

МЕТОД ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ КАК АЛЬТЕРНАТИВА МЕТОДУ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ТОКОФЕРОЛЬНОГО СОСТАВА СЕМЯН ПОДСОЛНЕЧНИКА В ГЕНЕТИКЕ И СЕЛЕКЦИИ

Истомин Д.С.¹, Демури Я.Н.^{1,2}, Золотавина М.Л.¹

¹ Кубанский государственный университет

ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, 350040, РФ; e-mail: istomin.dmitriy.94@mail.ru

² Федеральний научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта»

ул. Филатова, 17, г. Краснодар, 350038, РФ

Поступила в редакцию: 10.07.2021

Аннотация. В работе рассматриваются способы выделения токоферолов из семян подсолнечника *Helianthus annuus* L. и разделения их на разные гомологичные формы. Целью данной работы является сравнение методов выделения и разделения токоферолов семян подсолнечника для анализа их состава гомологичных форм. Методы позволяют оценить состав токоферолов в сортах и гибридах подсолнечника. Выбор способа оценки токоферолов особенно важен для селекционеров сельскохозяйственных культур и зависит от лабораторного оборудования. В работе рассматриваются метод тонкослойной хроматографии на силикагеле и метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Данные способы являются одними из лучших в своей группе методов, но подходят не для всех областей исследования. Для определения токоферолов в области биохимии, пищевой и аналитической химии, в которых требуется точное измерение концентрации и состава гомологов токоферолов, наиболее полезной будет ВЭЖХ. Этот метод совмещает в себе высокие точность и чувствительность и способен производить анализ быстрее других методов в своей группе. При помощи тонкослойной хроматографии невозможно производить количественное определение вещества, либо возможно производить их с очень высокой погрешностью. Тем не менее этот метод все еще является достаточно чувствительным для точного определения разных соединений. При необходимости возможно определение гомологов и изомеров искомым соединений, по своим химическим свойствам находящимся близко к искомым соединениям. Эти особенности метода позволяют использовать его для определения состава токоферолов в малом диапазоне наук. Особенно полезен этот метод будет в селекции и генетике масличных культур, поскольку он способен предоставить исчерпывающую информацию о биохимических свойствах исследуемых гибридов и сортов не только подсолнечника, но и других масличных растений.

Ключевые слова: витамин Е, гомологи токоферолов, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография.

ВВЕДЕНИЕ

За последние несколько лет интерес к маслам, полученным методом холодного отжима, вырос. Масло, полученное таким образом, используют в сфере пищевого производства, а также в косметической индустрии и фармацевтической промышленности. Такой интерес обусловлен высоким содержанием природных антиоксидантов, которые обладают высокими антиокислительными свойствами. Среди этих соединений наибольшей активностью обладают токоферолы (1).

Токоферолы представляют собой соединения, входящие в состав витаминов группы Е и являются основной группой соединений в этом витамине. Они относятся к производным хромана и являются гомологами по отношению друг к другу. Разница в их строении заключается в разном положении и количестве метильных групп при фенольном кольце молекулы. Альфа-токоферол отличается от других форм наличием трех метильных групп (5,7,8-триметилтокол). Бета- и гамма-токоферол отличаются от других наличием двух метильных групп вокруг фенольного кольца (5,8-диметилтокол и 7,8-диметилтокол соответственно), тем самым являясь изомерами по отношению друг к другу. Дельта-токоферол имеет всего одну метильную группу (8-метилтокол) (2).

Разнообразие типов токоферолов в подсолнечнике обеспечивается мутациями генов *tph1* и *tph2*. Данные гены не являются сцепленными и являются неаллельными по отношению друг к другу, что в результате их межгенного взаимодействия приводит к нарушениям в синтезе гомологов токоферола. Такое нарушение провоцирует качественные и количественные изменения в токоферольном составе подсолнечника (3). Все фракции токоферола, относительно других природных антиокислительных соединений, обладают высокой константой взаимодействия с перекисными радикалами. Этот факт диктует необходимость выведения новых сортов и гибридов подсолнечника с высоким уровнем токоферолов, что вызывает необходимость использования метода разделения разных фракций токоферола при анализировании их состава в семенах гибридов подсолнечника (4).

В качестве одного из методов разделения токоферолов может выступать метод тонкослойной хроматографии, выполненный на силикагелевой пластинке. Данный метод отличается от других своей простотой

и надежностью. Он не требует сложного оборудования и время его проведения короче, чем многие другие методы, однако этот способ определения токоферольного состава не позволяет получать точные количественные данные содержания токоферола, но его можно использовать в качестве экстренного метода, способного быстро и с высокой точностью показать какие гомологи токоферола содержатся в образце.

Другим методом разделения гомологов токоферола на разные фракции может выступать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Сейчас метод высокоэффективной жидкостной хроматографии позиционирует себя как один из лидирующих методов в определении соединений, в том числе и токоферолов. Такое место среди других методов он обеспечил себе благодаря возможности точного определения не только качественного, но и количественного состава. Метод менее трудоемкий и более быстрый в сравнении с другими традиционными методами определения соединений химического и физического принципов. Среди всех модификаций наиболее удобным и оправданным считается нормально-фазовый вариант ВЭЖХ. При помощи этой вариации данного метода можно различить все гомологи токоферола без потери чувствительности и скорости определения (5).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили вызревшие семена разных линий гибридов подсолнечника *Helianthus annuus* L. Линии гибридов обладают мутациями в генах *tph1* и *tph2* с ярко выраженной разностью экспрессии. Анализ методом тонкослойной хроматографии проводили на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта».

Методика проведения тонкослойной хроматографии заключается в следующем. В тонкослойной хроматографии для экстракции токоферолов семена подсолнечника подвергают дроблению с аскорбиновой кислотой в пробирке до состояния мелкого порошка, после чего в полученную порошковую смесь добавляют 0,5 мл 2М гидроксида калия. Полученный раствор ставят на водяную баню при 80 °С на 20 минут. По истечению времени в полученный раствор добавляют 0,5 мл дистиллированной воды и 1 мл гексана, после чего встряхивают пробирку с образцом и ожидают 5–7 минут. В это время происходит разделение фаз и полный переход токоферолов в гексан. Когда произойдет разделение фаз, отбирают гексановый слой, в котором растворены токоферолы, из пробирки в лунки планшета для биохимических исследований. После ожидают испарения гексана. В результате на дне лунок не останется тонкий слой соединений, включающий токоферолы.

Далее наносят на силикагелевые пластинки раствор токоферолов. Для этого в лунку с оставшимся на дне количеством токоферолов вносим 40 мкл гексана и при помощи механического аппликатора Sorbfil с нагревательным устройством УСП-2 и микрошприцем МШ-10Н наносим раствор токоферолов на силикагелевые пластинки размером 10×10 см. Нанесение происходит на ровной линии, параллельной нижнему краю пластинки. Расстояние между образцами рекомендовано брать не менее 5 мм. После нанесения образцов на силикагелевые пластинки их помещают в хроматографическую камеру по размеру пластинки. В качестве подвижной фазы преждевременно в камеру вносят 4 мл гексана и 1 мл диэтилового эфира. Подвижную фазу с пластинкой накрывают герметичной крышкой. После прохождения подвижной фазы 6 см по пластинке, пластинку изымают из камеры, сушат и производят окраску соединений токоферола.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате работы было проведен анализ токоферолов при помощи метода тонкослойной хроматографии. Пример результата разделения разных фракций токоферолов на силикагелевой пластинке изображен на рисунке 1.

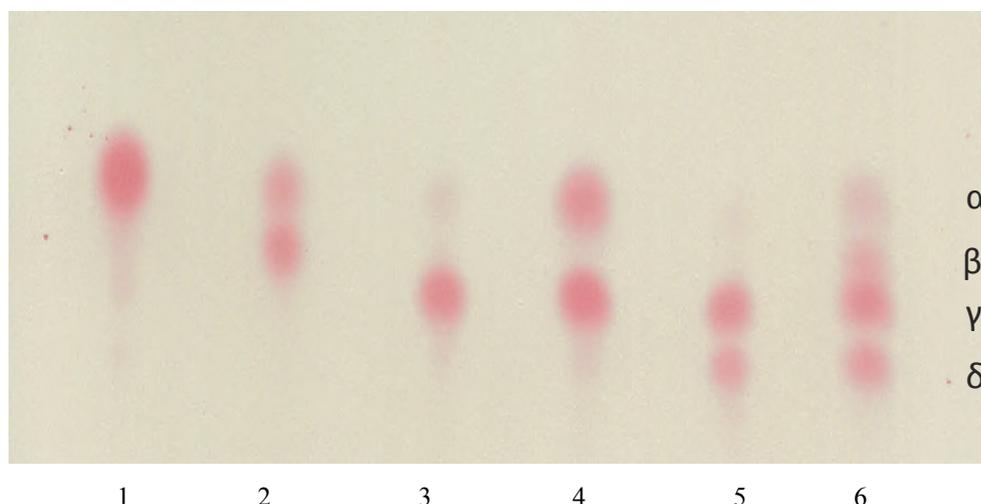


Рисунок 1. Состав токоферолов семян различных генотипов подсолнечника: 1 – нормальный; 2 – *tph1*; 3 – *tph2* max; 4 – *tph2* min; 5 – *tph1tph2* max; 6 – *tph1tph2* min

На рисунке отмечалось разделение токоферолов на все 4 фракции с четким преобладанием у разных мутаций своих доминирующих фракций токоферола. На пластинке под номером один изображен состав токоферолов у растений с нормальным генотипом без мутаций. У таких растений наблюдается наличие только альфа-токоферола. А у растений со слабой экспрессией мутантных генов *tph1* и *tph2*, состав токоферолов которых обозначен шестой позицией, наблюдаются все 4 формы токоферолов.

Противоположно методу тонкослойной хроматографии выступает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. В исследованиях Ещенко и соавт. (2) получены результаты исследования состава токоферолов методами нормально-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Метод нормально-фазовой ВЭЖХ проводится при помощи высокоэффективного жидкостного хроматографа. Данный метод отличается наличием полярной неподвижной фазы (силикагель) и неполярной подвижной фазы (гексан). В данном методе с увеличением полярности веществ, проходящих через колонку, растет их удержание. При изменении элюирующей силы подвижной фазы происходит разделение соединений в анализируемом растворе. Элюирующая сила зависит от силы взаимодействия компонентов подвижной фазы и поверхности неподвижной фазы.

Данные, полученные исследователями, показывают высокую чувствительность метода, что подтверждает способность определять как качественный состав токоферолов, так и количественные показатели фракций. Однако данный метод не дает четкого разделения гамма-токоферола и бета-токоферола, поскольку они являются изомерами друг для друга.

Результаты показывают, что метод тонкослойной хроматографии может быть удобнее метода ВЭЖХ в области генетики и селекции. Поскольку на пластинке видно все формы токоферола можно судить о наличии и уровне экспрессии мутантных аллелей *tph1* и *tph2* в генотипах разных гибридов подсолнечника. Такие данные могут позволить делать предположения о перспективе выведения новых сортов подсолнечника из разных линий экспериментальных гибридов для получения высококачественного масла.

Помимо этого, метод тонкослойной хроматографии в отличие от метода ВЭЖХ не требует сложного оборудования и сложных дорогих реактивов, что будет полезно для небольших частных селекционных компаний. Время анализа при использовании метода тонкослойной хроматографии, начиная от подготовки биоматериала и заканчивая высушиванием силикагелевых пластинок, занимает около 40 минут при использовании ручного метода нанесения экстракта токоферолов на силикагелевую пластинку, что обеспечивает быстрое получение результатов.

Кроме всего перечисленного, еще одним преимуществом метода тонкослойной хроматографии состоит в том, что им можно анализировать и другие части растений. Метод является универсальным и при помощи него можно рассматривать содержание разных гомологов токоферола в пыльце, стеблях, листьях и молодых побегах, если такая необходимость возникает у исследователей. Данный метод можно применять и к другим видам растений, что обеспечивает широкий диапазон исследований в разных направлениях селекции масличных и других культур.

Таким образом способ разделения изомеров токоферола хроматографическим методом на силикагелевой пластинке способен давать информацию о биохимических свойствах гибридов подсолнечника, его генетических особенностях, а также об окислительных свойствах масел в кратчайшее время, что позволяет контролировать токоферольный состав подсолнечника. Метод тонкослойной хроматографии способен выполнять те же функции, что и метод ВЭЖХ, однако он быстрее, позволяет визуализировать информацию, не требует дорогостоящего оборудования и в целом более экономически более выгоден, что делает его более доступным для широкого круга исследователей и начинающих предпринимателей в области селекции растений.

Список литературы / References:

1. Sionek B. Cold-pressed oils. *Annals of PZH*, 1997, vol. 48, no. 3, pp. 283-294. (In Poland)
2. Ещенко А.Ю., Зенкевич И.Г. Определение токоферолов и токотриенолов в растительных маслах и некоторые особенности их состава. *Вестник СПбГУ*, 2006, сер. 4, № 4, с. 68-75. [Eshchenko A.Yu., Zenkevich I.G. Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and some features of their composition. *Vestnik St. Petersburg State University*, 2006, ser. 4, no. 4, pp. 68-75. (In Russ.)]
3. Демури Я.Н., Ефименко С.Г., Перетягина Т.М. Линии подсолнечника с различной экспрессивностью мутаций состава токоферолов в семенах. *Масличные культуры*, 2006, № 2(135), с. 35-37. [Demurin Ya.N., Efimenko S.G., Peretyagina T.M. Sunflower lines with different expressiveness of mutations in the composition of tocopherols in seeds. *Maslichnye kultury*, 2006, no. 2(135), pp. 35-37. (In Russ.)]
4. Сизова Н.В. Снижение концентрации токоферолов в процессе окисления жирных масел. *Химия растительного сырья*, 2009, № 1, с. 117-119. [Sizova N.V. Decrease in the concentration of tocopherols in the process of oxidation of fatty oils. *Chemistry of vegetable raw materials*, 2009, no. 1, pp. 117-119. (In Russ.)]
5. Кищенко В.А., Левчук И.В., Ефименко С.Г. Определение токоферолов в маслах и маслосодержащих продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Масличные культуры*, 2007, № 2, с. 35-38. [Kishchenko V.A., Levchuk I.V., Efimenko S.G. Determination of tocopherols in oils and oily products by high performance liquid chromatography. *Maslichnye kultury*, 2007, no. 2, p. 35-38. (In Russ.)]

DETERMINATION OF TOCOPHEROL COMPOSITION OF SUNFLOWER SEEDS BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY AS AN ALTERNATIVE TO HIGH-EFFICIENCY LIQUID CHROMATOGRAPHY IN GENETICS AND BREEDING

Istomin D.S.¹, Demurin Ya.N.², Zolotavina M.L.¹

¹Kuban State University

Stavropolskaya str., 149, Krasnodar, 350040, Russia; e-mail: istomin.dmitriy.94@mail.ru

²Federal Scientific Center «All-Russian Research Institute of Oilseeds named after V.S. Pustovoyta»
Filatova str., 17, Krasnodar, 350038, Russia

Abstract. The paper discusses the methods for the isolation of tocopherols from *Helianthus annuus* L. sunflower seeds and their separation into different homologous forms. The aim of this work is to describe and compare the techniques for the isolation and separation of tocopherols of sunflower seeds into different homologous forms for the analysis of their composition. The techniques described in this work allow us to assess the composition of tocopherols in sunflower varieties and hybrids. The choice of method for evaluating tocopherols is especially important for crop breeders and depends on laboratory equipment and field of study. The paper considers the method of thin-layer chromatography on silica gel and the method of high performance liquid chromatography (HPLC). These methods are universal in their group of methods, but they are not suitable for all areas of research. For the determination of tocopherols in the fields of biochemistry, food and analytical chemistry, in which an accurate measurement of the concentration and composition of tocopherol homologues is required, HPLC will be most useful. This method combines high accuracy and sensitivity and is able to perform analysis faster than other methods in its group. Using the method of thin-layer chromatography, it is impossible to quantitatively determine a substance, or it is possible to produce them with a very high error. However, this method is still sensitive enough to accurately identify different compounds. If necessary, it is possible to determine the homologues and isomers of the desired compounds, which are close to the desired compounds by their chemical properties. These features of the method make it possible to use it to determine the composition of tocopherols in a small range of sciences. This method will be especially useful in the breeding and genetics of oilseeds, since it is able to provide comprehensive information on the biochemical properties of the studied hybrids and varieties of not only sunflower, but also other oilseeds.

Key words: *vitamin E, homologues of tocopherol, thin-layer chromatography, high performance liquid chromatography, HPLC.*