

## **ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА АНТОЦИАНОВ ИРГИ ОЛЬХОЛИСТНОЙ – *AMELANCHIER ALNIFOLIA NUTT* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАТРИЧНО-АКТИВИРОВАННОЙ ЛАЗЕРНОЙ ДЕСОРБЦИОННОЙ ИОНИЗАЦИИ (MALDI)**

**Д.И. ПИСАРЕВ, О.О. НОВИКОВ  
Н.А. ПИСАРЕВА, Н.В. АВТИНА  
М.Д. БЕЗМЕНОВА, А.В. СТЕПАНОВА**

*Белгородский государственный  
национальный исследовательский  
университет*

*e-mail pisarev@bsu.edu.ru*

В статье представлены результаты изучения состава антоцианов плодов ирги ольхолистной методами ВЭЖХ, масс- и УФ-спектроскопии. Обнаружено наличие двух гликозидов цианидина. Подобраны оптимальные условия для количественного определения антоцианов в сырье, которое осуществлялось методом рН-дифференциальной спектрофотометрии.

Ключевые слова: антоцианы, ирга ольхолистная, ВЭЖХ, масс-спектрометрия, УФ-спектрофотометрия.

Антоцианы – одни из самых важных для человека представителей растительных полифенольных соединений. Антоцианы применяются как пищевые красители (Е 163) и биологически активные соединения. Известны лекарственные препараты и биологически активные добавки к пище на основе антоцианов.

Интересным является факт аномально высокой антирадикальной активности антоцианов, которая во много раз превышает таковую других классов флавоноидов [5].

Для антоцианов в настоящее время доказаны следующие фармакологические эффекты: вазопротекторный, антиоксидантный, противовоспалительный, противоотечный [3].

Наличие антоцианов присуще многим растениям, так как они обеспечивают цвет цветков, плодов, но арсенал лекарственных растений, содержащих эту группу соединений, которые могут служить их рациональными источниками, насчитывает ограниченное количество наименований. Поэтому изучение и выявление перспективных источников антоцианов является актуальной проблемой. С этой позиции перспективным является ирга ольхолистая – *Amelanchier alnifolia* Nutt. – растение, интродуцированное в Россию из западных районов Северной Америки, где оно образует огромные заросли по берегам рек, на склонах холмов, в лесах. В 1918 г. введена в культуру и используется в качестве как декоративного, так и пищевого растения, легко поддающегося обрезке. От других видов ирги отличается влаголюбивостью и несколько более поздним цветением [1, 2].

Целью настоящего исследования явилось изучение плодов ирги ольхолистной с применением матрично-активированной лазерной десорбционной ионизации (MALDI).

В качестве объекта исследования использованы плоды ирги ольхолистной.

Для выделения суммы антоцианов использовали способ выделения антоцианов с помощью сорбции на тальке [6]. Для этого 10,0 г свежих плодов ирги ольхолистной экстрагировали 1% раствором кислоты хлористоводородной в 96% спирте этиловом. Полученное извлечение сгущали под вакуумом на ротационном испарителе ИР-1 до минимального объёма. Для получения чистой суммы антоцианов извлечённую фракцию подвергли избирательному сорбированию на тальке. Для этого её смешивали с достаточным количеством талька до образования кашицы. Полученную массу переносили в воронку Бюхнера с бумажным фильтром. Воронку присоединяли к колбе Бунзена с водоструйным насосом и под вакуумом промывали полученную массу водой очищенной до того момента, пока промывные воды не стали прозрачными. Промывные воды удаляли из колбы Бунзена, а из оставшейся на фильтре массы проводили десорбцию антоцианов 1% раствором кислоты хлористоводородной в 96% спирте этиловом. Вымывали до появления бесцветных промывных вод. Полученный раствор упаривали под вакуумом на ротационном испарителе ИР-1.

Полученную сумму далее подвергали масс-спектрометрическому анализу. Регистрацию масс-спектров проводили на приборе масс-спектрометр «Autoflex II» «MALDI TOF/TOF» фирмы Bruker Daltonics производства Германии. Анализируемую пробу в количестве 0,5 µl с помощью дозатора наносили на мишень «MTP 384 target plate matt steel

TF», высушивали и сверху наносили каплю матрицы. В качестве матрицы использовали  $\alpha$ -цианокоричную кислоту, регистрацию спектров вели с помощью программы «Flex Control», обработку данных осуществляли в программе «Flex Analis», в отражённом режиме при положительной полярности (reflective positive). При масс-спектрометрическом исследовании получен спектр, на котором наблюдается наиболее интенсивный пик иона с зарядом  $m/z = 287,316$ , соответствующий пику агликона – по молекулярной массе соответствующий цианидину, и интенсивный пик иона  $m/z = 449,214$ , отвечающий его моногликозиду (рис. 1).

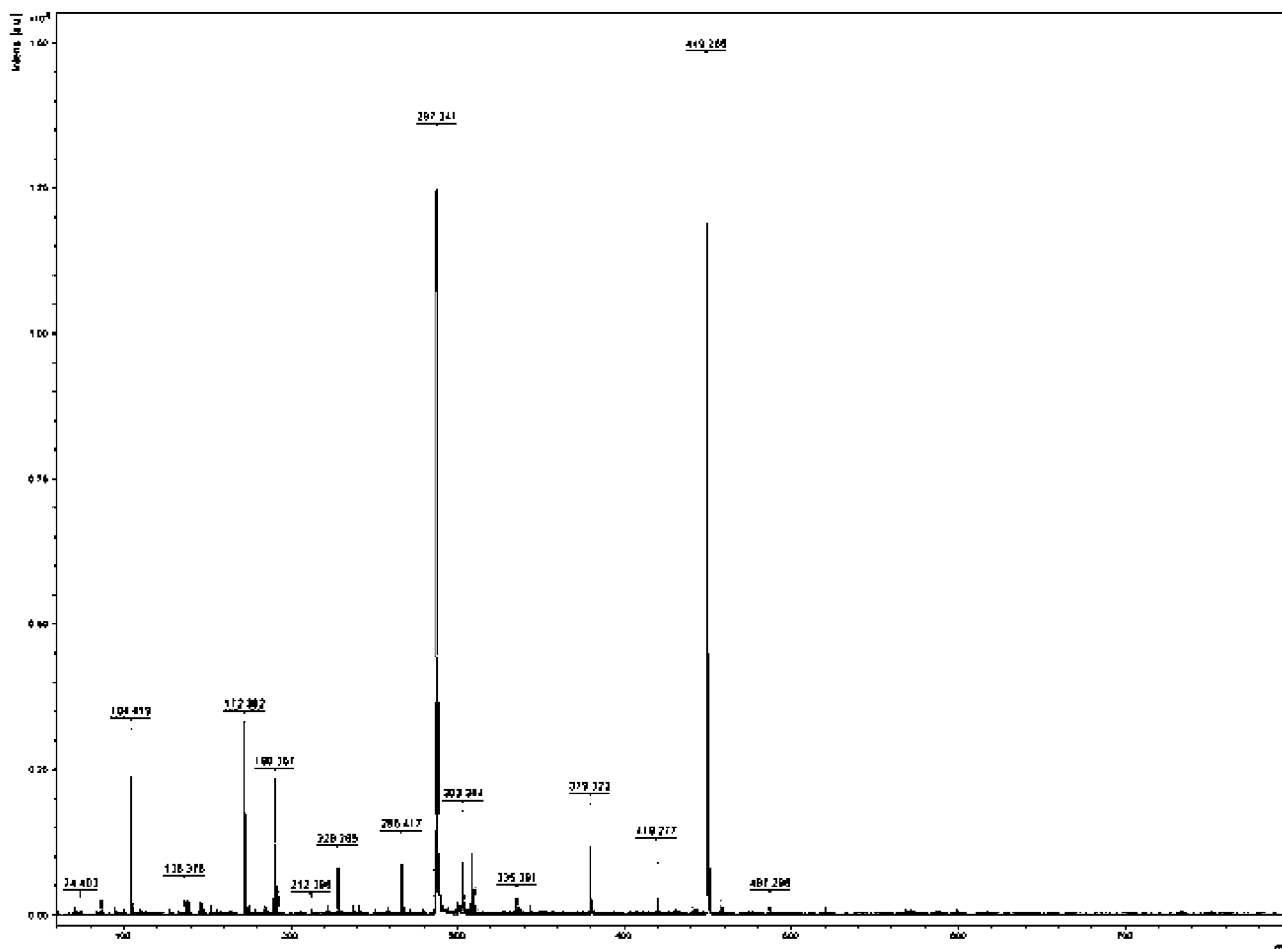


Рис. 1. Масс-спектр суммы антоцианов ирги ольхолистной

Для установления сахарного компонента, входящего в состав гликозида, использован кислотный гидролиз 10% раствором кислоты уксусной на водяной бане в течение 30 минут. Выпавший после гидролиза осадок агликона отфильтровывали, а гидролизную жидкость нейтрализовывали бария карбонатом. Далее в гидролизной жидкости обнаруживали моносахара в тонком слое силикагеля на пластинках «Сорбфил» в системе растворителей: этилацетат – кислота уксусная – вода (3:1:3) со свидетелями нейтральных сахаров. Детекцию пятен на хроматограмме проводили путём её нагревания до 105 °С. Таким образом было выявлено наличие галактозы и глюкозы. Следовательно, можно утверждать, что в плодах ирги ольхолистной содержатся цианиди-3-глюкозид и цианидин-3-галактозид.

Помимо пиков высокой интенсивности на масс-спектре можно заметить пик молекулярного иона с зарядом  $m/z = 303,344$ , отвечающий дельфинидину, и соответствующий ему гликозид с зарядом  $m/z = 487,295$ , отвечающий его натриевой форме гликозида.

Присутствие трёх гликозидов антоцианов подтверждено методом обратнoфазной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для разделения использованы следующие условия: колонка ZORBAX Eclipse XDB – C18 600 Bar 2.1×100мм, 1,8 Мм; подвижная фаза – 10% уксусная кислота в спирте этиловом, скорость подачи элюента 0,150 мл/сек, объем вводимой

пробы 5 мкл, детекция УФ  $\lambda = 510$  нм, температура колонки 25 °С, давление 300 Ваг. Разделение проводилось в изократическом режиме. Полученные результаты представлены на рис. 2.

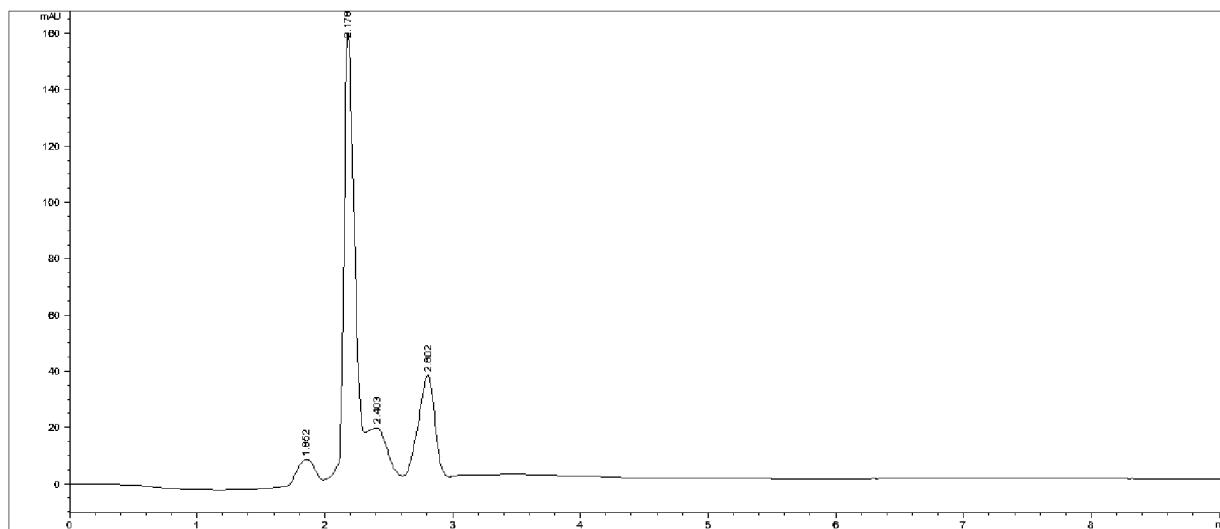


Рис. 2. Хроматограмма суммы антоцианов ирги ольхолистной

На рис. 2 наблюдаются три основных пика со временем удерживания: 1,852, 2,178 и 2,802.

Для доказательства расположения гидроксильных групп нами был использован метод УФ-спектрофотометрии с использованием шифт-реактива – 5% этанольного раствора алюминия хлорида.

Для выявления свободной орто-диоксигруппировки в кольце В сначала регистрировали УФ-спектр чистой суммы антоцианов. При этом наблюдался один максимум поглощения при длине волны  $\lambda = 545$  нм. При добавлении 5% раствором алюминия хлорида в 96% этиловом спирте наблюдалось смещение максимума поглощения на 47 нм, что свидетельствует о свободной орто-диоксигруппировке в кольце В, а сахарная часть у цианидина предположительно находится в положении 3 (рис. 3).

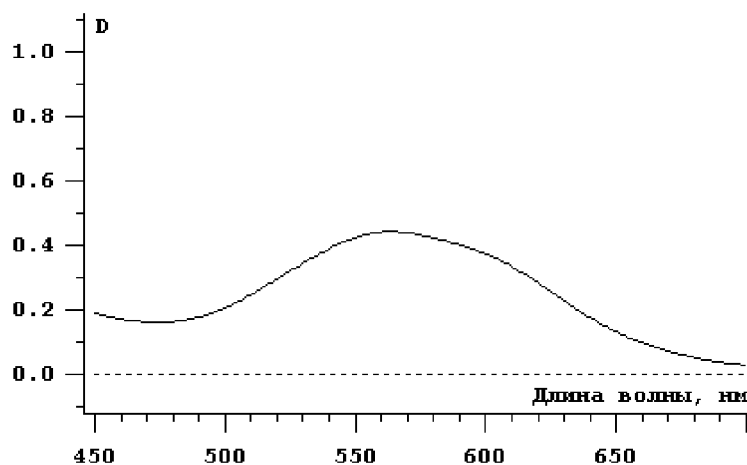


Рис. 3. УФ-спектр поглощения комплекса антоцианов ирги ольхолистной с алюминия хлоридом

Количественное определение антоцианов в плодах ирги ольхолистной проводили методом рН-дифференциальной спектрофотометрии [4].

Для осуществления количественного определения антоцианов возникла необходимость отработать стадию экстракции. Были подобраны оптимальные условия экстрагирования антоцианов из сырья 1% раствором кислоты хлористоводородной в спиртах различной крепости – 40%, 70%, 96% и воды. Установлено, что наилучшим растворителем для антоцианов является 1% раствор кислоты хлористоводородной в 96% спирте этиловом

при соотношении сырьё – растворитель 1:100, оптимальное время экстракции 30 минут, количество повторностей экстрагирования – 5.

Наибольший выход антоцианов наблюдался при использовании 96% концентрации спирта этилового, что объясняется тем, что при увеличении доли воды в экстрагенте массовая доля антоцианов в извлечении уменьшается. Это связано в первую очередь с тем, что при добавлении воды увеличивается не только концентрация антоцианов в извлечениях, но также растёт и концентрация примесей.

Также установлено влияние ультразвука на степень выхода антоцианов. Для этого использовалась обычная мацерация при температуре 80 °С и мацерация с использованием ультразвука в том же температурном режиме. Полученные растворы фотометрировали методом прямой спектрофотометрии на спектрофотометре СФ-56 в диапазоне длин волн  $\lambda = 450 - 600$  нм, в качестве раствора сравнения использовали 1% раствор кислоты хлористоводородной в спирте этиловом 96%. Полученный УФ-спектр представлен на рис. 4.

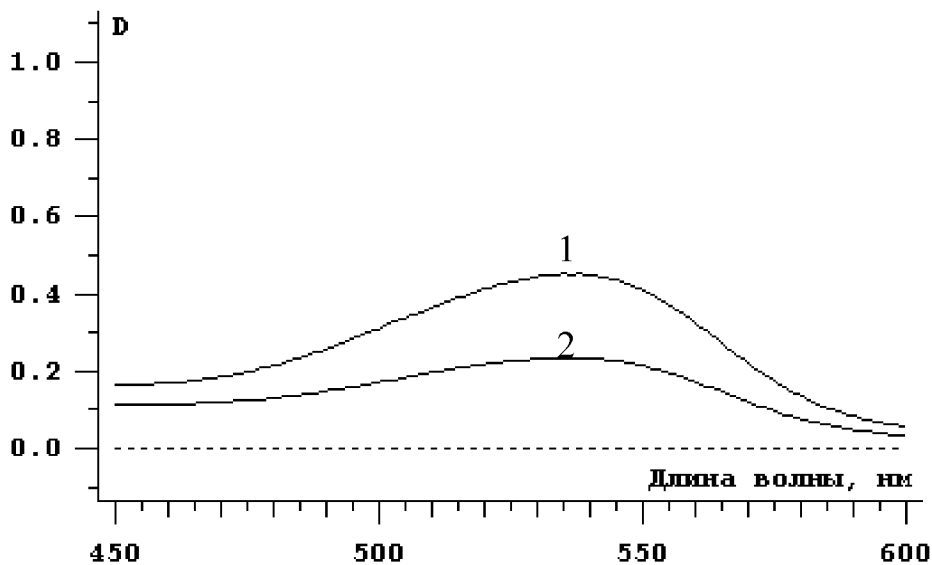


Рис. 4. УФ-спектр поглощения суммы антоцианов *Amelanchier alnifolia* Nutt

1 – УФ-спектр поглощения суммы антоцианов, извлекаемых 1% раствором кислоты хлористоводородной в спирте этиловом 96% с использованием ультразвука;

2 – УФ-спектр поглощения суммы антоцианов, извлекаемых 1% раствором кислоты хлористоводородной в спирте этиловом 96% простой мацерацией.

Таким образом, установлено, что использование ультразвука в среднем в два раза увеличивает выход антоцианов.

В результате проведённых предварительных испытаний удалось разработать рациональный метод количественного определения антоцианов, изложенный ниже.

Для этого навеску свежего сырья массой 5,0 г, предварительно растёртого в ступке, помещали в плоскодонную колбу со шлифом ёмкостью 100 мл и заливали 20 мл растворителя – 1% раствором кислоты хлористоводородной в спирте этиловом 96%-ном, присоединяли к обратному холодильнику и помещали в ультразвуковую баню с программируемым температурным режимом 80 °С и нагревали в течение 30 минут. Полученное извлечение охлаждали и фильтровали в мерную колбу ёмкостью 100 мл. Экстракцию остатка проводили ещё четыре раза порциями по 20 мл, собирая фильтрат в ту же мерную колбу вместимостью 100 мл. После охлаждения объём извлечения доводили экстрагентом до метки и перемешивали (раствор А). Далее из полученного раствора А отбирали две аликвоты в количестве по 5 мл, помещали в мерные колбы вместимостью 25 мл и одну колбу заполняли буферным раствором с рН – 1, другую с рН 4,5. Регистрировали значения оптической плотности растворов из первой и из второй колбы при длинах волн – 510 нм и 700 нм на спектрофотометре СФ-56. В качестве раствора сравнения использовали буферные растворы. рН дифференциальный спектр поглощения суммы антоцианов ирги ольхолистной представлен на рис. 5.

Приготовление буферного раствора с рН 1,0: 1,49 г КСl растворяли в 100 мл воды

очищенной, смешивали 25 мл раствора КСl с 67 мл 0,2 М раствора НСl. Регистрировали значение рН на потенциометре и доводили 0,2 М раствором НСl до 1,0.

Приготовление буферного раствора с рН 4,5: 1,64 г натрия ацетата растворяли в 100 мл воды, доводили 0,2 М раствором НСl до рН 4,5.

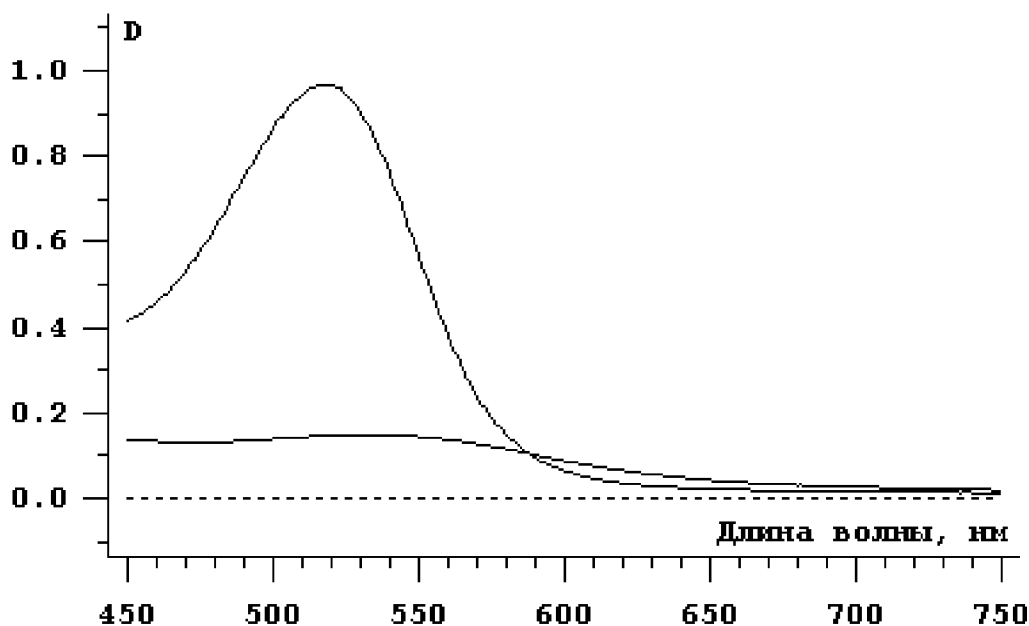


Рис. 5. рН-дифференциальный спектр поглощения суммы антоцианов *Amelanchier alnifolia* Nutt.

Величину оптической плотности рассчитывали по формуле 1:

$$A = (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH\ 1,0} - (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH\ 4,5} \quad [1]$$

Расчёт содержания суммы антоцианов (X%) в сырье в пересчете на цианидин-3-гликозид проводили по формуле 2:

$$X\% = \frac{A \times M_M \times W_1 \times W_2 \times 100}{\epsilon \times l \times m \times V \times 10 \times (100 - B)} \quad [2]$$

где X% – содержание антоцианов в пересчете на цианидин-3-гликозид, %;

$W_1$  – общий объем извлечения из сырья, мл;

$W_2$  – объем извлечения после разбавления, мл;

a – масса сырья, г;

$V_1$  – аликвота, взятая для разбавления, мл;

M – молярная масса цианидина-3-гликозида, равная 449,17;

l – толщина кюветы, см;

$\epsilon$  – молярный коэффициент поглощения цианидин-3-гликозида (26900).

B – влажность сырья.

Содержание антоцианов в свежих плодах *Amelanchier alnifolia* Nutt. Составило 17,14 мг%.

**Результаты количественного определения антоцианов  
в плодах *Amelanchier alnifolia* Nutt. Методом дифференциальной  
рН-спектрофотометрии**

$X(\%)$	$\bar{X} - X_i$	$(\bar{X} - X_i)^2$	Метрологические характеристики
16,46	0,68	0,4624	$\bar{X} = 17,14$ $\sum (\bar{X} - X)^2 = 3,71$ $S_x = \sqrt{\frac{\sum (\bar{X} - X_i)^2}{n(n-1)}} = 0,297$ $\Delta X = S_x \cdot t_x = 0,73$ $\varepsilon = 4,2\%$
18,01	-0,87	0,7569	
16,53	0,63	0,3721	
17,95	-0,81	0,6561	
16,55	0,59	0,3481	
16,5	0,64	0,4096	
17,98	-0,84	0,7056	
$\bar{X} = 17,14$		$\sum (\bar{X} - X)^2 = 3,71$	

Из представленных в таблице данных следует, что относительная ошибка единичного определения методом рН-дифференциальной спектрофотометрии с вероятностью 95% составляет  $\pm 4,2\%$ , что укладывается в пределы, рекомендуемые ГФ.

В ходе настоящего исследования изучен состав антоцианов плодов ирги ольхолистной методами ВЭЖХ, масс- и УФ-спектроскопии, в результате обнаружено наличие двух гликозидов цианидина. Подобраны оптимальные условия для количественного определения антоцианов в сырье, которое осуществлялось методом рН-дифференциальной спектрофотометрии.

Работа выполнена в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 гг., государственный контракт № П425 от 12 мая 2010 г. «Разработка методик выделения и определения полифенольных соединений классов флавоноидов, каротиноидов и антоцианов и технологии создания лекарственных форм на их основе».

#### Литература

1. Аксенова, Н.А. Деревья и кустарники для любительского садоводства и озеленения / Н.А. Аксенова, Л.А. Фролова. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 157 с.
2. Галактионов, И.И. Декоративная дендрология / И.И. Галактионов, А.В. Ву, В.А. Осин. – М.: Высшая школа, 1967. – 318 с.
3. Корулькин, Д. Ю. Природные флавоноиды / Д.Ю. Корулькин, Ж.А. Абилов, Р.А. Музычкина, Г.А. Толстикова; Рос. Акад. Наук, Сиб. Отд., Новосиб. Ин-т органической химии. – Новосибирск: Академическое изд-во "Тео", 2007. – 232 с.
4. Методы анализа минорных биологически активных веществ пищи / под ред. В.А. Тутельяна и К.И. Эллера. – М.: Изд-во «Династия», 2010. – 160 с.
5. Органическая химия: учеб. для вузов: в 2 кн.: Специальный курс / Н.А. Тюкавкина, С.Э. Зурабян, В.Л. Белобородов и др. / под ред. Н.А. Тюкавкиной. – М.: Дрофа, 2008. – 592 с.
6. Способ выделения биологически активных антоцианов / А. В.Птицын, Э. И. Мухтаров, А. П. Каплун. и др. // Патент №2302423. – Оpubл.10.07.2007, Бюлл.№19.

## STUDY OF ANTHOCYANINS OF *AMELANCHIER ALNIFOLIA* NUTT USING MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION (MALDI)

**D.I. PISAREV, O.O. NOVIKOV,  
N.A. PISAREVA, N.V. AVTINA,  
M.D. BEZMEENOVA, A.V. STEPANOVA**

*Belgorod National Research University*

*e-mail: pisarev@bsu.edu.ru*

The paper presents the results of a study of the anthocyanins of *Amelanchier alnifolia* Nutt by HPLC, MS- and UV-spectrometry. Revealed the presence of two cyanidin glycosides. Selected the optimal conditions for the quantitative determination of anthocyanins in raw material, which was carried out using a pH differential spectrophotometry.

Keywords: anthocyanins, *Amelanchier alnifolia* Nutt, HPLC, MS-spectrometry, UV-spectrometry