

МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 581.1

**СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СОДЕРЖАНИЯ КАРОТИНОВ, КСАНТОФИЛЛОВ И ХЛОРОФИЛЛОВ
В ЭКСТРАКТАХ СЕМЯН РАСТЕНИЙ**

© 2008 г. О. В. Булда*, В. В. Рассадина**, Г. Н. Алексейчук*, Н. А. Ламан*

* Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

** Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
Поступила в редакцию 20.03.2007 г.

Модифицирован спектрофотометрический метод определения содержания каротиноидов и хлорофиллов в экстрактах семян растений. Пигменты экстрагировали смесью петролейного эфира (ПЭ) и тетрагидрофурана (ТГФ) в соотношении 4 : 1. Формулы для расчета содержания β-каротина, лютеина, хлорофиллов *a* и *b* в смеси ПЭ : ТГФ выводили, используя удельные коэффициенты поглощения растворов индивидуальных пигментов. Показано, что вычитание вклада хлорофиллов из спектра поглощения экстракта семян позволяет получить спектры, которые в ряде случаев могут быть использованы для расчета содержания каротинов и ксантофиллов.

Ключевые слова: растения – семена – каротины – ксантофиллы – хлорофиллы *a* и *b* – спектрофотометрический метод – формулы для расчета содержания пигментов.

ВВЕДЕНИЕ

Каротиноиды высших растений представлены двумя группами пигментов – каротинами и их кислород-содержащими производными – ксантофиллами. В зеленых листьях основная доля пигментов приходится на β-каротин и ксантофиллы (лютеин, неоксантин, виолаксантин и зеаксантин). В фотосинтезирующих тканях каротиноиды являются интегральными компонентами хлорофилл-содержащих пигмент-белковых комплексов тилакоидных мембран хлоропластов. Основные функции каротиноидов – фотозащитная, светособирающая, структурная, а также участие в фотохимических процессах ФС I и II, хорошо изучены [1–8]. Каротиноиды играют также важную роль в репродукции растений: наряду с флавоноидами они создают яркую окраску у цветков, плодов и семян, что способствует опылению цветков и распространению семян. Местом локализации каротиноидов в репродуктивных органах, как и в фотосинтезирующих тканях, являются пластиды – хромопласты, амилопласты, элайопласты и лейкопласты [9]. Показано, что к наиболее распро-

страненным пигментам плодов и цветков относятся β-каротин и ликопин, тогда как основным пигментом семян является лютеин [9]. Известно, что в цветках и плодах каротиноиды могут быть предшественниками ароматических соединений [10], а также служат фотопротекторами ряда светочувствительных компонентов растительных тканей [11]. Сведения о функциях и метаболизме желтых пигментов в семенах весьма ограничены. В работе [12] отмечается важность каротиноидов в биосинтезе АБК и в поддержании жизнеспособности семян в состоянии покоя. Показано также, что каротиноиды являются компонентами антиоксидантной системы, в функции которой входит защита мембран от повреждающего действия свободных радикалов и замедление процессов старения семян [13, 14]. В последнее время было продемонстрировано, что уровень каротиноидов в семенах определяется как генетически, так и под действием внешних факторов в период развития, созревания и хранения семян [15]. Изменение содержания каротиноидов, в свою очередь, оказывает значительное воздействие на всхожесть семян и на формирование проростков [9, 16, 17].

В современной практике состав и содержание каротиноидов в растительных тканях определяют методом ВЭЖХ. Однако использование этого метода не всегда оправдано из-за его трудоемкости и высокой стоимости. В ряде случаев, когда нет необходимости определения состава каротиноидов, применяют более простой и дешевый

Сокращения: ПЭ – петролейный эфир; ТГФ – тетрагидрофуран; $C_{\beta\text{-кар}}$ – концентрация β-каротина; $C_{\text{лют}}$ – концентрация лютеина; C_a – концентрация хлорофилла *a*; C_b – концентрация хлорофилла *b*; α – удельный коэффициент поглощения.

Адрес для корреспонденции: Алексейчук Галина Николаевна. Беларусь, 220072 Минск, ул. Академическая, 27. Институт экспериментальной ботаники НАНБ. Электронная почта: alekseichuk@biobel.bas-net.by

спектрофотометрический метод оценки содержания пигментов в экстрактах тканей без предварительного хроматографического разделения. Поскольку отдельные представители каротиноидов обладают сходными спектрами, в экстрактах листьев определяют суммарное содержание пигментов, основываясь на том, что удельные коэффициенты наиболее распространенных каротиноидов листа близки между собой и при 450 нм составляют 250–260 л/(г см). Коэффициенты поглощения и формулы для расчета содержания каротиноидов в петролейном эфире, гексане, растворах ацетона приведены в работах [18–22].

В ряде работ [23–25] подчеркивается, что экстракция каротиноидов из семян с помощью растворителей, традиционно используемых при извлечении пигментов из листьев, затруднена. Целью данной работы явилась модификация методики выделения каротиноидов из семян сельскохозяйственных культур и их количественного определения спектрофотометрическим методом.

МЕТОДИКА

В работе использовали семена капусты кочанной (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.), рапса (*Brassica napus* L. var. *napus*), гороха (*Pisum sativum* L.), люпина (*Lupinus angustifolius* L.), кукурузы (*Zea mays* L.), тыквы гигантской (*Cucurbita maxima* Duch.), кабачка цукини (*Cucurbita pepo* L. var. *gironmontina*), моркови (*Daucus carota* L.), перца (*Capsicum annuum* L.), томатов (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Семена капусты и гороха предварительно сортировали на фракции, содержавшие более зрелые семена и менее зрелые семена. Семена капусты сортировали по интенсивности флуоресценции хлорофилла в семенных оболочках *in vivo* по методу [26], а семена гороха – визуально по цвету семенной оболочки (желтые и зеленые).

Экстракция пигментов из семян. Навеску сухих или замоченных в течение 1 ч в воде семян массой 0.5 г растирали в ступке в 2 мл смеси петролейный эфир (ПЭ, фракция 70–100) : тетрагидрофуран (ТГФ) – 1 : 1, затем добавляли 3 мл ПЭ и продолжали растирание до получения однородного гомогената, который фильтровали через капроновую мембрану с диаметром пор 0.45 мкм. Оставшийся на мембране осадок промывали 2–4 раза смесью ПЭ : ТГФ (4 : 1). Полученный фильтрат использовали для определения содержания каротиноидов и хлорофиллов.

Омыление экстрактов. Для удаления хлорофиллов и жиров из экстракта проводили его омыление. Для этого к 10 мл экстракта (в стеклянной пробирке) добавляли 60 мкл свежеприготовленного раствора КОН (1 г/мл). Раствор тщательно перемешивали и инкубировали на водяной бане

при 45°C в течение 5 мин. Далее раствор охлаждали на льду, добавляли 4 мл дистиллированной воды и давали отстояться. Верхнюю ярко окрашенную фракцию использовали для анализа.

Приготовление стандартных растворов. Растворы β-каротина и лютеина в ацетоне или в смеси ПЭ : ТГФ (4 : 1) готовили из стандартных препаратов фирмы “Fluka” (Швейцария). Хлорофиллы *a* и *b* получали путем хроматографии на бумаге ацетонового экстракта зеленых листьев ячменя [21]. После разделения пигменты концентрировали на бумаге методом восходящей хроматографии и элюировали в минимальный объем ацетона. Аликвоты полученного раствора вносили в смесь ПЭ : ТГФ (4 : 1) или в ацетон. Хроматографию в тонком слое силикагеля проводили на пластинах Silica gel 60 (“Merck”, Германия) в системе растворителей гексан : ацетон : метанол (80 : 15 : 5).

Спектры поглощения растворов регистрировали на спектрофотометре Unikon 931 (“Kontron Instrument”, Германия) при спектральном разрешении 2 нм. Результаты измерений обрабатывали в электронных таблицах. Для оценки спектров поглощения каротиноидов и светопоглощающих примесей из спектров поглощения экстрактов вычитали спектры поглощения хлорофиллов *a* и *b*. Спектры анализировали, используя подходы, описанные в работах [27–29].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Семена растений значительно различались по степени экстрагируемости содержащихся в них пигментов. Сравнение спектров поглощения экстрактов, полученных из сухих семян капусты (легкоэкстрагируемые) и сои (трудноэкстрагируемые), показало, что использование в качестве экстрагирующей смеси ПЭ и ТГФ приводило к более полному извлечению пигментов из ткани семян по сравнению с растворителями, традиционно используемыми для экстракции пигментов из растительных тканей – ацетоном и его водными растворами, метанолом, смесью хлороформа с метанолом, петролейным эфиром (данные не приведены).

В данной работе проанализированы спектры поглощения экстрактов семян капусты, гороха, рапса, люпина, вики, сои, моркови, кукурузы, перца, томатов, тыквы и кабачков в смеси ПЭ и ТГФ (рис. 1 и 2). Как видно из рисунков, спектры экстрактов характеризовались наличием полос в области Соре (400–500 нм) и в красной области поглощения хлорофиллов, их предшественников и продуктов катаболизма хлорофиллов (550–670 нм).

Для количественного определения пигментов в экстрактах семян применяли те же подходы, что и при спектрофотометрическом определении со-

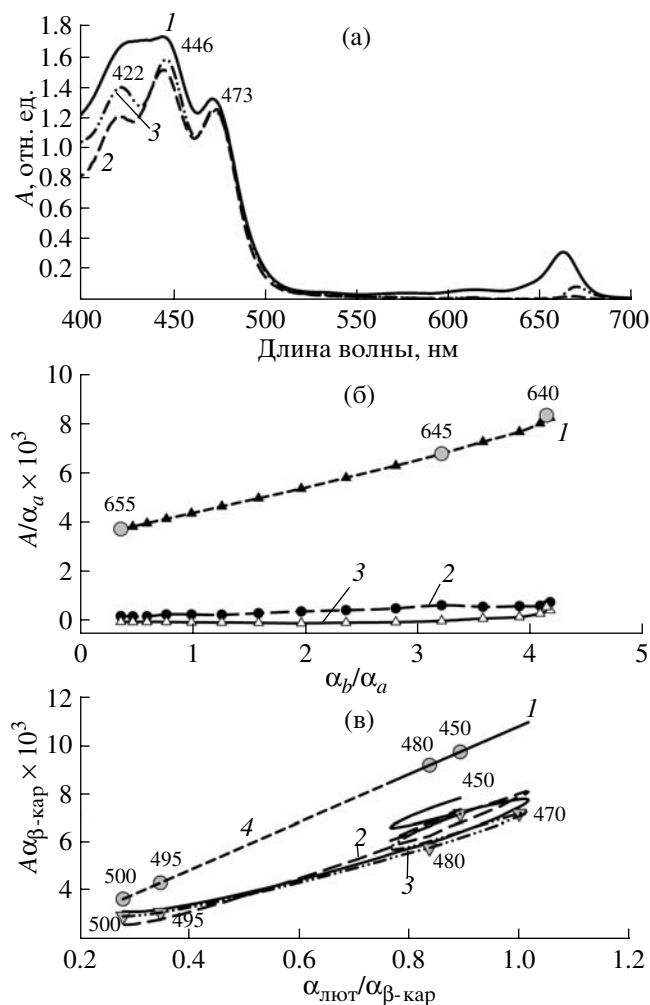


Рис. 1. Спектры поглощения экстракта семян капусты (сорта Бартоло, фракция менее зрелых семян) и зависимости отношений A/α_1 от α_2/α_1 , рассчитанные с использованием удельных коэффициентов поглощения отдельных пигментов.

а – спектры, полученные при использовании смеси петролейного эфира и тетрагидрофурана (4 : 1) до (1) и после омыления (2) экстрактов. Спектр (3) получен в результате вычитания из спектра поглощения экстракта (1) вклада хлорофиллов *a* и *b*; б – зависимости отношений A/α_a от α_b/α_a для кривых 1–3 в спектральном диапазоне 640–655 нм; в – зависимости отношений $A/\alpha_{\beta\text{-кар}}$ от $\alpha_{\text{лют}}/\alpha_{\beta\text{-кар}}$ в спектральном диапазоне 450–500 нм для кривых 1–3, кривая 4 – зависимость для спектра поглощения смеси β -каротина и лютеина, приготовленной в соотношении 1 : 10. Цифрами указаны длины волн.

держания пигментов в экстрактах зеленых листьев [22] и плодов растений [28]. С этой целью определяли удельные коэффициенты поглощения в смеси ПЭ : ТГФ чистых хлорофиллов *a* и *b*, а также β -каротина и лютеина, которые, по данным [9, 13, 14, 16], являются основными пигментами в семенах ряда культур, и выводили формулы для расчета концентрации пигментов по двух-

волновому методу [30]. Чтобы оценить, в каких случаях возможно применять полученные формулы для количественного определения пигментов, анализировали спектры в красной области поглощения хлорофиллов и в области поглощения каротиноидов по методу, описанному в работах [27, 28].

Спектр поглощения хлорофилла *a* в смеси ПЭ : ТГФ (4 : 1) отличался от спектра этого пигмента в ацетоне батохромным смещением основной полосы в области Сорс (на 3 нм) и небольшим перераспределением интенсивности полос спектра в полосе Сорс, при 579 и 616 нм (рис. 3а). При этом положение красного максимума хлорофилла *a* (при 662 нм) и интенсивность поглощения в этой полосе в смеси ПЭ : ТГФ оставались практически такими же, как и в ацетоне. По данным Lichtenthaler [3], удельный коэффициент хлорофилла *a* в ацетоне равняется 82.6 л/(г см); по данным, полученным в настоящей работе, – 82.7 в ацетоне и 82.3 в смеси ПЭ : ТГФ (табл. 1). Спектр поглощения хлорофилла *b* в смеси ПЭ : ТГФ (рис. 3а, табл. 1) также характеризовался смещением в красную область (на 2 нм) основной полосы пигмента в области Сорс по сравнению со спектром в ацетоне. Положение максимума и интенсивность поглощения красной полосы (645 нм) хлорофилла *b* в обоих растворителях оставались практически одинаковыми.

Из данных, представленных на рис. 3 и в табл. 1, видно, что спектры β -каротина в смеси ПЭ : ТГФ и в ацетоне были практически одинаковыми. В случае лютеина смена растворителя – ацетона на смесь ПЭ : ТГФ (4 : 1), сопровождалась смещением положения основных максимумов полос поглощения при 474 и 427 нм на 1 и 2 нм, соответственно, в синюю область и уменьшением интенсивности полос на 9–14% (табл. 1).

Положение полос поглощения в красной области спектров экстрактов семян капусты, гороха, рапса, люпина, вики, моркови и сои (рис. 2а, 2б), так же как и результаты тонкослойной хроматографии (данные не приведены), свидетельствуют о наличии в этих семенах хлорофиллов *a* и *b*. Поскольку каротиноиды не поглощают в красной области спектра, концентрацию хлорофиллов в экстрактах семян, по аналогии с экстрактами листьев [22], можно рассчитать, используя удельные коэффициенты поглощения пигментов в смеси ПЭ : ТГФ в этой области по двухволновому методу [28, 30]. Точность полученных при этом результатов зависит от наличия в экстрактах примесей, например, предшественников и продуктов катаболизма хлорофилла, спектры которых перекрываются со спектрами хлорофиллов [31]. При спектрофотометрическом определении концентрации хлорофиллов в экстрактах листьев высших растений в качестве критерия выполне-

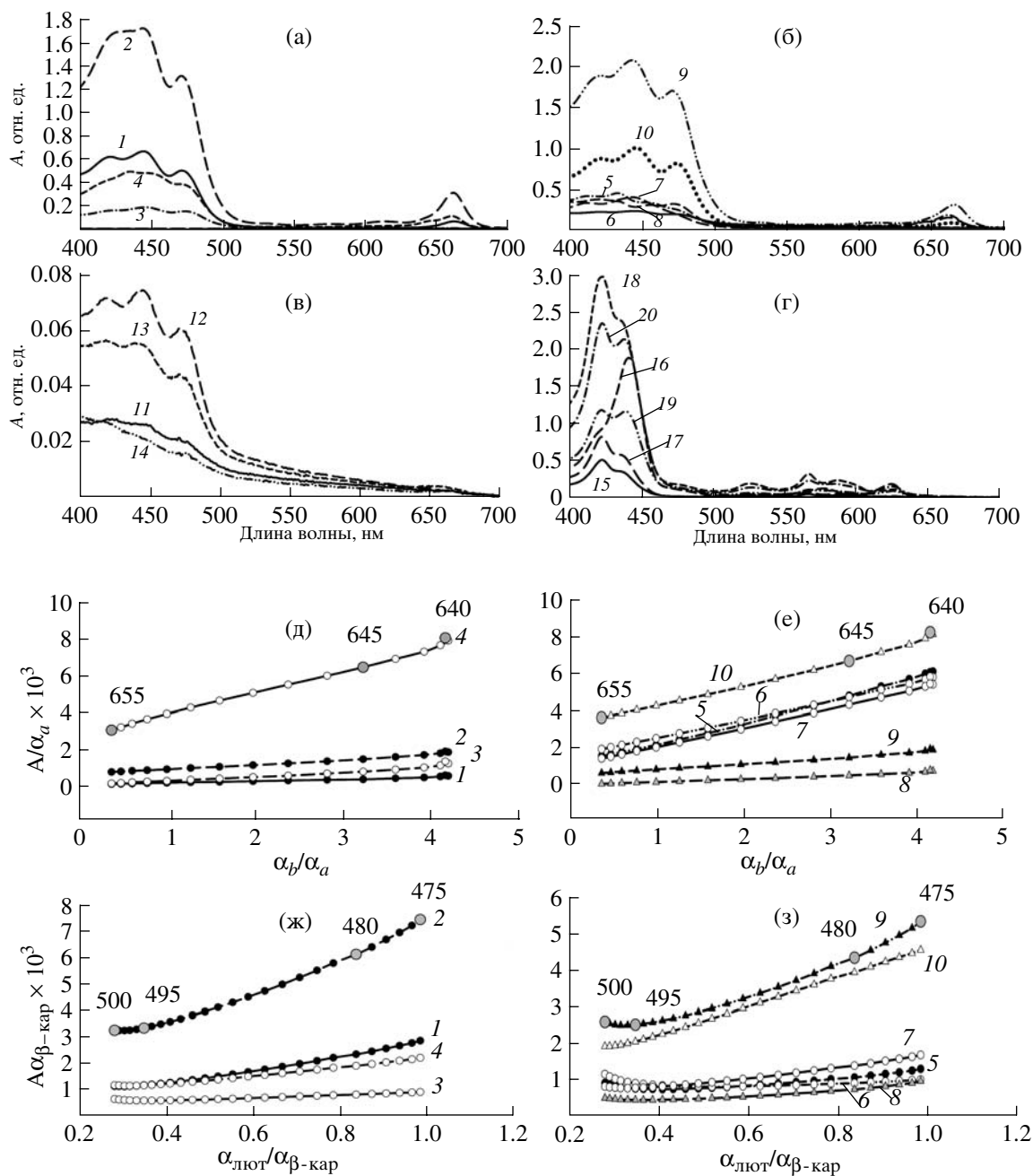


Рис. 2. Спектры поглощения экстрактов семян разных культурных растений и зависимости отношений A/α_1 от α_2/α_1 , рассчитанные с использованием удельных коэффициентов поглощения отдельных пигментов.

а–г – спектры, полученные при использовании смеси петролейного эфира и тетрагидрофурана (4 : 1); д, е – зависимости отношений A/α_a от α_b/α_a в спектральном диапазоне 640–655 нм; ж, з – зависимости отношений $A/\alpha_{\beta\text{-кар}}$ от $\alpha_{\text{лют}}/\alpha_{\beta\text{-кар}}$ в спектральном диапазоне 475–500 нм. Цифрами указаны длины волн. 1, 2 – фракции “более зрелых” и “менее зрелых” семян капусты сорта Бартоло, сортированные по интенсивности флуоресценции хлорофилла; 3, 4 – фракции “более зрелых” и “менее зрелых” семян гороха сорта Воронежский зеленый, сортированные по цвету семенной оболочки; 5 – семена вики сорта Глинковская элита; 6 – семена кукурузы сорта Ранняя лакомка; 7 – семена сои сорта Березина; 8 – семена моркови сорта Шантэнероля; 9 – семена люпина сорта Гулливер; 10 – семена рапса сорта Неман; 11 – семена перца сорта Золотой юбилей; 12 – семена пшеницы сорта Былина; 13 – семена тритикале сорта Михась; 14 – семена томатов сорта Золотое сердце; 15–17 – семена тыквы сортов Витаминная, Золотая корона, Улыбка; 18–20 – семена кабачков сортов Зебра, Золотинка, Аэронавт.

ния условия двухкомпонентности системы, в работах [27, 28] было предложено использование зависимости $A(\lambda)/\varepsilon_a(\lambda) = C_a + [\varepsilon_b(\lambda)/\varepsilon_a(\lambda)] C_b$, где

$A(\lambda)$ – спектр поглощения экстракта, $\varepsilon_a(\lambda)$ и $\varepsilon_b(\lambda)$ – спектры молярных коэффициентов поглощения, C_a и C_b – концентрации компонентов (хлоро-

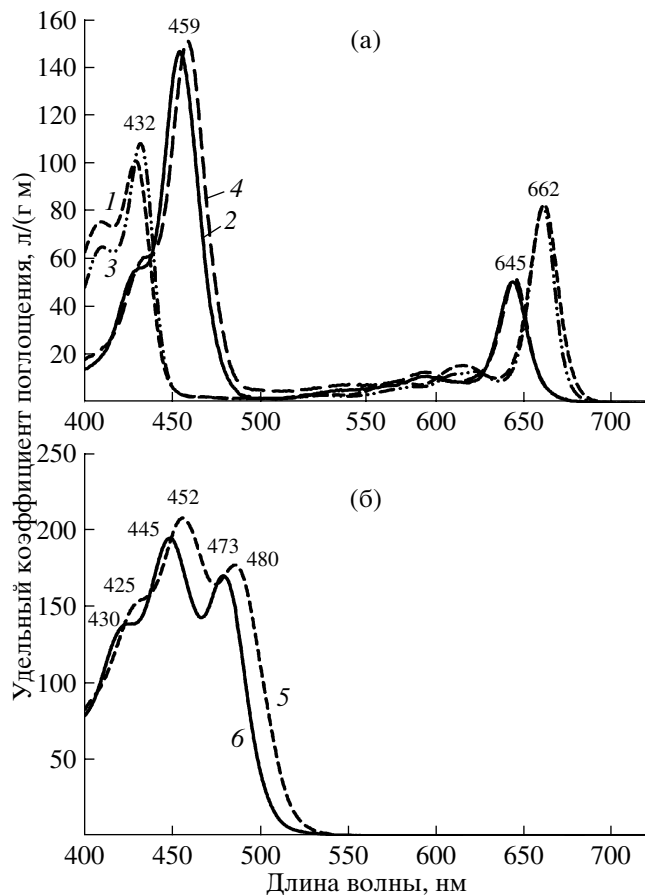


Рис. 3. Спектры поглощения растворов пигментов. а – хлорофиллы *a* (Хл *a*) и *b* (Хл *b*) в ацетоне (соответственно 1 и 2) и в смеси петролейного эфира и тетрагидрофурана (соответственно 3 и 4); б – β-каротин (5) и лютеин (6) в смеси петролейного эфира и тетрагидрофурана.

филлов) *a* и *b* соответственно. В случае двухкомпонентной системы зависимость $A(\lambda)/\epsilon_a(\lambda)$ от $\epsilon_b(\lambda)/\epsilon_a(\lambda)$ представляет собой прямую, тогда как в присутствии примесей, поглощающих свет в красной области, линейный характер зависимости теряется. В этих координатах пересечение прямой с ординатой дает величину C_a , а угол ее наклона равен C_b [28].

Проведенный в данной работе анализ красной области (630–670 нм) спектров экстрактов семян капусты в координатах $A(\lambda)/\alpha_a(\lambda) - \alpha_b(\lambda)/\alpha_a(\lambda)$, где $\alpha_b(\lambda)$ и $\alpha_a(\lambda)$ – спектры удельных коэффициентов поглощения хлорофиллов *a* и *b*, показал, что линейная зависимость $A(\lambda)/\alpha_a(\lambda)$ от $\alpha_b(\lambda)/\alpha_a(\lambda)$ наблюдается в диапазоне длин волн от 656 до 645 нм (рис. 1б), который и может быть использован для расчета содержания хлорофиллов *a* и *b*.

Подставляя удельные коэффициенты поглощения пигментов в смеси ПЭ : ТГФ при 645 и 655 нм, равные 16.32 и 59.17 для хлорофилла *a*, 52.42

и 20.99 л/(г см) для хлорофилла *b* соответственно, в уравнение для двух длин волн, получили следующие формулы:

$$C_a = 19.00 A_{655} - 7.61 A_{645}, \quad (1)$$

$$C_b = 21.45 A_{645} - 5.92 A_{655}, \quad (2)$$

$$C_{a+b} = 13.08 A_{655} + 13.84 A_{645}, \quad (3)$$

где A – поглощение раствора при 655 и 645 нм, C_a – концентрация хлорофилла *a* (мг/л), C_b – концентрация хлорофилла *b* (мг/л).

Как известно, спектры поглощения хлорофиллов и каротиноидов значительно перекрываются в синей области (рис. 3), однако, рассчитав концентрацию хлорофилла *a* по формуле (1) и *b* по формуле (2) и используя спектры индивидуальных пигментов, можно вычлест вклад каждого из них в спектр поглощения суммарной вытяжки пигментов при всех длинах волн. Полученный в результате вычитания спектр (рис. 1а, кривая 3) может быть использован для оценки присутствующих в экстрактах каротиноидов и других светопоглощающих примесей. “Остаточный” спектр в его синей области анализировали в координатах $A(\lambda)/\alpha_{\beta\text{-кар}}(\lambda) - \alpha_{\text{лют}}(\lambda)/\alpha_{\beta\text{-кар}}(\lambda)$, где $A(\lambda)$ – спектр поглощения, $\alpha_{\text{лют}}(\lambda)$ и $\alpha_{\beta\text{-кар}}(\lambda)$ – спектры удельных коэффициентов поглощения лютеина и β-каротина соответственно, чтобы определить, в каких случаях возможен количественный расчет β-каротина и лютеина (рис. 1в). Было обнаружено, что в “остаточном” спектре экстрактов семян капусты зависимость $A(\lambda)/\alpha_{\beta\text{-кар}}(\lambda)$ от $\alpha_{\text{лют}}(\lambda)/\alpha_{\beta\text{-кар}}(\lambda)$ имеет близкий к линейному характер в области 470–500 нм. Учитывая результаты анализа других “остаточных” спектров, расчет концентрации β-каротина и лютеина производили, используя поглощение при 495 и 480 нм.

Формулы для расчета концентрации β-каротина и лютеина в двухкомпонентном растворе этих веществ выводили, используя удельные коэффициенты поглощения β-каротина и лютеина при 480 и 495 нм, равные 177.82 и 99.29, 148.07 и 34.15 л/(г см) соответственно. Получили следующие уравнения:

$$C_{\beta\text{-кар}} = 17.16 A_{495} - 3.96 A_{480}, \quad (4)$$

$$C_{\text{лют}} = 11.51 A_{480} - 20.61 A_{495}, \quad (5)$$

где A – поглощение раствора при 480 и 495 нм, $C_{\beta\text{-кар}}$ – концентрация β-каротина (мг/л), $C_{\text{лют}}$ – концентрация лютеина (мг/л).

При расчете количества β-каротина и лютеина в экстрактах семян в формулах (4 и 5) использовали оптическую плотность “остаточного” спектра (при 480 и 495 нм), рассчитанную, исходя из равенства:

$$A'(\lambda) = A^\circ(\lambda) - [\alpha_a(\lambda) C_a + \alpha_b(\lambda) C_b], \quad (6)$$

где $A'(\lambda)$ – “остаточное” поглощение раствора после вычитания вкладов хлорофиллов a и b , $A^\circ(\lambda)$ – поглощение исходного раствора.

Подставив в уравнение (6) выражения для C_a и C_b из уравнений (1) и (2), получили:

$$A'(\lambda) = A^\circ(\lambda) - [19.0\alpha_a(\lambda) - 5.95\alpha_b(\lambda)]A_{655} - [21.45\alpha_b(\lambda) - 7.61\alpha_a(\lambda)]A_{645}. \quad (7)$$

С учетом удельных коэффициентов поглощения хлорофиллов a и b уравнения для расчета “остаточного” поглощения при 480 и 495 нм выглядят так:

$$A_{480} = A_{480}^\circ - 0.566 A_{645} + 0.121 A_{655}, \quad (8)$$

$$A_{495} = A_{495}^\circ - 0.112 A_{645} - 0.0036 A_{655}, \quad (9)$$

где $\alpha_a(480) = 2.08 \times 10^{-3}$, $\alpha_b(480) = 27.14 \times 10^{-3}$, $\alpha_a(495) = 2.04 \times 10^{-3}$, $\alpha_b(495) = 5.95 \times 10^{-3}$ л/(мг см).

Анализ красной области спектров экстрактов ряда семян в координатах $A(\lambda)/\alpha_a(\lambda) - \alpha_b(\lambda)/\alpha_a(\lambda)$ показал, что среди исследованных культур (помимо капусты) спектры экстрактов семян гороха, кукурузы, рапса, люпина, вики, моркови и сои могут быть использованы для количественного расчета содержания хлорофиллов (рис. 2а, 2б, 2д, 2ж). В то же время, было отмечено, что количественное определение хлорофиллов в спектрах экстрактов семян пшеницы, томатов, перца, тритикале (рис. 2в) затруднено из-за низкого количества пигмента и светорассеяния образцов. Спектры экстрактов семян тыквы и кабачков свидетельствуют о наличии в них значительных количеств протохлорофилл(ид)а (полосы при 438, 532.5, 571 и 622 нм) и протофеофорбида (полосы при 422, 524, 566, 587 и 625.5 нм) (рис. 2г), что согласуется с данными [32].

Как видно из данных рис. 2 (е, з), “остаточные” спектры экстрактов семян моркови, рапса, вики, сои, кукурузы, люпина и гороха, также как и “остаточный” спектр семян капусты характеризуются наличием линейных участков в области 495–480 нм в координатах $A(\lambda)/\alpha_{\beta\text{-кар}}(\lambda) - \alpha_{\text{лют}}(\lambda)/\alpha_{\beta\text{-кар}}(\lambda)$ и, соответственно, пригодны для расчета содержания β -каротина и лютеина. В спектрах экстрактов семян томатов, баклажана и перца, проанализированных в этих координатах в области $S_{\text{оре}}$, участки линейной зависимости не выявлены, что свидетельствует о наличии в экстрактах дополнительных светопоглощающих компонентов в этой части спектра и не позволяет использовать их для количественных расчетов по приведенным выше уравнениям (данные не приведены). Расчет содержания каротиноидов в экстрактах семян тыквы и кабачков затруднен присутствием протохлорофилл(ид)а и протофеофорбида/протофеофитина, дающих значительный вклад в области поглощения $S_{\text{оре}}$ (рис. 2г).

Таблица 1. Положение максимумов (λ) и удельные коэффициенты поглощения (α) хлорофиллов a и b , β -каротина, лютеина в ацетоне и в смеси петролейного эфира и тетрагидрофурана

Пигмент	Ацетон		ПЭ : ТГФ (4 : 1)	
	λ , нм	α , л/(г см)	λ , нм	α , л/(г см)
Хлорофилл a	662	82.7	662	82.3
	616	15.8	623	13.3
	579	9.1	589	6.9
	533	3.8	537	3.3
	430	101.2	432	108.5
Хлорофилл b	410	75.9	411	65.4
	645	50.7	645	52.4
	595	11.3	594	12.9
	455	146.9	459	151.4
	410	75.9	411	65.4
β -Каротин	480	177.3	480	177.3
	452	208.0	452	208.0
	430	154.8	430	154.8
Лютеин	474	197.3	473	170.2
	445	217.5	445	195.0
	427	151.7	425	139.0

Известно, что омыление экстрактов растительных тканей приводит к практически полному удалению из них хлорофиллов. Включение ТГФ в смесь для экстракции не вызывает изменения спектров каротиноидов и не приводит к появлению дополнительных полос в спектрах поглощения после омыления растворов чистых хлорофиллов, β -каротина и лютеина. Сравнение спектров, отражающих поглощение экстракта семян капусты после его омыления (рис. 1а, кривая 2) и после вычитания из спектра экстракта вклада хлорофилла математическим путем (кривая 3), обнаруживает наибольшую близость этих спектров в области полосы при 473 нм. Более высокая (на 5–6%) интенсивность поглощения моделированного спектра (кривая 3) по сравнению со спектром неомыляемой фракции (кривая 2), наблюдаемая в максимумах при 446 и 422 нм, может быть связана как с присутствием в экстрактах помимо хлорофиллов и каротиноидов и других компонентов, поглощающих в данной области, например, продуктов порфириновой природы [31], так и с потерями каротиноидов в процессе омыления.

В табл. 2 приведены данные о содержании хлорофилла a , хлорофилла b , каротинов и ксантофиллов в семенах ряда культурных растений, рассчитанные с использованием приведенных выше формул. Видно, что содержание пигментов сильно варьирует у семян разных видов и сортов. Ко-

Таблица 2. Содержание хлорофиллов *a* и *b*, каротинов и ксантофиллов в экстрактах, выделенных из семян культурных растений смесью петролейного эфира и тетрагидрофурана

Вид	Сорт	Хлорофиллы, мкг/г сухого вещества		Каротиноиды, мкг/г сухого вещества		К/Кс
		Хл <i>a</i>	Хл <i>b</i>	каротины (К)	ксантофиллы (Кс)	
Соя	Ясельда	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.59 ± 0.01	0.43 ± 0.01	1.37
	Березина	0.17 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.42 ± 0.01	1.54 ± 0.01	0.27
	Припять	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.53 ± 0.01	0.33 ± 0.01	1.61
Кукуруза	Алеся	0.27 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.65 ± 0.01	2.37 ± 0.01	0.27
	Немо	0.16 ± 0.01	0.35 ± 0.01	1.86 ± 0.01	0.95 ± 0.01	1.96
Вика	Глинковская элита	7.65 ± 0.01	4.32 ± 0.01	2.38 ± 0.01	2.78 ± 0.01	0.86
	Натали	5.50 ± 0.01	4.29 ± 0.01	2.74 ± 0.01	3.60 ± 0.02	0.76
	Чарауница	0.66 ± 0.01	0.77 ± 0.01	1.99 ± 0.01	2.14 ± 0.01	0.93
Люпин	Першацвет	0.79 ± 0.01	0.32 ± 0.01	2.29 ± 0.01	5.06 ± 0.01	0.45
	Гулливер	2.83 ± 0.01	1.26 ± 0.01	2.70 ± 0.02	6.40 ± 0.01	0.42
	Грей	0.38 ± 0.01	0.28 ± 0.01	1.55 ± 0.01	4.73 ± 0.01	0.33
Морковь	Шантэнероаль	26.31 ± 1.69	25.42 ± 1.74	4.36 ± 0.22	7.79 ± 0.33	0.56
	Тушон	9.62 ± 0.08	10.29 ± 0.12	2.39 ± 0.13	2.81 ± 0.16	0.85
Рапс	Неман	2.34 ± 0.19	1.15 ± 0.07	2.62 ± 0.01	14.24 ± 0.02	0.18
	Явар	4.42 ± 0.01	1.63 ± 0.01	2.97 ± 0.02	13.44 ± 0.05	0.22
	Антей	2.43 ± 0.02	1.01 ± 0.04	2.00 ± 0.06	10.34 ± 0.06	0.19
<i>Семена, сортированные по зрелости</i>						
Капуста	Бартоло, БЗС	2.30 ± 0.02	0.76 ± 0.01	1.00 ± 0.01	7.51 ± 0.03	0.13
	Бартоло, МЗС	10.4 ± 0.02	3.26 ± 0.02	3.92 ± 0.02	17.05 ± 0.02	0.23
Горох	Воронежский, БЗС	0.91 ± 0.01	1.07 ± 0.01	2.75 ± 0.01	2.96 ± 0.01	0.93
	Воронежский, МЗС	5.69 ± 0.01	4.75 ± 0.01	2.86 ± 0.01	6.27 ± 0.02	0.46

Примечание. БЗС и МЗС – фракции “более зрелых” и “менее зрелых” семян.

личество пигментов также значительно зависит от степени зрелости семян. Так, у менее зрелых семян капусты сорта Бартоло содержание хлорофиллов равнялось 13.66 ± 0.04 , а сумма каротиноидов – 20.97 ± 0.03 мкг/г, тогда как в более зрелых семенах, отсортированных из той же партии, обнаруживалось 3.06 ± 0.02 и 8.51 ± 0.02 мкг/г хлорофиллов и каротиноидов. Можно отметить также, что наибольшее содержание каротиноидов наблюдается в семенах рапса, люпина и в партиях менее зрелых семян капусты и гороха. Семена сои и кукурузы были обогащены β-каротином (за исключением сортов Березина и Алеся), тогда как в семенах вики, люпина, моркови, рапса, партиях зрелых семян капусты и гороха преобладал лютеин.

Таким образом, выведены уравнения, позволяющие оценить количество β-каротина, лютеина, хлорофилла *a* и хлорофилла *b* в растворе ПЭ : ТГФ (4 : 1), содержащем смесь указанных компонентов. Показано, что эти уравнения могут быть использованы для расчета количества пигментов в вытяжках из ткани семян. Вычитание математическим способом из спектра поглощения экстракта вклада, обусловленного присутствием хлорофиллов, позволяет без проведения омыления получать спектры поглощения каротиноидов в экстрактах и рассчитывать в них содержание каротинов и ксантофиллов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Белорусского фонда фундаментальных исследований (№ Б06-229) и международного реинтеграционного гранта НАТО (№ 981402).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Weedon B.C.L.* Carotenoid Research – Past, Present and Future // *Pure Appl. Chem.* 1979. V. 51. P. 435–445.
2. *Goodwin T.W.* Plants // *The Biochemistry of the Carotenoids.* V. 1 / London: Chapman and Hall, 1980.
3. *Lichtenthaler H.K.* Chlorophyll and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes // *Methods Enzymol.* 1987. V. 148. P. 331–382.
4. *Карнаухов В.Н.* Биологические функции каротиноидов. М.: Наука, 1988. 240 с.
5. *Havaux M.* Carotenoids as Membrane Stabilizers in Chloroplasts // *Trends Plant Sci.* 1998. V. 3. P. 147–151.
6. *Niyogi K.K.* Photoprotection Revisited: Genetic and Molecular Approaches // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1999. V. 50. P. 333–359.
7. *Стржалка К., Костецкая-Гугала А., Латовски Д.* Каротиноиды растений и стрессовое воздействие окружающей среды: роль модуляции физических свойств мембран каротиноидами // *Физиология растений.* 2003. Т. 50. С. 188–193.
8. *Ладыгин В.Г., Ширишкова Г.Н.* Современные представления о функциональной роли каротиноидов в хлоропластах эукариот // *Журн. общей биологии.* 2006. Т. 67. С. 163–189.
9. *Howitt C.A., Pogson B.J.* Carotenoids Accumulation and Function in Seeds and Non-Green Tissues // *Plant, Cell Environ.* 2006. V. 29. P. 435–445.
10. *Kaiser R., Kraft P.* Surprising Aromatic Experiences – New and Unusual Fascinating Floral Scents from Nature // *Chem. Unserer Z.* 2001. V. 35. P. 8–22.
11. *Merzlyak M.N., Solovchenko A.E.* Photostability of Pigments in Ripening Apple Fruit: A Possible Photoprotective Role of Carotenoids during Plant Senescence // *Plant Sci.* 2002. V. 163. P. 881–888.
12. *Maluf M.P., Saab I.N., Wurtzel E.T., Sachs M.M.* The Viviparous¹² Maize Mutant Is Deficient in Abscisic Acid, Carotenoids and Chlorophyll Synthesis // *J. Exp. Bot.* 1997. V. 48. P. 1259–1268.
13. *Pinzino C., Nanni B., Zandomenighi M.* Aging, Free Radicals and Antioxidants in Wheat Seeds // *J. Agric. Food Chem.* 1999. V. 47. P. 1333–1339.
14. *Galeschi L., Capocchi A., Ghiringhelli S., Saviozzi F.* Antioxidants, Free Radicals, Storage Proteins, and Proteolytic Activities in Wheat (*Triticum durum*) Seeds during Accelerated Aging // *J. Agric. Food Chem.* 2002. V. 50. P. 5450–5457.
15. *Korsell D.A., Korsell D.E.* Accumulation and Bioavailability of Dietary Carotenoids in Vegetable Crops // *Trends Plant Sci.* 2006. V. 11. P. 499–507.
16. *Shewmaker C.K., Sheehy J.A., Daley M., Colburn S., Ke D.Y.* Seed-Specific Overexpression of Phytoene Synthase: Increase in Carotenoids and Other Metabolic Effects // *Plant J.* 1999. V. 20. P. 401–412.
17. *Lindgren O.L., Stalberg K.J., Hoglund A.S.* Seed-Specific Overexpression of an Endogenous Arabidopsis Phytoene Synthase Gene Results in Delayed Germination and Increased Levels of Carotenoids, Chlorophyll, and Abscisic Acid // *Plant Physiol.* 2003. V. 132. P. 779–785.
18. *Калинин Ф.Л., Лобов В.П., Жидков В.А.* Справочник по биохимии. Киев: Навук. думка, 1971. 764 с.
19. *Mackinney G.J.* Absorption of Light by Chlorophyll Solutions // *J. Biol. Chem.* 1941. V. 140. P. 315–322.
20. *Davies B.H.* Analysis of Carotenoid Pigments // *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* / Ed. Goodwin T.W. London: Academic, 1965. P. 183–230.
21. *Шлык А.А.* О спектрофотометрическом определении хлорофиллов *a* и *b* // *Биохимия.* 1968. Т. 3. С. 275–285.
22. *Шлык А.А.* Определение хлорофилла и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // *Биохимические методы в физиологии растений* / Под ред. Павлиновой О.А. М.: Наука. 1971. С. 154–170.
23. *Oliver J., Palou A., Pons A.* Semi-Quantification of Carotenoids by High-Performance Liquid Chromatography: Saponification-Induced Losses in Fatty Foods // *J. Chromatogr. A.* 1998. V. 829. P. 393–399.
24. *Rodrigues-Amaya D.B., Kimura M.* Handbook for Carotenoids Analysis. Washington, D.C.: Harvest Plus, 2004. 58 p.
25. *Howe J.A., Tanumiharadio S.A.* Evaluation of Analytical Methods for Carotenoids Extraction from Modified Maize (*Zea mays* sp.) // *J. Agric. Food Chem.* 2006. V. 54. P. 7992–7997.
26. *Jalink H., van der Schoor R., Frandas A., van Pijlen J.G., Bino R.J.* Chlorophyll Fluorescence of *Brassica oleracea* L. Seeds as a Non-Destructive Marker for Seed Maturity and Seed Performance // *Seed Sci. Res.* 1998. V. 8. P. 437–443.
27. *Берштейн И.Я., Каминский Ю.Л.* Спектрофотометрический анализ в органической химии. Л.: Химия, 1986. 199 с.
28. *Мерзляк М.Н., Чивкунова О.Б., Лехимена Л., Белевич Н.П.* Ограничения и дополнительные возможности спектрофотометрического анализа пигментов в экстрактах листьев высших растений // *Физиология растений.* 1996. Т. 43. С. 926–936.
29. *Соловченко А.Е., Чивкунова О.Б., Мерзляк М.Н., Решетникова И.В.* Спектрофотометрический анализ пигментов в плодах яблони // *Физиология растений.* 2001. Т. 48. С. 801–808.
30. *Vierordt K.* Die Anwendung des Spectralapparates zur Photometrie der Absorptionsspectren und zur quaitativen chemischen Analyse. Tubingen, 1873. 170 p.
31. *Smith J.H.C., Benitez A.* Chlorophylls: Analysis in Plant Materials // *Modern Methods of Plant Analysis* / Eds Paech K., Tracey M. Berlin: Springer-Verlag, 1955. V. 4. P. 142–196.
32. *Акулович Н.К.* Формирование и состояние фотоактивного протохлорофиллового пигмента / Под ред. Шлыка А.А. Минск: Наука и техника, 1983. 221 с.