

LC-MS АНАЛИЗ И *IN VITRO* АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ НА ПОЛИФЕНОЛИ ОТ РОЗОВ (*ROSA DAMASCENA* MILL.) ЦВЯТ

*Васил Шиков¹, Дитмар Каммерер², Пламен Моллов¹,
Кирил Михалев¹, Николина Йончева¹, Райнхолд Карле²*

*¹Катедра Консервиране и хладилна технология,
Университет по хранителни технологии, Пловдив, България
²Institute of Food Science and Biotechnology, Hohenheim
University, Stuttgart, Germany*

ABSTRACT

Flavonol glycosides in water-ethanolic (30% v/v) extract from industrially distilled petals of *Rosa damascena* Mill. were studied by combined application of high-performance liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS). Among the 24 major compounds analysed both in the crude and purified extract, 13 kaempferol and 11 quercetin glycosides were detected. In addition, the *in vitro* antioxidant activity was evaluated by the radical inhibiting (DPPH test) and ferric reducing (FRAP test) abilities. The results obtained indicate that the rose petal extracts, especially when selectively enriched in polyphenols, might be used as functional food ingredients or as natural antioxidants.

Keywords: Rosa damascena, polyphenols, LC-MS.

ВЪВЕДЕНИЕ

Цветовете на *Rosa damascena* Mill., от които е извлечено етеричното масло при индустриални условия, са богат източник на полифеноли, в частност на флавонолови гликозиди [1]. Флавонолите са доказани [2] като един от най-активните класове полифенолни антиоксиданти. Използването на екстракти от дестилиран розов цвят като функционално-здравословни или технологични добавки за храни и напитки изисква предварителното характеризиране на отделните полифенолни компоненти, което е предпоставка за оценяване на техния принос към тоталната антиоксидантна активност на екстрактите. Сходните UV спектри на отделните компоненти, принадлежащи към един и същи подклас полифенолни, както и ограничения брой на търговски наличните стандарти, правят комбинираното използване на високоефективната течна

хроматография и масспектрометрията (LC-MS) надежен инструмент за идентификация на полифенолите [3-5].

Целта на настоящото изследване е да се характеризират флавоноловите гликозиди, съдържащи се в екстракт от индустриално дестилиран розов цвят, в зависимост от пречистването чрез адсорбционна технология. В допълнение, антиоксидантната активност на екстрактите е оценена чрез различни *in vitro* тестове.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Аналитичните стандарти (кверцетин, кверцетин 3-*O*-глюкозид, кверцетин 3-*O*-галактозид, кверцетин 3-*O*-рамнозид, кверцетин 3-*O*-ксилозид, кверцетин 3-*O*-рутинозид, кемпферол, кемпферол 3-*O*-глюкозид) са доставени от Roth (Karlsruhe, Germany). Всички други реагенти и разтворители са от VWR (Darmstadt, Germany). Адсорбционната смола Amberlite™ XAD 16 HP, използвана за пречистване на полифенолите, е закупена от Rohm & Haas (Darmstadt, Germany).

Отпадъчният материал от дестилацията на розов (*Rosa damascena* Mill.) цвят е предоставен от фирма „Нара Гео“ (Пловдив, България) и след пресуване в лабораторни условия, получените пресовки са изсушени с горещ въздух (60 °C, 6 h).

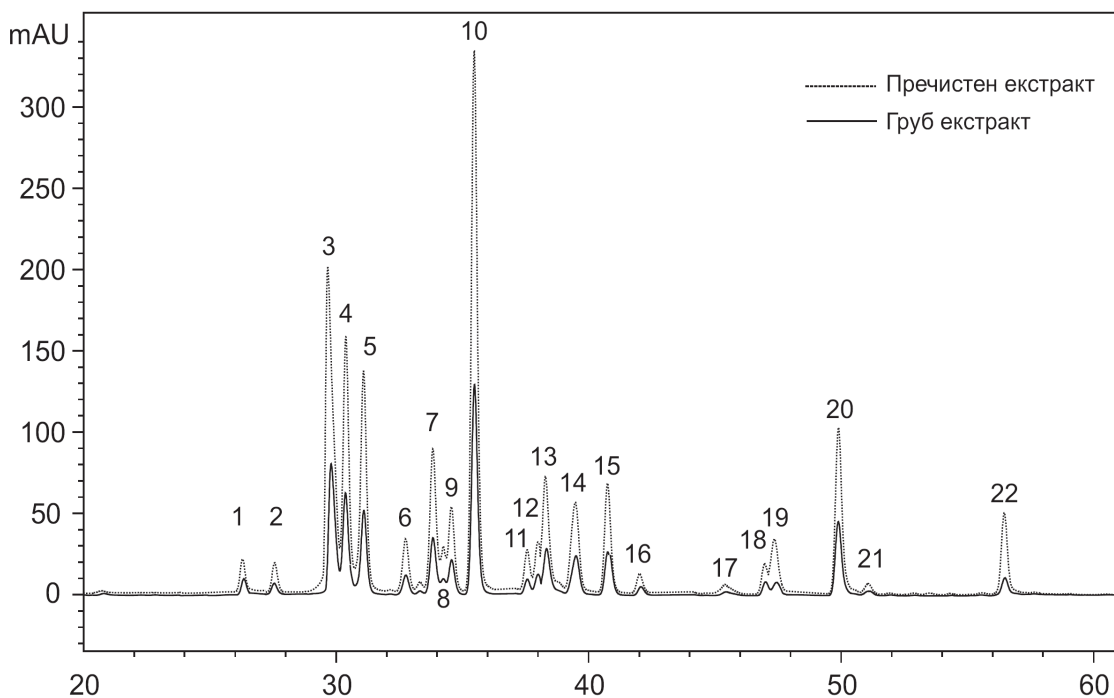
Екстракцията и пречистването на полифенолите, както и HPLC-DAD и LC-MS анализите, са осъществени в съответствие с методите описани в [6]. Използваната HPLC система е Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany), към която е свързан масспектрометър Esquire 3000 + (Bruker, Bremen, Germany).

Радикалоинхибиращата способност е определена чрез DPPH теста [7], а металоредуращата способност – в съответствие с FRAP теста [8].

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Профилът на флавоноловите гликозиди, съдържащи се в грубия и пречистен екстракт от розов цвят, е представен на Фигура 1. Осъществено е разделянето на 22 пика, масспектрометричният анализ на които дава основание да се идентифицират 24 компоненти (Таблица 1).

Фрагментацията на компонентите води до образуването на йони със съотношение маса/заряд m/z 285 и m/z 301, съответстващи на кемпферолов и кверцетинов агликон. Разликата в масите на молекулните йони и техните фрагменти показва присъствието на: дизахарид (308 D) – компоненти **3**, **8**, **9**, **13**, **17**, **20** и **21**; хексозид (162 D) – компоненти **4**, **5**, **7** и **10b**; пентозид (132 D) – компоненти **6a**, **12** и **14**. Дисоциацията на основния молекулен йон на компоненти **16** и **18** води до загуба на маса от 42 D, съответстваща на ацетилна група. Компонент **16** продуцира основен фрагмент m/z 609, докато компонент **18** – m/z 593. Този факт означава, че ацетилната група е свързана към гликозидната част на молекулата, а съответните съединения са кверцетин ацетилдизахарид (**16**) и кемпферол ацетилдизахарид (**18**).



Фигура 1. HPLC разделяне (370 nm) на полифенолите в груб и пречистен екстракт от розов цвят.

Таблица 1. LC-MS характеристики на полифенолите в екстракт от розов цвят

| Компонент | Пик | [M-H] ⁻ (m/z) | MS/MS фрагменти (m/z) |
|--|-----|-----------------------------|--------------------------|
| Кверцетин галоилхексозид | 1 | 615 | 463/301 |
| Кверцетин галоилхексозид | 2 | 615 | 463/301 |
| Кверцетин 3- <i>O</i> -рутинозид ^a | 3 | 609 | 301 |
| Кверцетин 3- <i>O</i> -галактозид ^a | 4 | 463 | 301 |
| Кверцетин 3- <i>O</i> -глюкозид ^a | 5 | 463 | 301 |
| Кверцетин 3- <i>O</i> -ксилозид ^a (следи) | 6a | 433 | 301 |
| Кверцетин галоилхексозид | 6b | 615 | 463/301 |
| Кемпферол хексозид | 7 | 447 | 285 |
| Кемпферол дизахарид | 8 | 593 | 285 |
| Кверцетин дизахарид | 9 | 609 | 301 |
| Кверцетин 3- <i>O</i> -рамнозид ^a (следи) | 10a | 447 | 301 |
| Кемпферол 3- <i>O</i> -глюкозид ^a | 10b | 447 | 285 |
| Кемпферол галоилхексозид | 11 | 599 | 447/285 |
| Кемпферол пентозид | 12 | 417 | 285 |
| Кемпферол дизахарид | 13 | 593 | 285 |
| Кемпферол пентозид | 14 | 417 | 285 |
| Кемпферол деоксихексозид | 15 | 431 | 285 |
| Кверцетин ацетилдизахарид | 16 | 651 | 609/301 |
| Кверцетин дизахарид | 17 | 609 | 301 |
| Кемпферол ацетилдизахарид | 18 | 635 | 593/285 |
| Кверцетин ^a | 19 | 301 | 151/179 |
| Кемпферол дизахарид | 20 | 593 | 285 |
| Кемпферол дизахарид | 21 | 593 | 285 |
| Кемпферол ^a | 22 | 285 | 257 |

^a Идентифициран със стандарт.

Компоненти **1**, **2** и **6b** продуцират фрагменти със съотношение маса/заряд m/z 463, а компонент **11** – m/z 447, което отразява разлика от 152 D, съответстваща на галоилна група. Следващите по интензитет фрагменти предполагат, че галоилната група е свързана с гликозидната част на молекулата, а съответните съединения са кверцетин галоилхексозид (**1**, **2** и **6b**) и кемпферол галоилхексозид (**11**). Анализът на фрагментацията на компонент **15** показва загуба в масата от 146 D между псевдомолекулния йон и основния фрагмент, съответстваща на деоксихексозидна група, поради което може да се приеме, че съответното съединение е кемпферол деоксихексозид.

При сравняване на времената за задържане, UV-vis и масспектрите на компоненти **3**, **4**, **5**, **6a**, **10a**, **10b**, **19** и **22** с тези на аналитичните стандарти са идентифицирани съответно кверцетин 3-*O*-рутинозид, кверцетин 3-*O*-галактозид, кверцетин 3-*O*-глюкозид, кверцетин 3-*O*-ксилозид, кверцетин 3-*O*-рамнозид, кемпферол 3-*O*-глюкозид, кверцетин и кемпферол.

Кемпфероловите гликозиди съставляват приблизително 65% от общото количество на флавонолите в екстракта (Таблица 2).

Таблица 2. Съдържание на полифеноли и *in vitro* антиоксидантна активност на груб и пречистен екстракт от розов цвят

| Показател | Груб екстракт | Пречистен екстракт |
|---|---------------|--------------------|
| Съдържание на кверцетинови гликозиди, mg/100 g dwb ^a | 2089 | 4612 |
| Съдържание на кемпферолови гликозиди, mg/100 g dwb | 3879 | 8628 |
| Съдържание на флавонолови гликозиди, mg/100 g dwb | 5968 | 13240 |
| Съдържание на галоилирани флавонолови гликозиди, mg/100 g dwb | 331 | 900 |
| Радикалоинхибираща способност (DPPH тест), g TE ^b /100 g dwb | 38 | 108 |
| Металоредуцираща способност (FRAP тест), g TE/100 g dwb | 26 | 78 |

^aНа база сухи вещества.

^bTrolox като стандарт.

Интересно е да се отбележи, че пречистването с адсорбционна смола повишава полифенолното съдържание 2.2 пъти, докато антиоксидантната активност на екстракта, оценена чрез DPPH и FRAP теста, нараства приблизително 3 пъти. Този резултат може да се обясни с различната ефективност на пречистването за отделните полифенолни компоненти, което води до селективното обогатяване на екстракта. Така например, докато нарастването на съдържанието на кверцетинови и кемпферолови гликозиди е 2.2 пъти, количеството на галоилираните флавонолови гликозиди се увеличава 2.7 пъти. Значимостта на този факт се подкрепя от резултати, получени при изследване [9] върху флавонолови гликозиди от листа на *Pemphis acidula* Forst. (Lythraceae) – галоилираните гликозиди проявяват по-висока антиоксидантна активност в сравнение със съответните негалоилирани компоненти.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получените резултати показват, че екстрактите от розов цвят, селективно обогатени на полифенолни, биха могли да се използват като компоненти на функционално-здравословни храни или като заместители на широко употребяваните в хранителната индустрия синтетични антиоксиданти.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Schieber, K. Mihalev, N. Berardini, P. Mollov, R. Carle, *Z. Naturforsch.*, 60c (2005) 379-384.
2. M. Foti, M. Piattelli, M.T. Baratta, G. Ruberto, *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996) 497-501.
3. A. Schieber, N. Berardini, R. Carle, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 5006-5011.
4. D. Kammerer, A. Claus, R. Carle, A. Schieber, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 4360-4367.
5. K. Schütz, D. Kammerer, R. Carle, A. Schieber, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 4090-4096.
6. V. Shikov, D.R. Kammerer, K. Mihalev, P. Mollov, R. Carle, *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 8521-8526.
7. W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28 (1995) 25-30.
8. I.F.F. Benzie, J.J. Strain, *Anal. Biochem.*, 239 (1996) 70-76.
9. T. Masuda, K. Iritani, S. Yonemori, Y. Oyama, Y. Takeda, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (2001) 1302-1309.

