

УДК 664.5

ОЛИГОСАХАРИДЫ ИЗ ПЛОДОВ АБРИКОСА, ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОМ ВЭЖХ**М.Х. Рахмонов, А.С. Джомуродов, Икром Х., З.К. Мухидинов***Институт химии им В.И. Никитина АН Республики Таджикистан*

Абрикосы – это красивые фрукты оранжевого цвета, богатые бета-каротином и клетчаткой, которые являются одним из первых признаков лета. Хотя сушёные и консервированные абрикосы доступны круглый год, свежие абрикосы с обильным запасом витамина С растут в Таджикистане с мая по август месяцы. Помимо высокого содержания полезных сахаров абрикосы богаты многими растительными антиоксидантами. Другие полезные вещества этого фрукта являются пектины и олигосахариды, которые полезны для здоровья. Фрукты абрикоса считают отличной пищей, которая обеспечивает защитное действие антиоксидантов, добавляя при этом очень мало калорий к ежедневному питанию.

Олигосахариды (ОС) в своём составе содержат остатки моносахаров (глюкозы, галактозы, фруктозы, ксилозы) и различаются длиной цепи, композицией моносахаров и степенью ветвления. Особую группу составляют «неусваиваемые» олигосахариды, которые не расщепляются в желудочном тракте (ЖКТ) человека, ввиду отсутствия ферментов, гидролизующих β -гликозидные связи, связывающие остатки моносахаров. Функциональные олигосахариды распространены в природе, например, мёде, фруктах, овощах и злаковых. Эти олигосахариды обладают физиологической активностью, низкой калорийностью, способностью стимулировать рост популяции микрофлоры кишечника, укреплять иммунную систему, снижать риск возникновения инфекций и рака кишечника, и т. д. Низкая степень сладости, водорастворимость, термостабильность, устойчивость в кислой среде, способность регулировать реакцию меланоидинообразования и сохранять влажность продукта, позволяют использовать олигосахариды в качестве функциональных пищевых ингредиентов, повышающих как биологическую активность, так и вкусовые показатели продуктов питания [1].

В данной работе ОС были получены последовательной обработкой выжимок абрикоса местного сорта «Махтоби» в процессе гидролиз-экстракции пектина. Раствор, полученный после обработки выжимок, и отделённый от остатков клетчатки (КС), разделяли на три фракции, различающиеся по структуре, молекулярной массе и физико-химическим параметрам и условно названные микрогель (МГ), пектиновые вещества в (ПВ) и олигосахариды (ОС). Образцы ОС были извлечены из соответствующих экстрактов по упрощённой схеме (далее Схема). Моносахаридный состав ОС был анализирован с помощью ВЭЖХ с использованием детектора рефрактометрического индекса (РИ).

Жидкостная хроматография (ЖХ) наиболее широко используется для разделения сахаров. Однако используемые традиционные колонки с обращённой фазой не могут быть использованы для исходных (непроизводных) сахаров [2], так как стационарная фаза не обеспечивает требуемого времени удержания, поэтому необходимы специальные колонки. Поскольку сахара в своей структуре не содержат хромофоров их обнаружение ставится затруднённым в ВЭЖХ приборах, имеющих УФ-видимую область света и других общедоступных детекторах. Для обнаружения сахаров используют такие датчики, как рассеяние света при испарении (СПИ-ELSD) [3], показатель преломления-рефрактометрический индекс (РИ) [4], масс-спектрометрия (МС) [5]. Причём, каждый детектор имеет свои ограничения.

Авторы [6, 7], использовали ВЭЖХ метод для разделения сахаров с использованием РИ детектора. Пределы обнаружения находились в одинаковых значениях, как и для предыдущих методов анализа, хотя для разделения использовались разные колонки. Одним из недостатков определения этого метода является чувствительность детектора к температуре, небольшие колебания температуры приводят к большим колебаниям. Обнаружение сахаров с РИ-детектором нельзя использовать в сочетании с градиентами несущей фазы, что ограничивает разработку метода.

Лопес и Гаспар [8], описали метод ВЭЖХ-РИ с использованием хиральной колонки. Способ позволяет идентифицировать углеводы и определять абсолютную конфигурацию (d или l), а также одновременно определять конфигурацию аномерного центра (α или β) моносахарида. Они также изучили влияние температуры колонки на профиль разделения сахаров.

Для анализа моносахаридного состава ОС использовали ВЭЖХ метод с использованием детектора РИ на приборе Waters Breeze (Waters, USA). Для разделения моносахаридов ОС образца, полученного из плодов абрикоса использовали колонку Varian MetaCarb 67C, с размерами 0,65 x 30 см, заполненный катионообменной смолой Varian в ионной форме Ca^{2+} . Удержание сахаров с использованием этого метода (так называемый катионный или лигандный обмен), в первую очередь, основано на образовании комплексов между гидроксильными группами сахаров и противоионами металлов. Следовательно, удерживание варьируется в зависимости от стабильности комплексов.

Данная колонка MetaCarb 67C специально разработана фирмой Varian (США) для разделения полисахаридов, моносахаридов и сахарных спиртов по одному хроматографическому профилю. В качестве подвижной фазы требуется только дистиллированная деионизированная вода. Рекомендуемая скорость потока для этой колонки составляет 0,5 мл/мин с использованием встроенного фильтра и защитной колонны. Концентрация образцов варьировалась в диапазоне 10–100 мг/л, объем инъекции составлял 20 мкл. Растворы фильтровали через мембрану 0,45 мкм и дегазировали перед использованием. Концентрацию сахаров определяли с помощью РИ детектора Waters 2414 с чувствительностью 512 и температуры колонки 90 °С.

Для количественного анализа моно- и дисахаридов использовали ряд стандартных сахаров для построения калибровочной кривой. Сахара элюировали изократически с помощью деионизированной воды со скоростью потока 0,5 мл/мин. Концентрацию каждого углевода определяли после интеграции соответствующих пиков и их сравнения со стандартными кривыми, полученными для сахарозы, D-глюкозы, D-галактозы, L-арабинозы, L-рамнозы и сорбита (Sigma). Хроматограммы сахарных смесей представлены на рис. 1.

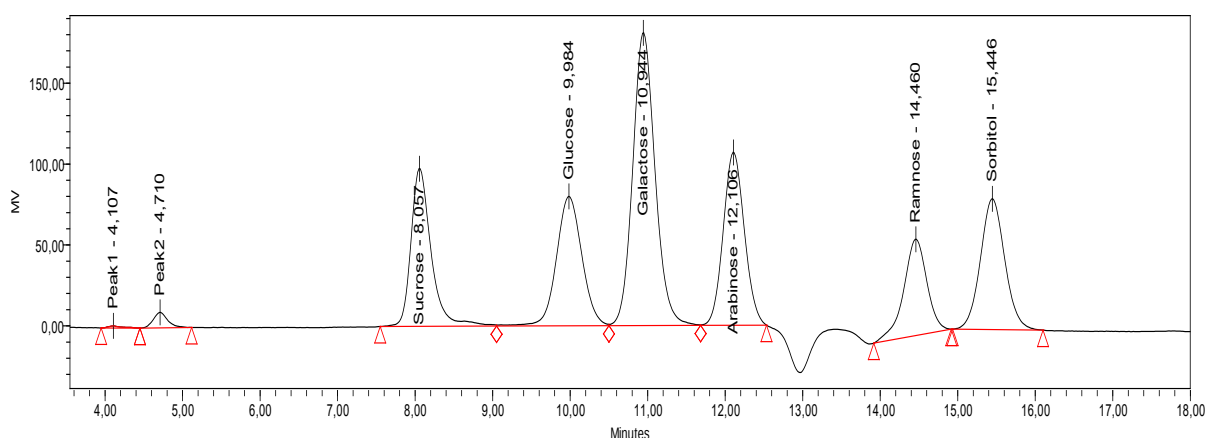


Рис. 1. Хроматограммы сахарных смесей: сахарозы, D-глюкозы, D-галактозы, L-арабинозы, L-рамнозы и сорбита (Sigma). Колонка Varian MetaCarb 67C, температура колонки 90° С, подвижная фаза – деионизированная дистиллированная вода, скорость потока 0,5 мл/мин, объем вводимого образца 20 мкл, чувствительность РИ 64. Концентрация образца 1000 мг / л

Для калибровки прибора использовали стандартные смеси сахаров с концентрацией 20,0, 40,0, 50,0, 60,0, 80,0, 100,0 мг/л. В качестве внутреннего стандарта использовали D-сорбитол с концентрацией 55,2 мг/л. Калибровочная кривая с использованием программного обеспечения Waters Breeze была создана для дальнейшего расчёта количества сахара в различных исследуемых образцов. Полученная зависимость показателя преломления от концентрации сахара очень хорошо согласуется с линией тренда уравнений регрессии с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,99$ для всех сахаров, кроме арабинозы ($R^2 = 0,92$). Время удерживания, площадь, параметры пиков, количество сахаров в стандартной смеси, процент их восстановления в соответствии с РИ-детектором, даётся в таблице 1.

В табл. 2. представлен состав сахаров раствора пермеата пектинового гидролизата, полученного с помощью мембраны PS 100, обозначенной как FIB2 (Схема). Среди элюированных моно- и дисахаридов были обнаружены глюкоза, арабиноза, мальтоза (пик 2) и сахароза с весовым процентом 37,77 %, 24,67 %, 19,82 % и 15,25 % соответственно.

Моносахаридный состав ОС, определённый таким образом, для фракции F1B2B (Схема), которая представляет собой концентрированный (150 мл) раствор пермеата, полученного из предыдущего фильтрата на другой мембране PES 5, представлены в таблице 3. Видно, что моносахаридный состав данной фракции практически идентичны с вышеуказанной фракцией, и состоит из глюкозы (40,90 %), арабинозы (28, 69 %), мальтозы (21,12 %) и сахарозы (10,56 %) и следов галактозы.

Таблица 1. Время удерживания, площадь, параметры пиков, количество сахаров в исходной смеси, процент их восстановления в соответствии с РИ-детектором

Назначение пика	Время удерживания, мин	Площадь Пика, мкм ²	Найденное количество, мг/л	Концентрация сахара в ст. растворе ст, мг/л	Выход, %
Peak1	4,107	16732			
Maltose	4,710	123071	56.54	55.5	98.1
Sucrose	8,057	1763764	64.45	64.3	99.4
Glucose	9,984	1823640	53.12	53.4	99.5
Galactose	10,944	3621038	54.31	55.2	98.4
Arabinose	12,106	2022201	62.62	64.2	97.5
Rhamnose	14,460	1237949	69.08	67.8	98.1
Sorbitol	15,446	1766661	52.16	55.2	94.5

Таблица 2. Время удерживания, площадь и параметры пиков, количество обнаруженных сахаров в мг/л и в процентах для фракции F1B2 (раствор пермеата от гидролизата пектина, полученный с помощью мембраны PS 100 KDA MWCO)

Назначение пика	Время удерживания, мин	Площадь Пика, мкм ²	Найденное количество, мг/л	Концентрация сахара в ст. растворе, мг/л
Peak1	4.075	14712	-	-
Maltose	4.744	381485	17.67	19.82
Sucrose	8.028	177854	13.60	15.25
Glucose	9.967	118503	33.69	37.77
Galactose	10.920	-	-	-
Arabinose	11.662	789067	22.00	24.67
Ramnose	14.150	-	-	-
Sorbitol	15.383	260832	2.20	2.47

Таблица 3. Время удерживания, площадь и параметр пиков, количество обнаруженных сахаров в мг/л и в процентах для фракции F1B2B (концентрат пермеата от гидролизата пектина, полученный с помощью мембраны PES 5)

Назначение пика	Время удерживания, мин	Площадь Пика, мкм ²	Найденное количество, мг/л	Концентрация сахара в ст. растворе, мг/л
Peak1	4,076	-	-	-
Maltose	4,785	367421	17.67	21.12
Sucrose	8,045	196306	5.49	10.56
Glucose	9,975	1185037	34.21	40.90
Galactose	10,703	-	-	-
Arabinose	11,671	786453	24	28.69
Peak7	13,333	-	-	-
Ramnose	14,167	-	-	-
Sorbitol	15,431	126491	2.28	2.73



Упрощённая схема выделения ОС из процесса получения пектина

Таким образом, используя калибровку, сохранённые в программе Breeze, был определен состав ОС и других образцов. Данный подход может быть применён для анализа сахаров из многих биологических объектов.

ЛИТЕРАТУРА

- <https://www.verywellfit.com/oligosaccharides-and-prebiotics-health-benefits-2242223>
- Glyad V.M., Determination of Monosaccharides, Disaccharides and Oligosaccharides in the Same Plant Sample by High-Performance Liquid Chromatography, Russian Journal of Plant Technology, 49–2, (2002), p. 277–282.
- Karlsson G., Winge S. and Sandberg H., Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection, Journal of Chromatography A 1092, (2005), p. 246–249.
- Hammad L.A., Saleh M.M., Novotny M.V. and Mechref Y. Multiple-Reaction Monitoring Liquid Chromatography Mass Spectrometry for Monosaccharides Compositional Analysis of Glycoproteins, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 20, (2009), p. 1224–1234.
- Barreira J.C.M., Pereira J.A., Beatriz M., Oliveira P.P. and Ferreira I.C.F.R. Sugars Profiles of Different Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and Almond (*Prunus dulcis*) Cultivars by HPLC-RI. Plants Foods Hum Nutr., 65, (2010), p. 38–43.
- Castellari M., Versari A., Spinabelli U., Galassi S. and Amati A. An improved HPLC method for the analysis of organic acids, carbohydrates and alcohols in grape musts and wines, J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. 23, (2000), p. 2047–2056.
- Lopes J.F. and Gaspar E.M.S.M. Simultaneous chromatographic separation of enantiomers, anomers and structural isomers of some biologically relevant monosaccharides, Journal of Chromatography A, 1188 (2008) 34–43.