

ИЗУЧЕНИЕ АНТОЦИАНОВ ПЛОДОВ ВИНОГРАДА КУЛЬТУРНОГО С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ОФ ВЭЖХ И MALDI/TOF/MS

Новиков О.О., Писарев Д.И., Жилиякова Е.Т., Левченко В.Е., Казакова В.С.,
Попов Н.Н., Фадеева Д.А.

ФГАОУ ВПО Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия (308015, Белгород, ул. Победы, 85), e-mail: Pisarev@bsu.edu.ru

В статье приводятся результаты химического анализа плодов винограда культурного. Известно, что виноград одно из древнейших растений, используемых человеком. Одной из наиболее важных групп соединений винограда являются антоцианы, представляющие собой природные красители с широким спектром фармакологической активности. Сведения о составе антоцианов плодов винограда литературных источников разнятся. Поэтому настоящее исследование посвящено изучению состава этой группы соединений в выбранном объекте. Состав антоцианов изучен с привлечением одних из наиболее эффективных методов анализа – высокоэффективной хроматографии и масс-спектрометрии в варианте MALDI/TOF/MS. С использованием указанных методов удалось расшифровать структуру антоцианов, входящих в состав плодов винограда. Установлено, что всего в плодах содержится 9 соединений антоциановой структуры, причём наибольшее процентное содержание приходится на гликозиды мальвидина. Использование метода ОФ ВЭЖХ при анализе антоцианов оказалось полезным для индивидуальной характеристики и количественной оценки компонентов в изученном объекте. Использование MALDI/TOF/MS оказалось важным для групповой характеристики антоцианов, когда необходимо подтвердить присутствие искомым компонентов в объекте.

Ключевые слова: виноград культурный, антоцианы, ОФ ВЭЖХ, градиентное элюирование, масс-спектрометрия, масс-спектрометрический профиль.

STUDY OF ANTHOCYANIN GRAPE-CULTURAL METHODS OF USING HPLC AND MALDI/TOF/MS

Novikov O.O., Pisarev D.I., Zhilyakova E.T., Levchenko V.E., Kazakova V.S., Popov N.N.,
Fadeeva D.A.

FGAOU VPO Belgorod State National Research Uni-versity, Belgorod, Russia (308015, Belgorod, st., 85), e-mail: Pisarev@bsu.edu.ru

The article presents the results of the chemical analysis of grape- cultural . It is known that the grape is one of the oldest plants used by man. One of the most important groups of compounds are grape anthocyanins constitute natural colors with a wide spectrum of pharmacological activity. Information about the composition of anthocyanins in grape- literary sources differ. Therefore, the present study investigates the composition of this group of compounds in the selected object . The composition of anthocyanins studied with the assistance of one of the most objective analysis methods - high performance chromatography and mass spectrometry in the form MALDI / TOF / MS. Using these methods could decipher the structure of anthocyanins that are part of the fruit of grapes. Found that only 9 in fruit anthocyanin compounds structure , with the highest percentage accounts for malvidin glycosides . The use of RP-HPLC method for the analysis of anthocyanins was useful for individual characteristics and quantify the components of the studied object. Using MALDI / TOF / MS proved to be important for the group characteristics of anthocyanins when necessary to confirm the presence of the desired components in the object.

Keywords: grapes cultural, anthocyanins, RP-HPLC, gradient elution, mass spectrometry, mass spectrometry profile

Виноград культурный (*Vitisvinifera*L.) – одно из древнейших растений, используемых человеком. Лечение виноградом (ампелометрия) известно с глубокой древности. *V. vinifera*L. оказывает тонизирующее, бактерицидное, мочегонное, слабительное, повышает мышечный тонус, особенно сердечной мышцы. *V. vinifera*L. эффективен при хронических заболеваниях желудка, кишечника, печени, желчного пузыря и желчевыводящих путей, лёгких, анемии, гипертонии, подагре [1, 2].

Одной из наиболее ценных групп действующих веществ плодов *V. vinifera*L. являются антоцианы, обладающие широким спектром фармакологической активности [4]. Сведения о составе антоцианов *V. vinifera*L. встречающиеся в литературе достаточно противоречивы. Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение антоцианов *V. vinifera*L. с помощью методов ОФ ВЭЖХ и *MALDI/TOF/MS*, как одних из наиболее объективных методов анализа.

Для выделения суммы антоцианов из плодов *V. vinifera*L. использовали способ выделения антоцианов с помощью сорбции на тальке [3].

Хроматографические исследования проводили на хроматографическом приборе фирмы «*AgilentTechnologies 1200 Infinity*» производства США автоматическим пробоотборником *Agilent 1200*, вакуумным микродегазатором, градиентным насосом и термостатом той же серии. Электронные спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометрического детектора с диодной матрицей серии *Agilent 1200* (диапазон длин волн от 190 до 950 нм, кювета с длиной оптического пути 10 мм; объемом 13 мкл), шаг сканирования - 2 нм.

Для регистрации и обработки спектральных данных и хроматограмм использовали программное обеспечение «*AgilentChemStation*».

Для испытаний использовали стальную хроматографическую колонку, *AscentisexpressC₁₈2,7μm × 100 мм × 4,6 мм*.

Антоцианы подвергали хроматографическому разделению в следующих условиях: подвижная фаза: (А) – водный раствор кислоты ортофосфорной (рН ~ 2), (Б) – ацетонитрил или 0,5%-ный водный раствор кислоты уксусной (А) – ацетонитрил (Б) в градиентном режиме элюирования; скорость подвижной фазы – 0,5 мл/мин; температура колонки +35 °С; объём вводимой пробы 1 μл.

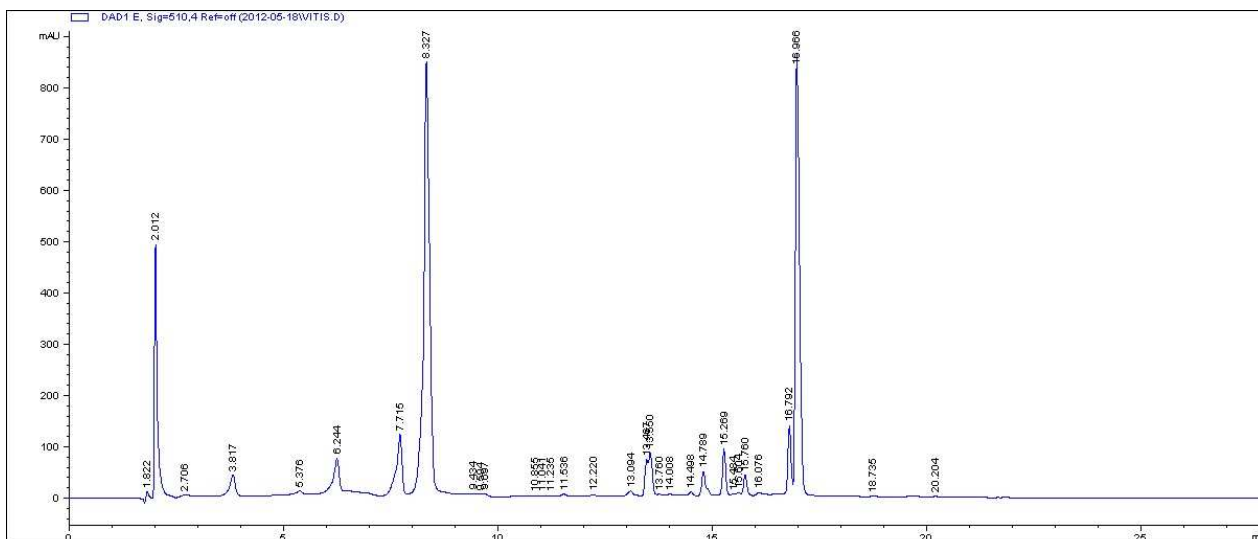
Состав подвижной фазы программировали в условиях, указанных в таблице 1.

Таблица 1 - Условия градиентного элюирования антоцианов

Время, мин	А,%	Б,%
0	90	10
10	80	20
20	70	30
30	50	50
40	10	90

Детектирование осуществляли при 520 нм.

Результатом хроматографического разделения суммы антоцианов *V. vinifera*L. методом ОФ ВЭЖХ явилось установление наличия 8 компонентов антоциановой структуры (рисунок 1).



**Рисунок 1 - Хроматограмма суммы антоцианов плодов *V. vinifera*L.
(детекция диодно-матричная, $\lambda = 510$ нм)**

Показатели пригодности хроматографической системы, рассчитанные по результатам хроматографирования, представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Показатели пригодности хроматографической системы для определения антоцианов *V. vinifera*L.

t_R	S	N	НЕТР	R_s	T_f	W_b
3,817	362,6	13501	7,4	-	1,427	0,1314
6,244	605,6	35212	2,8	18,35	1,734	0,1331
7,715	1141,2	53116	1,8	11,0	1,94	0,1339
8,322	8323,4	54340	1,8	4,4	0,861	0,1428
16,966	5762,6	425806	0,23	1,6	0,548	0,104

t_R - абсолютное время удерживания, S - площадь пика, N - число теоретических тарелок, НЕТР - высота, эквивалентная теоретической тарелке, R_s - коэффициент разделения пиков, T_f - коэффициент асимметрии, W_b - ширина пика на базовой линии

Результаты расчёта критериев эффективности ($N > 5000$, $R_s > 1,5$, $T_f < 2$) [5] свидетельствуют о пригодности использованной системы для анализа антоцианов *V. vinifera*L.

Регистрацию масс-спектров проводили на приборе масс – спектрометр «AutoflexII» (модификация *Microflex*) «MALDITOF/TOF» (приборная ошибка - не более 0,5 Da) фирмы *BrukerDaltonicsGmbH* производства Германии.

Анализируемую пробу в количестве 0,5 μ l с помощью дозатора наносили на мишень «MTP 384 targetplatemattsteelTF», высушивали и сверху наносили каплю матрицы. В качестве матрицы использовали α -цианокоричную кислоту (*HCCA*), регистрацию спектров вели с помощью программы «FlexControl», обработку данных осуществляли в программе «FlexAnalysis», в отражённом режиме при положительной полярности (*ReflexPositive*).

Масс-спектрометрический профиль антоцианов плодов *V. vinifera*L. показал присутствие пиков молекулярных ионов с зарядами $m/z = 463,187$, $m/z = 479,161$, $m/z = 493,201$, $m/z = 609,158$, $m/z = 625,143$, $m/z = 639,158$, соответствующих монозидным и дигликозидным формам антоцианов. При фрагментации образуются агликоны, молекулярные пики ионов которых имеют заряды $m/z = 301,306$, $m/z = 317,313$ и $m/z = 331,544$, соответствующие пеонидину, петунидину и мальвидину. Для мальвидина и его гликозида можно выделить характерный признак присутствия в спектре в деметилированном состоянии: $m/z = 345[C_{17}H_{15}O_6]-14[CH_2] = 331$, та же картина наблюдается в случае гликозида (рисунок 2).

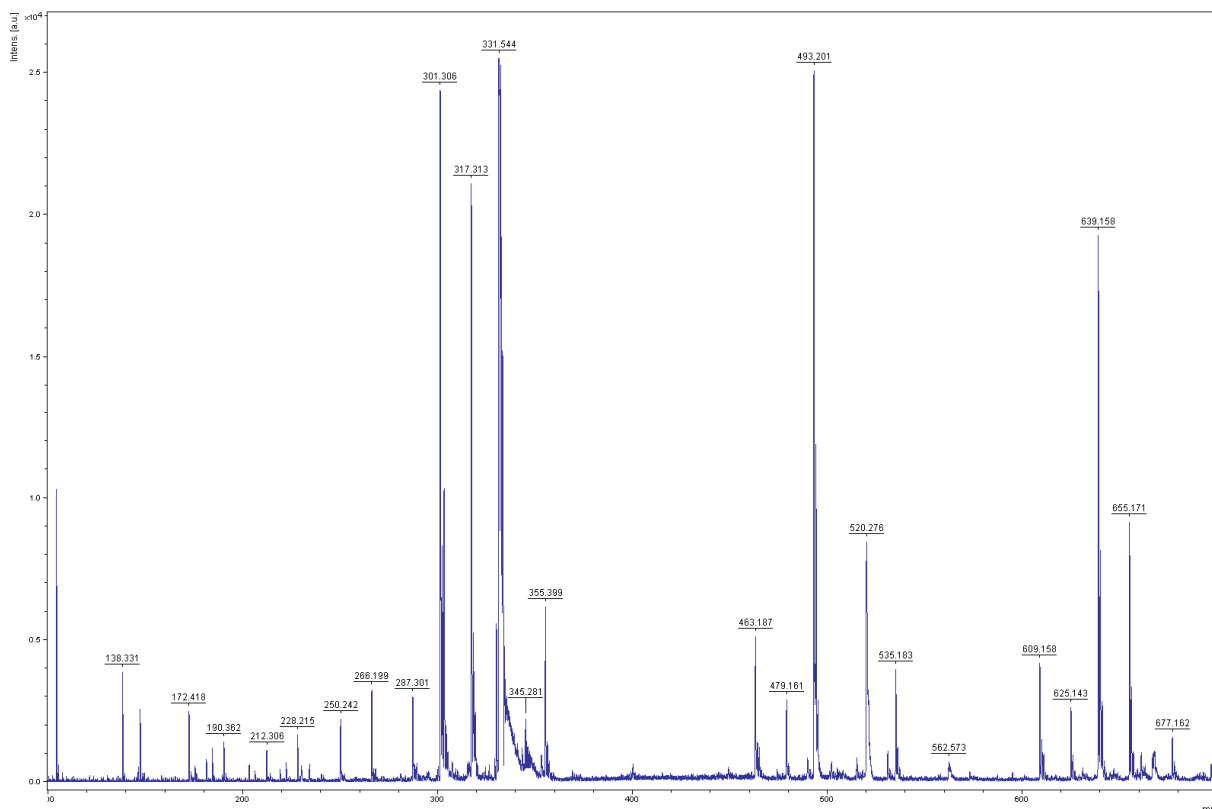


Рисунок 2 - Масс-спектр антоцианов плодов *V. vinifera*L.

Результаты анализа плодов *V. vinifera*L. представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Результаты анализа антоцианов в плодах *V. vinifera* L.

t_R , мин	Содержание антоцианов в сумме, %	Молекулярная масса m/z	Идентифицированный компонент
4,01	3,16	463	Пеонидин-3-глюкозид
-	-	610	Пеонидин-3-рутинозид
7,42	9,8	479	Петунидин-3-глюкозид
9,20	7,9	625	Петунидин-3-рутинозид
10,48	52,0	493	Мальвидин-3-глюкозид
16,13	5,0	639	Мальвидин-3-рутинозид
18,04	2,4	301	Пеонидин
19,36	3,7	317	Петунидин
19,818	16,1	331	Мальвидин

Таким образом, в ходе настоящего исследования с помощью методов ОФ ВЭЖХ и *MALDI/TOF/MS* удалось обнаружить присутствие 9 антоцианов, гликозидов мальвидина, пеонидина и петунидина. Причём использование метода ОФ ВЭЖХ при анализе антоцианов оказалось полезным для индивидуальной характеристики и количественной оценки компонентов в изученном объекте. Использование *MALDI/TOF/MS* оказалось важным для групповой характеристики антоцианов, когда необходимо подтвердить присутствие искомым компонентов в объекте.

Список литературы

1. Кишковский З. Н. Химия вина: учеб. пособие для вузов пищ. пром-сти / З. Н. Кишковский, И. М. Скурихин. – М. : Пищ. пром-сть, 1976. – 312 с.
2. Соколов С. Я. Фитотерапия и фитофармакология: Руководство для врачей / С. Я. Соколов – М. : Медицинское информационное агентство, 2000. – 976 с.
3. Способ выделения биологически активных антоцианов : пат. 2302423 Рос. Федерация : МПК С 07 Н 17/065, С 07 Н 1/08, С 09 В 61/00 / А. В. Птицын, Э. И. Мухтаров, А. П. Каплун [и др.] ; заявитель НПО «Техкон». – № 2005117999/04 ; заявл. 10.06.2005 ; опубл. 10.07.2007, Бюл. 19. – 7 с.
4. Anthocyanins in medicine / E. Kowalczyk, P. Krzesiński, M. Kura [et al.] // Pol. J. Pharmacol. – 2003. – Vol. 55, № 5. – P. 699-702.
5. European Pharmacopoeia [Text] : 2 vol. – 5th ed. – Strasbourg : Council of Europe. cop, 2005. – 2 v.

Рецензенты:

Шомаров В.К., д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, г.Курск.

Будко Е.В., д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, г.Курск.