

3. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes / P. J. Roach [et al.] // Biochem J. – 2012. – Vol. 441, № 3. – P. 763–787.

4. Великанов, В.В. Коррекция функционального состояния печени у свиноматок при токсической гепатодистрофии / В.В. Великанов // Учёные записки учреждения образования «Витебская ордена “Знак Почёта” государственная академия ветеринарной медицины». – 2019. – Т. 55, вып. 1. – С. 6–10.

5. Лебедева, Е.И. Морфометрическая оценка содержания гликогена в гепатоцитах пациентов при различных стадиях алкогольного поражения печени / Е.И. Лебедева // Медицинский журнал. – 2015. – № 3. – С. 84–88.

6. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): учеб. пособие / М.И. Прохорова [и др.] ; ред. М.И. Прохорова. – Л. : Изд-во ЛГУ, 1982. – С. 195–197.

7. Glycogenesis is common in nonalcoholic fatty liver disease and is independently associated with ballooning, but lower steatosis and lower fibrosis / Daniela S Allende [et al.] // Liver Int. – 2021. – Vol. 41, № 5. – P. 996–1011.

УДК 543.544.5.068.7

АНАЛИЗ КАРОТИНОИДОВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ДИОДНО-МАТРИЧНЫМ ДЕТЕКТОРОМ

HPLC ANALYSIS OF CAROTENOIDS WITH DIODE ARRAY DETECTOR

С.А. Фатыхова¹, П.С. Шабуня¹, А.В. Барановский^{1,2},
В.И. Долгопалец¹, Т.А. Чернова¹
S.A. Fatykhava¹, P.S. Shabunya¹, A.V. Baranovsky^{1,2},
V.I. Dolgopalets¹, T.A. Chernova¹

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь

²УО «Мозырский государственный педагогический университет
им. И.П. Шамякина», г. Мозырь, Республика Беларусь

В работе представлено описание качественного и количественного анализа каротиноидов методом жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектором. Показано применение данного метода для анализа растительных объектов.

Ключевые слова: ВЭЖХ, каротиноиды, количественный анализ, УФ-спектры.

Article describes the qualitative and quantitative analysis of carotenoids by HPLC with diode array detector. The application of this method for the analysis of plant objects has been shown.

Keywords: HPLC, carotenoids, quantitative analysis, UV-spectra.

Введение. Каротиноиды – биологически-активные вещества с антиоксидантными свойствами, которые участвуют в синтезе витамина А в организме человека. Определение качественного и количественного состава каротиноидов в овощах и фруктах является важной задачей для определения их пищевой ценности.

Цель работы – оптимизировать методику качественного и количественного хроматографического анализа каротиноидов в растительных объектах.

Материалы и методика исследований. Для анализа каротиноидов был предложен метод ВЭЖХ с диодно-матричным детектором с использованием колонки Agilent Zorbax XDB C18 4,6 x150 мм, размер частиц 1,8 мкм при температуре +35 °С. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила, метанола и этилацетата в соотношении 73 : 20 : 7 (объемные проценты). Использовали изократический режим элюирования при скорости потока 1 мл/мин в течение первых 4,5 минут; в 4,6 минуты – 1,4 мл/мин. Объем инъекции составил 20 мкл, время анализа – 29 минут. Так как каротиноиды (рисунок 1) характеризуются сложными УФ-спектрами с отличающимися максимумами, то детекцию вели на 5 длинах волн, соответствующих максимумам поглощения определяемых веществ: $\lambda = 446$ нм – лютеин, α -каротин; $\lambda = 402$ нм – ζ -каротин; $\lambda = 472$ нм – ликопин; $\lambda = 462$ нм – γ -каротин; $\lambda = 454$ нм – β -каротин. Стандарты лютеина, β -каротина, α -каротина, ζ -каротина, γ -каротина растворяли в хлороформе. Разведения стандартов для получения калибровочных растворов делали в подвижной фазе.

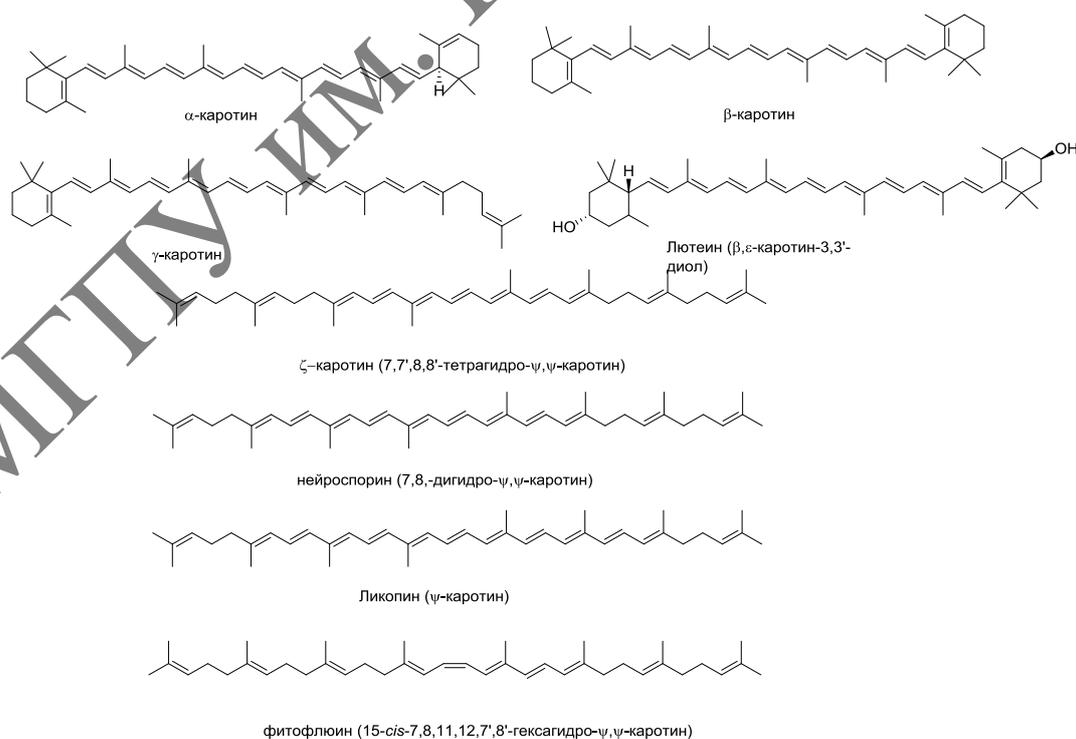


Рисунок 1 – Структурные формулы каротиноидов

В качестве стандарта ликопина был использован коммерческий препарат «Томатогенин» ГП «Академфарм». Содержимое одной капсулы препарата растворяли в деионизованной воде. Часть раствора фильтровали через мембранный шприцевой фильтр из регенерируемой целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм и использовали для получения калибровочных растворов путем разведения в подвижной фазе. Диапазоны калибровочных растворов для стандартов были следующие: лютеин от 0,097 до 0,97 мкг/мл; α -каротин от 0,1 до 10 мкг/мл; ζ -каротин от 0,484 до 4,84 мкг/мл; ликопин от 0,7 до 21 мкг/мл; γ -каротин от 0,0996 до 0,996 мкг/мл; β -каротин от 5,13 до 410,27 мкг/мл.

Результаты исследований и их обсуждение. В использованных условиях ВЭЖХ анализа удалось добиться приемлемого разделения на колонки всех использованных стандартов (рисунок 2). Предложенная методика была успешно применена для анализа каротиноидов в экстрактах моркови, цветов календулы [1; 2] и томатов. В экстрактах моркови были количественно определены лютеин, α - и β -каротин; в экстрактах цветов календулы – лютеин и β -каротин. Для количественной оценки содержания отдельных каротиноидов в образцах экстрактов томатов по хроматограммам растворов стандартов были построены калибровочные прямые. Так как стандарты ζ -каротина и γ -каротина были нестабильными в растворе и разрушались в течение месяца при хранении в морозильной камере ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), то для их обсчета в образцах были вычислены коэффициенты пересчета по отношению к α -каротину, что позволило обсчитывать ζ -каротин и γ -каротин по калибровке для α -каротина. После разрушения стандартов ζ -каротин и γ -каротин на хроматограммах экстрактов томатов идентифицировали, сравнивая УФ-спектры в пиках со спектрами стандартов, записанных ранее, и литературными данными.

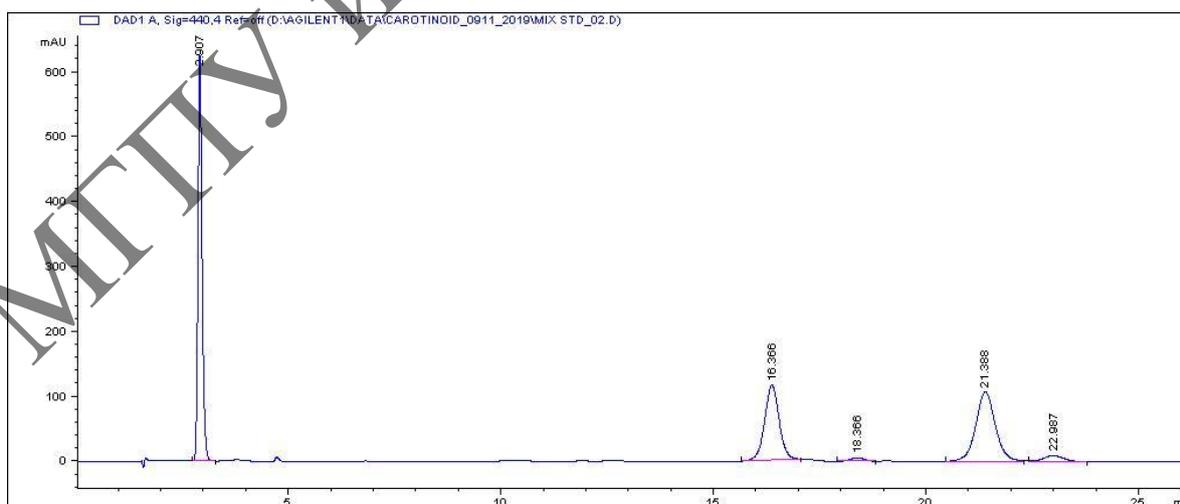


Рисунок 2 – Хроматограмма стандартов каротиноидов ($\lambda = 440\text{ нм}$): лютеин (RT = 2,9 мин); γ -каротин (RT = 16,3 мин); ζ -каротин (RT = 18,3 мин); α -каротин (RT = 21,4 мин); β -каротин (RT = 22,9 мин)

Используя приведенные в [3] характеристики УФ-спектров различных каротиноидов томатов, в некоторых экстрактах плодов томатов удалось идентифицировать предположительно нейроспорин (neurosporene) и фитофлюин (phytofluene) (рисунок 3). Содержание нейроспорина и фитофлюина было обчислено по калибровке для α -каротина без учета коэффициентов пересчета, так как стандарты данных веществ отсутствуют.

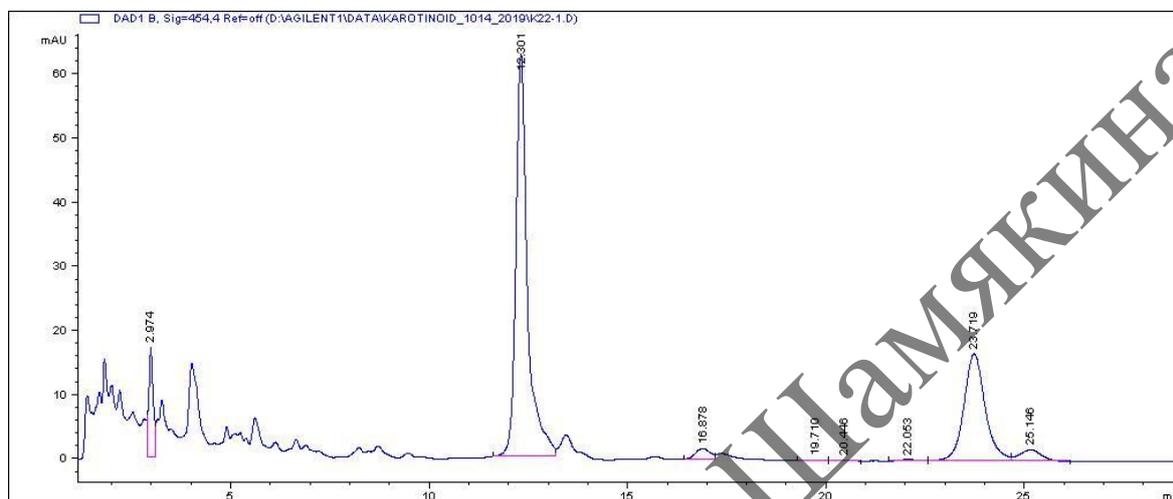


Рисунок 3 – Хроматограмма каротиноидов ($\lambda = 454$ нм) в экстракте плодов томата: лютеин (RT = 2,9 мин); ликопен (RT = 12,3 мин); γ -каротин (RT = 16,8 мин); ζ -каротин изомеры (RT = 19,7 и 20,4 мин); α -каротин (RT = 22,0 мин); β -каротин (RT = 23,7 мин); фитофлюин (RT = 25,1 мин)

Заключение. Представленная в работе методика позволяет качественно и количественно оценить отдельные каротиноиды в растительных экстрактах.

Список использованной литературы

1. HPLC analysis of carotenoids in particular carrot (*Daucus Carota* L.) cultivars / E.N. Zelenkova [et al.]. // Вестн. Международной академии холода. – 2015. – № 4. – С. 9–15.
2. Особенности биосинтеза целевых метаболитов в сырье календулы лекарственной под влиянием низкоинтенсивного электромагнитного излучения и сверхнизких концентраций экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты / С.Н. Шиш [и др.]. // Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине : сб. науч. тр. междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 85-летию ВИЛАР. – М. : Щербинская типография, 2016. – С. 360–364.
3. Kimura, M. Carotenoids of tomato and tomato paste: verification of the occurrence of γ -carotene / M. Kimura, D. Rodriguez-Amaya // Rev. Inst. Adolfo Lutz. – 2003. – Vol. 62, № 1. – P. 21–26.