

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Астраханский государственный университет»
(Астраханский государственный университет)

Кафедра английской филологии

Письменный перевод

по книге «Medicinal and Aromatic Plants of the World
Scientific, Production, Commercial and Utilization Aspects»

выходные данные Editor Akos Mathe Faculty, University of
West Hungary Budapest, Hungary ISSN 2352-6831 ISSN 2352-
684X (electronic), © Springer Science+Business Media Dordrecht,
2015

перевод стр. с 62 по 75

для сдачи кандидатского экзамена
по иностранному языку
(английский)

Выполнил:

Нургазиева Раиля Кумаровна

*Кафедра физиологии, морфологии, генетики и
биомедицины*

Астрахань – 2021 г.

Natural products (secondary metabolites) have always been among the most fascinating objects of the practicing chemist

In fact, in many definitions of chemistry the isolation, purification and structural elucidation of natural products play a central role.

For centuries, drugs were entirely of natural origin and composed of herbs, animal products and inorganic materials.

The chemistry of natural products has always excited the interest of the scientists and it provided the early stimulus for foundation of organic chemistry as a separate discipline.

The serious study of natural products, lasting for a long time, has been greatly facilitated by the advent of modern spectroscopic techniques, namely nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and mass spectrometry (MS), as well as separation techniques, such as gas and liquid chromatography (GC and LC).

Nowadays more rapid strategies for chemical characterizations of phytoconstituents of natural products as well as assessing the bioactivities of the natural products are available.

The coupling of spectrometers to chromatographs resulted in very powerful so-called hyphenated (coupled) techniques enabling on-line direct analysis of complex mixtures of natural products without prior isolation.

Натуральные продукты (вторичные метаболиты) всегда были одними из самых интересных предметы практикующего химика

Фактически, во многих определениях химии выделение, очистка и выяснение структуры природных продуктов играют центральную роль.

На протяжении веков лекарства были полностью натурального происхождения и состояли из трав, продуктов животного происхождения и неорганических материалов.

Химия природных продуктов всегда вызывала интерес ученых и давала первые стимулы для создания органической химии как отдельной дисциплины.

Серьезному изучению природных продуктов, продолжающемуся долгое время, в значительной степени способствовало появление современных спектроскопических методов, а именно спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и масс-спектрометрии (МС), а также методов разделения, таких как газ и жидкостная хроматография (ГХ и ЖХ).

В настоящее время доступны более быстрые стратегии для химической характеристики фитосоставляющих натуральных продуктов, а также для оценки биоактивности натуральных продуктов.

Соединение спектрометров с хроматографами привело к очень мощным, так называемым, разделенным (связанным) методам, позволяющим проводить прямой анализ сложных смесей натуральных продуктов в режиме онлайн без

The GC/MS, developed during the 1950s, after being originated by James and Martin in 1952 (James and Martin 1952) was practically the only heavily used hyphenated method for half a century.

But its application is rather limited to thermally stable non-polar volatiles, e.g. essential oils, fatty acid methyl esters and similar samples.

The breakthrough, responsible for introducing the combination LC/MS applicable to the variety of polar non-volatiles has occurred in the second half of the twentieth century by development of MS ionic sources compatible with LC: APCI (atmospheric pressure chemical ionization) by J. Henion and ESI (electrospray ionization) by J. Fenn, the latter was awarded a share of the Nobel Prize in chemistry in 2002 for this achievement.

Today, the various hyphenated methods involving coupling LC and MS are becoming routine, e.g. LC/UV-photodiode array detection/MS (LC/UV/MS), LC-tandem MS (LC/MS/MS) and LC-multiple stage MS (LC/MS_n).

The combination LC/UV/MS affords on-line UV and mass spectra of the eluted components, as well the liquid chromatograms measured as the variation in time of the absorbance (mAU, milliabsorbance units) at the selected wavelength (PDA) and/or total

предварительного выделения.

ГХ / МС, разработанный в 1950-х годах после того, как был изобретен Джеймсом и Мартином в 1952 году (Джеймс и Мартин 1952), был практически единственным широко используемым методом разделения в течение полувека.

Но его применение ограничено термически стабильными неполярными летучими веществами, например, эфирные масла, метиловые эфиры жирных кислот и аналогичные образцы

Прорыв, ответственный за внедрение комбинации ЖХ / МС, применимой к множеству полярных нелетучих веществ, произошел во второй половине двадцатого века благодаря разработке источников ионов МС, совместимых с ЖХ: ХИАД (химическая ионизация при атмосферном давлении) Дж. Хенион и ИЭР (ионизация электрораспылением) Дж. Фенна, последний был удостоен Нобелевской премии по химии в 2002 г. за это достижение.

Сегодня различные методы разделения, включающие сочетание ЖХ и МС, становятся обычными, например ЖХ / УФ-детектирование на фотодиодной матрице / МС (ЖХ / УФ / МС), ЖХ-танDEMная МС (ЖХ / МС / МС) и ЖХ-многоступенчатая МС (ЖХ / МС_n).

Комбинация ЖХ / УФ / МС позволяет получать УФ- и масс-спектры элюированных компонентов в режиме реального времени, а также жидкостные хроматограммы, измеренные как изменение во времени поглощения (mAU,

ion current, TIC (%ΣI) with MS detector.

LC coupled to a NMR spectrometer (LC/NMR) has first appeared in the late 1970 through demonstration of both stop-flow and continuous-flow LC/NMR, and until recently, been little used mainly because of its lack of sensitivity.

However, development of suitable flow cells and techniques to optimize NMR acquisition conditions, introduction of pulse field gradients (PFG) and solvent signal suppression sequences, together with improvements in probe technology (development of cryoprobe) and the construction of high field magnets have alleviated many of the initial problems of this technique.

LC/NMR has important potential for on-line structure identification of natural products.

Indeed, NMR spectroscopy is by far the most powerful spectroscopic technique for obtaining detailed structural information about organic compounds in solution.

The development of solid phase extraction (SPE) and the recent addition of an automated SPE unit to an LC/NMR system for peak trapping results in an improved NMR signal-to-noise ratio (S/N) and also has other practical advantages.

миллиабсорбционные единицы) на выбранной длине волны (PDA) и или общего количества ионов тока, ПИТ (% ΣI) с детектором МС.

ЖХ, соединенный с ЯМР-спектрометром (ЖХ / ЯМР), впервые появился в конце 1970 года благодаря демонстрации ЖХ / ЯМР с остановленным и непрерывным потоком, и до недавнего времени мало использовался в основном из-за недостаточной чувствительности.

Однако разработка подходящих проточных ячеек и методов для оптимизации условий сбора данных ЯМР, введение градиентов импульсного поля (PFG) и последовательностей подавления сигналов растворителя, вместе с усовершенствованиями в технологии датчиков (разработка криозондов) и создание сильнополюсных магнитов облегчили многие проблемы. исходных проблем этой техники.

ЖХ / ЯМР имеет важный потенциал для определения структуры натуральных продуктов в режиме онлайн.

Действительно, ЯМР-спектроскопия на сегодняшний день является наиболее мощным спектроскопическим методом для получения подробной структурной информации об органических соединениях в растворах.

Развитие твердофазной экстракции (ТФЭ) и недавнее добавление автоматизированного блока ТФЭ к системе ЖХ / ЯМР для улавливания пиков приводит к улучшенному соотношению сигнал-шум ЯМР (S / N), а также имеет другие практические преимущества.

This indirect hyphenation technique involving multiple collections of the separated compounds on SPE cartridges, followed by drying with nitrogen and their subsequent transfer to the NMR flow cells using deuterated solvents is nowadays the most efficient technique in comparison with the previous ones (on-flow and stopflow) leading to foundation for today's commercial HPLC-NMR instruments.

The advantages of LC/SPE NMR are the following:

LC separation with cheap, non-deuterated solvents

Additives non-compatible with NMR are possible.

The complete peak can be trapped: concentration effect.

This leads to a higher sensitivity.

Multiple trapping feasible

Desorption with 100 % deuterated solvents is possible.

Choices! No or less solvent suppression is necessary

Choice of peaks that should be analysed

Easy comparison with literature spectra

Measurements at another NMR spectrometer are possible.

Easy 2D NMR measurements

At the same time, due to the high sensitivity of the mass spectrometry, a small portion of the effluent after LC can be transferred in the same run via splitter to the mass spectrometer thus

Этот метод не прямой расстановки переносов (ЖХ / ТФЭ ЯМР), включающий несколько сборов разделенных соединений на картриджах ТФЭ, с последующей сушкой азотом и их последующим переносом в проточные ячейки ЯМР с использованием дейтерированных растворителей, в настоящее время является наиболее эффективным методом в сравнение с предыдущими (проточный и стоп-поток) привело к созданию современных коммерческих приборов для ВЭЖХ-ЯМР.

Преимущества ЯМР ЖХ / ТФЭ следующие:

Разделение ЖХ с дешевыми недейтерированными растворителями
Возможны добавки, несовместимые с ЯМР.

Можно уловить полный пик: эффект концентрации.

Это приводит к более высокой чувствительности.

Возможен множественный захват

Возможна десорбция 100% дейтерированными растворителями.

Выбор! Подавление растворителем не требуется или в меньшей степени

Выбор пиков, которые следует проанализировать

Легкое сравнение с литературными спектрами

Возможны измерения на другом ЯМР-спектрометре.

Простые измерения 2D ЯМР

В то же время, благодаря высокой чувствительности масс-спектрометрии, небольшая часть элюента после ЖХ может быть перенесена в один и тот же цикл

affording online UV, MS and NMR spectra in the same experiment.

Combining spectral data from MS, NMR and UV can considerably decrease the time for structural elucidation of secondary metabolites.

Identification of a compound often is very difficult based on NMR spectral data only; hence, MS data also are essential.

Therefore, LC based hyphenation of NMR and MS detectors to combine sets of spectral information of secondary metabolites has already been used for several years.

In addition, other LC-combinations using different spectrometers as chromatographic detectors have also developed: LC-infrared spectroscopy (LC/IR), and LC-circular dichroism (LC/CD).

The application of LC/CD enables chiroptical online stereoanalysis of natural products directly from stereoisomeric mixtures, thus giving the full absolute stereostructures of novel compounds without the necessity of isolation and purification.

The combination of the high separation efficiency of LC with these different detectors has made possible the acquisition of on-line complementary spectroscopic data, e.g. LC-MS/MS-NMR-CD "triad", on an LC peak of interest within a complex mixture

через разветвитель в масс-спектрометр, что позволяет получать онлайн-спектры УФ, МС и ЯМР в одном эксперименте.

Объединение спектральных данных МС, ЯМР и УФ может значительно сократить время структурного выяснения вторичных метаболитов.

Идентификация соединения часто бывает очень сложной на основании только данных спектров ЯМР; следовательно, данные МС также важны.

Поэтому расстановка переносов на детекторах ЯМР и МС на основе ЖХ для объединения наборов спектральной информации вторичных метаболитов используется уже несколько лет.

Кроме того, были разработаны и другие комбинации ЖХ с использованием различных спектрометров в качестве хроматографических детекторов: ЖК-инфракрасная спектроскопия (ЖХ / ИК) и ЖК-круговой дихроизм (ЖХ / КД)

Применение ЖХ / КД позволяет проводить хироптический онлайн-стереоанализ природных продуктов непосредственно из стереоизомерных смесей, что дает полную абсолютную стереоструктуру новых соединений без необходимости выделения и очистки.

Сочетание высокой эффективности разделения ЖХ с этими различными детекторами сделало возможным получение дополнительных спектроскопических данных в режиме онлайн, например «Триада» ЖХ-МС / МС-ЯМР-КД на интересующем пике ЖХ в сложной

In further text two general approaches to the analysis of the plant extracts are discussed: the “traditional” one involving isolation of the components and identification of the components in the crude extracts without prior isolation.

The rather simplified presentation of the “traditional” procedure being used in the identification of constituents of the plant is presented in Fig. 4.2.

Unfortunately, extraction, which is usually the first step in the analysis of the plant constituents, rarely results in the form of pure compounds.

More often rather complex mixtures containing quite a few components are obtained.

The complete characterization of constituents has to rely on spectral analyses of their purified form.

Therefore, rational and efficient isolation procedures have to be developed.

Historically, separation and isolation of components from complex mixtures has occupied (and still does) a central role in the activity of researchers in the field of natural products research.

Consequently, most of the working time is devoted to the separation/ purification steps and not to the structural determination.

The following drawbacks of this (traditional) methods are encountered:

Large amounts of the rare biological

смеси

В дальнейшем тексте обсуждаются два общих подхода к анализу экстрактов растений: «традиционный», включающий выделение компонентов и идентификацию компонентов в сырых экстрактах без предварительного выделения.

Довольно упрощенное представление «традиционной» процедуры, используемой для идентификации компонентов установки, представлено на рис. 4.2.

К сожалению, экстракция, которая обычно является первым шагом в анализе компонентов растений, редко приводит к образованию чистых соединений.

Чаше получаются довольно сложные смеси, содержащие довольно много компонентов.

Полная характеристика составляющих должна основываться на спектральном анализе их очищенной формы.

Следовательно, необходимо разработать рациональные и эффективные процедуры изоляции.

Исторически разделение и выделение компонентов из сложных смесей занимало (и до сих пор играет) центральную роль в деятельности исследователей в области исследования природных продуктов.

Следовательно, большая часть рабочего времени посвящена этапам разделения / очистки, а не определению структуры.

Встречаются следующие недостатки этого (традиционного) метода:

Иногда требуется большое

material are sometimes needed.	количество редкого биологического материала.
Expensive tools and supplies, like adsorbents and eluents	Дорогие инструменты и расходные материалы, такие как адсорбенты и элюенты.
Long lasting process (several days....)	Длительный процесс (несколько дней)
Unstable compounds may decompose already during the preparative separation and thus may escape the analysis.	Нестабильные соединения могут разлагаться уже во время препаративного разделения и, следовательно, могут не попадать в анализ.
Recently, a development of the very efficient automated LC semi-prep chromatographic methods, which could be performed on the analytical LC-devices made the preparative step much more efficient, enabling collecting mg quantities of the pure compounds ready for structure determination in one run.	В последнее время разработка очень эффективных автоматизированных методов полупрепаративной хроматографии ЖХ, которые могут быть выполнены на аналитических устройствах ЖХ, сделала подготовительный этап намного более эффективным, позволив собирать количества чистых соединений в миллиграммах, готовых для определения структуры, за один прогон.
The versatile semi-prep systems perform sample injection, fraction collection and re-injection of the collected fractions.	Универсальные системы полуфабрикатов выполняют ввод пробы, сбор фракций и повторный ввод собранных фракций.
The difference between the analytical and preparative HPLC is the amount of sample applied to the column.	Разница между аналитической и препаративной ВЭЖХ заключается в количестве пробы, нанесенной на колонку.
Semi-preparative chromatography is the link between analytical HPLC and preparative LC.	Полупрепаративная хроматография является связующим звеном между аналитической ВЭЖХ и препаративной ЖХ.
Even though the chromatographic systems used for semi-preparative LC do not reach the size of preparative LC systems, the objectives remain the same:	Несмотря на то, что хроматографические системы, используемые для полупрепаративной ЖХ, не достигают размеров препаративных систем ЖХ, цели остаются прежними
Purification and isolation of maximum	Очистка и выделение максимального

sample quantity.

Savings in time and costs.

In the analytical LC the applied sample amount is very small compared to the amount of stationary phase in the column (less than 1:10,000).

Therefore, very good separations can be achieved.

To purify higher amounts of sample in a single run the loadability of a column has to be increased.

This can be done either by concentration or volume overloading, depending on the application.

Consequently, the scaleup from analytical LC (microgram quantity) to semi-prep one (milligram quantities) requires the increase column dimensions from ca. 4–8 to 10–20 mm ID, as well as the flow rate from ca. 0.4–2 to 2–10 mL/min, respectively.

In addition, in last two decades some of the inherent insensitivity of the NMR spectroscopy which is the major tool for structure elucidation, has been overcome by improvements in spectrometer hardware and development of new multipulse sequences, considerably reducing the required quantity of the sample to be analysed down to the sub-microgram range.

Example #1

Isolation of jatrophanes, bioactive diterpenoids from *Euphorbia dendroides*

количества пробы

Экономия времени и средств.

В аналитической ЖХ количество нанесенной пробы очень мало по сравнению с количеством неподвижной фазы в колонке (менее 1:10 000).

Следовательно, можно добиться очень хорошего разделения.

Чтобы очистить большее количество образца за один цикл, необходимо увеличить загружаемость колонки.

Это может быть сделано либо путем концентрации, либо путем перегрузки по объему, в зависимости от области применения.

Следовательно, переход от аналитической ЖХ (количество в микрограммах) к полуфабрикату (количество в миллиграммах) требует увеличения размеров колонки с прибрл. внутренний диаметр от 4–8 до 10–20 мм, а также расход от ок. от 0,4–2 до 2–10 мл / мин соответственно.

Кроме того, за последние два десятилетия некоторая внутренняя нечувствительность ЯМР-спектроскопии, которая является основным инструментом для выяснения структуры, была преодолена за счет усовершенствования аппаратного обеспечения спектрометра и разработки новых многоимпульсных последовательностей, что значительно уменьшило необходимое количество образца для анализа, анализируется до диапазона субмикрограмм.

Пример # 1

Выделение ятрофанов, биоактивных дитерпеноидов из *Euphorbia*

(Tree Spurge) using optimized semi-prep LC in combination with classical column chromatography (CC)

The application of this improved purification step involving semi-prep LC in combination with the classical chromatographic methods used for preliminary purification and enrichment of the interesting fractions in the analysis of the bioactive constituents of the Montenegrin spurge *Euphorbia dendroides* as a part of the comprehensive study of this species has been carried out recently in our laboratory.

In course of these investigations, two types of samples were prepared: 60 % aqueous ethanolic extract of the aerial parts and n-hexane fraction of the lyophilized latex.

Before the preparative isolation both samples were subjected to LC/UV/ESI TOF MS as well as the ¹H NMR analysis (not shown), revealing rather complex mixtures with diterpenoids as the major constituents

Before the semi-prep LC, the isolation of the extract constituents involved a combination of the classical prep chromatographic techniques on Si-gel, i.e. DCFC/ prep TLC, or DCFC/CC

The isolation scheme used for the purification of latex components involving in the first step DCFC on Si-gel (n-hexane/EtOAc in three different proportions, 60 %, 80 %, and 100 %

dendroides (Молочай Древесный) с использованием оптимизированной полупрепаративной ЖХ в сочетании с классической колончатой хроматографией (КХ)

Применение этой улучшенной стадии очистки с использованием полупрепаративной ЖХ в сочетании с классическими хроматографическими методами, используемыми для предварительной очистки и обогащения интересных фракций при анализе биоактивных компонентов черногорского молочай *Euphorbia dendroides* в рамках комплексного исследования этот вид был недавно проведен в нашей лаборатории.

В ходе этих исследований были приготовлены образцы двух типов: 60% водно-спиртовой экстракт надземных частей и н-гексановая фракция лиофилизированного латекса.

Перед препаративным выделением оба образца были подвергнуты ЖХ / УФ / ИЭР ВМА МС, а также ¹H ЯМР-анализу (не показан), выявив довольно сложные смеси с diterпеноидами в качестве основных компонентов

Перед полупрепаративной ЖХ выделение компонентов экстракта включало комбинацию классических методов препаративной хроматографии на Si-геле, то есть DCFC / препаративной ТСХ или DCFC / CC.

Схема выделения, использованная для очистки латексных компонентов с использованием на первом этапе DCFC на Si-геле (н-гексан / EtOAc в трех различных пропорциях: 60%,

EtOAc) afforded fractions A – C, respectively, containing, according to the ^1H NMR and LC/UV/ESI TOF MS spectra, jatrophone diterpenoids as the main constituents.

In the second step these fractions were divided by CC on silica gel eluting with EtOAc/n-hexane, into subfractions A1-3, B1-2 and C1-2 and subjected to the semi-prep LC.

The example of semi-prep LC chromatogram of fraction A2 containing four diterpenes (1, 2, 6 and 9) is presented in Figs. 4.5 and 4.6.

From both extracts (aerial parts and latex) nineteen jatrophone diterpenoids (1–19) and two epimeric tiglianes (20, 21) have been isolated.

With exception of tiglane 21, named *Euphorbia* factor Pr2 by Wu et al. (1994), all isolated compounds were new and their structures were elucidated by spectroscopic methods, including HRESIMS, 1D and various 2D NMR techniques.

Compounds 1, 2 and 16 were found in both extracts.

It also should be noted that the biological activity of compounds 1–5, 16 and 20 was studied against four human cancer cell lines.

The most effective jatrophone-type compound (2) and its structurally closely related derivative (1) were evaluated for their interactions with paclitaxel and doxorubicin using a multidrug-resistant cancer cell line.

80% и 100% EtOAc), дала фракции А – С, соответственно, содержащий, согласно спектрам ^1H ЯМР и ЖХ / УФ / ИЭР ВМА МС, дитерпеноиды ятрофана в качестве основных компонентов.

На втором этапе эти фракции разделяли СС на силикагеле, элюируя EtOAc / н-гексаном, на подфракции А1-3, В1-2 и С1-2 и подвергали полупрепаративной ЖХ.

Пример полупрепаративной хроматограммы ЖХ фракции А2, содержащей четыре дитерпена (1, 2, 6 и 9), представлен на рис. 4.5 и 4.6.

Из обоих экстрактов (надземных частей и латекса) выделено девятнадцать дитерпеноидов ятрофана (1–19) и два эпимерных тиглиана (20, 21).

За исключением резинифератоксина, названного фактором *Euphorbia* Ву и соавт. (1994), все изолированные соединения были новыми, и их структура была выяснена с помощью спектроскопических методов, включая HRESIMS, 1D и различные методы 2D ЯМР.

Соединения 1, 2 и 16 были обнаружены в обоих экстрактах.

Также следует отметить, что биологическая активность соединений 1–5, 16 и 20 изучалась в отношении четырех линий раковых клеток человека.

Наиболее эффективное соединение ятрофанового типа (2) и его близкое по структуре производное (1) оценивали на предмет их взаимодействия с паклитакселом и доксорубицином с использованием линии раковых клеток с множественной лекарственной

Both compounds exerted a strong reversal potential resulting from inhibition of P-glycoprotein transport.

Among the jatrophanes isolated from latex, the assessment of the P-glycoprotein (P-gp) inhibiting activities of the representative set of compounds 1, 2, 6–10 and 15–19 revealed the activity of jatrophanes 6 and 9 as the most powerful in inhibition of P-gp, even higher than R(+)-verapamil and tariquidar in colorectal multi-drug resistant (MDR) cells (DLD1-TxR)

There are two general approaches in the analysis of the crude extracts without prior isolation: hyphenated (coupled) techniques involving the combination of chromatographic and spectroscopic techniques and direct spectroscopic measurement of the extract, as well as their combination

Example #2

Proanthocyanidins from grape (*Vitis vinifera*) seed extracts

The hyphenated techniques involving LC are now extensively used for investigation of various polar biologically active secondary metabolites such as, for example, antioxidant phytochemicals.

Most of them are polyphenols widely present in the plant kingdom.

Very important representatives of these

устойчивостью.

Оба соединения проявляли сильный обратный потенциал в результате ингибирования транспорта Р-гликопротеина.

Среди ятрофанов, выделенных из латекса, оценка ингибирующей активности Р-гликопротеина (Р-gp) репрезентативного набора соединений 1, 2, 6–10 и 15–19 выявила активность ятрофанов 6 и 9 как наиболее сильную в ингибировании Р-gp, даже выше, чем R (+) - верапамил и таривикар, в колоректальных клетках с множественной лекарственной устойчивостью (MDR) (DLD1-TxR)

Существует два общих подхода к анализу сырых экстрактов без предварительного выделения: методы с разделением дефисов (связанные), включающие комбинацию хроматографических и спектроскопических методов и прямое спектроскопическое измерение экстракта, а также их сочетание.

Пример # 2

Проантоцианидины из экстрактов косточек винограда (*Vitis vinifera*)

Методы разделения с участием ЖХ в настоящее время широко используются для исследования различных полярных биологически активных вторичных метаболитов, таких как, например, антиоксидантные фитохимические вещества.

Большинство из них представляют собой полифенолы, широко распространенные в растительном мире.

Очень важными представителями

natural products are proanthocyanidins (PAs), also known as condensed tannins.

They are ubiquitous and one of the most abundant group of natural polyphenols and can be detectable in a wide variety of food sources, such as fruits, nuts, beans, apples, and red wine.

PAs in foods are of interest in human nutrition and medicine due to their antioxidant capacities and beneficial effects on human health in reducing the risk of chronic diseases, such as cardiovascular and cancer.

They are oligomers and polymers composed of flavan-3-ol units linked mainly through C(4)-C(8) and less frequent through C(4)-C(6) bond, both denoted as B-type.

The flavan-3-ol units can also be doubly linked by an additional ether C(2)-O(7) which is assigned as A-type

The monomeric units of the oligomeric and polymeric PAs are afzelechin, catechin, gallocatechin and their 3 β -epimers.

The size of PAs is described by its degree of polymerization (DP).

Oligomers are those with $DP^{1/2} \sim 7$, whereas polymers exhibit $DP^{1/8} \sim 24$ or more.

The most common classes of the proanthocyanidins are the procyanidins, which are chains of catechin, epicatechin, and their gallic acid esters, and the prodelphinidins, which consist

этих натуральных продуктов являются проантоцианидины (ПА), также известные как конденсированные танины.

Они распространены повсеместно и являются одной из самых распространенных групп природных полифенолов и могут быть обнаружены в самых разных источниках пищи, таких как фрукты, орехи, бобы, яблоки и красное вино.

ПА в пищевых продуктах представляют интерес для питания человека и медицины из-за их антиоксидантной способности и благотворного воздействия на здоровье человека, снижая риск хронических заболеваний, таких как сердечно-сосудистые и рак.

Они представляют собой олигомеры и полимеры, состоящие из звеньев флаван-3-ола, связанных в основном через связь C (4) -C (8) и реже через связь C (4) -C (6), оба обозначены как В-тип.

Единицы флаван-3-ола также могут быть дважды связаны дополнительным эфиром C (2) -O (7), который обозначен как А-тип

Мономерными звеньями олигомерных и полимерных ПА являются афцелехин, катехин, галлокатехин и их 3 β -эпимеры.

Размер ПА описывается степенью полимеризации (DP).

Олигомеры - это те, у которых $DP^{1/2} \sim 7$, в то время как полимеры показывают $DP \sim 8 \sim 24$ или более.

Наиболее распространенными классами проантоцианидинов являются процианидины, которые представляют собой цепи катехина, эпикатехина и их сложных эфиров

of gallocatechin, epigallocatechin, and their galloylated derivatives as the monomeric units.

The proanthocyanidins containing afzelechin as the subunits are named propelargonidins

Several methods for the analysis of polyphenols have been presented in the literature.

Most of them are based on liquid chromatography (LC) coupled with either a photodiode array (PDA) detector and/or a mass spectrometer (MS).

This is a very effective and highly sensitive method for characterizing procyanidins from complex matrices.

In recent years, electrospray ionization (ESI) has been shown to be suitable for the analysis of such polar compounds in aqueous solutions without any previous sample derivatisation.

ESI permits the identification of the molecular weight of procyanidins with different degrees of polymerisation.

Both normal and reverse phase LC techniques are applied.

The normal- phase technique effects the separation of the proanthocyanidin oligomers according different degrees of polymerisation (DP) whereas reversed-phase C18 columns have the ability to separate different isomeric oligomers with equivalent molecular mass.

However reverse-phase analysis of higher oligomeric proanthocyanidins (i.e. tetramers) is not feasible due to

галловой кислоты, и продельфинидины, которые состоят из галлокатехина, эпигаллокатехина и их галлоилированных производных в качестве мономерных единиц.

Проантоцианидины, содержащие афзелехин в качестве субъединиц, называются пропеларгонидинами.

В литературе представлено несколько методов анализа полифенолов.

Большинство из них основаны на жидкостной хроматографии (ЖХ) в сочетании с детектором на основе фотодиодной матрицы (КПК) и / или масс-спектрометром (МС).

Это очень эффективный и высокочувствительный метод определения процианидинов из сложных матриц.

В последние годы было показано, что ионизация электрораспылением (ИЭР) подходит для анализа таких полярных соединений в водных растворах без предварительной дериватизации образцов.

ИЭР позволяет определять молекулярную массу процианидинов с разной степенью полимеризации.

Применяются методы ЖХ как с нормальной, так и с обращенной фазой.

Нормально-фазовый метод обеспечивает разделение олигомеров проантоцианидина согласно разным степеням полимеризации (DP), тогда как обращенно-фазовые колонки C18 способны разделять различные изомерные олигомеры с эквивалентной молекулярной массой.

Однако обращенно-фазовый анализ высших олигомерных проантоцианидинов (то есть

the fact that, with increasing degrees of polymerization, the number of isomers also increases.

This effect results in a retention time overlap of isomers containing differing degrees of polymerization, causing the large unresolved peak.

Catechins and proanthocyanidins are usually detected at 280 nm using a UV detector.

However, peak intensity is rather low, and many other phenolic compounds also absorb light at 280 nm.

Much better sensitivity is obtained using fluorescence with excitation and emission set to 230 and 321 nm, respectively

The application of the LC/MS method for the analysis of such compounds, together with ^{13}C NMR spectroscopy, is demonstrated in our laboratory by direct analysis of polyphenol constituents of grape seed MeOH extracts (GSE).

Grape seeds are known as an abundant source of procyanidins consisting of both (+)-catechin and ()-epicatechin forming units that, in the particular case of ()-epicatechin, can appear galloylated or not.

The use of a rapid resolution HPLC column and the appropriate gradient program afforded the separation of seventeen phenolic compounds in less than 30 min.

The exact mass measurements of the of

тетрамеров) неосуществим из-за того, что с увеличением степени полимеризации количество изомеров также увеличивается.

Этот эффект приводит к перекрытию времени удерживания изомеров, содержащих разную степень полимеризации, вызывая большой неразрешенный пик.

Катехины и проантоцианидины обычно обнаруживаются при 280 нм с помощью УФ-детектора.

Однако пиковая интенсивность довольно мала, и многие другие фенольные соединения также поглощают свет при 280 нм.

Намного лучшая чувствительность достигается при использовании флуоресценции с возбуждением и эмиссией, установленными на 230 и 321 нм соответственно

Применение метода ЖХ / МС для анализа таких соединений вместе со спектроскопией ЯМР ^{13}C продемонстрировано в нашей лаборатории прямым анализом полифенольных компонентов экстрактов MeOH (GSE) виноградных косточек.

Виноградные косточки известны как богатый источник процианидинов, состоящих как из (+) - катехина, так и из () -эпикатехин-образующих единиц, которые, в конкретном случае () -эпикатехина, могут казаться галлоилированными или нет.

Использование колонки для ВЭЖХ с быстрым разрешением и соответствующей программы градиента позволило разделить семнадцать фенольных соединений менее чем за 30 мин.

Точные измерения массы

molecular and fragment ions of analytes with a time-of-flight (TOF) mass spectrometer in positive and in negative polarity mode revealed the structures of seventeen polyphenols in our extract comprising catechin and epicatechin monomers, i.e. procyanidin oligomers, and their gallates.

The procyanidin dimers, trimers, tetramers and pentamers (B-type) have molecular masses of 578, 866, 1,154 and 1,442, respectively and their gross structures were identified in the positive mode by the abundant $[M + H]^+$ and, in some cases by $[M + Na]^+$ and $[2M + Na]^+$ sodium adducts (positive mode).

All identified compounds exhibited $[M - H]$ in the negative mode, as well as $[2M - H]$ ions for some of them, confirming molecular mass.

In addition, procyanidin dimers and epicatechin gallate possessed high affinity to sodium ions, giving adducts such as $[M + Na - 2H]$ and $[2M + 2Na - 3H]$.

Doubly charged $[M - 2H]^{2-}$ species were observed for procyanidin epicatechin gallate possessed high affinity to sodium ions, giving adducts such as $[M + Na - 2H]$ and $[2M + 2Na - 3H]$.

Doubly charged $[M - 2H]^{2-}$ species were observed for procyanidin trimers.

It should also be noted that such identification, based solely on precise mass measurement of quasimolecular ions, of the gross structure of

молекулярных и фрагментарных ионов аналитов с помощью времяпролетного масс-спектрометра (ВМА) в режиме положительной и отрицательной полярности выявили структуры семнадцати полифенолов в нашем экстракте, включающих мономеры катехина и эпикатехина, то есть олигомеры процианидина, и их галлаты.

Димеры, тримеры, тетрамеры и пентамеры процианидина (В-тип) имеют молекулярные массы 578, 866, 1154 и 1442 соответственно, и их общие структуры были идентифицированы в положительном режиме по обильному $[M + H]^+$, а в некоторых случаях аддуктами $[M + Na]^+$ и $[2M + Na]^+$ натрия (положительный режим).

Все идентифицированные соединения показали $[M - H]$ в отрицательном режиме, а также ионы $[2M - H]$ для некоторых из них, что подтверждает молекулярную массу.

Кроме того, димеры процианидина и галлат эпикатехина обладают высоким сродством к ионам натрия, давая такие аддукты, как $[M + Na - 2H]$ и $[2M + 2Na - 3H]$.

Двухзарядные частицы $[M - 2H]^{2-}$ наблюдались для процианидин-эпикатехингаллата, обладающего высоким сродством к ионам натрия, давая такие аддукты, как $[M + Na - 2H]$ и $[2M + 2Na - 3H]$.

Для тримеров процианидина наблюдались двухзарядные формы $[M - 2H]^{2-}$.

Следует также отметить, что такая идентификация, основанная исключительно на точном измерении массы квазимолекулярных ионов,

procyanidin oligomers is tentative.

This method allows only elucidation of chain length, and the chemical constitution of the individual chains, but not the stereochemistry at the chiral centers C-2 and C-3.

In order to get more information regarding the structure of procyanidin oligomers detected in the extract, the ^{13}C NMR spectroscopy was applied.

The ^{13}C NMR spectrum of the GSE was measured by a pulse sequence allowing the total relaxation of all carbons, as well as the suppression of the nuclear Overhauser effect (NOE effect) which enables quantitative measurements based on peak intensities.

Assignments of the resonances were based on comparison with those reported in the literature.

This spectrum provided structural and stereochemical details on subunit composition.

The signals of the ^{13}C -NMR spectrum indicated the presence of catechin, epicatechin and B-type linked procyanidins, with some traces of gallate unit.

There were no other major signals present in GSE, ruling out the presence of some other types of flavonoid molecules, or proanthocyanidins based on other units.

The signals at δ 82 and 79 ppm were diagnostic for the 2,3-trans and 2,3-cis stereochemistry of the heterocyclic ring respectively, indicating that both stereoisomers (catechin/epicatechin) are

общей структуры олигомеров процианидина является предварительной.

Этот метод позволяет выяснить только длину цепи и химическое строение отдельных цепей, но не стереохимию хиральных центров C-2 и C-3.

Чтобы получить больше информации о структуре олигомеров процианидинов, обнаруженных в экстракте, была применена спектроскопия ЯМР ^{13}C .

Спектр ЯМР ^{13}C GSE был измерен с помощью последовательности импульсов, обеспечивающей полную релаксацию всех атомов углерода, а также подавление ядерного эффекта Оверхаузера (эффект NOE), что позволяет проводить количественные измерения на основе пиковых интенсивностей.

Назначения резонансов были основаны на сравнении с данными, опубликованными в литературе.

Этот спектр предоставил структурные и стереохимические подробности о составе субъединиц.

Сигналы спектра ^{13}C -ЯМР указывают на присутствие катехина, эпикатехина и процианидинов, связанных типа В, с некоторыми следами галлатного звена.

В GSE не было других важных сигналов, что исключает присутствие некоторых других типов молекул флавоноидов или проантоцианидинов на основе других единиц.

Сигналы при 82 и 79 м.д. были диагностическими для 2,3-транс- и 2,3-цис-стереохимии гетероциклического кольца соответственно, что указывает на

present.

Comparison of the areas of these resonances, gave catechin/epicatechin ratio of 1:0.74.

The same HPLC UV/ESI MS method was also applied subsequently in screening of the GSE from eight grape cultivars (*Vitis vinifera*) growing in Serbia for their polyphenolic composition.

The study revealed 34 phenolic compounds belonging to the following groups: flavan-3-ol monomers, procyanidin dimers and trimers, flavonoids, hydroxycinnamic acid and hydroxybenzoic acid derivatives.

The quantities of the main constituents were determined using LC PDA.

Qualitative and quantitative differences among the cultivars were observed.

In the above examples only oligomeric proanthocyanidin chains of B-type formed from the same monomeric flavanol building blocks, i.e. (+)-catechin and its ()-epimer, i.e. procyanidins, were encountered.

However, there are numerous examples of heterogeneous proanthocyanidins containing in addition to (epi)catechin other monomer units such as (epi)afzelechin and/or gallocatechin, as well as A-type linkage.

Such type of mixed chains could be analysed by combination of LC with tandem mass spectrometry, e.g. (LC/MS/MS) or LC-multiple stage MS

присутствие обоих стереоизомеров (катехин / эпикатехин).

Сравнение площадей этих резонансов дало соотношение катехин / эпикатехин 1: 0,74.

Тот же самый метод HPLC UV / ESI MS впоследствии был применен при скрининге GSE из восьми сортов винограда (*Vitis vinifera*), произрастающих в Сербии, на предмет их полифенольного состава.

В ходе исследования было выявлено 34 фенольных соединения, относящихся к следующим группам: мономеры флаван-3-ола, димеры и тримеры процианидинов, флавоноиды, производные гидроксикоричной кислоты и гидроксибензойной кислоты.

Количества основных компонентов определяли с помощью ЖХ КПК.

Между сортами наблюдались качественные и количественные различия.

В приведенных выше примерах встречались только олигомерные проантоцианидиновые цепи В-типа, образованные из одних и тех же мономерных строительных блоков флаванола, то есть (+) - катехина и его () -эпимера, то есть процианидинов.

Однако существует множество примеров гетерогенных проантоцианидинов, содержащих, помимо (эпи) катехина, другие мономерные единицы, такие как (эпи) афцелехин и / или галлокатехин, а также связь А-типа.

Такой тип смешанных цепей может быть проанализирован путем сочетания ЖХ с тандемной масс-спектрометрией, например (ЖХ / МС

(LC/MS_n).

Tandem mass spectrometry (MS/MS) can give more information about the structural details of the different molecules which is based on their characteristic fragmentation patterns.

The MS/MS technique used for this analysis is mostly product ion scan involving selection of the quasi-molecular ion, such as [M-H] or [M+H]⁺ by the first analyzer, its fragmentation by the collisional activation, followed by the analysis of product ions.

The proanthocynidin mixtures can also be analysed directly, without chromatographic separation using matrixassisted laser desorption ionization in combination with time of flight mass spectrometry (MALDI/TOF MS) using the so-called post source decay (PSD) fragmentation.

Another example of direct analysis, without chromatographic separation of the condensed tannins is a direct flow injection electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry (ESI-IT-MS/MS) which was used to investigate the polyphenolic compounds present in an infusion from the barks of *Hancornia speciosa* Gom. (Аросунасеае), a native Brazilian plant popularly known as 'mangabeira', used as a source of nutrition and against gastric disorders.

/ MS) или многоступенчатая ЖХ-МС (ЖХ / МС_n).

Тандемная масс-спектрометрия (МС / МС) может дать больше информации о структурных деталях различных молекул, основанных на их характерных паттернах фрагментации.

Метод МС / МС, используемый для этого анализа, в основном представляет собой сканирование иона продукта, включающее выбор квазимолекулярного иона, такого как [МН] или [М + Н]⁺, первым анализатором, его фрагментацию путем столкновительной активации с последующей анализ продуктовых ионов.

Смеси проантоцинидинов также можно анализировать напрямую, без хроматографического разделения, с использованием матричной лазерной десорбционной ионизации в сочетании с времяпролетной масс-спектрометрией (МЛДИ / КПК МС) с использованием так называемой фрагментации после распада источника (РИД).

Другим примером прямого анализа без хроматографического разделения конденсированных танинов является тандемная масс-спектрометрия с ионизацией ионной ловушкой и электрораспылением с прямым впрыском (ESI-IT-MS / MS), которая использовалась для исследования полифенольных соединений, присутствующих в настойке из коры растений. *Hancornia speciosa* Gom. (Аросунасеае), местное бразильское растение, широко известное как «мангабейра», используемое в качестве источника питания и против

желудочных расстройств.