

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА АНТОЦИАНОВ СМОРОДИНЫ ЧЁРНОЙ – *RIBES NIGRUM L.* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАТРИЧНО-АКТИВИРОВАННОЙ ЛАЗЕРНОЙ ДЕСОРБЦИОННОЙ ИОНИЗАЦИИ (MALDI)

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

*Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет*

e-mail: pisarev@bsu.edu.ru

В результате анализа полученных масс-спектров суммы антоцианов смородины чёрной удалось обнаружить наличие четырёх гликозидов антоцианов, агликонами которых являются цианидин и дельфинидин. Установлено, что методом *MALDI* можно устанавливать состав смесей антоцианов в объектах растительного происхождения без их предварительного разделения.

Ключевые слова: антоцианы, смородина черная, *MALDI*.

Метод *MALDI-MS* (*matrix assisted laser desorption/ionization*) – матрично активированная лазерная десорбция / ионизация – относится к методам десорбционной ионизации, то есть в основе лежит идея быстрого нагрева образца, способствующая тому, что при высоких температурах константа скорости испарения выше константы скорости разложения. При этом в процессе десорбции/ионизации участвует специальное вещество – матрица.

MALDI – один из наиболее передовых методов масс-спектрометрии, позволяющий определять, в том числе и большие молекулы, такие как белки. В методе *MALDI* исследуемый образец смешивают с матрицей и наносят на подложку из нержавеющей стали – мишень [3].

Метод *MALDI* нас привлёк по причине, того, что имеет преимущества перед другими методами масс-спектрометрии, а именно:

- позволяет анализировать смеси веществ без их предварительного разделения;
- ионизации подвергается непосредственно твёрдая или жидкая проба без её предварительного испарения;
- поскольку с помощью *MALDI* осуществляется мягкая ионизация, то в спектрах фрагментации не наблюдается или она мало выражена, поэтому масс-спектры крайне просты и в предельном случае состоят только из специфического молекулярного пика иона;
- обычная чувствительность *MALDI* порядка нескольких фемтомоль (10^{-15} моля).

В качестве объекта исследования выбраны антоцианы смородины чёрной. Известно, что основными антоцианами плодов черной смородины являются гликозиды цианидина и дельфинидина [1]. Поэтому целью настоящего исследования явилось определение возможности использования метода *MALDI* для установления состава антоцианов смородины черной без предварительного разделения их суммы.

Для реализации цели поставлены следующие задачи:

1. Выделить сумму антоцианов смородины чёрной.
2. Проанализировать выделенную сумму с помощью метода *MALDI*.
3. Соотнести полученные результаты с литературными данными.

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 α -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 наблюдались интенсивные пики ионов с зарядом $m/z = 287,321$, соответствующий пику агликона и по молекулярной массе соответствующий цианидину и $m/z = 303,311$, отвечающий пику агликона дельфинидина (рис. 1).

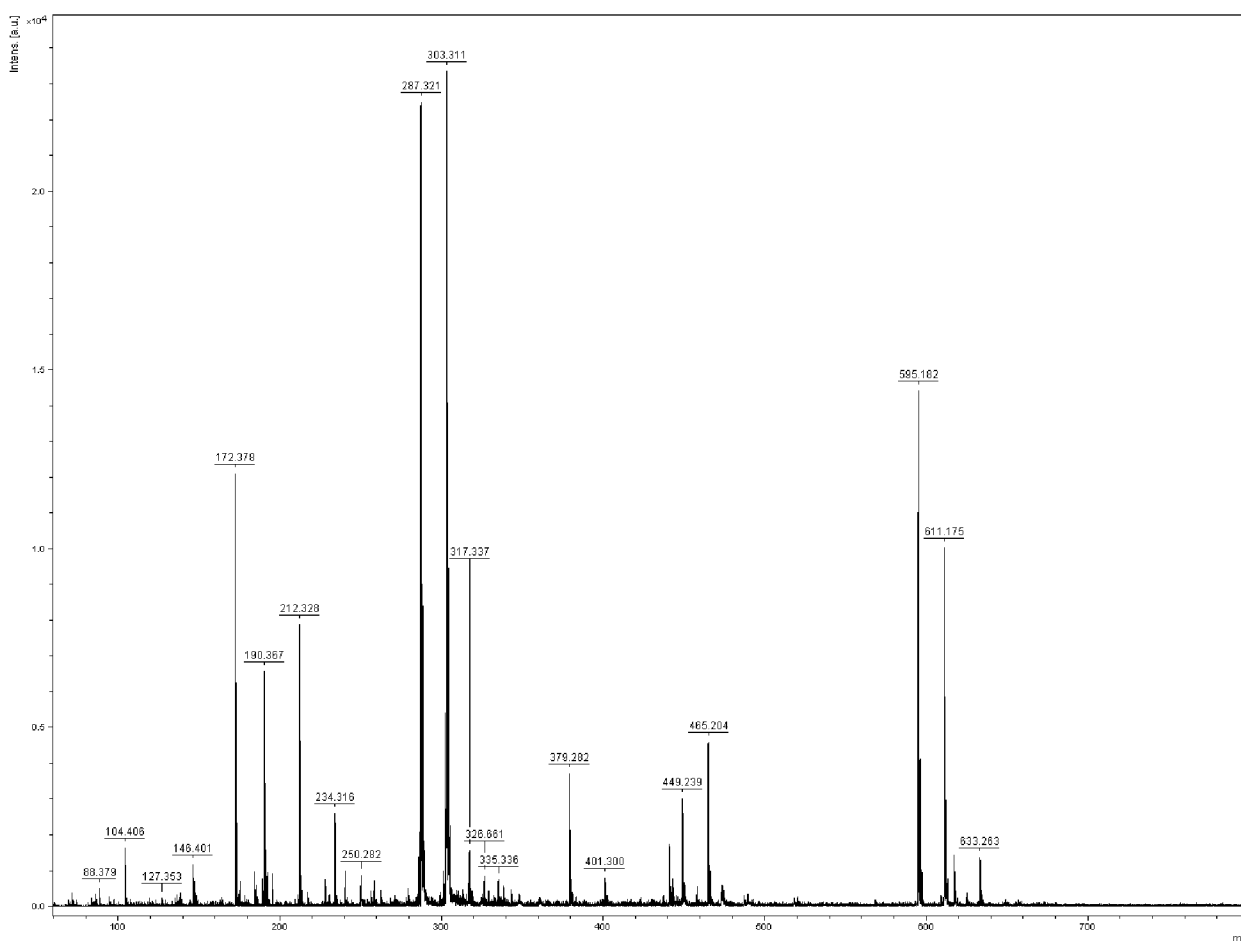


Рис. 1. Масс-спектр суммы антоцианов смородины черной – *Ribes nigrum L.*

Наличие пика иона с зарядом $m/z = 449,514$ свидетельствует о присутствии 3-глюкозида цианидина. Пик иона с зарядом $m/z = 595,204$ указывает на наличие цианидин-3-рутинозида. Наличие пика иона низкой интенсивности с зарядом $m/z = 465,204$ свидетельствует о наличии дельфинидина-3-глюкозида, пика иона с зарядом $m/z = 611,175$ и указывает на наличие дигликозида дельфинидина (рис. 2)

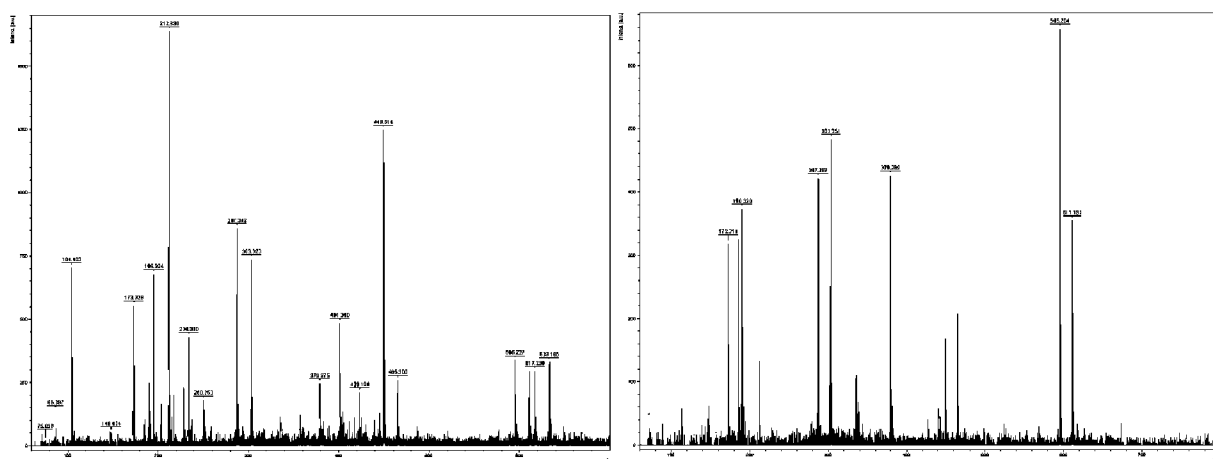


Рис. 2. Масс-спектр гликозидов антоцианов смородины черной – *Ribes nigrum L.*

Таким образом, в результате анализа полученных масс-спектров суммы антоцианов смородины чёрной удалось обнаружить наличие четырёх гликозидов антоцианов, агликонами которых являются цианидин и дельфинидин.

Для оценки правильности полученных результатов нами проведено сравнение полученных сведений с имеющимися в литературе данными по составу антоцианов плодов чёрной смородины. В результате найдено, что чёрная смородина содержит дельфинидин-3-глюкозид (М.м. = 465), дельфинидин-3-рутинозид (М.м. = 611), цианидин-3-глюкозид (М.м. = 449) и цианидин-3-рутинозид (М.м. = 595) [2].

В результате проведённого исследования установлено, что методом *MALDI* можно устанавливать состав смесей антоцианов в объектах растительного происхождения без их предварительного разделения.

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. Демина, Т.Г. Антоцианы некоторых сортов смородины черной /Т.Г.Демина// Биологически активные соединения растений сибирской флоры. – Новосибирск: Наука, 1974. – С. 23-26.
2. Методы анализа минорных биологически активных веществ пищи / под ред. В.А. Тутьяна и К.И. Эллера. – М.: Изд-во «Династия», 2010. – 160 с.
3. Отто, М. Современные методы аналитической химии. – Изд. 2-е, испр. / М. Отто. – М.: Техносфера, 2006. – 416 с.

STUDY OF A BLACK CURRANT (*RIBES NIGRUM L.*) ANTHOCYANINS USING MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION (MALDI)

**D.I. PISAREV, O.O. NOVIKOV
N.A. PISAREVA, M.D. BEZMENOVA
N.V. AVTINA, V.N. SOROKOPUDOV**

Belgorod National Research University

e-mail: pisarev@bsu.edu.ru

An analysis of the obtained mass spectra of the sum of black currant anthocyanins could detect the presence of four glycosides anthocyanins, which aglycones are cyanidin and delphinidin. It is established that can be installed by MALDI of mixtures of anthocyanins in objects of vegetable origin without their prior separation.

Key words: anthocyanins, black currant, MALDI