

УДК 634.8(045)Ш51

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА АНТОЦИАНОВ ВИНОГРАДА «ЗАГАДКА ШАРОВА»

© *В.И. Шестернин**, *В.П. Севедин*

Бийский технологический институт (филиал) Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова, ул. Трофимова, 27, Бийск, 659305 (Россия), e-mail: S.V.I@mail.ru

Целью настоящей работы является выделение и идентификация основного антоциана винограда «Загадка Шарова». Фракция мажорного антоциана была получена методом бумажной хроматографии. Антоциан идентифицирован по совокупности методов бумажной хроматографии, ультрафиолетовой и видимой спектроскопии, а также хромато-масс-спектрометрии как мальвидин-3-О-глюкозид.

Ключевые слова: виноград, хроматография на бумаге, антоцианы, мальвидин-3-О-глюкозид.

Введение

В настоящее время в Алтайском крае успешно выращиваются сверхранние и ранние сорта винограда, подходящие для производства вина. Одним из наиболее перспективных сортов, показывающих требуемые агроклиматические и биохимические характеристики, является виноград «Загадка Шарова».

«Загадка Шарова» – сверхранний сорт винограда, выведенный в городе Бийске виноградарем-любителем Р.Ф. Шаровым путем опыления сорта «Дальневосточный 60», являющийся сложным межвидовым гибридом амурского, европейского и американского винограда, смесью пыльцы ранних сортов винограда Тукай, Магарач №352 и др. [1]. В Алтайском крае виноград успевает вызревать и давать в среднем до 5 кг ягоды с куста, а виноматериал сорта обладает сложным фруктовым ароматом. Несмотря на то, что сорт не передан на государственное испытание, он очень популярен у виноградарей северных регионов. Недостатками сорта являются низкая титруемая кислотность (около 3,5 г/дм³) и не очень интенсивная окраска.

Известно, что 80% пищевых продуктов покупают лишь на основании цветового восприятия, поэтому изучение составляющих цвета винограда «Загадка Шарова» является актуальной задачей виноделия региона [2].

Состав красящих веществ винограда в зависимости от вида значительно колеблется, а основную роль в формировании цвета красных вин играют антоцианы и их агликоны. Антоцианы – группа водорастворимых пигментов относящихся к классу флавоноидов. Эти красящие вещества винограда представлены в основном D-глюкозидами мальвидина, цианидина, дельфинидина, пеонидина, петунидина и пеларгонидина, а также их эфирами с производными бензойной и гидроксикоричных кислот [3, 4]. Общее число антоцианов в винограде может достигать двадцати и более, а хроматографический профиль антоцианов винограда одного района произрастания остается постоянным и может использоваться в качестве отличительного признака при идентификации сорта и вина [4, 5].

Цель исследования – выделение и идентификация мажорного антоциана винограда «Загадка Шарова».

Экспериментальная часть

Извлечение красящих веществ из размороженной сбродившей выжимки винограда (сбродившую в течении 4 сут выжимку направляли в морозильную

Севедин Валерий Павлович – декан факультета химической технологии и машиностроения, кандидат химических наук, профессор
Шестернин Владимир Игоревич – аспирант,
e-mail: S.V.I@mail.ru

* Автор, с которым следует вести переписку.

камеру) урожая 2011 г., собранного в стадии технической зрелости в селе Сростки (52° северной широты; 85° восточной долготы), Алтайского края, осуществляли 70% этанолом, содержащим 0,1% соляной кислоты. В 64 г измельченной выжимки вносили 250 мл спирта и вели экстракцию при температуре 50 °С, периодически перемешивая. По истечению часа экстракт сливали и повторяли операцию. Объединенные порции экстракта фильтровали и выпаривали на роторном испарителе при температуре 40 °С до 60–65 мл.

Исследование осуществлялось методом одномерной восходящей хроматографии на бумаге (Munk-Tell Chrom. – Paper, FN7, 150 г/м²). Промывку бумаги производили разбавленной соляной кислотой (1 : 4) в течение 3–5 ч с последующим промыванием ее дистиллированной водой до нейтральной реакции. Бумага высушивалась при комнатной температуре. В качестве подвижной фазы использовались следующие системы растворителей: система №1 – *n*-бутанол : уксусная кислота : вода (40 : 12 : 29); система №2 – *n*-бутанол : уксусная кислота : вода (4 : 1 : 5) – верхний слой; система №3 – вода : концентрированная соляная кислота (97 : 3); система №4 – уксусная кислота : соляная кислота : вода (15 : 3 : 82) [6, 7]. Для разделения экстракта использовалась система №1.

После разделения высушенные в вытяжном шкафу хроматограммы просматривали в видимом свете, отмечая зоны. Особо яркую зону вырезали отдельно и измельчали для элюции, которую незамедлительно проводили в темноте при температуре 5–6 °С подкисленным соляной кислотой этанолом (рН 1–2). Элюат фильтровали через пористый фильтр и выпаривали под вакуумом до 3–4 мл при температуре 40 °С. Полученный экстракт подвергали вторичному хроматографированию в том же растворителе, затем необходимую зону вновь элюировали, концентрировали и хроматографировали на бумаге, определяя однокомпонентность антоциана.

Идентификацию вещества осуществляли совокупностью методов: хроматографией на бумаге, ультрафиолетовой и видимой спектроскопией, а также жидкостной хромато-масс-спектроскопией.

Оценка выделенного вещества бумажной хроматографией осуществлялась по значениям R_f, а также по цвету зоны до и после обработки парами аммиака.

Исследование методом ультрафиолетовой и видимой спектроскопии проводилось на спектрофотометре Shimadzu UV-2401 (Япония) в интервале от 200 до 750 нм, с длиной оптического пути 10 мм и шагом сканирования 1 нм. Запись спектров выполняли в различных растворителях: CH₃OH+0,01% HCl, C₂H₅OH+0,1% HCl, 0,1 н. HCl, KCl рН 1,0 (HCl). При проведении опыта на присутствие орто-гидроксильных групп использовался 5% AlCl₃ в этаноле.

Для получения масс-спектров вещества использовали жидкостной масс-спектрометр Shimadzu LCMS-8030 (Япония). Детектирование вещества осуществляли в режиме электроспрей (ESI). Масс-спектры записывались в режимах анализа положительных и отрицательных ионов в диапазоне 100–1000 а.е.м., с напряжением рабочей поверхности иглы 4,5 кВ, а также с температурой линии десольватации 250 °С. Подвижная фаза ацетонитрил – вода (70 : 30). Чистый образец, полученный бумажной хроматографией, вводился напрямую, без использования колонки.

Обсуждение результатов

В зависимости от условий разделения на хроматограмме исходного экстракта присутствовали до шести различных зон, одна из которых по насыщенности цвета являлась доминирующей. После проведения третьего рехроматографирования этой зоны получено 35 мг чистой фракции мажорного антоциана, что соответствует выходу на сухие вещества выжимки 0,146%.

Для идентификации пигмента методом бумажной хроматографии использовались три основные системы: №2, 3 и 4. R_f выделенного вещества и литературные данные представлены в таблице 1. Как известно, изменение цвета антоциана, в зависимости от различных условий среды и обработки специфическими реагентами, также является признаком идентификации. Цвет выделенной зоны и литературные данные во время хроматографирования на воздухе и в парах аммиака представлен в таблице 2.

По результатам идентификации методом бумажной хроматографии выделенный антоциан является мальвидин-3-О-глюкозидом (рис. 1).

Таблица 1. Значения R_f×100 выделенного вещества и антоциана в различных системах [7]

Антоциан	Значения R _f ×100 в системе №		
	2	3	4
Выделенный антоциан	38	05	28
Мальвидин 3-глюкозид [7]	38	06	29

Для идентификации вещества также использовалась ультрафиолетовая и видимая спектроскопия. Основные спектральные характеристики антоциана, записанные в стандартном растворителе, и литературные данные для мальвидин-3-О-гликозида представлены в таблице 3. Спектр выделенного антоциана изображен на рисунке 2. При добавлении $AlCl_3$ к раствору антоциана изменения в спектре вещества не наблюдаются, что указывает на отсутствие ортогидроксильных групп в кольце В, а это еще раз, наряду с другими близкими спектральными характеристиками, подтверждает структуру заявленного выше пигмента [10–12].

При идентификации выделенного антоциана методом жидкостной хромато-масс-спектрографии в положительной области масс-спектра присутствует пик со значением $493 m/z$ (0,35) $[M]^+$, который совпадает как с молекулярной массой, так и с литературными данными относительно мальвидин-3-О-гликозида (рис. 3) [13]. В отрицательной области имеется ион $509 m/z$ (0,40) $[M+OH-N]^-$, вероятно, образованный псевдооснованием моногликозида мальвидина.

По результатам идентификации выделенного вещества различными методами была установлена структура антоциана, соответствующая мальвидин-3-О-гликозиду.

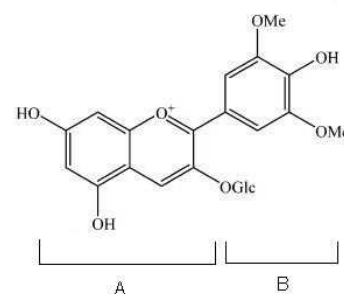


Рис. 1. Мальвидин-3-О-гликозид

Таблица 2. Цвет выделенного вещества и антоциана в зависимости от различных условий

Антоциан	Во время хроматографирования	На воздухе	В парах NH_3
Выделенный антоциан	Розовый	Фиолетовый	Голубой
Мальвидин 3-О-гликозид	Розовый	Фиолетовый	Голубой
Источник литературы	[8, 12]	[8]	[8]

Таблица 3. Основные спектральные характеристики антоциана и литературные данные ($CH_3OH + 0,01\% HCl$)

Антоциан	Визуальный максимум, нм	Изменения с добавлением $AlCl_3$, нм	$A_{\lambda_{max}UV} / A_{\lambda_{max}viz}$	$A_{440} / A_{\lambda_{max}viz}$
Выделенный антоциан	537	0	1,27	0,29
Мальвидин-3-О-гликозид	537 ± 2	0	$1,20 \pm 20$	$\sim 0,30$
Источник литературы	[10, 11]	[4, 7, 10]	[12]	[9]

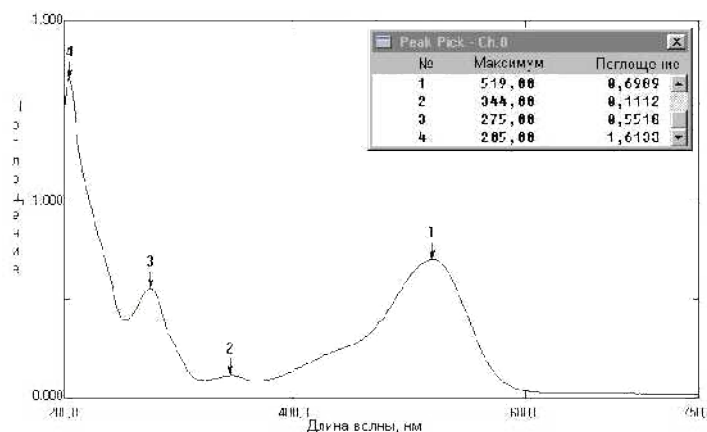


Рис. 2. Спектр и максимумы поглощения (1–4) выделенного антоциана в буферном растворе хлорида калия pH 1,0 (HCl)

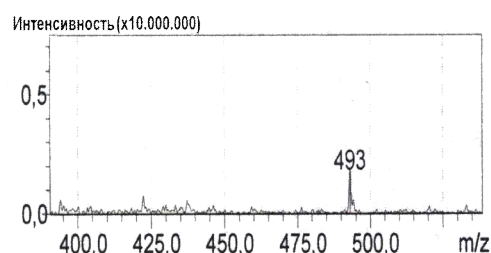


Рис. 3. Положительная область масс-спектра при анализе образца

Выводы

Изучен компонентный состав пигментов винограда «Загадка Шарова». Методом бумажной хроматографии выделен его основной антоциан, который по совокупности методов бумажной хроматографии, ультрафиолетовой и видимой спектроскопии, а также жидкостной хромато-масс-спектрометрии идентифицирован как мальвидин-3-О-гликозид. Дополнено ампелографическое описание морозоустойчивого сорта, имеющего возможность применения в пищевой промышленности.

Список литературы

1. Лазаревский М.А., Кузьмин А.Я., Рамминг А.А., Комарова Е.С., Захарова Е.И., Евдокимов В.Я., Дашкевич А.В. Краткая ампелография северных регионов виноградарства. М., 1952. 255 с.
2. Скорикова Ю.Г. Полифенолы плодов и овощей и формирование цвета продуктов. М., 1973. 232 с.
3. Кишковский З.Н., Скурихин И.М. Химия вина. М., 1976. 312 с.
4. Giusti M. M., Wrolstad R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy // Current protocols in food analytical chemistry. 2001, New York. F1.2.1-F1.2.13.
5. Скобанова Е., Рында П., Кайряк Н. Определение чистосортности вин из винограда *Vitis vinifera* // Виноделие и виноградарство. 2006. №1. С. 24–25.
6. Валуйко Г.Г., Германова Л.М. Идентификация антоцианов винограда // Виноделие и виноградарство СССР. 1969. №6. С. 19–22.
7. Танчев С.С. Антоцианы в плодах и овощах. М., 1980. 304 с.
8. Bate-Smith E.C. Paper chromatography of anthocyanins and related substances in petal extracts // Nature. 1948. Vol. 162. N4100. Pp. 835–838.
9. Wrolstad R.E. Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC // Current protocols in food analytical chemistry. 2001, New York, F1.3.1-F1.3.13.
10. Bakker J., Timberlake C.F. Isolation, Identification, and Characterization of New Color-Stable Anthocyanins Occurring in Some Red Wines // J. Agric. Food Chem. 1997. Vol. 45. Pp. 35–43.
11. Harborne J. B. Spectral Methods of Characterizing Anthocyanins // Biochem J. 1958. Vol. 70, N1. Pp. 22–28.
12. Селемев В.Ф., Ломова Т.С., Болотов В.М. Выделение и анализ антоциановых пигментов из *Hibiscus Sabdariffa* L // Известия вузов. Химия и химическая технология. 2007. Т. 50, вып. 7. С. 26–28.
13. Lopes-Lutz D., Dettmann J., Nimalarantne C., Schieber A. Characterization and quantification of polyphenols in amazon grape (*Pourouma cecropiifolia* Martius) // Molecules. 2010. Vol. 15. Pp. 8543–8552.

Поступило в редакцию 14 октября 2012 г.

После переработки 18 декабря 2012 г.

*Shesternin V.I.**, *Sevodin V.P.* RESEARCH COMPOSITION OF ANTHOCYANINS IN GRAPE «SHAROV'S ENIGMA»

Bijskij Technological Institute (branch), Altai State Technical University I.I. Polzunova, st. Trofimova, 27, Bijsk, 659305 (Russia), e-mail: S.V.I@mail.ru

The aim of the present work is isolation and identification of major anthocyanin in grape variety «Sharov's Enigma». Fraction of major anthocyanin was separated by the method of paper chromatography. Individual anthocyanin was identified as malvidin-3-O-glucoside by a combination of the methods of paper chromatography, ultraviolet -visible spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry.

Keywords: grape, paper chromatography, anthocyanins, malvidin-3-O-glucoside.

References

1. Lazarevskii M.A., Kuz'min A.Ia., Ramming A.A., Komarova E.S., Zakharova E.I., Evdokimov V.Ia., Dashkevich A.V. *Kratkaia ampelografiia severnykh regionov vinogradarstva*. [Brief ampelography northern regions of viticulture]. Moscow, 1952, 255 p. (in Russ.).
2. Skorikova Iu.G. *Polifenoly plodov i ovoshchei i formirovanie tsveta produktov*. [Polyphenols fruit and vegetable products and the formation of colored]. Moscow, 1973, 232 p. (in Russ.).
3. Kishkovskii Z.N., Skurikhin I.M. *Khimiia vina*. [Chemistry of wine.]. Moscow, 1976, 312 p. (in Russ.).
4. Giusti M. M., Wrolstad R.E. *Current protocols in food analytical chemistry*, 2001, New York, F1.2.1-F1.2.13.
5. Skobanova E., Rynda P., Kairiak N. *Vinodelie i vinogradarstvo*, 2006, no. 1, pp. 24–25. (in Russ.).
6. Valuiko G.G., Germanova L.M. *Vinodelie i vinogradarstvo SSSR*, 1969, no. 6, pp. 19–22. (in Russ.).
7. Tanchev S.S. *Antotsiany v plodakh i ovoshchakh*. [Anthocyanins in the fruit and vegetables]. Moscow, 1980, 304 p. (in Russ.).
8. Bate-Smith E.C. *Nature*, 1948, vol. 162, no. 4100, pp. 835–838.
9. Wrolstad R.E. *Current protocols in food analytical chemistry*, 2001, New York, F1.3.1-F1.3.13.
10. Bakker J., Timberlake C.F. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, vol. 45, pp. 35–43.
11. Harborne J.B. *Biochem J.*, 1958, vol. 70, no. 1, pp. 22–28.
12. Selemenev V.F., Lomova T.S., Bolotov V.M. *Izvestiia vuzov. Khimiia i khimicheskaiia tekhnologiia*, 2007, vol. 50, no. 7, pp. 26–28. (in Russ.).
13. Lopes-Lutz D., Dettmann J., Nimalarantne C., Schieber A. *Molecules*, 2010, vol. 15, pp. 8543–8552.

Received October 14, 2012

Revised December 18, 2012

* Corresponding author.