

# STUDIUM KONDENZOVANÝCH ANTHOKYANINOVÝCH PIGMENTŮ

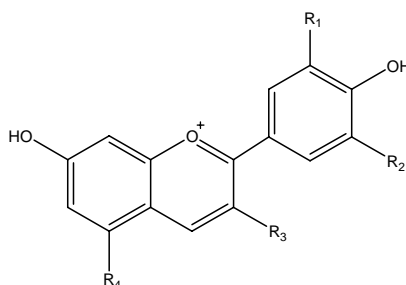
*Renáta Myjavcová*

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Třída Svobody 8, 771 46 Olomouc.

E-mail: [renata.myjavcova@post.cz](mailto:renata.myjavcova@post.cz)

## Úvod

Anthokyaniny, vznikající jako sekundární metabolity při biochemických procesech v rostlinné buňce, jsou významná rostlinná barviva patřící do skupiny flavonoidů. Skládají se z barevné složky (anthokyanidinu) a cukerného zbytku (nejčastěji glukosy) (Obr. 1). Pro své antioxidační a antimikrobiální účinky jsou tyto látky dlouhodobým předmětem intenzivního studia s ohledem na potenciální využití v medicíně.<sup>1,2</sup> Moderně jsou anthokyaniny využívány rovněž v prevenci, ale i terapii cukrovky<sup>6</sup>, některých kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny<sup>7</sup>. Vyskytují se nejčastěji v plodech, květech, listech, ale i kořenech nebo semenech rostlin. Přítomnost anthokyaninových pigmentů ve víně způsobuje barevnost červeného vína a rozdílný obsah jednotlivých anthokyaninů může sloužit k identifikaci jednotlivých odrůd.<sup>3</sup>

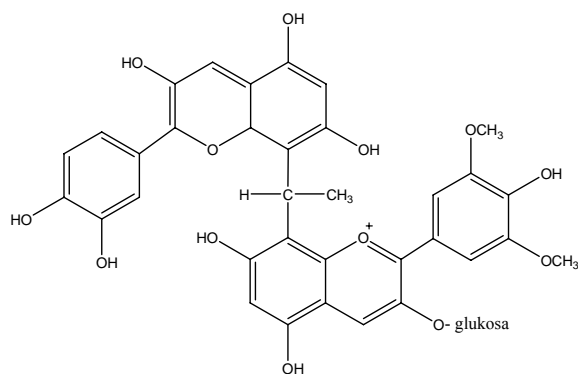


Obr. 1 Základní struktura anthokyaninů

$R_1, R_2 - H, OH, OCH_3$

$R_3, R_4 - \text{cukr}, OH$

Během vývoje rostliny a/nebo zrání plodu dochází v některých pletivech ke kondenzačním reakcím vedoucím k tvorbě složitějších pigmentů. Kondenzované pigmenty kromě toho vznikají i při zrání vína (klesá obsah volných anthokyaninů a taninových látek a dochází k jejich vzájemné kondenzaci). Profil kondenzovaných pigmentů je možno použít k charakterizaci rostliny nebo také odhadu stáří vína. Kondenzace může probíhat různými způsoby např. přímou reakcí anthokyaninu s proanthokyanidem nebo v přítomnosti aldehydu (Obr. 2).



Obr. 2 Struktura pigmentu vznikajícího kondenzací malvidin-3-glukosidu s epikatechinem přes acetaldehydový můstek

Spektrum těchto látek v rostlinném materiálu je velmi pestré a ve většině případů doposud nejsou jednotlivé pigmenty dostupné. Vzhledem k potenciálně zajímavým vlastnostem ve farmácii a potravinářství je vysoce žádoucí tyto pigmenty izolovat (ev. frakcionovat do definovaných skupin) a fyzikálně-chemicky charakterizovat (rozpuštnost, redoxní vlastnosti atp.). Analytická charakterizace zase dovolí využití frakcionovaných produktů jako standardů.

Zajímavé možnosti pro účinnou separaci látek v širokém rozmezí molekulových hmotností skýtají monolitické materiály. Různé typy monolitů jsou intenzivně testovány jako stacionární fáze pro kapalinovou (elektro)chromatografii<sup>11</sup>, extrakci tuhou fází<sup>10</sup> nebo například báze pro enzymatické mikroreaktory<sup>8</sup> (on-line tryptické štěpení proteinu před MS detekcí). Monolity se dělí do dvou hlavních kategorií, křemenné a polymerní.

V případě polymerních monolitických kolon je vhodnou volbou podmínkami polymerace (složení reakční směsi – obsah monomerů, zesilovací látky, póry-formující rozpouštědla a typ iniciace) možno zajistit definované vlastnosti polymerního materiálu (mikrostruktura, velikost pórů).<sup>4</sup>

Cílem práce je provést frakcionaci kondenzovaných anthokyaninových pigmentů s využitím cíleně laboratorně připravených monolitických kolon a frakcionované produkty analyticky charakterizovat s využitím hmotnostní spektrometrie a jejím spojením s mikrokapalinovou chromatografií (ev. kapilární elektroforézou).

## Experimentální část

### 1. Příprava monolitické kolony

Jako pouzdro byla použita skleněná trubice o délce 10 cm a průměru 0,7 cm. Vnitřní povrch bylo nejdříve nutné upravit. Trubice byla promyta acetonem, 200mM NaOH,

destilovanou vodou, 200 mM HCl a okyseleným ethanolem (kyselinou octovou, pH  $\approx$  5). Poté byla provedena silylace 20% (v/v) roztokem trimethoxysilylpropyl- methakrylátu v ethanolu o pH 5 (15 hodin). Následně byla trubice promyta acetonem a vysušena v proudu dusíku. Takto připravená kolona se naplnila polymerační směsí, která obsahovala 12 % BMA (butylmethakrylát), 8 % EDMA (ethylendimethakrylát), 25 % 1,4-butandiolu (složení odpovídající přibližně velikosti pórů 4,8  $\mu$ m), 54,5 % 1-propanolu, 0,5 % AMPS (kyselina-2-akrylamid-2-methyl-1-propansulfonová) a 0,01 g AIBN (azobisisobutyronitril). Polymerace probíhala 20 hodin ve vodní lázni při teplotě 70°C (modifikovaný postup převzatý z práce<sup>4</sup>).

## 2. Frakcionace barviv

Separace jednotlivých barviv na připravené monolitické koloně byla provedena za použití dvousložkové mobilní fáze (manuální míchání a dávkování mobilní fáze na kolonu, mobilní fáze protékala volně gravitací, ev. přetlakem na začátek kolony), která obsahovala:

Složka A – destilovaná voda okyselená 0,12 % kys. trifluoroctovou (v/v)

Složka B – acetonitril okyselený 0,12 % kys. trifluoroctovou (v/v)

Eluce barviv probíhala isokraticky 5 ml 10 % složky B, poté gradient (přídavek 2 ml 50 % B) a dále se gradient pro dosažení 100 % B (pro kvantitativní eluci složky s vyšší retencí – byla optimalizována pro každou separační úlohu zvlášť). Byla provedena separace dvojice barviv cyaninu a pelargonidinu a poté dvojice oenin - malvin, kdy 1. frakce se získala po nadávkování 5 ml mobilní fáze a 2. frakce v případě první dvojice po 22 ml a u malvinu a oeninu po 11 ml mobilní fáze (celkový objem nanesený na kolonu) nadávkované na kolonu.

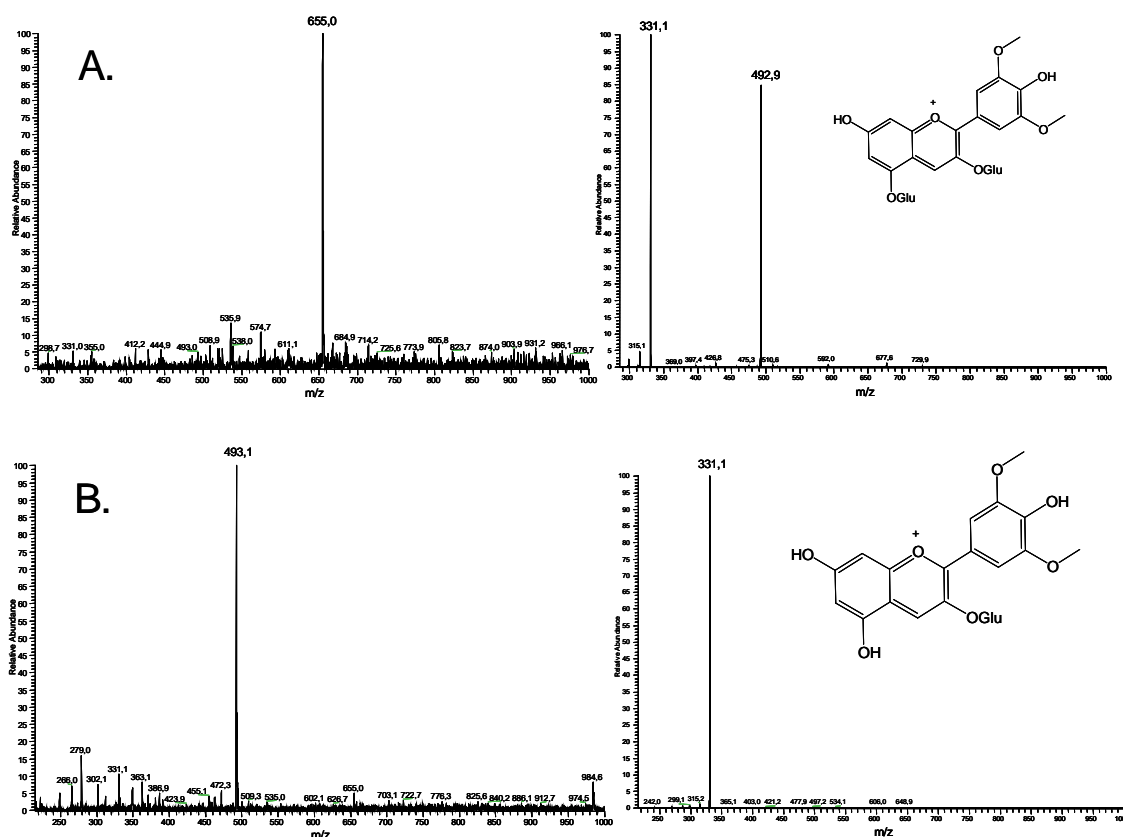
## 3. Analýza frakcí hmotnostní spektrometrií

Identifikace získaných frakcí byla provedena na hmotnostním spektrometru LCQ MAT (Finnigan, San Jose, CA, USA) s ionizací elektrosprejem a analyzátozem typu iontové pasti. Přímé zavádění vzorku do iontového zdroje – průtok 10  $\mu$ l/min, teplota vyhřívání kapiláry 200°C, sprejovací napětí +5,6 kV, průtok zmlžovacího plynu 40 arbitrary units, ladění – iontová optika byla laděna na malvidin-3-glukosid. Identifikace frakcionovaných barviv byla provedena na základě m/z rodičovského iontu a fragmentace po kolizi indukované disociací v iontové pasti (MS/MS, normalizovaná kolizní energie 60%). Měření kondenzovaného pigmentu ve vzorku vína (odřůda Nitra, Vinařství Bukovský Kobylí, ročník 2002) bylo provedeno s využitím přímé infuze vzorku přečištěného extrakcí na tuhé fázi

(Strata SDB-L, 200mg/3ml, Phenomenex) do hmotnostního spektrometru s ionizací elektrosprejem (Q-TOF, Premier, Waters Corporation). Experimentální parametry: sprejovací napětí +2,8 kV, průtok vzorku 5  $\mu$ l/min, průtok zmlžovacího plynu 250 l/hod, teplota iontového zdroje a desolvačního plynu 150°C.

## Výsledky a diskuse

Správná funkce připraveného monolitu byla ověřena separací standardů anthokyaninů. Nejprve se podařilo oddělit dvojici v polaritě vysoce se lišících látek, a to cyaninu (cyanidin-3,5-diglukosidu) a pelargonidinu (aglykon). MS analýzou jednotlivých frakcí bylo potvrzeno, že dochází k dokonalému oddělení obou barviv, a že monolit se chová jako reverzní fáze (cyanin eluuje jako první). Úplné rozlišení další dvojice anthokyaninů se stejnou barevnou složkou lišící se o jednu glukosu (oenin (malvidin-3-glukosid) a malvin (malvidin-3,5-diglukosid) (Obr. 5) prokázalo velmi dobrou separační schopnost připraveného monolitu pro tyto látky.

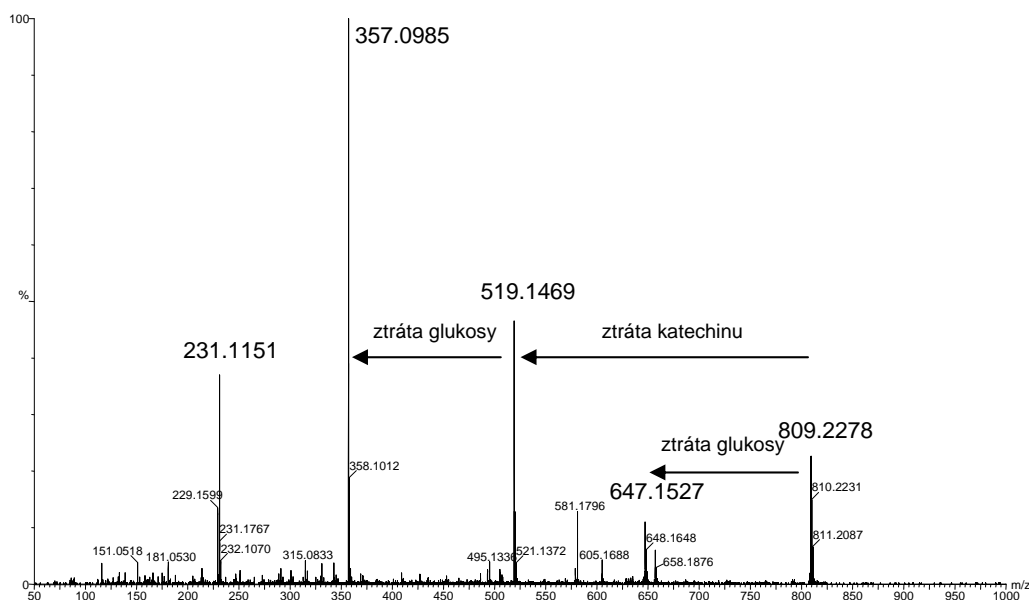


Obr.5

A - MS spektrum 1. frakce – malvin

B - MS spektrum 2. frakce – oenin

Při MS analýze vzorku vína odrůdy Nitra (viz. Experimentální část) byl nalezen kondenzovaný pigment typu malvidin-3-glukosid-acetaldehyd-katechin (Obr. 2). Jeho identita byla jednoznačně potvrzena fragmentací (Obr. 6). V současné době jsou optimalizovány postupy pro frakcionaci tohoto vzorku na připravených monolitických methakrylátových kolonách za účelem hlubší analytické charakterizace a testování antioxidačních vlastností.



Obr. 6 Fragmentační spektrum kondenzovaného pigmentu typu malvidin-3-glukosid-acetaldehyd-katechin získané fragmentací iontu o  $m/z$  809 po kolizi v kolizní cele (MS/MS)

#### Poděkování

Studie je podpořena projektem Ministerstva školství, mládeže a sportu, MŠM 6198959216.

#### **Literatura:**

1. Tsuda T., Watanabe M., Ohshima K., Norinobu S., Choi S., Kawakashi S., Osada T.: *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2407 (1994).
2. Tsai P., Huang H., Huang T.: *J. Food Qual.* **27**, 497 (2004).
3. Nunez V., Monagas M., Gomez-Cordoves MC., Bartolome B.: *Postharvest Biol. Technol.* **31**, 69 (2004).
4. Svec F.: *J. Sep. Sci.* **27**, 1419 (2004).
5. Eeltink S.: *Packed and Monolithic Capillary Columns for LC*, Thesis, University of Amsterdam, Amsterdam, (2005).
6. Tsuda T., Yuki Y., Yoshikawa T., Kojo H., Osawa T.: *Biochem. Pharmacol.* **71**, 1184 (2006).
7. Prior R., Wu X.: *Free Radic. Res.* **40**, 1014 (2006).
8. Svec F.: *Electrophoresis* **27**, 947 (2006).
9. Yang Y., Li Ch., Lee K., Craighead H.: *Electrophoresis* **26**, 3622 (2005).
10. Hutchinson JP., Macka M., Avdalovic N., Haddad PR.: *J. Chromatogr. A* **1106**, 43 (2006).
11. Švec F.: *Chem. Listy* **98**, 232 (2004).