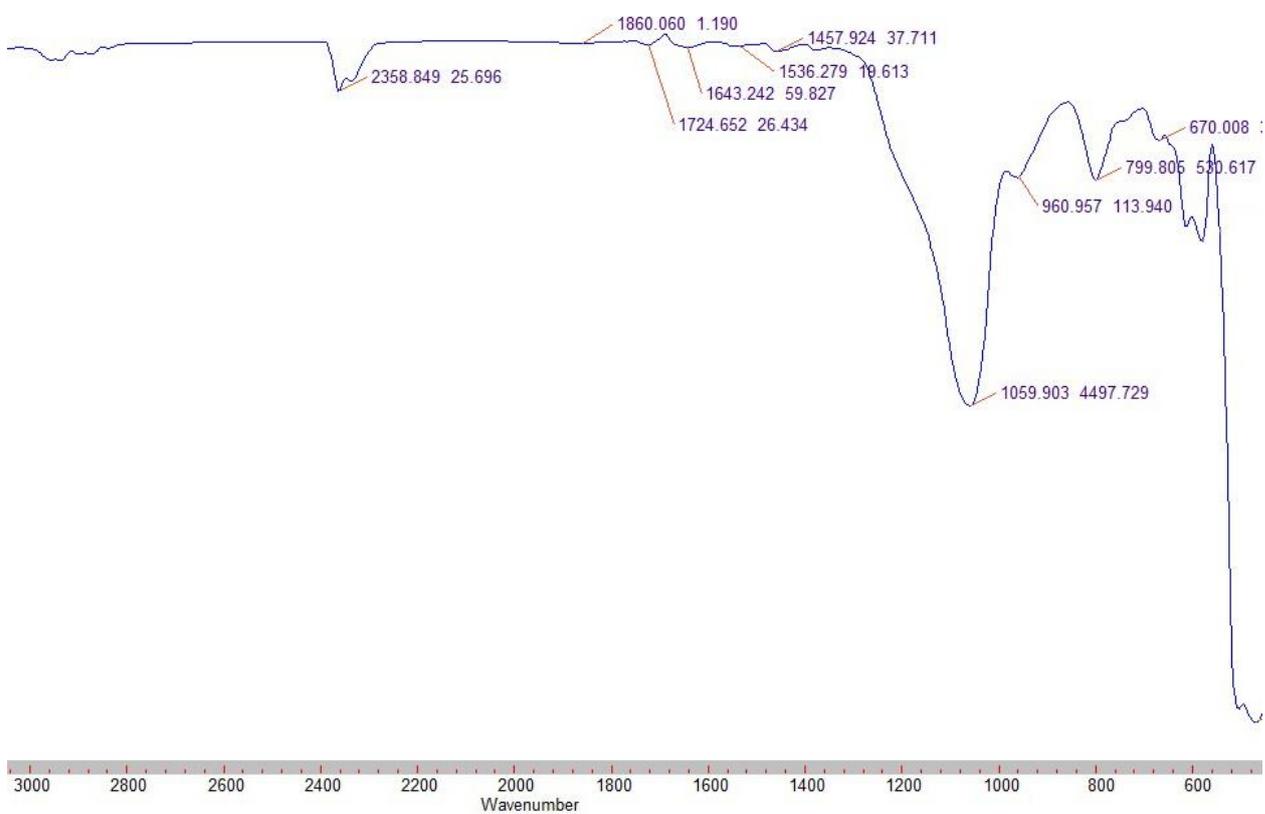


Рисунок Б. 2 – ИК-спектр хлорофилла «b»

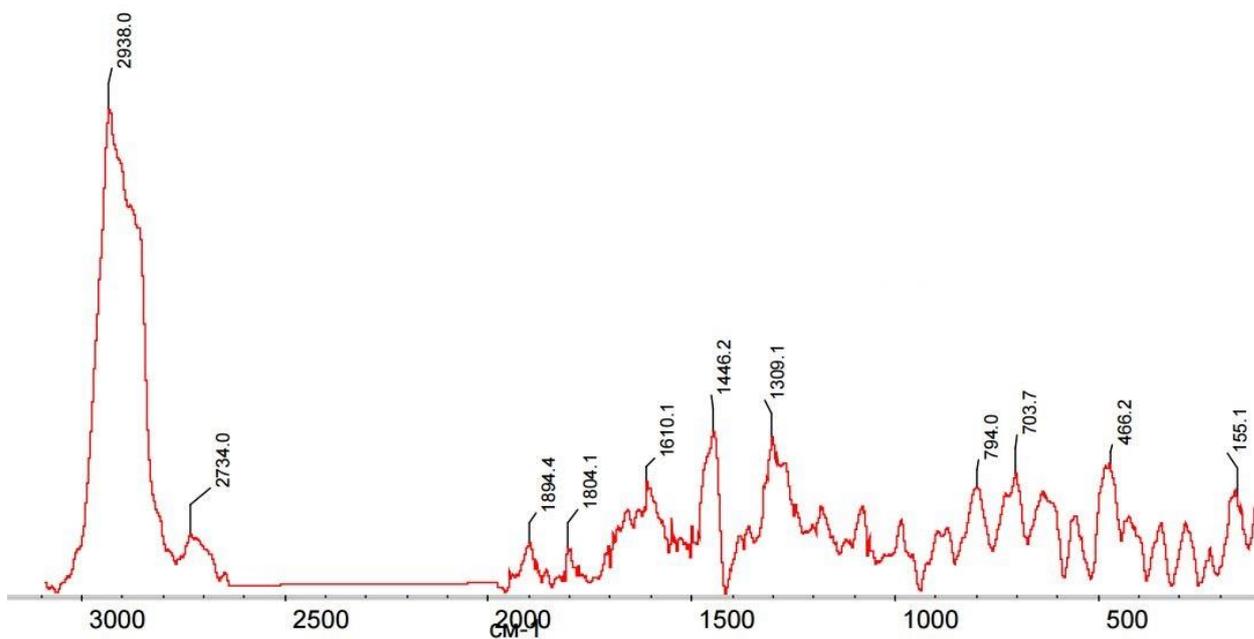


Рисунок Б. 3 – КР-спектр хлорофилла

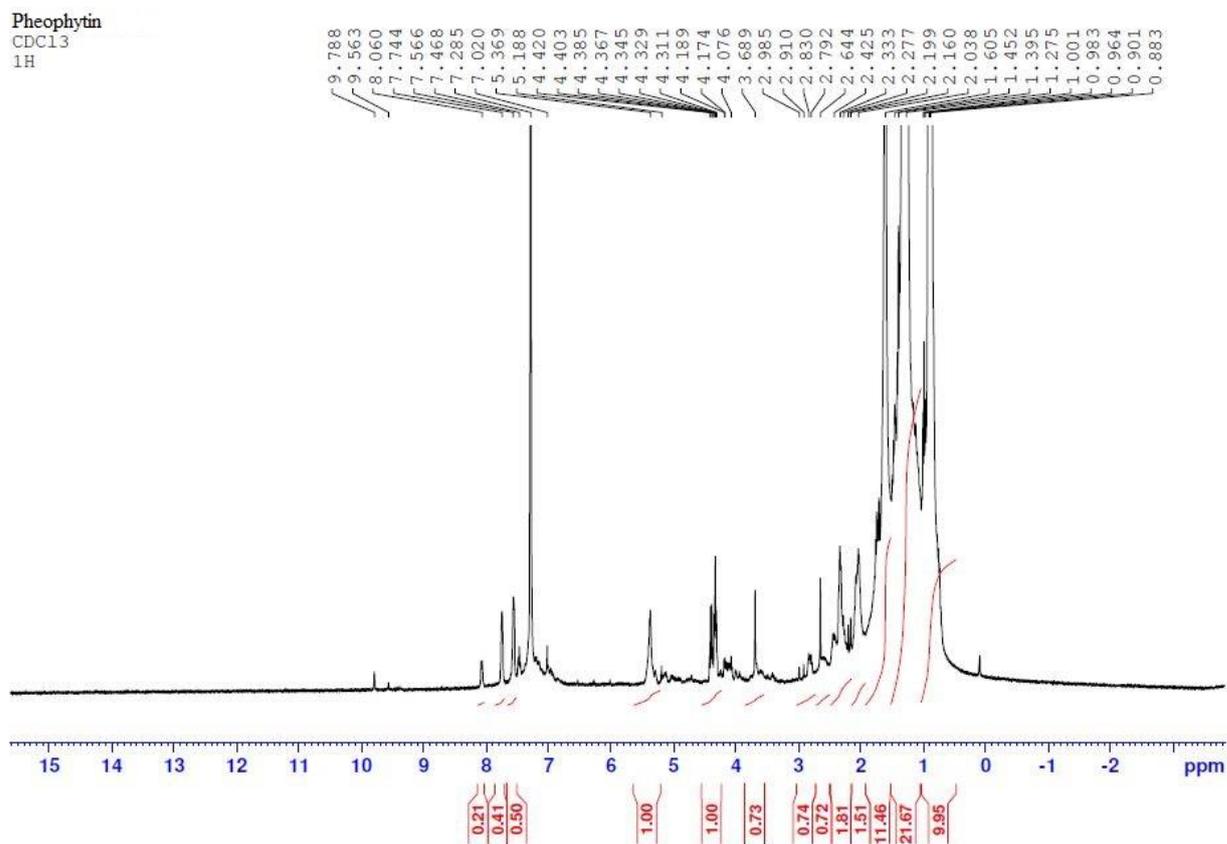


Рисунок Б. 4 – ПМР-спектр феофитина

Pheophytin  
CDCl<sub>3</sub>  
1H

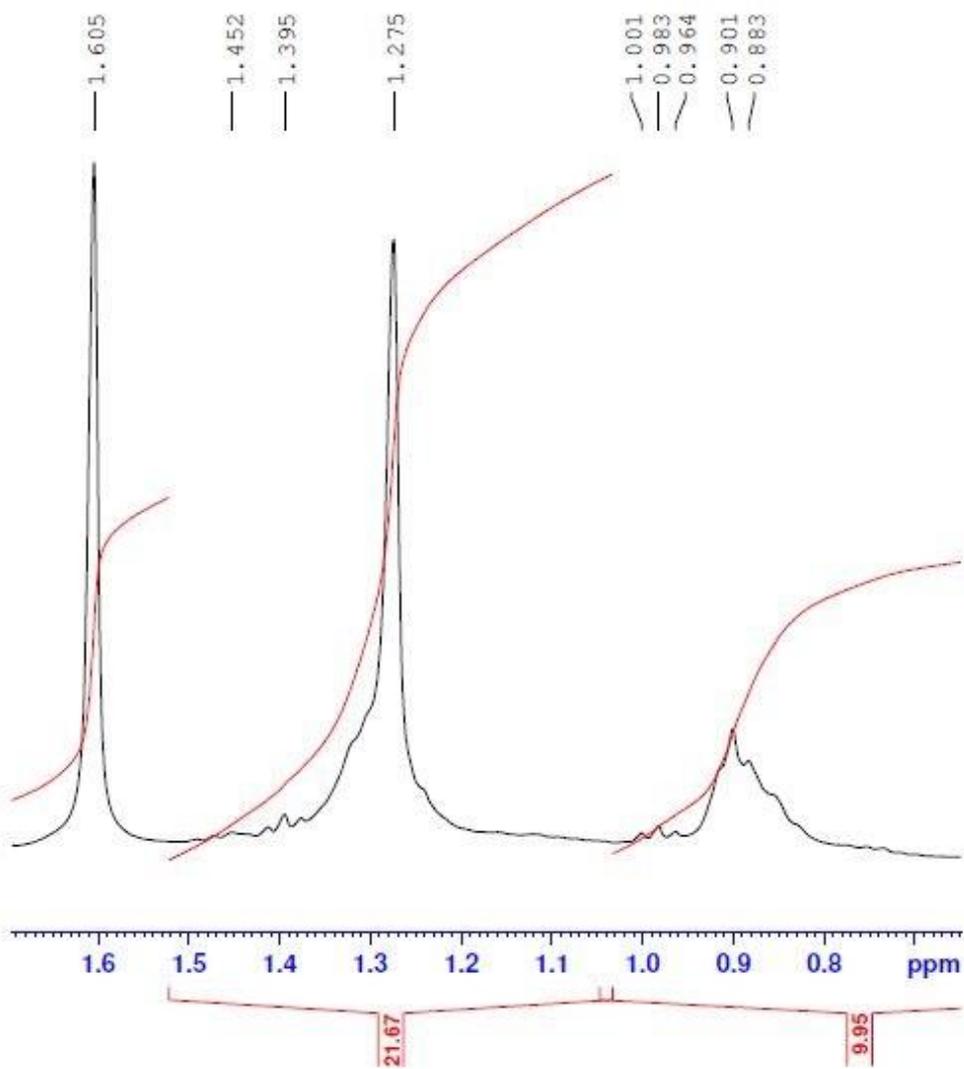


Рисунок Б. 5 – ПМР-спектр феофитина

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Основы химии и технологии производства синтетических моющих средств : [учеб. пособие] / П. В. Николаев [и др.]. – Иваново : Изд-во Иван. гос. хим.-технол. ун-та, 2007. – 116 с.
2. Жиряков В. Г. Органическая химия / В. Г. Жиряков. – М. : Химия, 1978. – 408 с.
3. Плесовских В. А. Физико-химия и технология производства мыла / В. А. Плесовских, О. А. Дубовик, А. А. Безденежных. – СПб : Химиздат, 2007. – 336 с.
4. Кривова А. Ю. Технология производства парфюмерно-косметических продуктов / А. Ю. Кривова, В. Х. Паронян. – М. : ДеЛи принт, 2009. – 668 с.
5. Валов Р. И. Фармакогностическое исследование надземной части *Chamaenerion angustifolium* (L.) Scop. : автореф. дис. ... канд. фарм. наук / Р. И. Валов. – Улан-Удэ, 2012. – 22 с.
6. Бабаян М. С. Фармакогностическое изучение манжетки тринадцатипестной : дис. ... канд. фарм. наук / М. С. Бабаян. – Пятигорск, 2015. – 115 с.
7. Ушанова В. М. Исследование влияния условий произрастания на химический состав крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) / В. М. Ушанова, О. И. Лебедева, С. М. Репях // Химия растительного сырья. – 2001. – № 3. – С. 97-104.
8. Яцюк В. Я. Биологически активные вещества травы крапивы двудомной / В. Я. Яцюк, Г. А. Чалый, О. В. Сошникова // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2006. – № 1. – С. 25-29.
9. Шнайдман Л. О. Производство витаминов / Л. О. Шнайдман. – М. : Пищевая промышленность, 1973. – 443 с.
10. Петрова С. Н. Химический состав и антиоксидантные свойства видов рода *Rosa* L. (обзор) / С. Н. Петрова, А. В. Ивкова // Химия растительного сырья. – 2014. – № 2. – С. 13-19.
11. Лекарственные растения СССР / О. В. Журба [и др.] – М. : Планета, 1988. – 208 с.
12. Чепалов В. А. Эколого-физиологические особенности пигментного аппарата у растений криолитозоны Якутии : автореф. дис. ... канд. биол. наук / В. А. Чепалов. – Иркутск, 2010. – 22 с.
13. Ушанова В. М. Переработка древесных отходов хвойных деревьев / В. М. Ушанова, Р. А. Степень, С. М. Репях // Химия растительного сырья. – 1998. – № 2. – С. 17-23.
14. Kalac P. Carotenoids, ergosterol and tocopherols in fresh and preserved herbage and their transfer to bovine milk fat and adipose tissues: A review / P. Kalac // Journal of Agrobiology. – 2012. – № 29. – P. 1-13.

15. Агаев Ф. Н. Биохимическая характеристика сортов клевера лугового в условиях северо-запада Нечерноземной зоны РСФСР и выделение образцов с пониженным содержанием фитоэстрогенов : дис. ... канд. биол. наук / Ф. Н. Агаев. – Ленинград, 1983. – 263 с.
16. Похлебкин В. В. Чай, его история, свойства и употребление / В. В. Похлебкин. – М.: Центрполиграф, 2007. – 121 с.
17. Использование метода ВЭЖХ для определения каротиноидов в сухом растительном материале (цветках) *Calendula Officinalis* L. / П. К. Лаптинская [и др.] // Вопросы обеспечения лекарственных средств. – 2015. – № 4. – С. 19-26.
18. Ушанова В. М. Исследование влияния компонентов лекарственного растительного сырья на состав получаемых экстрактов / В. М. Ушанова, В. М. Воронин, С. М. Репях // Химия растительного сырья. – 2001. – № 3. – С. 105-110.
19. Каротиноиды лепестков цветков календулы / В. И. Дейнека [и др.] // Научные ведомости БелГУ. Сер. Естественные науки. – 2011. – № 9. – С. 279-287.
20. Химия изопреноидов : [учеб. пособие] / В. В. Племенков. – Барнаул : Изд-во Алт. ун-та, 2007. – 322 с.
21. Cadenas E. Handbook of Antioxidants / E. Cadenas, L. Packer. – New York : Marcel Dekker, 2001. – 711 p.
22. Eldahshan O. A. Carotenoids / O. A. Eldahshan, A. N. B. Singab // Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. – 2013. – № 1. – P. 225-234.
23. Воробьева О. А. Разработка и стандартизация фитопрепарата бетулина и тимола на основе масла семян тыквы : дис. ... канд. фарм. наук / О. А. Воробьева. – Н. Новгород., 2016. – 145 с.
24. The Role of Carotenoids in Human Skin / M. E. Darvin [and others] // Molecules. – 2011. – № 16. – P. 10491-10506.
25. Колотилова А.И. Витамины / А.И. Колотилова, Е.П. Глушанков. – Л. : Изд-во Ленингр. гос. ун-та, 1976. – 247 с.
26. Britton G. Carotenoids in Photosynthesis / G. Britton, A. Young. – Liverpool : Springer Science+Business Media Dordrecht. – 1993. – 498 p.
27. Чечета О. В. Методика определения каротиноидов методом хроматографии в тонком слое сорбента / О. В. Чечета, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т.8. – С. 320-326.
28. 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. Серия: Медицина. Фармация. – 2010. – Т. 12. – С. 119-122.
29. Nuclear magnetic resonance analysis of carotenoids from the burgundy plumage of the Pompadour Cotinga (*Xipholena punicea*) / A. M. LaFountain [and others] // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2013. – № 2. P. 133-141.
30. Разработка методик количественного определения содержания  $\beta$ -каротина и фикоцианина в биомассе спирулины пищевой (*Spirulina platensis*) / С. В. Первушкин [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 8. – С. 1426-1429.
31. Определение каротиноидов плодов облепихи методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / В. И. Дейнека [и др.] // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. – 2011. – Т. 15. – С. 374-381.
32. Сычев С. Н. Методы совершенствования хроматографических систем и механизмы удерживания в ВЭЖХ / С. Н. Сычев. – Орел : ГТУ, 2000. – 211 с.
33. Пакетт Л. Основы современной химии гетероциклических соединений / Л. Пакетт ; под ред. В. Г. Ящунского. – М. : Мир, 1971. – 352 с.
34. Физиология растений : [лабораторный практикум для студентов биологического факультета] / А. П. Кудряшов [и др.]. – Минск : БГУ, 2011. – 76 с.
35. Кретович В. Л. Основы биохимии растений / В. Л. Кретович ; под ред. А. И. Опарина. – 2-е изд. – М. : Советская наука, 1956. – 498 с.
36. Спецглавы физических и химических наук: инструментальные методы исследования : [учебное пособие] / Р. В. Кайгородов [и др.]. – Пермь : Перм. гос. нац. исслед. ун-т, 2015. – 81 с.
37. Федосеева Л. М. Изучение и сравнительная оценка липофильных веществ зеленых, красных и черных листьев бадана толстолистного, произрастающего на Алтае / Л. М. Федосеева, Т. С. Малолеткина // Химия растительного сырья. – 1999. – № 2. – С. 113-117.
38. Антимикробная активность препаратов, содержащих хлорофиллы (обзор) / С. А. Жумабекова [и др.]. // Вестник АГИУВ. – 2013. – № 1. – С. 32-33.
39. Физиология растений: лабораторные работы : [практикум] / Е. В. Порохина [и др.]. – Томск : Изд-во ТГПУ, 2013. – 96 с.
40. Ольшанова К. М. Практикум по хроматографическому анализу / К. М. Ольшанова, М. А. Потапова, Н. М. Морозова. – М. : Высшая школа, 1970. – 312 с.
41. Тринеева О. В. Выбор оптимальной системы для определения пигментов листьев крапивы двудомной методом ТСХ / О. В. Тринеева, С. В. Воропаева, А. И. Сливкин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2013. – Т. 13, вып. 2. – С. 213-219.

42. Березин К. В. Расчет структуры и колебательного спектра этилхлорофиллида (А) методом функционала плотности / К. В. Березин, В. В. Нечаев, О. Д. Зиганшина // Журнал структурной химии. – 2004. – Т. 45, вып. 2. – С. 232 – 239.
43. Пат. 2531940 Российская Федерация, МПК G01N 33/15 G01N 21/25. Способ спектрофотометрического количественного определения в листьях крапивы двудомной при совместном присутствии хлорофилла, каротиноидов и гидроксикоричных кислот / Тринеева О. В., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И., Воропаева С. В. ; заявитель и патентообладатель Воронеж. гос. ун-т. – опубл. 27.10.2014, Бюл. № 30. – 8 с.
44. Органическая химия : [методические указания к лабораторному практикуму] / А. Д. Котов [и др.]. – Ярославль : ЯрГУ, 2011. – 48 с.
45. Практикум по органической химии. Часть I. Методы очистки и идентификации органических соединений : [учебное пособие] / Р. Я. Юсубова [и др.]. – Томск : Изд-во Том. политех. ун-та, 2009. – 45 с.
46. Курегян А. Г. Способ получения каротиноидов из растительного сырья / А. Г. Курегян, С. В. Печинский // Современная медицина: актуальные вопросы: сб. ст. по матер. XXI междунар. науч.-практ. конф. – Новосибирск : СибАК, 2013. – С. 148-154.

Уважаемый пользователь! Обращаем ваше внимание, что система «Антиплагиат» отвечает на вопрос, является ли тот или иной фрагмент текста заимствованным или нет. Ответ на вопрос, является ли заимствованный фрагмент именно плагиатом, а не законной цитатой, система оставляет на ваше усмотрение.

## Отчет о проверке № 1

дата выгрузки: 14.06.2017 10:16:28  
 пользователь: [maria94@sibmail.com](mailto:maria94@sibmail.com) / ID: 3720500  
 отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат»  
 на сайте <http://www.antiplagiat.ru>

### Информация о документе

№ документа: 117  
 Имя исходного файла: Диплом 1.pdf  
 Размер текста: 2614 кБ  
 Тип документа: Не указано  
 Символов в тексте: 78674  
 Слов в тексте: 9164  
 Число предложений: 561

### Информация об отчете

Дата: Отчет от 14.06.2017 10:16:28 - Последний готовый отчет  
 Комментарий: не указано  
 Оценка оригинальности: 95.6%  
 Заимствования: 4.4%  
 Цитирование: 0%



Оригинальность: 95.6%  
 Заимствования: 4.4%  
 Цитирование: 0%

### Источники

Доля в тексте	Источник	Ссылка	Дата	Найдено в
0.86%	[1] Сборник научных трудов: "Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции" Выпуск 65	<a href="http://pmedpharm.ru">http://pmedpharm.ru</a>	15.12.2016	Модуль поиска Интернет
0.86%	[2] Сборник научных трудов: "Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции" Выпуск 67	<a href="http://pmedpharm.ru">http://pmedpharm.ru</a>	05.12.2016	Модуль поиска Интернет
0.63%	[3] Сборник научных трудов: "Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции" Выпуск 66	<a href="http://pmedpharm.ru">http://pmedpharm.ru</a>	12.12.2016	Модуль поиска Интернет