



КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В ОЦЕНКЕ КАРОТИНОИДНОГО СОСТАВА ТОМАТА *SOLANUM LYCOPERSICUM*

QUANTITATIVE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY FOR EVALUATION OF CAROTENOID COMPOSITION OF TOMATOES *SOLANUM LYCOPERSICUM*

Голубкина Н.А.¹ – доктор с.-х. наук, главный научный сотрудник лабораторно-аналитического испытательного центра
Молчанова А.В.¹ – кандидат с.-х. наук, н.с. лабораторно-аналитического центра
Тареева М.М.¹ – кандидат с.-х. наук, с.н.с.
Бабак О.Г.² – кандидат биол. наук, н.с. лаборатории экологической генетики и биотехнологии
Некрасевич Н.А.² – н.с. лаборатории экологической генетики и биотехнологии
Кондратьева И.Ю.¹ – кандидат с.-х. наук, ведущий н.с. лаборатории селекции и семеноводства пасленовых культур

Golubkina N.A.¹, Doctor of Sciences, Analytic Center
Molchanova A.V.¹, Ph.D. in Agriculture, Researcher, Analytic Center
Tareeva M.M.¹, Ph.D. in Agriculture
Baback O.G.², Ph.D. in Agriculture
Nekrashevich N.A.², Laboratory of Environmental Genetics and Biotechnology, Senior Researcher
Kondratyeva I.Yu.¹, Ph.D. in Agriculture, Leading Researcher in Laboratory of Solanaceae Crop Breeding and Seed Production

¹ ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства» (ФГБНУ ФНЦО) 143080, Россия, Московская обл., Одинцовский р-н, пос. ВНИИССОК, ул. Селекционная, 14
E-mail: segolubkina45@gmail.com
² Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» 220072, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Академическая, 27

¹ FSBSI, Federal Scientific Vegetable Centre Selectionnaya, 14, Odintsovo district, Moscow region, 143080, Russia

² Institute of genetics and cytology Akademicheskaya 27, Minsk, Belarus

Качественная и количественная оценка каротиноидного состава томата представляется основополагающей в селекции на содержание каротиноидов. Среди известных методов идентификации и установления содержания каротиноидов тонкослойная хроматография занимает важное место, как быстрый, недорогой и доступный метод анализа. В работе представлены данные оценки содержания индивидуальных каротиноидов красных плодов *Solanum lycopersicum* на основе использования известных эмпирических формул и с применением тонкослойной хроматографии на бумаге. Показано, что использование эмпирических формул для определения содержания в красных плодах ликопина и β -каротина характеризуются большим разбросом показателей содержания β -каротина и заниженными данными общего содержания каротиноидов. Разработанные условия хроматографического разделения и идентификации выделенных каротиноидов основаны на разной полярности исследуемых каротиноидов и специфических спектрах поглощения индивидуальных пигментов. Метод тонкослойной хроматографии может служить быстрым эффективным способом оценки качества плодов томата любой окраски и установления содержания в плодах β -каротина, ζ -каротина, нейроспорина, ликопина и лютеина.
Ключевые слова: каротиноиды, томат, тонкослойная хроматография.

Для цитирования: Голубкина Н.А., Молчанова А.В., Тареева М.М., Бабак О.Г., Некрасевич Н.А., Кондратьева И.Ю. Количественная тонкослойная хроматография в оценке каротиноидного состава томата *Solanum lycopersicum*. Овощи России. 2017;(5):96-99. DOI:10.18619/2072-9146-2017-5-96-99

Введение

Среди природных жирорастворимых антиоксидантов каротиноиды занимают важное место в защите организма человека от кардиологических и онкологических заболеваний благодаря мощным антиоксидантным свойствам (Willcox et al, 2003; Giovannucci, 1999). Основным источником каротиноидов для человека является томат, плоды которого отличаются высокими концентрациями β -каротина и ликопина, а также пользуются огромной популярностью в разных странах мира (FAOSTAT 2005). Цвет плодов зависит от сорта/вида и варьирует от красного до оранжевого, желтого и коричневого и определяет в значительной степени аромат плодов (Lewinsohn et al, 2005). Среди прочих каротиноидов следует выделить несколько присутствующих в гораздо меньших количествах, чем ликопин и β -каротин и более характерных для желтых и оранжевых сортов: ζ -каротин, нейроспорин и лютеин (Khachik et al, 2002). Другие идентифицированные каротиноиды томатов (γ -каротин, фитоен, фитофлюен) содер-

Qualitative and quantitative evaluation of tomatoes carotenoid composition is considered to be the basis of tomato selection. Among known methods of identification and carotenoid content determination thin layer chromatography (TLC) is characterized by inexpensive, quick and available method of analysis. Comparison of individual tomato carotenoid content data obtained using well-known empirical formulas and based of TLC separation on chromatographic paper was achieved. Empirical formulas for the determination of lycopene and beta-carotene concentrations were shown to give high variations in beta-carotene content and decreased values of total carotenoids concentration values. Developed conditions of chromatographic separation and identification of selected carotenoids are based on different polarity of individual pigments and specific absorption spectra of the latter. Method of thin layer chromatography may serve as a quick and effective method for quality evaluation of tomato fruit of different color and determination of beta-carotene, ζ -carotene, neurosporene, lycopene and lutein content.

Keywords: carotenoids, tomatoes, thin layer chromatography.

For citation: Golubkina N.A., Molchanova A.V., Tareeva M.M., Baback O.G., Nekrashevich N.A., Kondratyeva I.Yu. Quantitative thin layer chromatography for evaluation of carotenoid composition of tomatoes *Solanum lycopersicum*. *Vegetable crops of Russia*. 2017;(5):96-99. (In Russ.) DOI:10.18619/2072-9146-2017-5-96-99

жатся в следовых количествах (Голубкина и др., 2010).

Осуществление селекции томата по показателю содержания каротиноидов и цвету плодов требует проведения быстрой количественной оценки каротиноидного состава. Общепринятым методом за рубежом в этом отношении является высокоэффективная фазовая жидкостная хроматография (ВЭЖХ) (Gupta et al, 2015). Однако использование указанного метода в ряде случаев может быть затруднено в связи с высокой стоимостью прибора и малой доступностью и низкой устойчивостью стандартов, среди которых на практике используются, как правило, лишь β -каротин, ликопин и реже лютеин.

Тонкослойная хроматография (ТСХ) является мощным, быстрым и недорогим аналитическим методом количественного разделения различных биологически активных соединений, включая каротиноиды (Hahn-Deinstrop, 2007). Этот метод широко используют в количественном анализе различных фармацевтических препаратов, продуктов питания и объ-

ектов окружающей среды. В связи с этим нами была разработана методика количественной оценки каротиноидного состава плодов томата разной окраски с использованием ТСХ на хроматографической бумаге.

Материалы и методы

Подготовка образцов для анализа

В качестве объектов исследования были использованы 29 образцов томата селекции Белорусского центра генетики, отличающихся цветом и размером плодов. Перед началом анализа плоды промывали, высушивали фильтровальной бумагой и гомогенизировали. От 0,5 до 1,5 г полученной смеси (в зависимости от яркости окраски плодов) экстрагировали ацетоном (3x5 мл), используя стеклянный порошок для лучшего извлечения каротиноидов при растирании образцов в ступке. К объединенному ацетоновому экстракту добавляли около 9 мл гексана и затем 50-60 мл дистиллированной воды. Водный слой отделяли и помывку органического слоя водой повторяли 4-5 раз до исчезновения резкого запаха ацетона. Такая последовательность операций обусловлена с одной стороны, высокой растворимостью каротиноидов в ацетоне, что обеспечивает быстроту экстракции. С другой стороны, неустойчивость каротиноидов в ацетоне определяет необходимость перевода их в гексановый экстракт. Полученный таким образом гексановый слой количественно переносили в пикнометр на 10 мл, доводили до метки гексаном и фильтровали на складчатом фильтре через слой безводного сульфата натрия. Раствор хранили без доступа яркого света и анализировали в течение 6 часов после приготовления.

Спектрофотометрическое определение β -каротина и ликопина красных плодов томата без предварительного хроматографического разделения каротиноидов

Определяли величину поглощения готовых гексановых экстрактов при длинах волн 451 нм и 503 нм. Содержание β -каротина и ликопина рассчитывали по формулам (Muratore et al, 2005):

$$\beta\text{-каротин (мг/л)} = 462 D_{451} - 309 D_{503}$$

$$\text{Ликопин (мг/л)} = 395 D_{503} - 80,5 D_{451}$$

Спектрофотометрическое определение каротиноидного состава плодов томата с использованием количественной тонкослойной хроматографии

Полученный экстракт каротиноидов в количестве 0,5 мл наносят на хроматографическую бумажную пластинку Ватман 3А в виде полоски и разделяют каротиноиды методом восходящей тонкослойной хроматографии в системе: 1) гексан для выделения не полярных каротиноидов (β -каротин, ликопин, ζ -каротин) и 2) гексан : ацетон, 10:0,5 для отделения лютеина и хлорофилла. По окончании хроматографирования пластинку вынимают из хроматографической камеры, быстро вырезают зоны, соответствующие индивидуальным каротиноидам (не допуская полного высыхания пластинки), и помещают в пробирки с а) 3 мл гексана (для β , ζ -каротина и нейроспорина); б) с 3,5 мл смеси гексан:ацетон, 3:0,5 (для ликопина и лютеина); в) 3 мл ацетона для хлорофилла – и оставляют при комнатной температуре при периодическом перемешивании в течение 15-20 мин. Определяют величину

поглощения растворов индивидуальных каротиноидов в полученных экстрактах:

- 1) β -каротина при 451 нм,
- 2) ζ -каротина – при 425 нм,
- 3) нейроспорина – при 440 нм,
- 4) ликопина – при 474 нм,
- 5) лютеина – при 447 нм,
- 6) хлорофилла – при 646 нм и 663 нм.

Для расчета содержания индивидуальных каротиноидов в образцах томата используют значения удельного поглощения исследуемых каротиноидов в гексане (Rodriguez-Amaya, 2001):

$$\beta\text{-каротин } E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2580 \text{ (450 нм)}$$

$$\zeta\text{-каротин } E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2555 \text{ (425 нм)}$$

$$\text{Нейроспорин } E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2918 \text{ (440 нм)}$$

$$\text{Ликопин } E_{1\text{cm}}^{1\%} = 3470 \text{ (474 нм)}$$

$$\text{Лютеин } E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2560 \text{ (447 нм)}$$

Содержание хлорофилла рассчитывают по эмпирическим формулам:

$$\text{Хлорофилл а} = 12.21 D_{663} - 2.81 D_{646}$$

$$\text{Хлорофилл б} = 20.13 D_{645} - 5.03 D_{663}$$

Результаты и обсуждение

Анализ каротиноидного состава красных плодов томата

Наиболее простым способом определения содержания β -каротина и ликопина в красных плодах является спектрофотометрический, основанный на разных максимумах поглощения этих каротиноидов (табл.1).

Это позволяет успешно пользоваться эмпирическими формулами (Muratore et al, 2005). Для оценки величины ошиб-

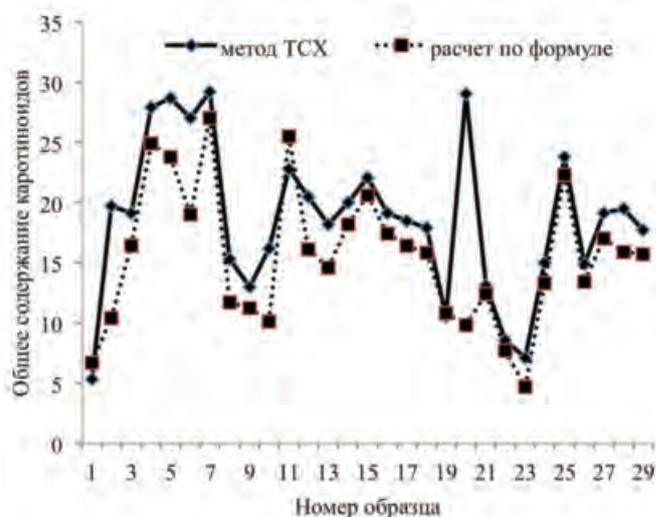


Рис. 1. Сравнение результатов определения суммы каротиноидов красных плодов томата методом ТСХ и по эмпирической формуле.

Таблица 1. Максимумы поглощения каротиноидов томата в гексане (Rodriguez-Amaya, 2001)

| Соединение | Максимумы поглощения * | III/II, % ** |
|--------------|------------------------|--------------|
| Бета-каротин | 425; 450*; 477 | 30 |
| Z-каротин | 378; 400; 425 | 115,4 |
| Нейроспорин | 414; 439; 469 | 92,3 |
| Ликопин | 444; 470; 502 | 73,9 |
| Лютеин | 421; 445; 474 | 62,5 |

*жирным шрифтом указаны длины волн с известной величиной удельного поглощения

**в зависимости от прибора максимумы поглощения могут варьировать в пределах +1 нм

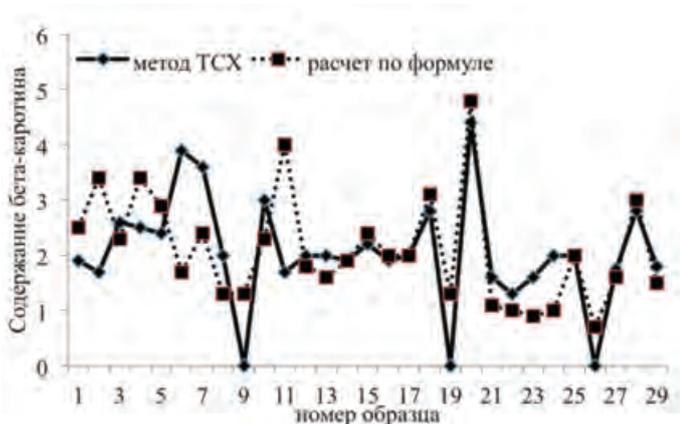


Рис.2. Сравнение результатов определения β -каротина красных плодов томата методом ТСХ и по эмпирической формуле.

ки такого подхода в количественном определении β -каротина и ликопина красных плодов томата мы провели сравнение результатов определения содержания указанных каротиноидов двумя методами: с использованием эмпирических формул и после количественного хроматографического разделения. Полученные результаты показывают, что расхождения в результатах определяются преимущественно присутствием в отдельных образцах лютеина, максимум поглощения которого близок к максимуму поглощения β -каротина (рис. 1-3). В результате расчет содержания суммы каротиноидов по величине поглощения гексанового экстракта при 450 нм дает заниженные результаты, где уровень занижения определяется концентрацией лютеина (рис. 1).

Кроме того, как видно из данных рис.2, эмпирическая формула для β -каротина дает существенное завышение результатов благодаря присутствию лютеина. Что касается содержания ликопина, то оба метода давали сходные результаты опре-

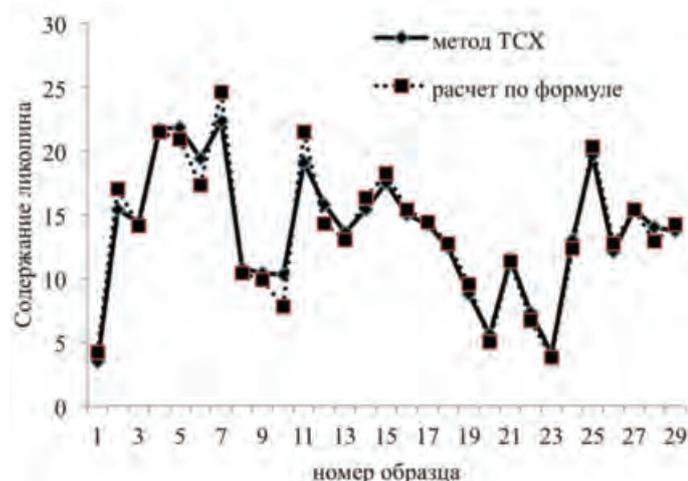


Рис.3. Сравнение результатов определения ликопина красных плодов томата методом ТСХ и по эмпирической формуле.

деления (рис.3). Обращает внимание, что при отсутствии β -каротина в образце и наличии лютеина эмпирическая формула фиксирует определенное содержание гипотетического β -каротина, спектр поглощения которого близок к спектру поглощения лютеина.

Таким образом, оба метода в целом дают сходные результаты (табл.2), хотя наибольшая зарегистрированная ошибка в определении β -каротина с использованием формулы может составлять до 135%, в то время как максимальная ошибка определения ликопина этим методом не превышает 24,3%.

В целом для расчета содержания суммы каротиноидов можно использовать данные оценки содержания индивидуальных каротиноидов, полученных с использованием ТСХ

Таблица 2. Результаты определения β -каротина и ликопина с использованием эмпирической формулы и метода количественной ТСХ (n=29)

| Метод | Показатель | β -каротин | ликопин |
|---------|--|------------------|-----------------|
| ТСХ | M \pm SD | 2.05 \pm 0.67 | 13.73 \pm 3.8 |
| | Интервал концентраций | 0-4.4 | 3.45-22.3 |
| | CV, % | 31.7 | 27.7 |
| Формула | M \pm SD | 2.11 \pm 0.77 | 13.71 \pm 4.1 |
| | Интервал концентраций | 0.7-4.8 | 3.8-24.6 |
| | CV, % | 36.5 | 29.9 |
| | Ошибка определения, % (без учета образцов, где β -каротин отсутствует) | 26.75% (0-135%) | 6.9 % (0-24.3%) |

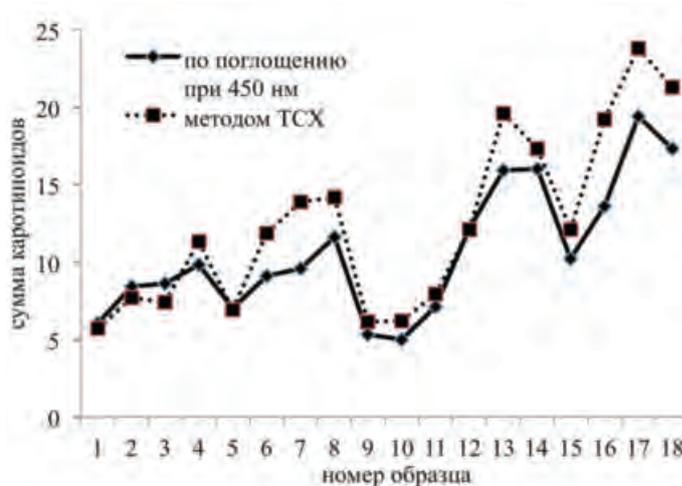


Рис.4. Сравнение результатов определения суммы каротиноидов красных томатов методом ТСХ и по величине поглощения гексанового экстракта при 450 нм (Ермаков, 1986).

или условно рассчитывать валовое содержание каротиноидов в расчете на β -каротин по величине поглощения гексанового экстракта при 450 нм (рис.4). Очевидно, что последний метод часто дает заниженные результаты, особенно для образцов с высоким содержанием ликопина.

Данные результаты определения каротиноидов красных плодов томата свидетельствуют о том, что в выбранной коллекции уровень β -каротина колеблется от нуля до 35,5% с медианой на уровне 15%. Для ликопина наиболее часто встречается содержание в 75-80% от суммы при минимуме в 47%. Доля лютеина не превышает 20% (рис.5).

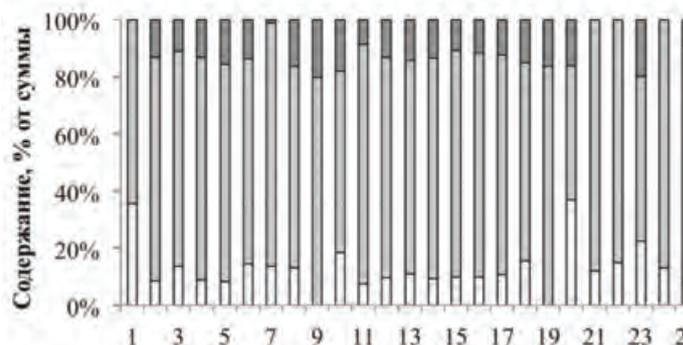


Рис. 5. Каротиноидный состав исследованных образцов красных плодов томата

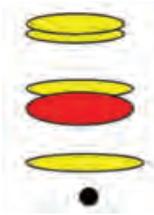
Таблица 3. Основные каротиноиды томата

| | β -каротин | ζ -каротин | нейро-спорин | ликопин | лютеин |
|-----------|------------------|------------------|--------------|---------|--------|
| Красные | + | + | | +++ | + |
| Желтые | + | + | | | + |
| Оранжевые | + | + | + | | + |

Анализ каротиноидного состава желтых и оранжевых плодов

Желтые и оранжевые сорта томата, как правило, содержат микроколичества ликопина (или вовсе его не содержат) и повышенное содержание лютеина. При этом важными компонентами в отдельных образцах оказываются такие каротиноиды, как ζ -каротин и нейроспорин. С другой стороны, следует отметить, что в отдельных случаях ζ -каротин может содержаться также в красных плодах. Основные каротиноиды томата представлены в табл.3.

В этом случае метод тонкослойной хроматографии оказывается незаменимым в оценке компонентного состава каротиноидов. Такой анализ основан на знании хроматографической подвижности индивидуальных каротиноидов (рис.6).



Бета-каротин Rf=1, гексан
 ζ -каротин Rf=0,95, гексан

Рис.6. Хроматографическая подвижность каротиноидов томата.

нейроспорин Rf=0,75, гексан
 ликопин Rf=0,4, гексан
 лютеин Rf=0,2, гексан/ацетон=10:0.5
 хлорофилл Rf=0, гексан/ацетон= 10:0.5

Полученные данные свидетельствуют о том, что содержание ζ -каротина, как правило, не превышает 3 мг/100 г, нейроспорина – 2 мг/100 г.

Литература

- Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений / под ред. - 3-е изд. - Л.: Агропромиздат, 1987. - 430 с.
 FAOSTAT 2005; <http://faostat.fao.org>
 Giovannucci E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. Journal of the National Cancer Institute. 1999, Vol.91(4). P. 317-331 .
 Gupta P, Sreelakshmi Y, Sharma R A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography//Plant Methods. 2015. Vol. 11. P. 5-16. doi: 10.1186/s13007-015-0051-0
 Hahn-Deinstrop E Applied Thin-Layer Chromatography: Best Practice and Avoidance of Mistakes, Second Edition-2007- DOI: 10.1002/9783527610259
 Khachik F, Carvalho L, Bernstein PS, Muir GJ, Zhao D-Y, Katz NB. Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. Exp. Biol. Med. 2002, Vol.227(10). P.845-851.
 Lewinsohn E, Sitrit Y, Bar E, Azulay Y, Meir A, Zamir D, Tadmor Y.Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses. J Agric Food Chem. 2005, Vol.53(8). P.3142-3148.
 Muratore G., Licciardello F., Maccarone E. (2005). Evaluation of the chemical quality of a new type of small-sized tomato cultivar, the plum tomato (*Lycopersicon lycopersicum*)//Italian Journal of Food Science. 2005, Vol. 17 (1).P. 75-81.
 Rodriguez-Amaya DB A guide to carotenoid analysis in foods.2001 Washington:ILSI press.
 Willcox JK, Catignani GL, Lazarus S. Tomatoes and cardiovascular health. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2003, Vol.43(1). P.1-18.

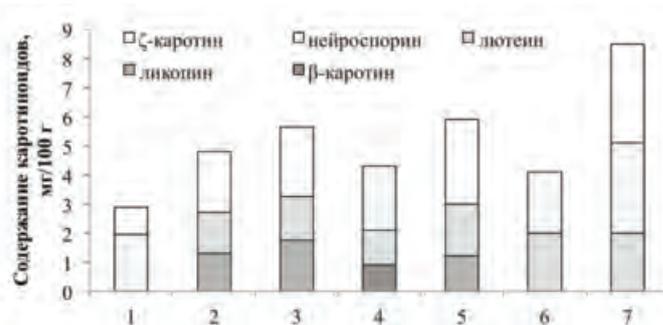


Рис.7. Примеры каротиноидного состава желтых и оранжевых плодов томата.

Примеры каротиноидного состава оранжевых и желтых плодов томата приведены на рис.7.

Анализ каротиноидного состава коричневых плодов

Окраска темно-коричневых плодов томата обусловлена присутствием хлорофилла, что определяет необходимость хроматографического разделения пигментов и выделения смеси хлорофиллов а и в.

Таким образом, хроматографическое количественное выделение индивидуальных пигментов плодов томата позволяет контролировать каротиноидный состав томата различных цветов и количественно оценивать содержание каждого индивидуального компонента. Метод практически не требует использования стандартов благодаря возможности спектрального отнесения каждого каротиноида к той или другой структуре и хроматографической подвижности.

Заключение

Разработанные условия хроматографического разделения каротиноидов томата существенно облегчают оценку каротиноидного состава плодов разной расцветки и позволяют осуществлять быстрое количественное определение индивидуальных каротиноидов. Сравнительная простота процесса разделения и идентификации и доступность аппаратного обеспечения являются отличительной особенностью метода.

References

- Ermakov A.I. Metody biokhimicheskogo issledovaniya rastenij / pod red.. - 3-e izd. - L.: Agropromizdat, 1987. - 430 s.
 FAOSTAT 2005; <http://faostat.fao.org>
 Giovannucci E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. Journal of the National Cancer Institute. 1999, Vol.91(4). P. 317-331 .
 Gupta P, Sreelakshmi Y, Sharma R A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography//Plant Methods. 2015. Vol. 11. P. 5-16. doi: 10.1186/s13007-015-0051-0
 Hahn-Deinstrop E Applied Thin-Layer Chromatography: Best Practice and Avoidance of Mistakes, Second Edition-2007- DOI: 10.1002/9783527610259
 Khachik F, Carvalho L, Bernstein PS, Muir GJ, Zhao D-Y, Katz NB. Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. Exp. Biol. Med. 2002, Vol.227(10). P.845-851.
 Lewinsohn E, Sitrit Y, Bar E, Azulay Y, Meir A, Zamir D, Tadmor Y.Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses. J Agric Food Chem. 2005, Vol.53(8). P.3142-3148.
 Muratore G., Licciardello F., Maccarone E. (2005). Evaluation of the chemical quality of a new type of small-sized tomato cultivar, the plum tomato (*Lycopersicon lycopersicum*)//Italian Journal of Food Science. 2005, Vol. 17 (1).P. 75-81.
 Rodriguez-Amaya DB A guide to carotenoid analysis in foods.2001 Washington:ILSI press.
 Willcox JK, Catignani GL, Lazarus S. Tomatoes and cardiovascular health. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2003, Vol.43(1). P.1-18.