

## СПЕКТРОФОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИТИНОВОЙ КИСЛОТЫ В СЕМЕНАХ ТЫКВЫ

Л.И. Бутенко, А.А. Шамилов, Е.С. Уварова, Д.С. Золотых, Ж.В. Подгорная

ФГБОУ ВО Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал

Поступила в редакцию 29.03.2025 г.

**Аннотация.** Фитиновую кислоту, как биологически активное соединение стали изучать во второй половине XX столетия. С одной стороны ее относят к антинутриентам, которые снижают биодоступность питательных веществ (микронутриентов: селен, цинк, йод, железо, витамины), содержащихся в продуктах питания. Для нее же установлена противораковая активность и она предлагается в качестве средства для химиопрофилактики рака. Кроме того, установлено, что ее можно использовать в качестве защитного средства при патологии болезни Альцгеймера.

Целью нашего исследования является разработка спектрофотометрического количественного определение содержания фитиновой кислоты в семенах тыквы с использованием реактива Вэйда.

В работе представлены результаты исследований количественного содержания фитиновой кислоты в семенах тыквы сортов Бенинказа Акулина, Бенинказа Кульминская, Россиянка и чалмовидная, а также в мякоти и кожуре тыквы чалмовидной. Количественное содержание фитиновой кислоты проводили спектрофотометрическим методом с использованием реактива Вейда.

Наиболее простым и удобным методом определения содержания фитиновой кислоты является использование реактива Вэйда (железо сульфосалицилатный комплекс), который можно использовать для качественных реакций, хроматографических исследований и спектрофотометрического определения. В работе изучена зависимость оптической плотности комплексов фитиновой кислоты от убыли реагента - реактивом Вэйда. Таким образом, по снижению оптической плотности комплекса можно определить количественное содержание фитиновой кислоты.

В результате проведенных исследований определено содержание фитиновой кислоты в семенах тыквы Россиянка-  $1,94 \pm 0,11\%$ , чалмовидной -  $2,72 \pm 0,13\%$ , Бенинказа Акулина  $1,72 \pm 0,12\%$ , и Бенинказа Кульминская  $2,02 \pm 0,10\%$ , а также в мякоти тыквы чалмовидной –  $1,8 \pm 0,10\%$  и кожуре тыквы чалмовидной –  $1,35 \pm 0,11\%$ .

В результате проведенных исследований установлено, что все семена тыквы содержат фитиновую кислоту ( $1,72$  -  $2,72\%$ ), которая обладает антиоксидантными свойствами. В семенах фитиновой кислоты больше чем в мякоти и кожуре.

**Ключевые слова:** фитиновая кислота, антинутриент, семена тыквы, бумажная хроматография, реактив Вэйда, спектрофотометрия, калибровочный график.

В настоящее время в литературе существует большое количество противоречивой информации о целебных свойствах и противопоказаниях фитиновой кислоты (гексаfosфорилированного инозитола), которую как биологически активное соединение стали изучать только во второй половине XX столетия. Фитиновая кислота используется в промышленности в качестве пищевой добавки с присвоенным индексом Е391, которая отнесена к группе антиоксидантов и выполняет технологическую функцию флокулянта (очисти-

теля) и осветлителя продукта. В России с 2008 года использование добавки Е 391 в пищевой промышленности запрещено СанПиНом 2.3.2.2364-08 [1].

Фитиновая кислота относится к антинутриентам, которые снижают биодоступность питательных веществ (микронутриентов: селен, цинк, йод, железо, витамины), содержащихся в продуктах питания [2, 3, 4]. С другой стороны, установлено, что фитиновая кислота обладает противораковой активностью и предлагается в качестве средства для химиопрофилактики рака [5, 6, 7, 8, 9]. Кроме того, установлено, что ее можно использовать

в качестве защитного средства при патологии болезни Альцгеймера [10,11]. Фитиновая кислота образуется во время созревания почти всех семян и составляет 60-90% от общего содержания фосфора в растениях. В литературе в подробных обзорах [12,13,14,15] рассматривается положительная и отрицательная роль фитиновой кислоты в питании человека. Кроме того, авторы приходя к выводу о необходимости стандартизации продуктов питания по фитиновой кислоте. Поэтому актуальными являются исследования, посвященные разработке количественного определения фитиновой кислоты в растительных объектах.

В литературе описаны многочисленные методики определения фитиновой кислоты [16,17,18]. В целом, их можно разделить на две большие группы:

1) Методики с использованием цветных реагентов, представляющих собой сложные и достаточно устойчивые комплексы железа с лигандами, такими как 1,10-фенантролин, катехолы, сульфосалициловая кислота, тиоционат.

Фитиновая кислота способна вытеснять железо из таких комплексов, образуя более устойчивые неокрашенные комплексы. Детектирование образования фитата железа или исходных окрашенных комплексов железа с лигандами проводят как с использованием спектрофотоколориметрических методов анализа, так с использованием ВЭЖ-хроматографии с различными детекторами (ионный, УФ, флуоресцентный, хемолюминесцентный).

2) Методики по определению фосфорсодержащих соединений в виде фосфатов, фосфорных эфиров ( $^{31}\text{P}$ -ЯМР, потенциометрия) и определение общего фосфора, например ванадиево-молибдатным методом.

Наиболее простым и удобным методом определения содержания фитиновой кислоты является использование реактива Вэйда (железо сульфосалицилатный комплекс), который можно использовать для качественных реакций, хроматографических исследований и спектрофотометрического определения.

Целью нашего исследования является разработка спектрофотометрического количественного определение содержания фитиновой кислоты в семенах тыквы с использованием реактива Вэйда.

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Фитиновая кислота- пищевая добавка высокой степени очистки, производство; Shaanxi, Hongda, Phytochemistry, Co., Ltd. CAS No. 83-86-3

Семена тыквы: сорт Бенинказа Акулина и Бенинказа Кульминская (выращенные на базе Никитского ботанического сада). Семена были собраны в сентябре 2021 года,

Тыква чалмовидная была выращена на дачном участке г Пятигорска. Мякоть, кожура и семена были отделены друг от друга, измельчены и высушены в сушильном шкафу при температуре 60° С.

Семена тыквы Россиянка были приобретены в магазине «Семена» г. Пятигорска.

*Получение экстрактов мякоти, кожуры и семян тыквы чалмовидной для определения фитиновой кислоты.*

Около 10 грамм (точная навеска) измельченных семян (мякоти, кожуры) помещали в колбу вместимостью 500мл, добавляли 200мл раствора кислоты хлористоводородной разбавленной (концентрация 2,4 %). Указанную смесь перемешивали стеклянной палочкой до гомогенного состояния и оставляли при комнатной температуре на 24 часа. Раствор фильтровали через бумажный фильтр, фильтрат использовали для дальнейших исследований.

*Качественные реакции.* Реактив Вэйда.

- Раствор А - 0,3240 г сульфосалициловой кислоты растворяют в 100 мл воды.
- Раствором Б - 0,0324 г  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 100 мл воды.

Реактив Вэйда всегда готовится непосредственно перед анализом смешивая раствор А с раствором Б в соотношении 1:1 по объему. В результате 1 мл реагента содержал 0,2 мкмоль железа.

*Хроматографические исследования.* На бумагу для хроматографии *filtra* ТЕЧ СН51 F на линию старта капилляром наносили 1% раствор стандартного образца фитиновой кислоты и исследуемые экстракты. Разделение проводили восходящим методом в системе бутанол: уксусная кислота: вода = 4 : 1 : 2 (БУВ = 4:1:2). Полученные хроматограммы обрабатывали реактивом Вэйда. Фитиновая кислота проявлялась белыми пятна на фиолетовом фоне.

*Спектрофотометрические исследования* были выполнены на спектрофотометре СФ 103 в кварцевых кюветах (толщина слоя 10 мм) в диапазоне длин волн 300–600 нм.

*Количественное определение.* Определение фитиновой кислоты основано на ее способности конкурентно связывать ионы металлов в составе окрашенных комплексов, в следствие чего их окраска ослабевает. Таким образом, по снижению оптической плотности комплекса можно определить присутствие и количественное содержание фитиновой кислоты [18, 19].

Содержание инозитгексафосфорной кислоты (ИГФК) в сырье рассчитывали по формуле:  

$$\text{ИГФК, \%} = \frac{(\text{Fe (III)}_{\text{н}} - \text{Fe (III)}_{\text{ост}}) \cdot 2,9547 \cdot V_p \cdot 100}{\text{Вал. г}}$$

Где  $\text{Fe(III)}_{\text{н}}$  - начальное количество железа (III), мг,  $\text{Fe(III)}_{\text{ост}}$  - непрореагировавшее количество железа (III), мг, 2,9547 – коэффициент пересчета (Мм ИГФК: Ат.м.4 Fe),  $V_p$  - объем 2,4% -ного раствора хлороводородной кислоты, взятый для экстракции инозитгексафосфорной кислоты из сырья, мл,  $V_{\text{ал.}}$  – аликвотный объем экстракта, мл, г - навеска сырья, мг.

*Построение калибровочного графика.*

Для построения калибровочного графика использовали 1% раствор фитиновой кислоты концентраций  $C = 0,01\text{г/мл}$ ). Далее готовили разбавления.

Таблица 1

*Разбавления растворов фитиновой кислоты.*

№	Конц фитиновой кислоты, %	V 1% раствора Фитиновой кислоты	V воды
1	0,0	0	0,0
2	0,1	1	9
3	0,2	2	8
4	0,3	3	7
5	0,4	4	6
6	0,5	5	5
7	0,7	7	3

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На исследования были представлены 4 сорта семян тыквы, а для тыквы чалмовидной для сравнения были исследованы мякоть и кожура. На основе всех образцов, выбранных для исследования, были получены экстракты раствором кислоты хлористоводородной  $W = 2,4\text{ \%}$ .

Наличие фитиновой кислоты в полученных экстрактах доказывали методом бумажной хроматографии с использованием достоверного образца свидетеля. Результаты хроматографических исследований проведены на рисунке 1.

Как видно из рисунка, во всех образцах присутствует фитиновая кислота.

Предварительно были исследованы растворы различной концентрации достоверного образца фитиновой кислоты с реагентом Вейда. Растворы фиолетового цвета различной интенсивности исследовали на спектрофотометре в диапазоне длин волн 300–600 нм. Результаты исследования представлены на рис. 2.

Как видно из рисунка 2, за аналитическую длину волны необходимо принять поглощение (A) при  $\lambda = 504\text{nm}$ . Результаты

УФ-спектрофотометрического определения поглощения A по сравнению с Ao в котором концентрация кислоты равна разности ( $Ao - A_{\text{ср}}$ ) растворов фитиновой кислоты различной концентрации представлены в табл. 2.

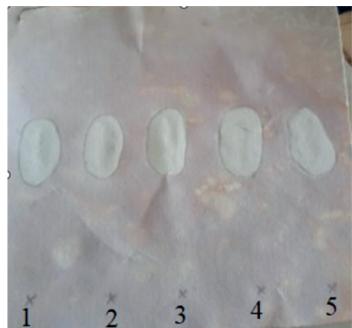


Рис. 1. Хроматограмма фитиновой кислоты (1) и экстрактов семян сорта Бенинказа Акулина (2), сорта Бенинказа Кульминская (3), сорта тыквы чалмовидная (4) и сорта Россиянка (5), значения  $Rf = 0,52$ .

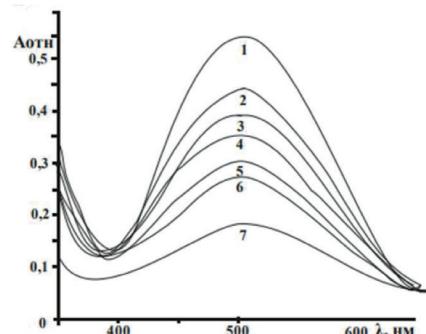


Рис. 2. УФ-спектры раствора реагента Вэйда и фитиновой кислоты различной концентрации.

Таблица 2

*Результаты УФ-спектрофотометрического определения поглощения A по сравнению с  $A_o$  растворов фитиновой кислоты.*

№	Конц фитиновой кислоты, %	A среднее	$Ao - A_{\text{ср}}$
1	0,000	0,548	0,0000
2	0,1	0,451	0,097
3	0,2	0,396	0,152
4	0,3	0,359	0,190
5	0,4	0,312	0,236
6	0,5	0,273	0,274
7	0,7	0,199	0,349

Для доказательства линейности полученной зависимости оптической плотности от убыли окрашенного реагента строили график (рис.3).

Для количественных определений содержания фитиновой кислоты семенах тыквы строили калибровочный график (рис. 4).

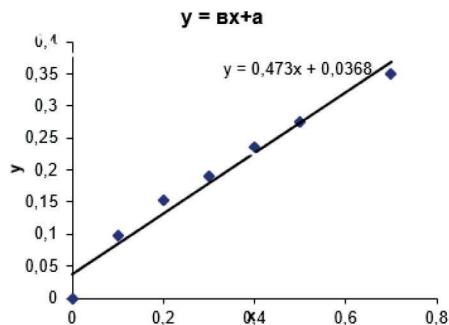


Рис. 3. Зависимость оптической плотности от убыли окрашенного реагента.

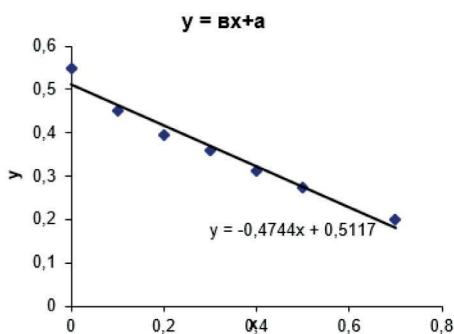


Рис. 4. Калибровочный график по фитиновой кислоте.

Как видно из калибровочного графика (рис. 4), подчинение закону Бугера-Ламберта-Бера для растворов фитиновой кислоты лежит в пределах 0,01 до 0,8%, что составляет аналитическую область методики. Другие валидационные характеристики методики рассчитывали согласно фармакопейной статье «Валидация аналитических методик» [20].

Количественное содержание фитиновой кислоты проводили спектрофотометрическим методом с использованием реактива Вейда по калибровочному графику. В результате проведенных исследований определено содержание фитиновой кислоты в семенах тыквы Россиянка-  $1,94 \pm 0,11\%$ , чалмовидной -  $2,72 \pm 0,13\%$ , Бенинказа Акулина  $1,72 \pm 0,12\%$ , и Бенинказа Кульминская  $2,02 \pm 0,10\%$ , а также в мякоти тыквы чалмовидной –  $1,8 \pm 0,10\%$  и кожуре тыквы чалмовидной –  $1,35 \pm 0,11\%$ .

## ВЫВОДЫ

1. Методом бумажной, хроматографии с использованием достоверного образца свидетеля фитиновой кислоты, доказано наличие фитиновой кислоты в водных экстрактах в семенах всех выбранных сортов.

2. Аналитическая область и подчинение закону Бугера-Ламберта-Бера методики определения

фитиновой кислоты в природных объектах лежит в пределах 0,01 до 0,8%.

3. На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что содержание фитиновой кислоты в семенах тыквы лежит в пределах 1,72 - 2,72%. В семенах фитиновой кислоты больше чем в мякоти и кожуре.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что все семена тыквы содержат фитиновую кислоту, которая обладает антиоксидантными свойствами.

Коллектив авторов выражает благодарность Кравченко Екатерине Николаевне, м.н.с. Лаборатории ароматических и лекарственных растений Никитский ботанический сад – за предоставленное сырье - семена тыквы: сорт Бенинказа Акулина и Бенинказа Кульминская заготовленные на территории Национального научного центра РАН, Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES

1. Гигиенические требования по применению пищевых добавок. Дополнения и изменения 1 к СанПиН 2.3.2.1293—03: Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. М: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008.— 18 с. // Gigiyenicheskiye trebovaniya po primeneniyu pishchevykh dobavok. Dopolneniya i izmeneniya 1 k SanPiN 2.3.2.1293—03: Sanitarno-epidemiologicheskiye pravila i normativy. M: Federalnyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora. 2008.— 18 s

2. Wang R. Phytic acid and its interactions: contributions to protein functionality, food processing and safety / R. Wang, S. Guo // Sci Food Saf Review. –2021. – V. 20(2). – P. 2081–2105.

3. Browns F. Phytic acid and whole grains are a contradiction for health / F. Browns // Nutrients. – 2021. – V. 14(1): 25.

4. Pramita J.L. The diverse roles of phytic acid in plants and approaches to developing low-phytate grains to enhance micronutrient bioavailability. J.L. Pramita, S. Rana, P.R. Aggarwal, R. Ravikesavan, A.J. Joel, M. Muthamilarasan // Adv Genet. – 2021. – V 107. –P. 89-120.

5. Masunaga T. Anticancer activity of a cell membrane-permeable prodrug of phytic acid / T. Masunaga, N. Murao, H. Tateishi, R. Koga, T. Osugi, M. Otsuka, M. Fujita // Bioorg Chem. – 2019. – V. 92: 103240

6. Shamsuddin A.M. Ingibirovaniye opukholi molochnoy zhelezy s pomoshchyu IP6: obzor. // A.M. Shamsuddin, I. Vuchenik // Protivorakovoye issledovaniye. – 1999. – V. 19 (5A): 3671-4.
7. Kapral M. Assessment of the expression of the transcription factor NF-kappa B induced by phytic acid in colon cancer cells / M. Kapral, B. Parfiniewicz, B. Strzałka-Mrozik, A. Zachacz, L. Weglarz // Acta Pol Pharm. – 2008. – V. 65 (6). – P. 697-702.
8. Kapral M. Inhibitory effect of inositol hexaphosphate on the transcription of metalloproteinases in colon cancer cells stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate / M. Kapral, J. Wawszczyk, A. Hollek, D. Dymitruk, L. Weglarz // Acta Pol Pharm. – 2012. – V. 69 (6). – P. 1307-1312.
9. Sharma G. Growth inhibitory and apoptotic effects of inositol hexaphosphate in transgenic mouse prostate adenocarcinoma cells (TRAMP-C1) / G. Sharma, R.P. Singh, R. Agarwal // Int J Cancer Oncol. – 2003. – V. 23(5): 1413-8.
10. Thimmappa S. Anekonda. Phytic acid as a potential treatment for Alzheimer's pathology: evidence from animals and in vitro models / Thimmappa S. Anekonda, Teri L. Wadsworth, Robert Sabin, Keith Frahler, Christopher Harris, Babette Petrico, Martina Ralle, Randy Woltjer, and Joseph F. Quinn // J Alzheimers Dis. – 2011. – V. 23 (1). – P. 21-35.
11. Lee H. H. Effect of phytic acid on nutrient bioavailability and antioxidant properties of refined rice / H. H. Lee, S. P. Loh, K. F. J. Bong, S. R. Sarbini, P. H. Yu // J Food Sci Technol. – 2015. – V. 52 (12). – P. 7806-7816.
12. Raboy Victor. Low phytic acid crops: observations based on four decades of research / Victor Raboy // Plants (Basel). – 2020. – V. 9 (2): 140.
13. Magallanes-López Ana María. Variability of iron, zinc and phytic acid content in the world's collection of commercial durum wheat varieties and the impact of reduced irrigation on these traits // Ana María Magallanes-López, Nayeli Hernández-Espinoza, Govindan Velu, Gabriel Posadas-Romano, Virginia María Guadalupe Ordoñez-Villegas, José Crossa, Karim Ammar, Carlos Guzmá // Food chemistry. – 2017. – V. 237. – P. 499-505.
14. Schlemmer U. Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis / U. Schlemmer // Mol Nutr Food res. – 2009. – V. 53. – P. S330-S375.
15. Silva Elisângela O. Phytic Acid: From Antinutritional to Multiple Protection Factor of Organic Systems / Elisângela O Silva, Ana Paula F R L Bracarense // J Food Sci. – 2016. – V.81(6): R1357-62.
16. Marol Gregor. Analytical methods for the determination of phytic acid and other inositol phosphates: a review / Gregor Marolt, Mitja Kolar // Molecules. – 2021. – V. 26(1): 174.
17. Marol Gregor. Complex formation of phytic acid with selected monovalent and divalent metals / Gregor Marolt, Ema Gričar, Boris Pihlar, Mitja Kolar // Front. Chem. – 2020. – V. 8: 582746.
18. Butenko L.I. Quantitative determination of phytic acid content in flax, soy and oat seeds / L.I. Butenko, L.G. Davydenko, S.A. Kuleshova, E.S. Uvarova // In the book: abstracts of the international scientific and practical conference. Nikitsky Botanical Garden - National Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. Simferopol, 2021. – P. 36.
19. Разработка методики количественного определения инозитгексафосфорной кислоты. К.т.н., Ташменов Р.С. Южно – Казахстанская Государственная Медицинская Академия, Казахстан, Шымкент rusnauka. com 13 NPT 2008 / Chimia / 31861. doc. Htm // Razrabotka metodiki kolichestvennogo opredeleniya inozitgeksafosfornoj kisloty. K.t.n.. Tashmenov R.S. Yuzhno – Kazakhstanskaya Gosudarstvennaya Meditsinskaya Akademiya. Kazakhstan. Shymkent rusnauka. com 13 NPT 2008 / Chimia / 31861. doc. Htm
20. ГФ XIII, ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. – Режим доступа: <http://pharmacopoeia.ru/ofc-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskikh-metodik> // GF XIII. OFS.1.1.0012.15 Validatsiya analiticheskikh metodik. – Rezhim dostupa: <http://pharmacopoeia.ru/ofc-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskikh-metodik>.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск

Бутенко Людмила Ивановна, доцент кафедры органической химии, кандидат химических наук

E-mail: Polechka2802@yandex.ru

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute - Branch of the Volga State Medical University of the Ministry of Health of Russia

Butenko Lyudmila I., PhD., Associate Professor of the Department of Organic Chemistry

E-mail: Polechka2802@yandex.ru,

Шамилов Арнольд Алексеевич, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогенезии, ботаники и технологии фитопрепаратов  
E-mail: : shamilovxii@yandex.ru

Уварова Екатерина Сергеевна, студентка 5 курса отделение «Фармация»  
E-mail: uvarova1201ekt@gmail.com

Золотых Денис Сергеевич, доцент токсикологической и аналитической химии  
E-mail: metronidazol@mail.ru

ООО Медифарм  
Подгорная Жанна Валерьевна, кандидат фармацевтических наук, Заместитель директора  
E-mail: j.podgornaya@imex-company.ru

Shamilov Arnold A., PhD., Associate Professor of the Department Pharmacognosy, Botany and Technology of Herbal Medicines  
E-mail: : shamilovxii@yandex.ru

Uvarova Ekaterina S. 5th year student, Department of Pharmacy  
E-mail: uvarova1201ekt@gmail.com

Zolotykh Denis S., Associate Professor of Toxicological and Analytical Chemistry  
E-mail: metronidazol@mail.ru

Medifarm LLC  
Podgornaya Zhanna V., PhD., Deputy Director  
E-mail: j.podgornaya@imex-company.ru

## SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF PHYTIC ACID IN PUMPKIN SEEDS

**L. I. Butenko, A. A. Shamilov, E. S. Uvarova, D. S. Zolotykh, Z. V. Podgornaya**

*Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute - Branch of the Volga State Medical University of the Ministry of Health of Russia*

**Abstract.** Phytic acid, as a biologically active compound, began to be studied in the second half of the 20th century. On the one hand, it is classified as an antinutrient that reduces the bioavailability of nutrients (micronutrients: selenium, zinc, iodine, iron, vitamins) contained in food products. Anticancer activity has been established for it and it is proposed as a means for cancer chemoprevention. In addition, it has been established that it can be used as a protective agent in the pathology of Alzheimer's disease.

The aim of our study is to develop a spectrophotometric quantitative determination of phytic acid content in pumpkin seeds using Wade's reagent.

Materials and methods of research. The paper presents the results of studies of the quantitative content of phytic acid in the seeds of the Benincasa Akulina, Benincasa Kulminskaya, Rossiyanka and Chalmoid pumpkin varieties, as well as in the pulp and peel of Chalmoid pumpkin. The quantitative content of phytic acid was determined by a spectrophotometric method using Wade's reagent.

Research results. The simplest and most convenient method for determining the content of phytic acid is the use of Wade's reagent (iron sulfosalicylate complex), which can be used for qualitative reactions, chromatographic studies and spectrophotometric determination. The paper studies the dependence of the optical density of phytic acid complexes on the loss of the reagent - Wade's reagent. Thus, by reducing the optical density of the complex, it is possible to determine the quantitative content of phytic acid. As a result of the conducted studies, the content of phytic acid in the seeds of the Rossiyanka pumpkin was determined to be 1.94 + 0.11%, turban pumpkin - 2.72 + 0.13%, Benincasa Akulina 1.72 + 0.12%, and Benincasa Kulminskaya 2.02 + 0.10%, as well as in the pulp of turban pumpkin - 1.8 + 0.10% and the peel of turban pumpkin - 1.35 + 0.11%. Conclusion. As a result of the conducted studies, it was established that all pumpkin seeds contain phytic acid (1.72 - 2.72%), which has antioxidant properties. There is more phytic acid in the seeds than in the pulp and peel.

**Keywords:** phytic acid, antinutrient, pumpkin seeds, paper chromatography, Wade's reagent, spectrophotometry, calibration graph.