



УДК 544.723.23

ВЭЖХ в определении антоцианов плодов некоторых видов винограда

Макаревич С.Л.¹, Чулков А.Н.², Дейнека В.И.¹, Костенко М.О.¹,
Дейнека Л.А.¹, Тохтарь В.К.¹.

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород

² Федеральное государственное бюджетное учреждение Белгородский филиал «Центр оценки качества зерна и продуктов его переработки», Белгород

Поступила в редакцию 11.10.2014 г.

Исследовано разделение 3- и 3,5-диглюкозидов пяти основных антоцианидинов и предложены условия разделения антоцианов из кожуры плодов винограда, выращенного на территории Белгородской области. Для полной характеристики антоцианового комплекса предложен градиентный режим в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. Установлено, что для видов винограда *Vitis amurensis* (амурский), *V. flexuosa* (извилистый), *V. labrusca* (лабруска), *V. coignetiae* (японский) и гибридного сорта Молдова характерно присутствие до 90% 3,5-диглюкозидов различных антоцианидинов. Но в плодах многих сортов гибридных укрывных виноградов, предложенных для выращивания в условиях Белгорода, активность 5-глюкозил-трансферазы остается слабо выраженной.

Ключевые слова: обращенно-фазовая ВЭЖХ, виноград, 3,5-диглюкозиды, 3-глюкозиды, цианидин, дельфинидин, петунидин, пеонидин, мальвидин, карта разделения.

Determination of anthocyanins in fruits of some species of grapes by HPLC

Makarevitch S.L.¹, Chulkov A.N.², Deineka V.I.¹, Costenko M.O.¹,
Deineka L.A.¹, Tokhtar V.K.¹

¹ Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Professional Education «Belgorod State National Research University», Belgorod

² Belgorod Branch of Federal State-Funded Institution «Federal Centre of Quality and Safety Assurance for Grain and Grain products», Belgorod

The aim of the paper was investigation of chromatographic behaviour of five major anthocyanidin 3-glucosides and 3,5-diglucosides for working out reversed-phase HPLC method for the hybrid grape fruit skin anthocyanins separation. As objects, some hybrid grapes grown in Belgorod were chosen.

Chromatographic behavior of the anthocyanins was analyzed in the framework of relative retention analysis. Visible spectra, mass-spectrometric data as well as peak effectivity control were utilized for the anthocyanin identification.

For the separation, an effective isocratic reversed-phase HPLC procedure was proposed. It was found that in case of *V. amurensis*, *V. flexuosa*, *V. labrusca* and *V. coignetiae* species fruits and for Moldova hybrid variety the presence of large amounts (up to 90%) of 3,5-diglucosides of all five anthocyanidines is typical. Nevertheless for many for not winter-hardy Belgorod hybrid grape varieties the activity of 5-glucosyltransferase is suppressed.

The method propose may be used for chemosystematics of hybrid grape varieties. However, for some winter-hardy species biosynthesis of 3,5-diglucosides may be suppressed to produce typical for *V. vinifera* anthocyanins. Thus, HPLC is a powerful approach for heredity control at plant breeding.

Keywords: reversed phase HPLC, grape, 3,5-diglucosides, 3-glucosides, cyanidin, delphinidin, petunidin, peonidin, malvidin, separation map.

Введение

Для продвижения на север ареала устойчивого выращивания винограда получают сорта скрещиванием традиционного для Средиземноморья винограда вида *Vitis vinifera* с виноградами других видов, например, *V. labrusca* (обычный вид для востока США и Канады), *V. amurensis* (с родиной на азиатском континенте, включая Сибирь и Китай) и других, адаптированных к суровому климату видов. Однако такое скрещивание приводит к заметному изменению антоциановых комплексов – в дополнение к 3-гликозидам традиционных антоцианидинов и продуктам их ацилирования появляются 3,5-диглюкозиды [1]. Вероятно, для защиты своего рынка от винограда из Молдавии в ЕС введен запрет [2] на получение вин из сортов винограда, в кожуре которых синтезируется мальвидин-3,5-диглюкозид (М3,5dG), – один из основных компонентов позднего и широко распространенного сорта Молдова со вкусными плодами).

В антоциановом комплексе кожуры плодов гибридных виноградов к пяти основными 3-гликозидам цианидина, пеонидина, дельфинидина, петунидина и мальвидина может быть добавлено такое же количество 3,5-диглюкозидов. Это существенно усложняет разделение всех компонентов, особенно с учетом не очень высокой эффективности хроматографических систем по отношению к антоцианам, связанной с серьезным уширением пиков по сравнению с традиционными анализатами [3].

Цель настоящей работы – исследование хроматографического поведения 3-гликозидов и 3,5-диглюкозидов пяти основных антоцианов винограда для определения условий разделения этих компонентов при их совместном присутствии для обнаружения 3,5-диглюкозидов в некоторых сортах современных виноградов, предназначенных для выращивания в нашем регионе.

Эксперимент

Антоцианы из растительного материала экстрагировали водным 0.1 М раствором соляной кислоты. В качестве объектов исследования использовали винограды, выращенные в условиях Белгородской области, включая Ботанический сад, а также сорт винограда Молдова приобретенный на рынке г. Белгорода. Перед хроматографированием экстракты были очищены от ряда сопутствующих экстрактивных веществ методом твердофазной экстракции на концентрирующих патронах ДИАПАК С18 (БиоХимМак СТ, Москва): сорбцию проводили из экстракта в 0.1 М водном растворе HCl, а для десорбции антоцианов использовали раствор, содержащий 30 об.% ацетонитрила и 30 об.% муравьиной кислоты в воде. Полученный раствор перед введением в хроматографическую систему разбавляли в три раза дистиллированной водой.

В работе использован хроматограф фирмы Agilent 1260 с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами. В качестве элюентов использовали водно-ацетонитрильные смеси, подкисленные муравьиной кислотой состава ацетонитрил - муравьиная кислота – вода в изократическом или в градиентном режимах. Разделение компонентов проводили на хроматографической колонке Symmetry®C18, 5 мкм, 4.6×250 мм при температуре 40°C.

Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин. Длина волны детектирования: 515 нм. Спектры индивидуальных компонентов записаны в ячейке диодноматричного детектора в диапазоне 420-600 нм.

Идентификацию антоцианов проводили на квадрупольном масс-спектрометре фирмы Agilent 6130. Для идентификации антоцианов масс спектрометрией в работе использована ESI ионизация распылением в электрическом поле с позитивным режимом сканирования в диапазоне масс 250-1200. Величина напряжения на фрагменторе составляла 100 - 200 В. Давление распылителя 2 бар. Скорость газа осушителя 10 л/мин. Температура газа осушителя 350 °С. Температура испарителя 250 °С. Величина тока на короне 4 мкА. Хроматографическая колонка 2.1×150 мм Kromasil 100-3.5C18, элюенты той же системы, но расход 150 мкл/мин.

Обсуждение результатов

Карта разделения десяти антоцианов: 3-глюкозидов дельфинидина (D3G), цианидина (C3G), петунидина (Pt3G), пеонидина (Pn3G), мальвидина (M3G) и 3,5-диглюкозидов этих же антоцианидинов (3,5dG), представлена на рис.1.

Из взаимного расположения линий тренда на карте разделения следует, что для ряда компонентов наблюдается если не инверсия времен удерживания, то очень близкие их значения, это означает что соответствующие пары анализов не разделяются, причем в достаточно широком диапазоне составов подвижных фаз. Очевидно также, что использование обычного варианта (по монотонному росту элюирующей силы) градиентного элюирования также не может обеспечить полное разделение всех компонентов. При этом и в очень медленном элюенте ухудшается разделение Cy3,5dG и Dp3G, и лишь в узком диапазоне составов подвижных фаз можно удовлетворительно разделить все 10 компонентов, рис.2.

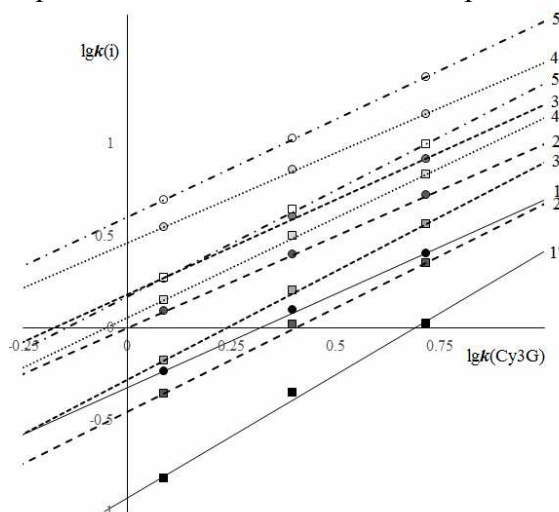


Рис. 1. Карта разделения основных неацилированных антоцианов из кожуры плодов гибридных виноградов

Колонка: 4.6×250 мм Symmetry® C18, 5 мкм, (40 °С), подвижные фазы системы ацетонитрил – вода - 10 об. % муравьиной кислоты. Штрихом помечены данные для 3,5-диглюкозидов, без штриха – для 3-глюкозидов дельфинидина (1), цианидина (2), петунидина (3), пеонидина (4) и мальвидина (5).

На рис.2 представлена хроматограмма экстракта плодов вида виноград японский (*Vitis coignetiae*), состоящего главным образом из 3,5-диглюкозидов, и экстракта листьев пурпурнолистного барбариса обыкновенного (*Berberis vulgaris* f.

atropurpurea), образованного только 3-гликозидами этих же антоцианидинов. Последний экстракт удобнее в работе по сравнению с экстрактом плодов винограда вида *V. vinifera*, поскольку в нем кроме таких же антоцианов может присутствовать большое количество сильнее удерживаемых ацилированных компонентов, пики которых могут накладываться на последующие хроматограммы.

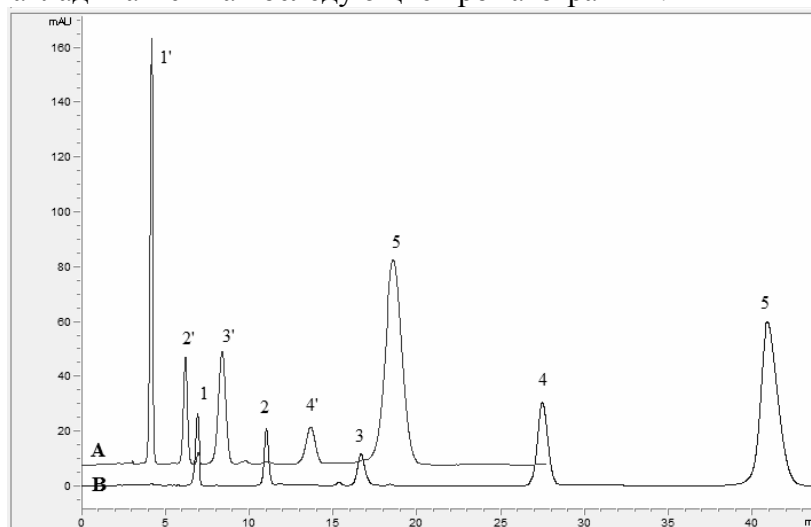


Рис. 2. Разделение 3,5-дигликозидов (А) 3-гликозидов (В) пяти антоцианидинов

Колонка: Symmetry® 4.6×250 мм (40 °С), подвижная фаза 6 об. % CH₃CN и 10 об. % HCOOH в воде, 1 мл/мин; 515 нм. А – экстракт плодов винограда японского (*Vitis coignetiae*) и В - экстракта листьев барбариса обыкновенного; нумерация пиков как на рис.1.

Различить 3-гликозиды и 3,5-дигликозиды можно по электронным спектрам. Во-первых, введение в положение 5 антоцианидина гликозидного заместителя отчетливо распознается по исчезновению небольшого поглощения в диапазоне 400 – 450 нм, рис.3 [4], которое, впрочем, наблюдается (по нашим данным) и в том случае, если гликозидный радикал перенести из положения 3 в положение 5. Во-вторых, максимум основного пика смещается гипсохромно на ~ 1 ÷ 2 нм, при этом сам сигнал становится несколько уже.

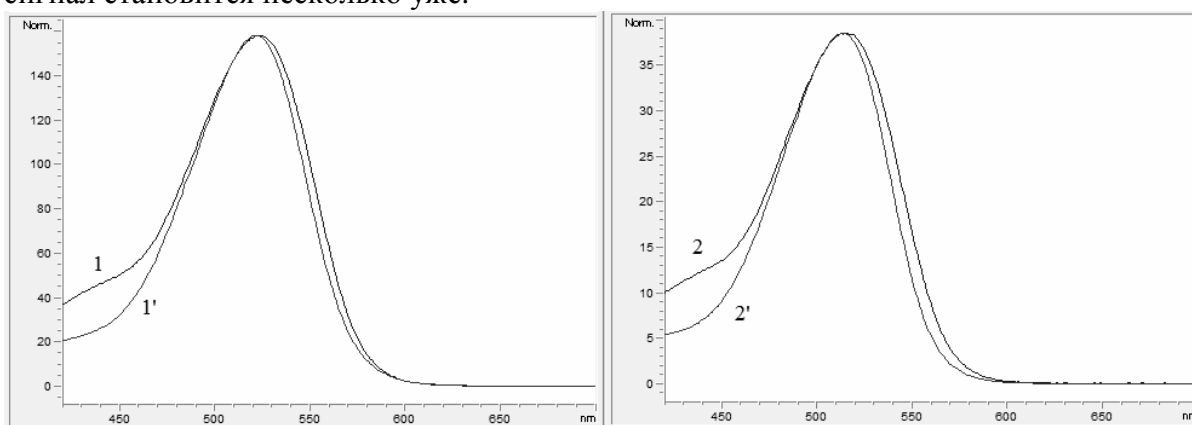


Рис. 3. Сопоставление электронных спектров 3-гликозидов и 3,5-дигликозидов дельфинидина (1 и 1') и цианидина (2 и 2')

Но предложенный метод распознавания приемлем только для оборудования, позволяющего записывать спектры в кювете детектора. Удивительно, но возможности анализа спектров аналитов с использованием диодно-матричных

детекторов для отнесения пиков практически не востребованы в настоящее время, но в действительности максимумы абсорбции одготипных гликозидов обычных антоцианидинов весьма информативны: для антоцианидинов «дельфинидинового» ряда переход:

дельфинидин – петунидин – мальвидин

сопровождается последовательным батохромным сдвигом на ~ 1.25 нм, тогда как для пары цианидин – пеонидин изменения обнаружить сложно, табл.1. Отметим, что отнесение пиков было подтверждено результатами масс-спектрометрического детектирования, табл.1.

Предложенный выше вариант хроматографического разделения антоцианов необходимо модифицировать и дополнить градиентным элюированием для обнаружения ацилированных компонентов. При этом начальный участок должен быть изократическим с ранее указанным составом подвижной фазы, табл.2.

На рис.4 представлена записанная в предложенных градиентных условиях хроматограмма экстракта плодов гибридного винограда сорта «Молдова», антоциановый комплекс плодов которого на 50.8 % образован мальвидин-3,5-диглюкозидом (в некоторых образцах доля этого компонента достигала даже более высоких значений (см. табл. 3).

Таблица 1. Некоторые параметры гликозидов антоцианидинов плодов винограда

№	Антоциан	t _R , мин	λ* _{max} , нм	m/z
1	Дельфинидин-3,5-диглюкозид	2.80	524.0	627.4
2	Дельфинидин-3-глюкозид	4.07	524.0	465.5
3	Цианидин-3,5-диглюкозид	3.67	514.0	611.5
4	Цианидин-3-глюкозид	5.92	515.0	449.1
5	Петунидин-3,5-диглюкозид	4.50	524.0	641.1
6	Петунидин-3-глюкозид	7.82	525.0	479.2
7	Пеонидин-3,5-диглюкозид	6.47	514.0	625.5
8	Пеонидин-3-глюкозид	12.50	515.0	463.0
9	Мальвидин-3,5-диглюкозид	7.82	525.0	655.4
10	Мальвидин-3-глюкозид	16.80	526.0	493.2

*- 8% CH₃CN и 10% HCOOH

Таблица 2. Режим градиентного элюирования

Время, мин	% элюента А*	% элюента Б*	Комментарий
0	100	0	Изократический участок
17	100	0	Линейный градиент
30	0	100	
31	0	100	Изократическая выдержка
32	100	0	Возврат к исходному элюенту
40	100	0	Регенерация системы

Компонент А: 6 об. % CH₃CN, 10 об. % HCOOH в воде; Компонент Б: 20 об. % CH₃CN, 10 об. % HCOOH в воде

Разработанный в настоящей работе метод определения антоцианов позволил определить состав плодов некоторых видов винограда из коллекции ботанического сада НИУ БелГУ (табл. 3) и плодов некоторых сортов, предложенных селекционерами для выращивания в условиях Белгорода (табл. 4). Анализ бал

выполнен с особым акцентом на обнаружение 3,5-диглюкозидов – маркеров межвидового скрещивания.

Как следует из данных, представленных в табл.3, основным 3,5-диглюкозидом может быть производное мальвидина (виноград японский и виноград гибридного сорта Молдова). Но в антоциановых комплексах плодов винограда японского также велико содержание 3,5-диглюкозидов остальных антоцианидинов дельфинидинового ряда (дельфинидина и петунидина). А для винограда вида *V. labrusca* доминирующим оказывается петунидин-3,5-диглюкозид.

В случае указанных в таблице 4 гибридных сортов винограда присутствие 3,5-диглюкозидов не высоко, возможно, поэтому эти сорта (кроме сорта с условным местным названием «Изабелла») требуют укрытия на зиму.

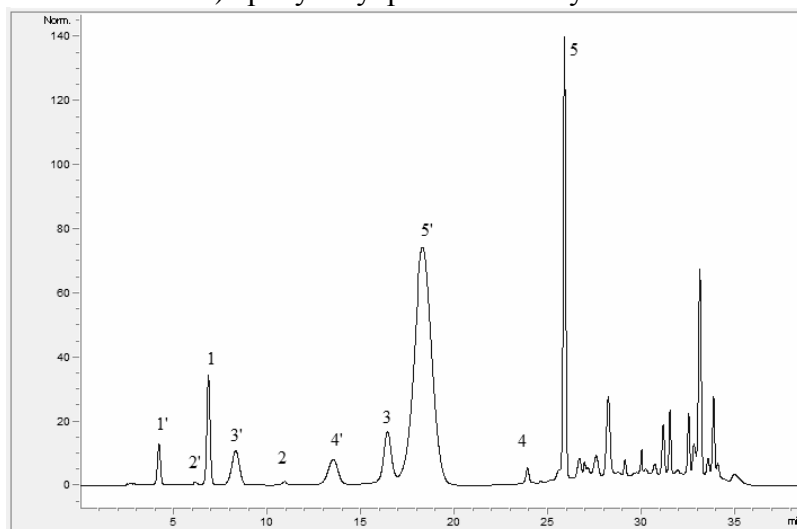


Рис.4. Разделение антоцианов плодов гибридного винограда сорта Молдова

1' - дельфинидин-3,5-диглюкозид (Dp3,5dG); 1 - дельфинидин-3-глюкозид (Dp3G);
2' - цианидин-3,5-диглюкозид (Cy3,5dG); 2 - цианидин-3-глюкозид (Cy3G); 3' - петунидин-3,5-диглюкозид (Pt3,5dG); 3 - петунидин-3-глюкозид (Pt3G); 4' - неонидин-3,5-диглюкозид (Pn3,5dG); 4 - неонидин-3-глюкозид (Pn3G); 5' - мальвидин-3,5-диглюкозид (M35dG); 5 - мальвидин-3-глюкозид (M3G)

Таблица 3. Состав антоциановых комплексов виноградов некоторых видов

Название антоцианов	Доля антоцианов по площадям пиков,%, видов винограда (<i>Vitis</i>)					
	Молдова	<i>V. coignetiae</i>	<i>V. labrusca</i>	<i>V. palmata</i>	<i>V. amurensis</i>	<i>V. flexuosa</i>
Dp3,5dG	0.60	15.1	13.2	5.30	16.3	3.50
Cy3,5dG	0.40	3.20	6.20	9.20	3.40	4.50
Dp3G	0.50	3.70	20.7	30.6	30.1	18.3
Pt3,5dG	2.10	13.8	25.1	21.4	18.1	3.30
Cy3G	0.50	0.70	4.70	5.50	2.80	15.1
Pn3,5dG	12.6	4.10	4.80	3.70	0.80	7.10
Pt3G	0.30	1.40	7.20	10.7	13.3	7.90
M3,5dG	71.5	55.7	15.4	11.2	10.6	18.2
Pn3G	1.80	0.10	0.50	0.40	0.80	4.50
M3G	9.70	2.00	1.70	1.90	3.60	17.5
Содержание*	280	120	290	390	90	85

* - в мг на 100 грамм кожуры в пересчете на цианидин-3-глюкозид

Таблица 4. Состав антоциановых комплексов некоторых гибридных сортов винограда, акклиматизированных в условиях Белгорода

Название антоцианов	Доля антоцианов по площадям пиков, %, сортов винограда				
	Агат Донской	Мечта Татьяны	Ришелье	Страшенский	“Изабелла”**
Dp3,5dG	0.10	0.00	0.00	0.00	0.40
Cy3,5dG	0.00	1.40	0.00	0.00	0.30
Dp3G	15.3	9.50	6.20	4.10	26.2
Pt3,5G	0.00	0.00	0.00	0.00	0.90
Cy3G	3.50	30.4	1.5	0.80	8.20
Pn3,5dG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Pt3G	11.6	7.4	7.0	4.70	18.6
Mv3,5dG	0.00	0.00	0.00	0.30	1.00
Pn3G	13.1	35.8	22.5	11.4	1.60
Mv3G	41.8	12.3	58.5	44.3	9.50
Ацилированные,%	4.97	4.60	18.6	34.7	36.0
Содержание*	150	85.0	350	180	150

* - в мг на 100 грамм кожуры в пересчете на цианидин-3-глюкозид. ** - народное название популярного у Белгородских садоводов сорта неизвестно происхождения.

Из приведенных сортов выделяется виноград сорта Мечта Татьяны, – в нем содержание производных цианидина и пеонидина выше, чем антоцианов дельфинидинового ряда. При этом антоциановый комплекс плодов винограда «Изабелла» с превалированием антоцианов дельфинидинового ряда характеризуется низкой степенью метилирования, т.е. активность соответствующего фермента (метилтрансферазы) заметно подавлена, что не характерно для традиционных сортов *V. vinifera*.

Заключение

В работе построена карта разделения 3-глюкозидов и 3,5-диглюкозидов пяти основных антоцианидинов, выявляющая особенности разделения некоторых пар антоцианов. Для полного разделения десяти глюкозидов предложен изократический режим ВЭЖХ в обращенно-фазовом варианте. В работе предложен также градиентный режим, который позволяет разделять не только 3-глюкозиды и 3,5-диглюкозиды основных антоцианидинов, но и более сильно удерживаемые ацилированные компоненты. Анализ результатов, полученных для виноградов некоторых видов и гибридных сортов, показал, что устойчивые к зимним условиям неукрывные растения накапливают большое количество 3,5-диглюкозидов, тогда как для укрывных сортов характерны только 3-глюкозиды и продукты их ацилирования.

Список литературы

1. He F., Mu L., Yan G.-L. et al. Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes // *Molecules*. - 2010. V. 15. pp. 9057-9091.
2. Слатья Е.А., Жилыкова Т.А., Аристова Н.И. и др. Новый экспресс-метод полуколичественного определения мальвидин-3,5-диглюкозида в винограде и вине // *Вісник Харківського національного університету*. 2005. № 669. Хімія. Вип.13(36). С. 119-124.
3. de Villiers F., Cabooter D., Lynen F. et al. performance liquid chromatography analysis of wine anthocyanins revisited:

Effect of particle size and temperature // Journal of Chromatography A. 2009. V. 1216. pp. 3270-3279.

4. Harborne J.B. Spectral methods of characterizing anthocyanins // Biochem. J. 1958. V. 70. pp. 22-28.

References

1. He F., Mu L., Yan G.-L. et al. Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes, *Molecules*, 2010, vol. 15, pp. 9057-9091.

2. Slast'ya E.A., Zhilyakova T.A., Aristova N.I. et al. Novyi ekspress-metod polukolichestvennogo opredeleniya mal'vidin-3,5-diglyukozida v vinograde i vine [A new express method semi-quantitative determination of malvidin-3,5-diglucoside in grapes and wine], *Visnik Kharkivs'kogo*

natsional'nogo universitetu, 2005, No. 669, *Khimiya*, V. 13(36), pp. 119-124.

3. de Villiers F., Cabooter D., Lynen F. et al. High performance liquid chromatography analysis of wine anthocyanins revisited: Effect of particle size and temperature, *Journal of Chromatography*, 2009, V. 1216, pp. 3270-3279.

4. Harborne J.B. Spectral methods of characterizing anthocyanins, *Biochem. J.*, 1958, V. 70, pp. 22-28.

Дейнека Виктор Иванович – д.х.н. профессор кафедры общей химии НИУ БелГУ, Белгород

Чулков Андрей Николаевич – сотрудник Белгородского филиала «Центр оценки качества зерна и продуктов его переработки», Белгород

Дейнека Людмила Александровна – к.х.н. доцент кафедры общей химии НИУ БелГУ, Белгород

Тохтар Валерий Константинович – д.б.н. профессор, директор ботанического сада НИУ БелГУ, Белгород

Макаревич Сергей Леонидович – аспирант кафедры общей химии НИУ БелГУ, Белгород

Костенко Михаил Олегович – магистрант кафедры общей химии НИУ БелГУ, Белгород

Deineka Victor I. - Dr.Sci. (Chemistry), professor, Belgorod National Research University, Belgorod, E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Chulkov Andrey N. – Belgorod Branch of Federal State-Funded Institution «Federal Centre of Quality and Safety Assurance for Grain and Grain products», Belgorod

Deineka Ludmila A. - Ph.D. (Chemistry) Belgorod National Research University, Belgorod

Tokhtar Valeriy K. - Dr.Sci. (Biology). Professor, Director of the Botanical Garden, Belgorod National Research University, Belgorod

Makarevich Sergey L. - Postgraduate of Chemistry Belgorod National Research University. Belgorod. E-mail: sergmazay@yandex.ru

Costenko Michail O. - student of magistrate. Common Chemistry Chair. Belgorod National Research University, Belgorod