

Министерство образования и науки Российской Федерации

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ПЕРМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

«УТВЕРЖДЕНО»

Проректор ПНИПУ по науке и  
инновациям, профессор

В.Н. Коротаев  
2019 г.

«СОГЛАСОВАНО»

Директор ООО «НПК «Инфинити»»

С.М. Шамаев  
2019 г.

ОТЧЕТ

**«Анализ биологически активных веществ в представленных образцах:  
количественное определение амигдалина»**

№ 2018/ 471

Руководитель исследования:  
к.х.н. Красных О.П.

Пермь, 2019г.

## Список исполнителей

Директор НОЦ ХимБИ  
ПНИПУ, к.х.н



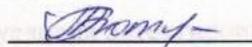
Красных О.П. (эксперимент, отчет,  
заключение)

Ведущий инженер  
НОЦ ХимБИ ПНИПУ



Фефилова И.В. (эксперимент,  
отчет)

Доцент кафедры химии и  
биотехнологии ПНИПУ,  
к.фарм.н.



Ботева А.А. (эксперимент)

### 1. Следование нормативным актам:

- ГОСТ 13044-2014 Правила выполнения лабораторной практики
- ГОСТ Р ИСО 9001-2012 Системы менеджмента качества. Требования к совместным операционным процедурам (СОП) лабораториям

### Библиография:

- Development and validation of HPLC method for the determination of amygdalin in the plant seeds of pink lotus. Kazan Journal of Chemistry and Biochemistry. Vol 16(4), 2012, pp 80-85

## Реферат

Отчет 22 страницы, 4 таблицы, 20 рисунков, 1 схема.

Ключевые слова: Персин, амигдалин, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), масс-спектрометрия (МС).

**Цель работы:** Изучить содержание амигдалина в продукте Персин

### Задачи:

1. Подобрать оптимальные условия детектирования Амигдалина методом ВЭЖХ
2. Провести пробоподготовку образцов
3. Исследовать образцы на содержание амигдалина
4. Провести количественное определение амигдалина в продукте Персин.

В отчете представлены результаты анализа проб продукта Персин, исследованного методом ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС.

### 1. Следование нормативным актам

Исследование проведено в соответствии со следующей нормативной документацией.

- 1) ГОСТ 33044-2014 Принципы надлежащей лабораторной практики
- 2) ГОСТ Р ИСО 9001-2015 Системы менеджмента качества. Требования.
- 3) Стандартные операционные процедуры (СОП) лаборатории.

### Литература:

1. Development and validation of HPLC method for the determination of amygdalin in the plant extract of plum kernel. Research Journal of Chemistry and Environment. Vol 16(4), 2012, pp 80-86.

## **2. Сведения об изучаемом продукте**

Изучаемый продукт - концентрат безалкогольного напитка "Персин" из листьев персика. В состав входят вода подготовленная, листья персика обыкновенного (*Persica vulgaris*), аскорбиновая кислота. Производитель ООО "НПК Инфинити" 19.11.2018 на анализ был представлен запечатанный образец продукции, произведенный 01.11.2018.

## **3. Материалы**

### **3.1 Реактивы**

Ацетонитрил ChromAR HPLC

Ацетонитрил LC-MS Chromasolv

Трифторуксусная кислота (ТФУК)

Муравьиная кислота

### **3.2 Материалы**

Наконечники для дозаторов

Пробирки эппендорфа

Шприцы одноразовые

### **3.3 Стандартный образец.**

В качестве стандартного образца амигдалина использовались капсулы APRAMAR, в состав которых входят: 300 мг экстракта семян абрикоса (содержание амигдалина 99%), лактоза, кукурузный крахмал и тальк. Образец представлен Заказчиком.

## **4. Методы и оборудование**

### **4.1 Оборудование**

1. Аналитическая ВЭЖХ-система Shimadzu Prominence XR с диодным детектором SPD-M20A .
2. ВЭЖХ-система Shimadzu Prominence XR с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040
2. Роторный выпаритель ИКА
3. Микроцентрифуга MPW-55
4. Аквадистиллятор электрический ДЭ-10
5. Деионизатор воды Sartorius Stedim arium pro VF
6. Ультразвуковая водяная баня Branson 1510
7. Дозаторы автоматические Sartorius

## 8. Весы аналитические Shrinko Denshi HTR-220CE

### 4.2 Методы

#### 4.2.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

Анализ проводили с помощью аналитической ВЭЖХ-системы Shimadzu Prominence XR Колонка Shim-pack XR-ODS II 2.0 mm. d x 75 mm., детектор - диодно-матричный SPD-20МА. В качестве жидкой фазы использовали ацетонитрил с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК.

#### 4.2.2. Масс-спектрометрия.

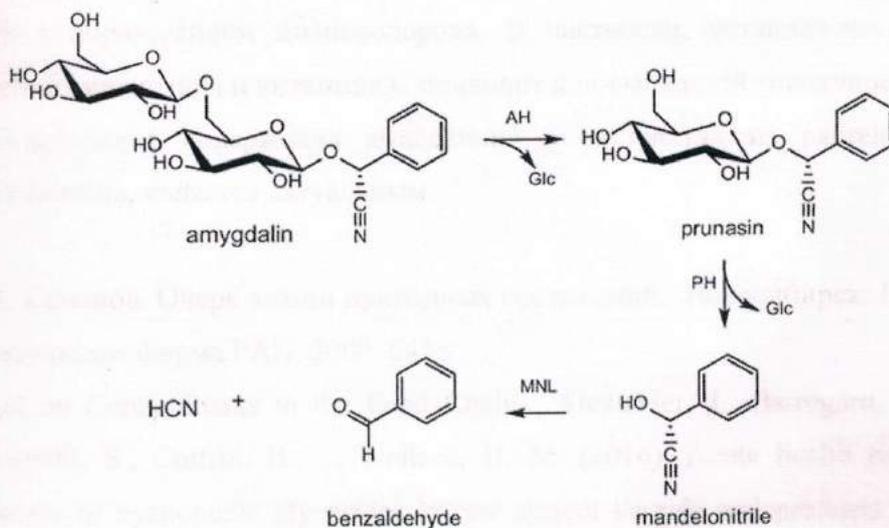
Анализ проводили с помощью аналитической ВЭЖХ-системы Shimadzu Prominence XR с тройным квадрупольным масс-спектрометрический детектором на колонке Shim-pack XR-ODS II 2.0 mm. d x 75 mm. Режим ионизации - ESI. Использовали изократический режим 10 % ацетонитрила в воде с 0,1 % муравьиной кислоты.

## 5. Проведенный эксперимент и его обсуждение

### 5.1. Краткий обзор литературных данных об объекте исследования

Амигдалин – органическое соединение, относящееся к классу гликозидов. Краткое название – генцибиозид нитрила миндальной кислоты, название по правилам IUPAC- [(6-*O*-β-D-глюкопиранозил-β-D-глюкопиранозил)окси](фенил)ацетонитрил. Амигдалин впервые выделен в 1890 году из ядер косточек горького миндаля (*Prunus dulcis*) и от слова «миндаль» по-гречески (άμυγδάλη) получил свое название. Содержится в ядрах косточек и семенах многих растений рода *Prunus* (вишня, слива, миндаль, абрикос и др) и Яблоневых (*Maleae*), а также в различных частях других растений (незрелый сахарный тростник, сорго, некоторые виды орехов и др.)

Амигдалин является компонентом системе защиты растений против насекомых и животных, природным токсином, представителем класса так называемых цианогенных гликозидов, молекулы которых содержат в связанной форме циановодород (синильную кислоту). Растительные ткани содержат ферменты, гидролизующие цианогенные гликозиды. В интактных клетках амигдалин и катаболизирующие ферменты находятся в разных компартментах, однако при повреждении по какой-либо причине растительных тканей ферменты входят в контакт с гликозидами. Как правило, цианогенные гликозиды присутствуют в вакуолях клетки, а гликозидаза, отщепляющая углеводный фрагмент молекулы, — в цитозоле. После повреждения клеток растений синильная кислота высвобождается в процессе гидролиза (Схема 1).



AH: amygdalin hydrolase; PH: prunasin hydrolase; MNL: mandelonitrile lyase; Glc: glucose.

### Схема 1. Гидролиз амигдалина с образованием циановодорода

Аналогичный процесс гидролиза протекает под действием микробиоты и ферментов желудочно-кишечного тракта животных и человека.

Амигдалин и его ближайшие аналоги, часто противоречиво называемые в литературе витамином В17 (так как ни одно из них в научном смысле витамином не является), предлагаются в нетрадиционной медицине для излечения различных типов раковых заболеваний. Однако данные заявления не подтверждены клиническими испытаниями, а также отягощены противоречивыми данными экспериментов, выполненных на животных и на клетках.

Хотя данные по токсическим эффектам амигдалина и его аналогов при их введении парентерально недостаточны или разноречивы, вплоть до признания их нетоксичными, однозначно подтверждено, что при пероральном применении амигдалина и его аналогов в экспериментах на разных лабораторных животных с функционирующей микрофлорой кишечника наблюдается их высокая токсичность. Установлено, что токсические эффекты в основном вызваны действием циановодорода (синильной кислоты) выделяющегося при гидролизе *in vivo* при непосредственном участии микробиоты кишечника. Аналогичный процесс протекает под действием консорциума микроорганизмов человека. Поскольку характеристики микробиоты являются очень вариативным фактором (как между отдельными людьми, так и у одного человека в зависимости от физиологического состояния и др.) применение амигдалина и его аналогов всегда является риском даже при дозах, заявляемых как безвредные.

В дополнение, были обнаружены факторы усиливающие гидролиз амигдалина и его аналогов с образованием циановодорода. В частности, установлено, что совместное применение амигдалина и витамина С приводит к повышенной токсичности первого.

Исследование содержания амигдалина в экстрактах из растений, содержащих данный гликозид, является актуальным.

1. А.А. Семенов. Очерк химии природных соединений. Новосибирск: Наука. Сибирская издательская фирма РАН, 2000. 644с.
2. Panel on Contaminants in the Food Chain , Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Ceccatelli, S., Cottrill, B., ... Wallace, H. M. (2016). Acute health risks related to the presence of cyanogenic glycosides in raw apricot kernels and products derived from raw apricot kernels. EFSA Journal, 14(4), [4424]. DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4424

3. Suchard J.R., Wallace K.L., Gerkin R.D. Acute cyanide toxicity caused by apricot kernel ingestion. *Ann Emerg Med.* 1998. 32 (6): 742–4. [doi:10.1016/S0196-0644\(98\)70077-0](https://doi.org/10.1016/S0196-0644(98)70077-0). *PMID 9832674*.
4. Vani Jaswal, Jeyanthi Palanivelu, Ramalingam C. Effects of the Gut microbiota on Amygdalin and its use as an anti-cancer therapy: Substantial review on the key components involved in altering dose efficacy and toxicity. *Biochemistry and Biophysics Reports* 14 (2018) 125–132
5. Andrew Vickers. Alternative Cancer Cures: “unproven” or “Disproven”. *Cancer J. Clin.* 54 (2004) 110–118, <http://dx.doi.org/10.3322/canjclin.54.2.110>.

## 5.2. Подбор условий детектирования стандартного образца

### 5.2.1. Пробоподготовка

1 капсулу APRAMAR (п 3.3) растворяли в 20 мл 25% раствора ацетонитрила в воде. 20 минут проводили обработку ультразвуком. Полученный раствор (15 мг/мл) использовали для приготовления раствора 5 мг/мл.

Перед забором в хроматограф, раствор центрифугировали при 14500 об/мин в течение 10 минут. Для анализа отбирали 500 мкл надосадочной жидкости.

### 5.2.2. ВЭЖХ анализ

Был проведен анализ стандартного образца, используя изократический режим вода: ацетонитрил (25/75 v/v), согласно статье; условия не подошли, время удерживания амигдалина совпадает с временем удерживания несорбируемого вещества. Рис №1.

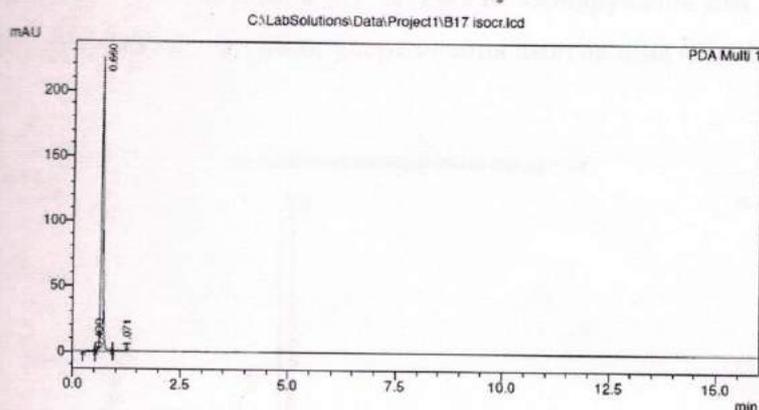


Рис. 1. Хроматограмма раствора амигдалина, Режим: изократический с 75% ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК.

Использование градиента. При линейном 10 минутном градиенте от 5 до 95 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК время удерживания амигдалина - 3,635. - рис. 2.

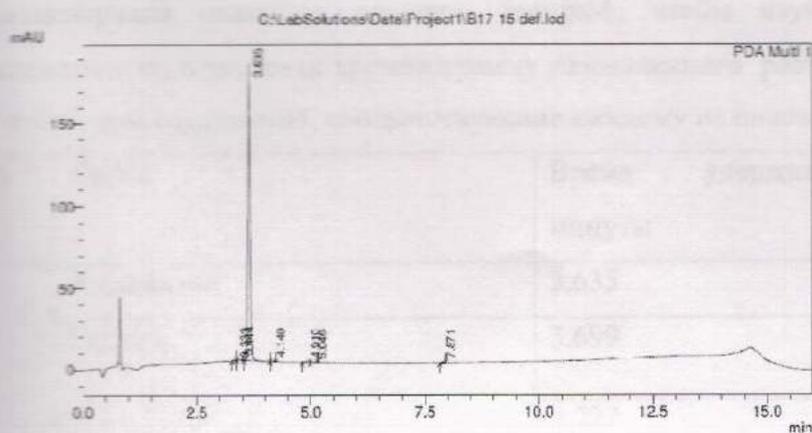


Рис. 2. Хроматограмма раствора амигдалина. Режим: линейный градиент, от 5 до 95 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК.

### 5.3 Исследование образцов продукта Персин

#### 5.3.1. Пробоподготовка

К 2 мл Персина добавили 10 мл этанола и кипятили в колбе с обратным холодильником 100 минут. Затем отфильтровали через бумажный фильтр и выпарили досуха на ротационном испарителе. К сухому остатку добавили 2 мл смеси вода: ацетонитрил (50/50), затем разбавили в 20 раз и пропустили через шприцевой фильтр.

#### 5.3.2. ВЭЖХ анализ

Закальвали пробу, используя линейный 10 минутный градиент от 5 до 95 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК. Обнаружены два пика с временем удерживания, примерно равным времени удерживания амигдалина (Рис №3).

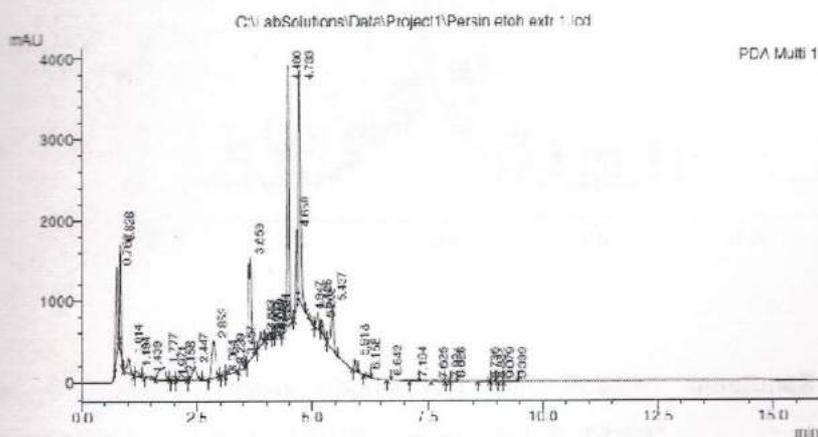


Рис. 3. Хроматограмма пробы Персина. Режим: линейный градиент, от 5 до 95 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК.

Концентрация оказалась слишком высокой, чтобы изучить спектры поглощения, вследствие чего записали хроматограмму разбавленного раствора (Рис 4,5.) и сравнивали УФ спектры соединений, соответствующие каждому из пиков (Табл №2)

№	Проба	Время удерживания, минуты	Максимум поглощения, нм
1	Амигдалин	3.635	199, 220 (плечо), 262
2	Персин	3.699	200, 216, 325
		3.727	199, 217, 325

Таблица №2. Сравнение времени удерживания и спектров поглощения, соответствующих двум пикам на хроматограммах растворов Персина и пику Амигдалина.

Как видно из таблицы, спектры поглощения всех компонентов разные. Поскольку значительную роль может играть матрица, в которой проводится анализ, записали хроматограмму смеси Амигдалина и Персина. Площадь под кривой пика 3.716 увеличилась (Рис .6.), поглощение: 198, 325 нм. Для того, чтобы исключить влияние вложения пиков при анализе, возникла необходимость более значительно разделить двойной пик.

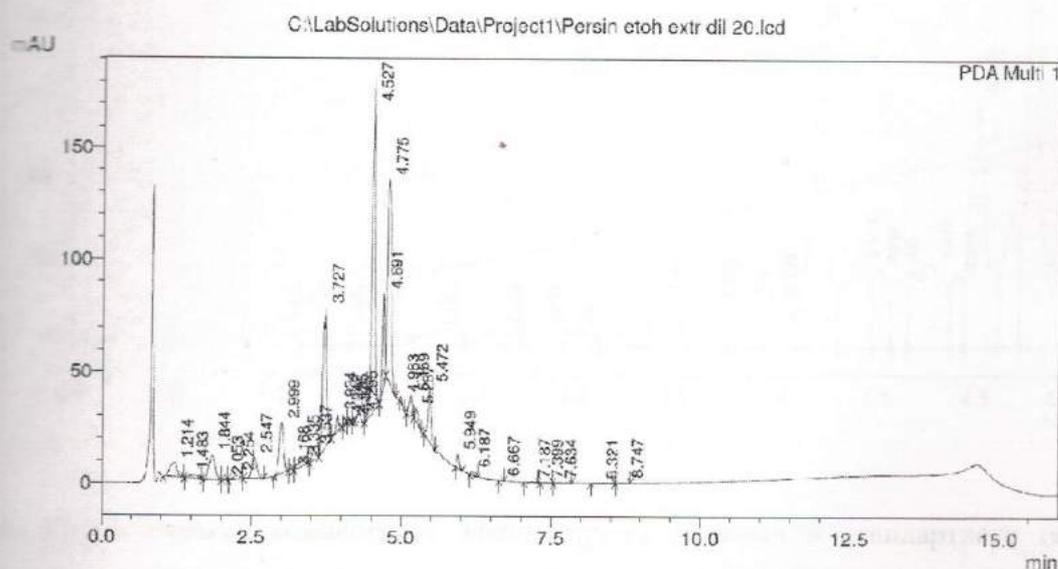


Рис 4. Хроматограмма пробы Персина. Режим: линейный градиент, от 5 до 95 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК.

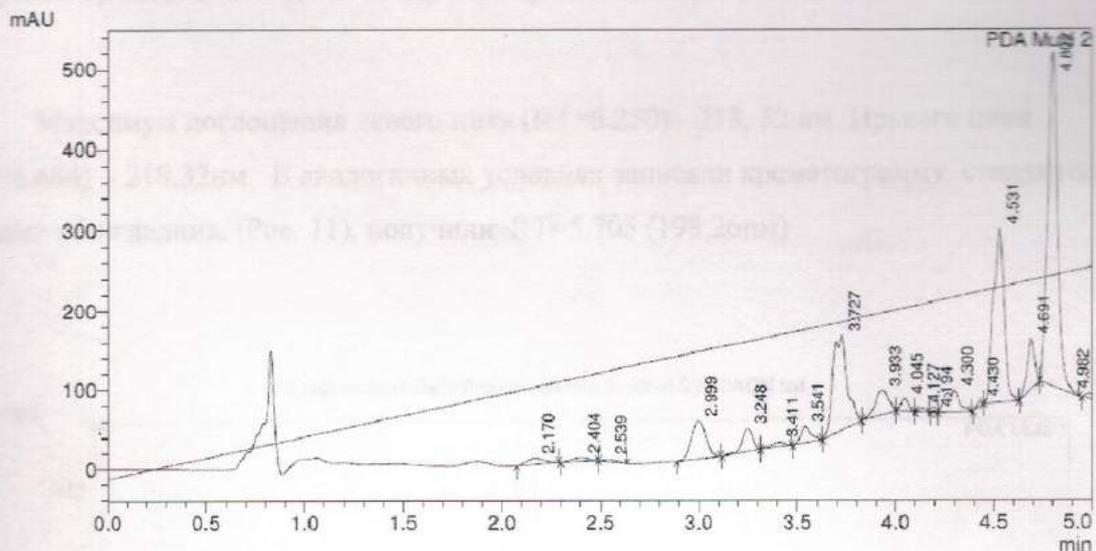


Рис 5. Хроматограмма пробы Персина. Режим: линейный градиент, от 5 до 95 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК. 254 нм, увеличенный масштаб.

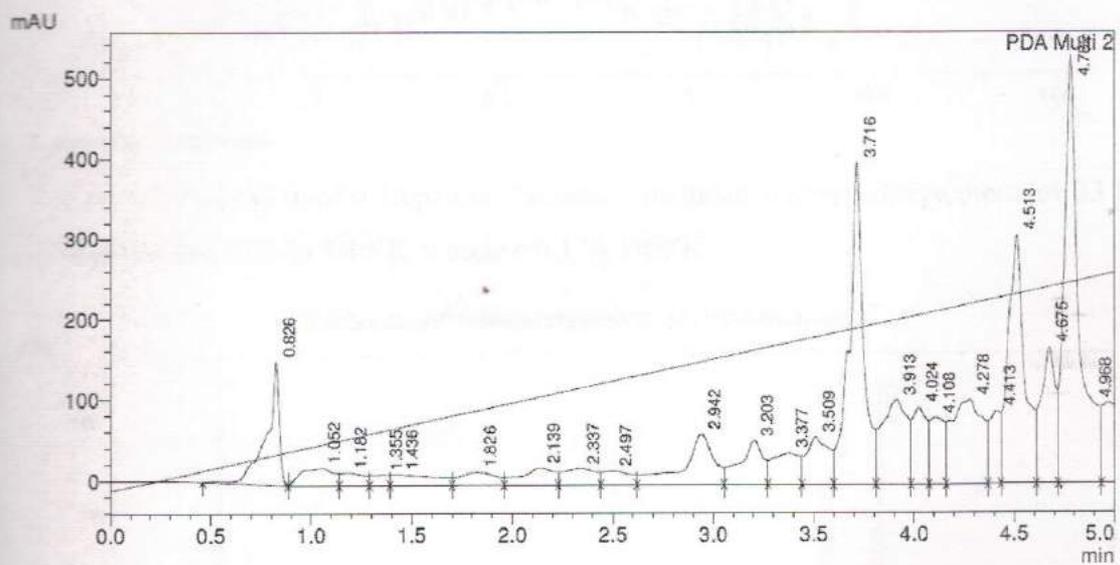


Рис 6: Хроматограмма совместного закола пробы Персина и стандартного образца амигдалина. Режим: линейный градиент, от 5 до 95 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК. 216 нм, увеличенный масштаб.

Для подбора метода для эффективного разделения пиков варьировали начальную и конечную концентрации ацетонитрила и время анализа (Рис. 7-10). Были проведены 4 эксперимента, оптимальное разделение пиков было достигнуто при линейном 30

минутном градиенте от 5 до 31 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК. Рис 10.

Максимум поглощения левого пика (RT=6.250) - 218,32 нм. Правого пика (RT=6.684) - 219,32нм. В аналогичных условиях записали хроматограмму стандартного образца Амигдалина. (Рис. 11), получили RT=5.705 (198,26нм)

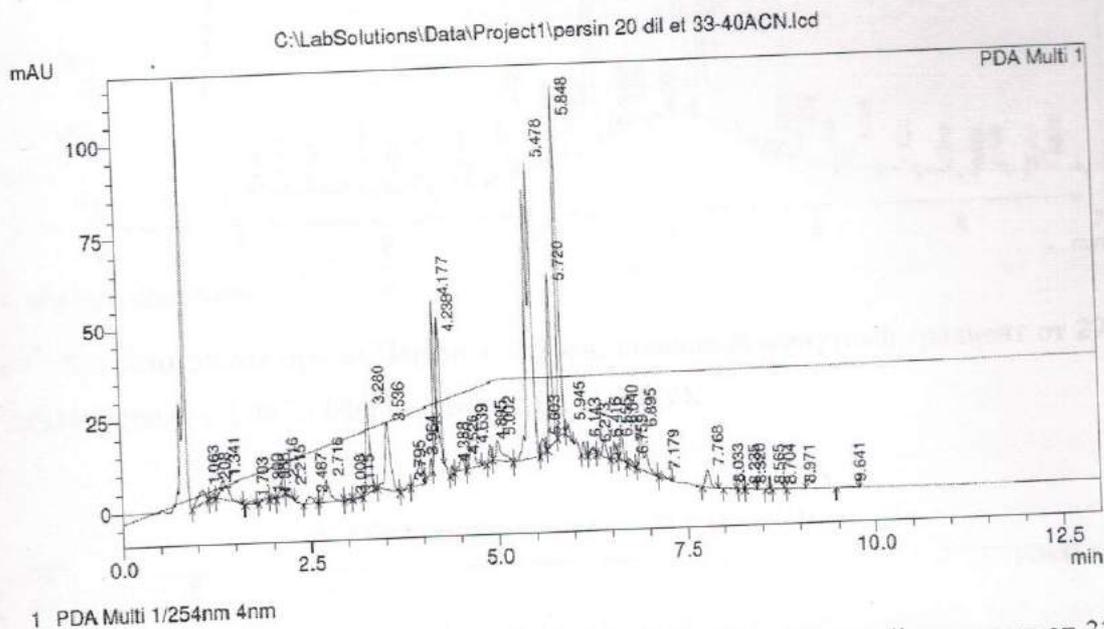


Рис 7: Хроматограмма пробы Персина. Режим: линейный минутный градиент от 33 до 40 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК.

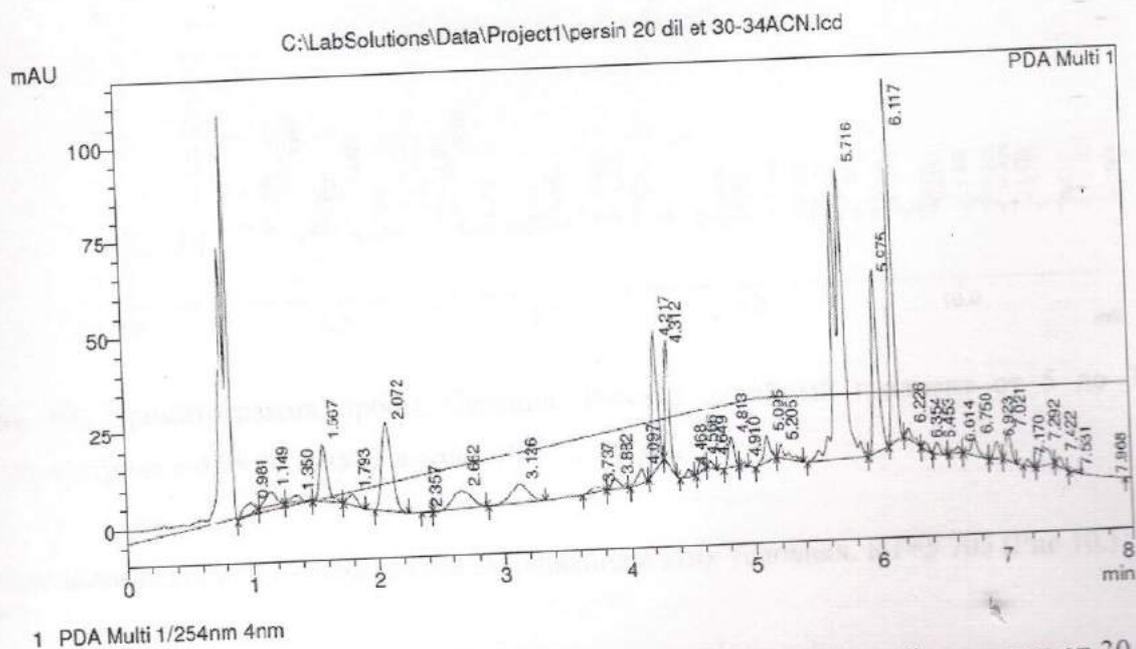
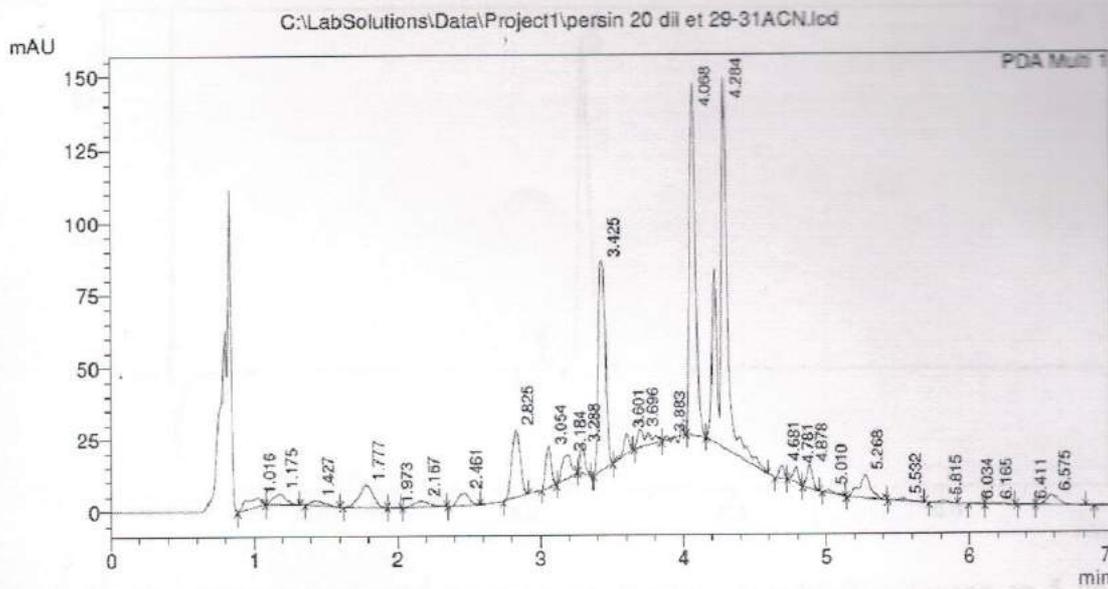


Рис 8: Хроматограмма пробы Персина. Режим: линейный минутный градиент от 30 до 34 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК.



1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Рис 9: Хроматограмма пробы Персина. Режим: линейный минутный градиент от 29 до 31 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК.

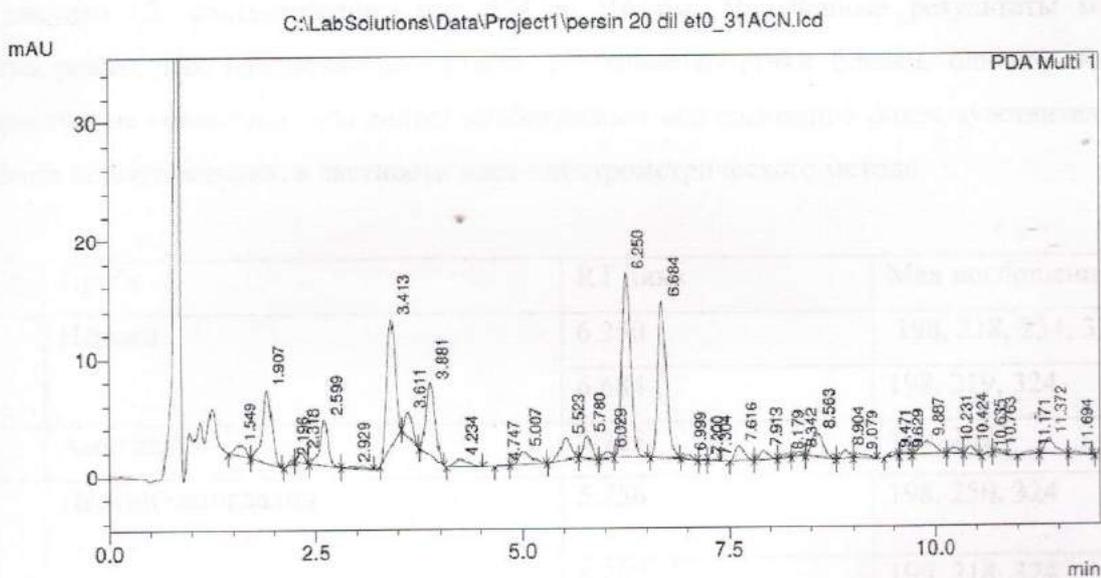


Рис 10: Хроматограмма пробы Персина. Режим: линейный градиент от 5 до 31 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК.

Определение времени удерживания амигдалина в этих условиях. RT=5.705 (Рис 10.)

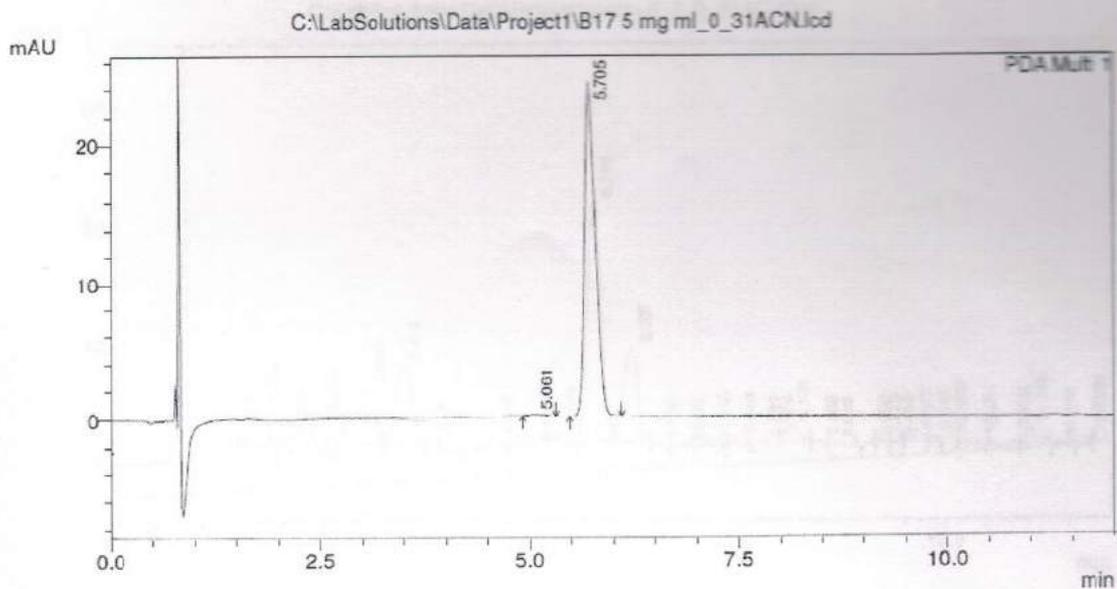


Рис 11: Хроматограмма раствора амигдалина. Режим: линейный градиент от 5 до 31 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК.

Чтобы учесть влияние матрицы на время удерживания, необходим совместный закол Персина и амигдалина в подобранных условиях. Полученные хроматограммы приведены на рисунке 12, соответственно при 254 и 216 нм. Полученные результаты можно рассматривать как неоднозначные (Табл. 3). Характеристики близки, однако спектры полностью не совпадают, что делает необходимым использование более чувствительных методов детектирования, в частности масс-спектрометрического метода.

№п/п	Проба	RT пика	Мах поглощения, нм
1	Персин	6.250	198, 218, 234, 324
		6.684	198, 219, 324
2	Амигдалин	5.705	199, 262
3	Персин+амигдалин	5.756	198, 250, 324
		6.207	199, 218, 324

Таблица №3. Время удерживания и максимумы поглощения проб Персина, амигдалина, и совместного закола в оптимальных подобранных условиях.

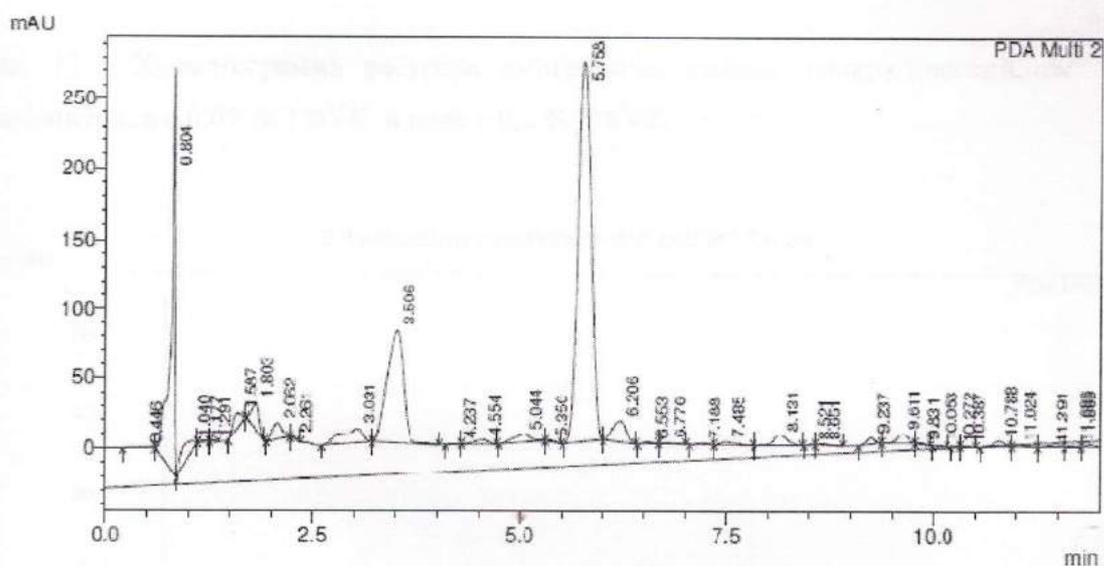
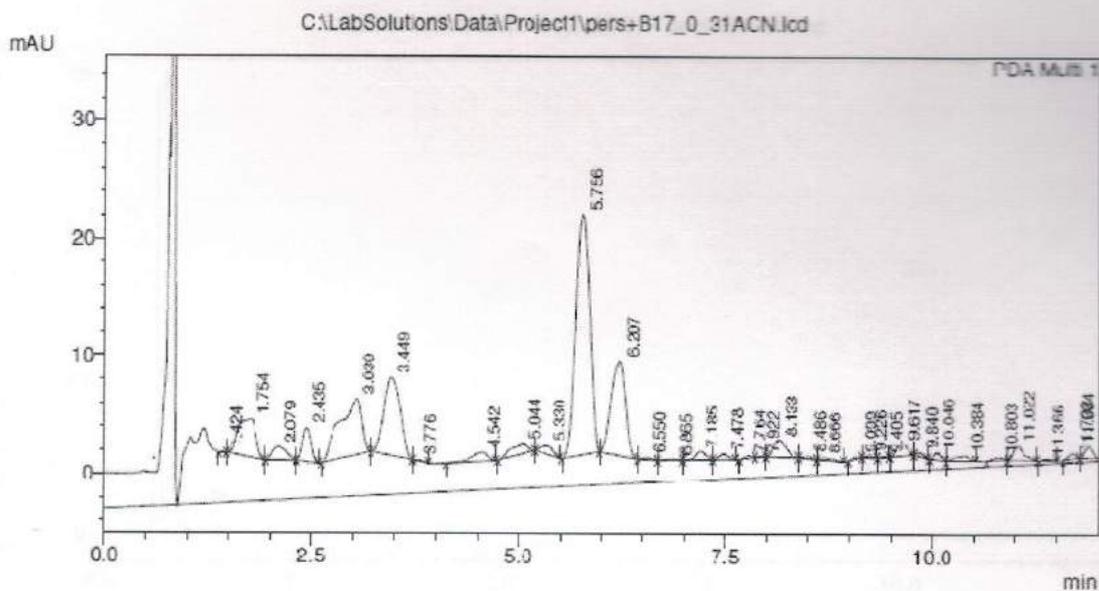


Рисунок 12. Хроматограмма совместного закола Персина с амигдалином, при разной длине волн - 254 и 216 нм. Режим: линейный градиент от 5 до 31 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК.

Для анализа на ВЭЖХ-МС необходимо было подобрать параметры изократического режима хроматографирования. При подборе было изучено хроматографирование при 30, 25, 20 и 10 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК. Рис 13-16.

Время удерживания образца амигдалина было 0.707, 0.741, 0.975 и 2.313 соответственно. Условия с использованием 10 % ацетонитрила решено использовать для проведения ВЭЖХ-МС анализа Персина.

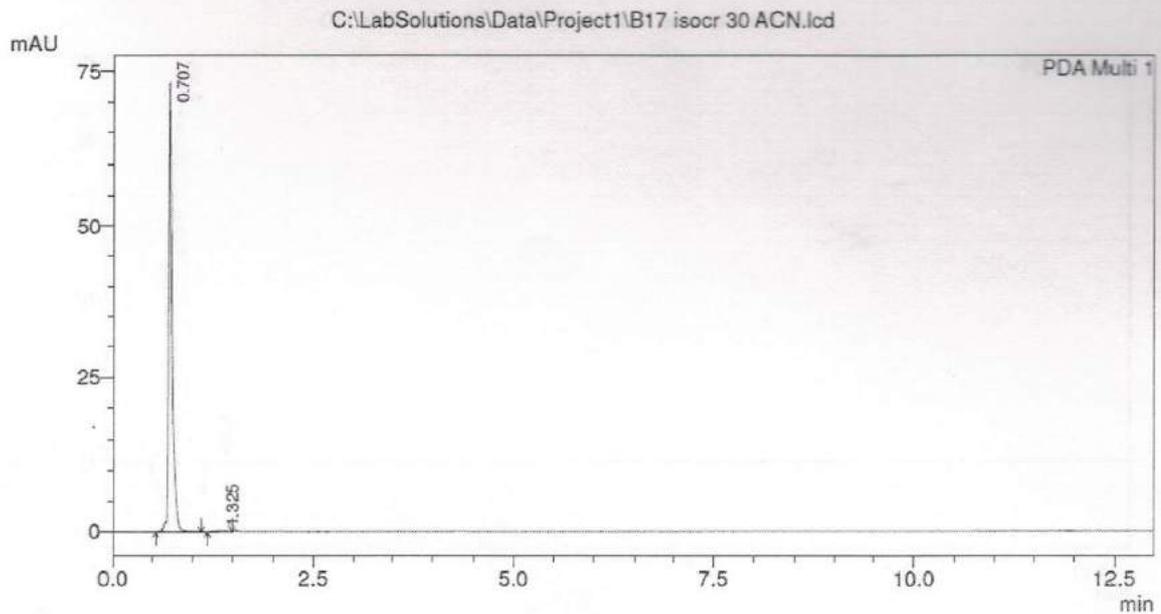


Рис. 13 . Хроматограмма раствора амигдалина. Режим: изократический, при 30 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК.

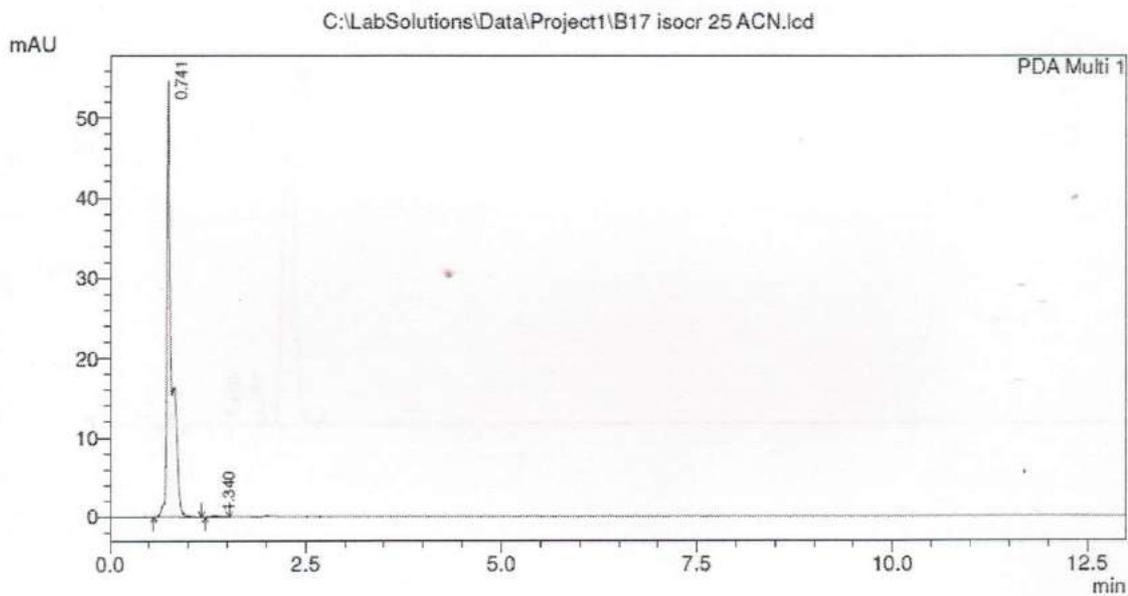


Рис. 14 . Хроматограмма раствора амигдалина. Режим: изократический, при 25 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК.

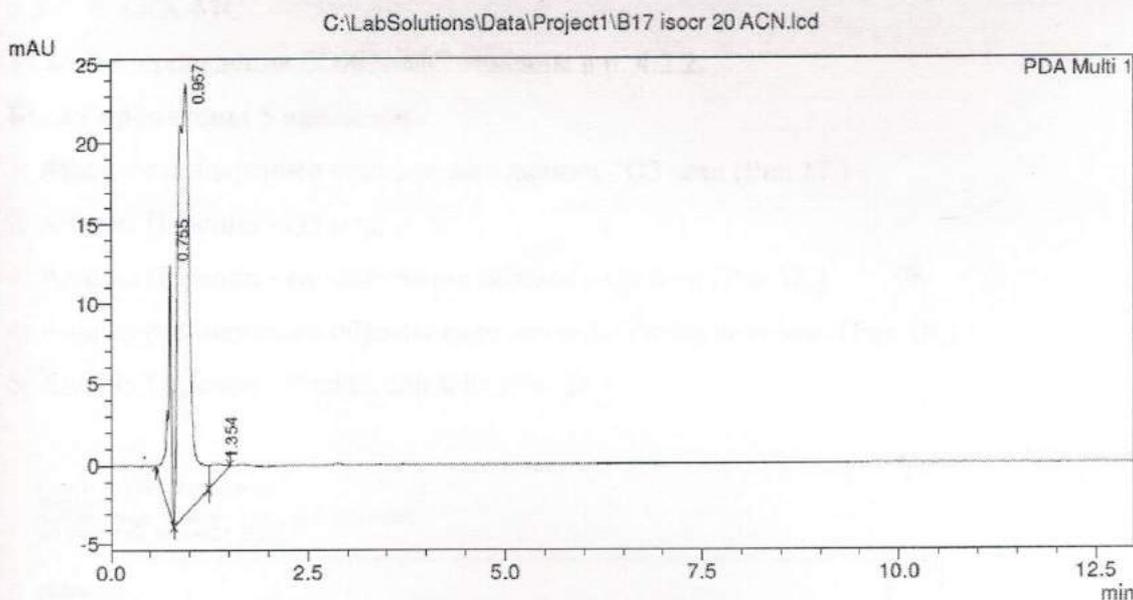


Рис. 15 . Хроматограмма раствора амигдалина. Режим: изократический, при 20 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК.

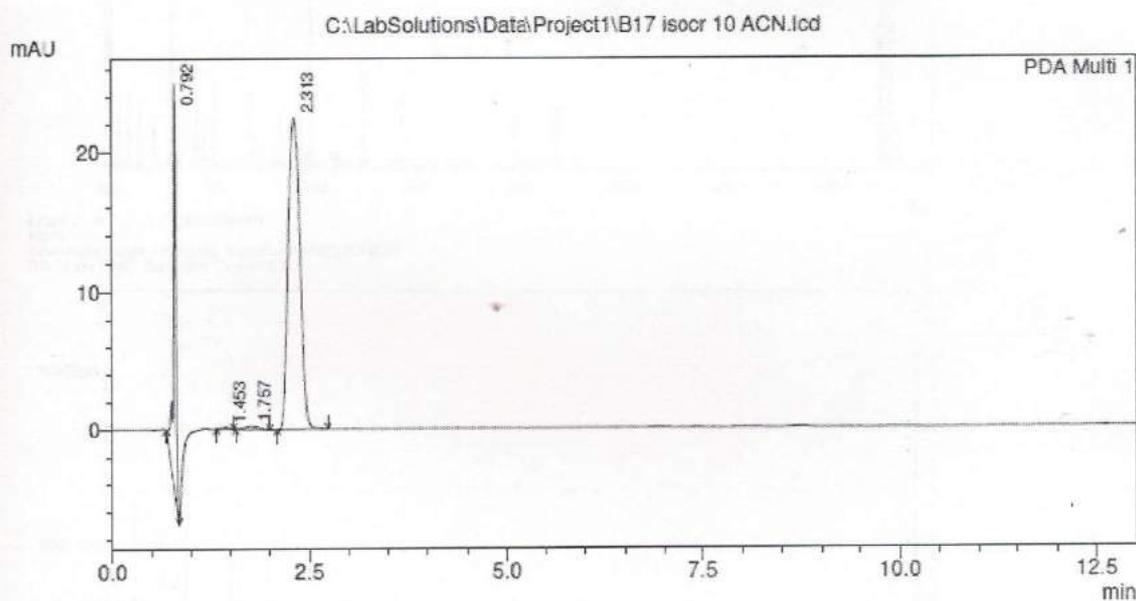


Рис. 16. Хроматограмма раствора амигдалина. Режим: изократический, при 10 % ацетонитрила с 0,05 % ТФУК в воде с 0,1 % ТФУК.

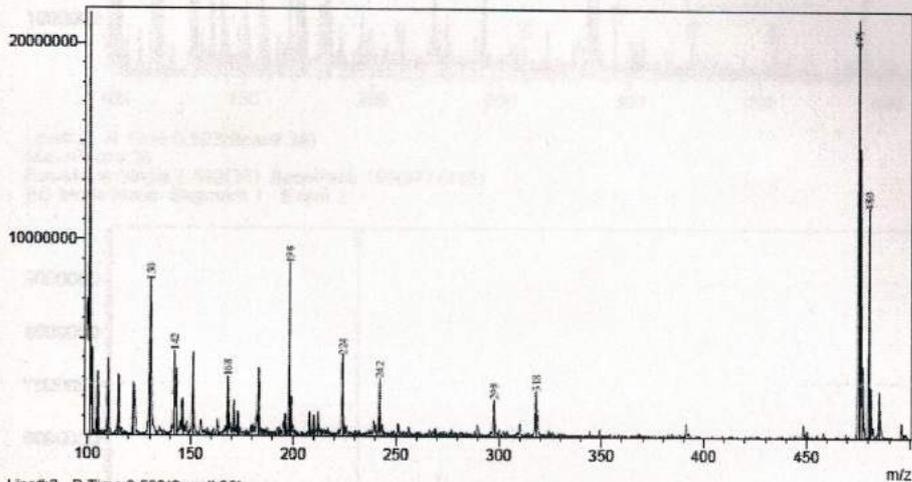
### 5.3.3. ВЭЖХ-МС

Условия проведения ВЭЖХ-МС описаны в п. 4.2.2.

Были проведены 5 анализов :

1. Анализ стандартного образца амигдалина - Q3 scan (Рис 17.)
2. Анализ Персина - Q3 scan
3. Анализ Персина - концентрация больше - Q3 scan (Рис 18.)
4. Анализ стандартного образца амигдалина - Product ion scan (Рис 19.)
5. Анализ Персина - Product ion scan (Рис 20.)

Line#:1 R.Time:0,575(Scan#:35)  
MassPeaks:31  
RawMode:Single 0,575(35) BasePeak:101(20000000)  
BG Mode:None Segment 1 - Event 1



Line#:2 R.Time:0,592(Scan#:36)  
MassPeaks:17  
RawMode:Single 0,592(36) BasePeak:492(2404909)  
BG Mode:None Segment 1 - Event 2

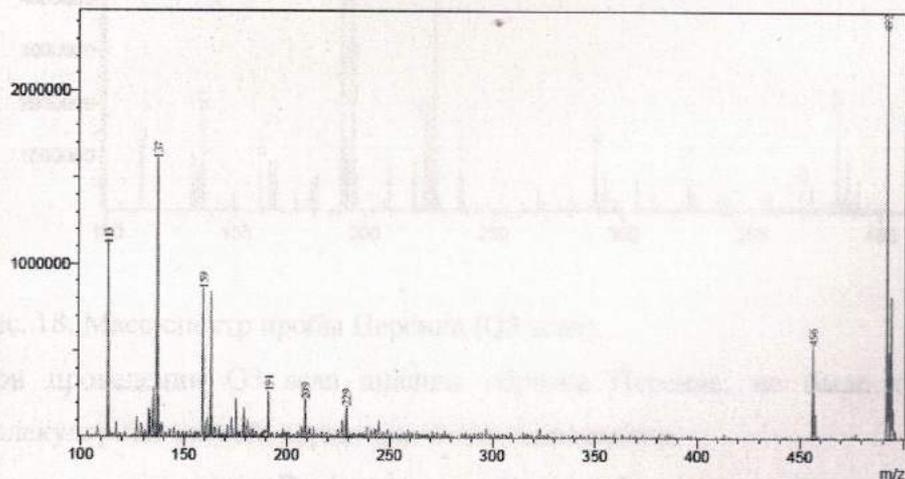
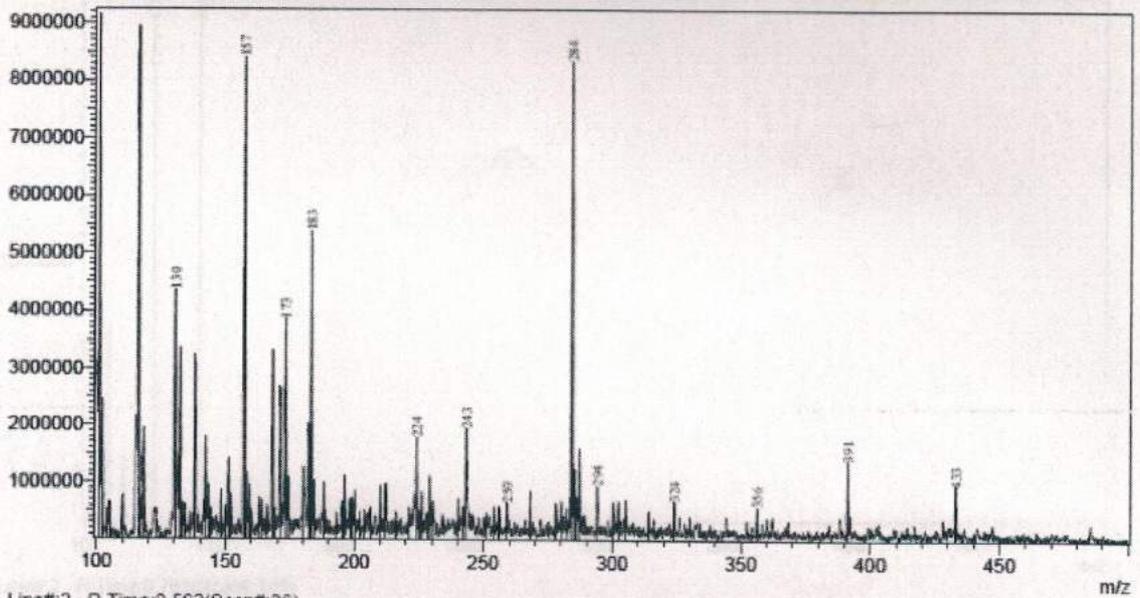


Рис. 17. Масс-спектр стандартного образца амигдалина (Q3 scan).

В спектрах присутствуют характерные для амигдалина ионы  $m/z$  475,2 и  $m/z$  456,2 (пик молекулярного иона) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/656516#section=Top>)

Line#:1 R.Time:0.575(Scan#:35)  
MassPeaks:82  
RawMode:Single 0.575(35) BasePeak:101(9153216)  
BG Mode:None Segment 1 - Event 1



Line#:2 R.Time:0.592(Scan#:36)  
MassPeaks:28  
RawMode:Single 0.592(36) BasePeak:195(9777415)  
BG Mode:None Segment 1 - Event 2

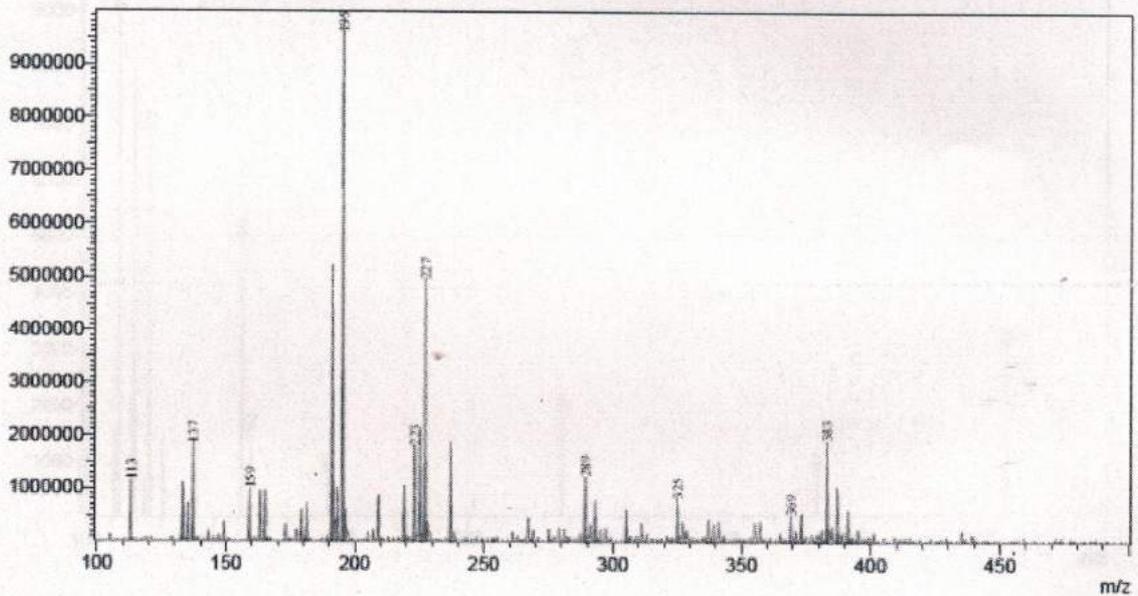
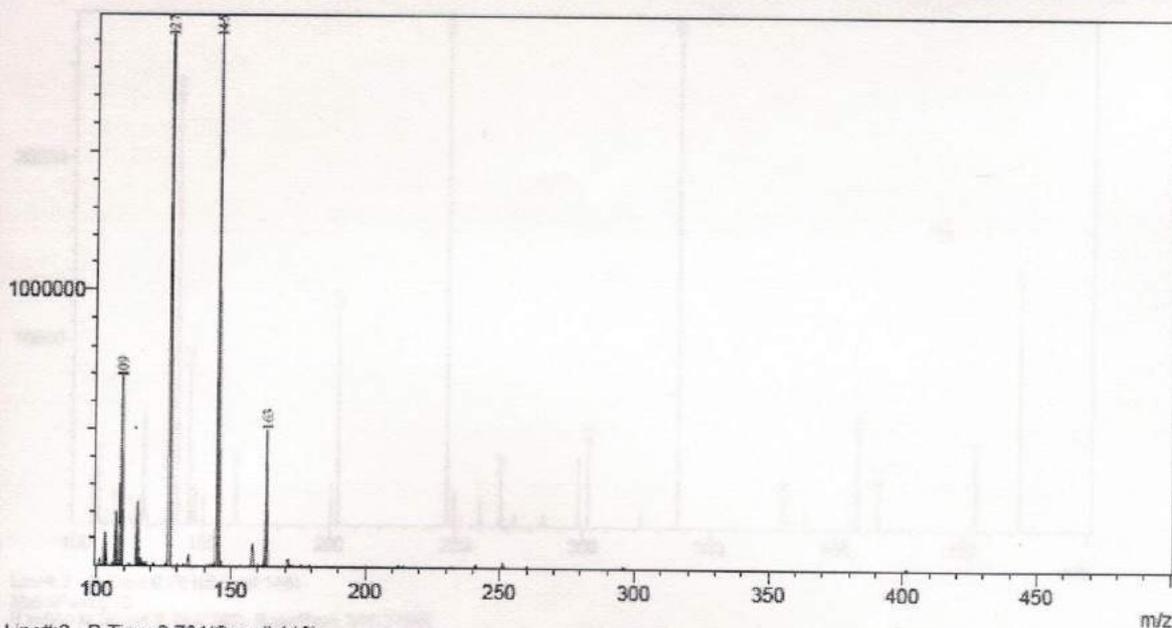


Рис. 18. Масс-спектр пробы Персина (Q3 scan)

При проведении Q3 scan анализа образца Персина, не было обнаружено ионов с молекулярной массой, характерной для Амигдалина.

Для анализа в режиме Product ion scan были выбраны ионы-прекурсоры: (+) 475.20 и (-) 456.20, характерные для амигдалина, однако присутствующие в масс-спектре пробы Персина на уровне шума.

Line#:1 R.Time:0,756(Scan#:145)  
 MassPeaks:7  
 RawMode:Single 0,756(145) BasePeak:145(1925072)  
 BG Mode:None Segment 1 - Event 1



Line#:2 R.Time:0,761(Scan#:146)  
 MassPeaks:19  
 RawMode:Single 0,761(146) BasePeak:113(9213)  
 BG Mode:None Segment 1 - Event 2

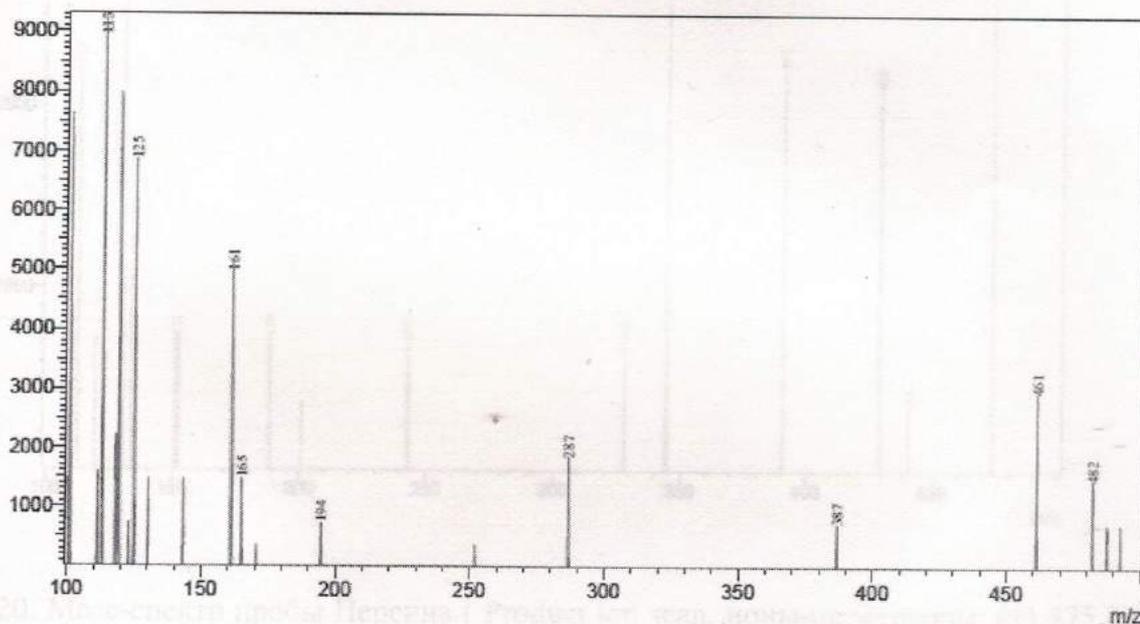
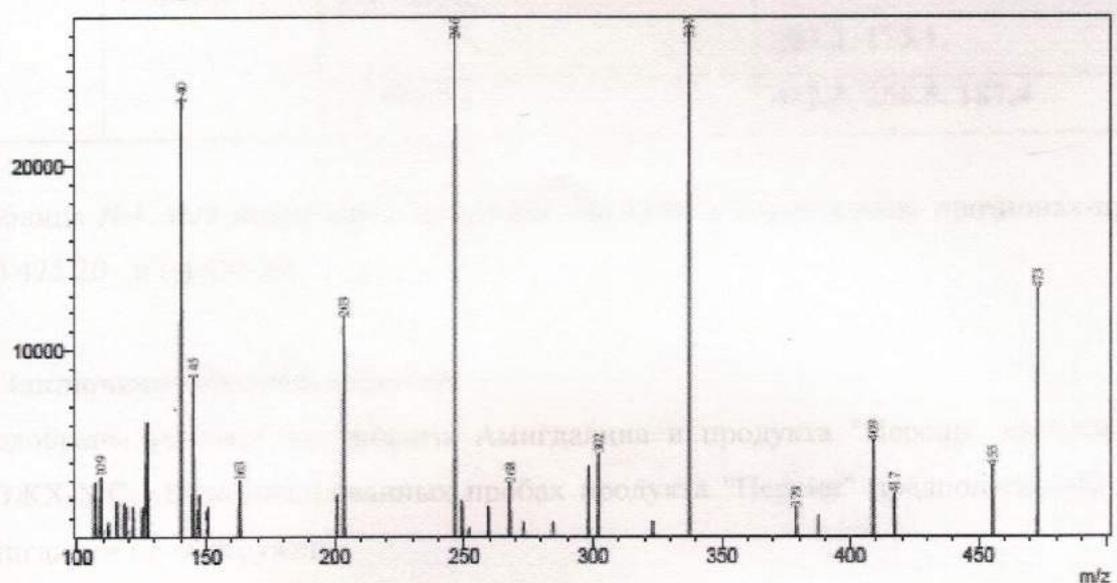


Рис. 19. Масс-спектр стандартного образца амигдалина (Product ion scan), ионы-прекурсоры: (+) 475.20 и (-) 456.20

№ п/п	Проба	Ион-прекурсор, m/z	Ион-продукт (ионы фрагментов), m/z
1	Амигдалин	(+) 475.20	163.1, 145.1, 137.1, 109.1
		(-) 456.20	482.0, 461.2, 386.6, 286.7, 194.5, 164.9, 161.1, 125.1, 119.2, 115.1

Line#1 R.Time:0,756(Scan#:145)  
 MassPeaks:27  
 RawMode:Single 0,756(145) BasePeak:246(27285)  
 BG Mode:None Segment 1 - Event 1



Line#2 R.Time:0,761(Scan#:146)  
 MassPeaks:15  
 RawMode:Single 0,761(146) BasePeak:345(2786)  
 BG Mode:None Segment 1 - Event 2

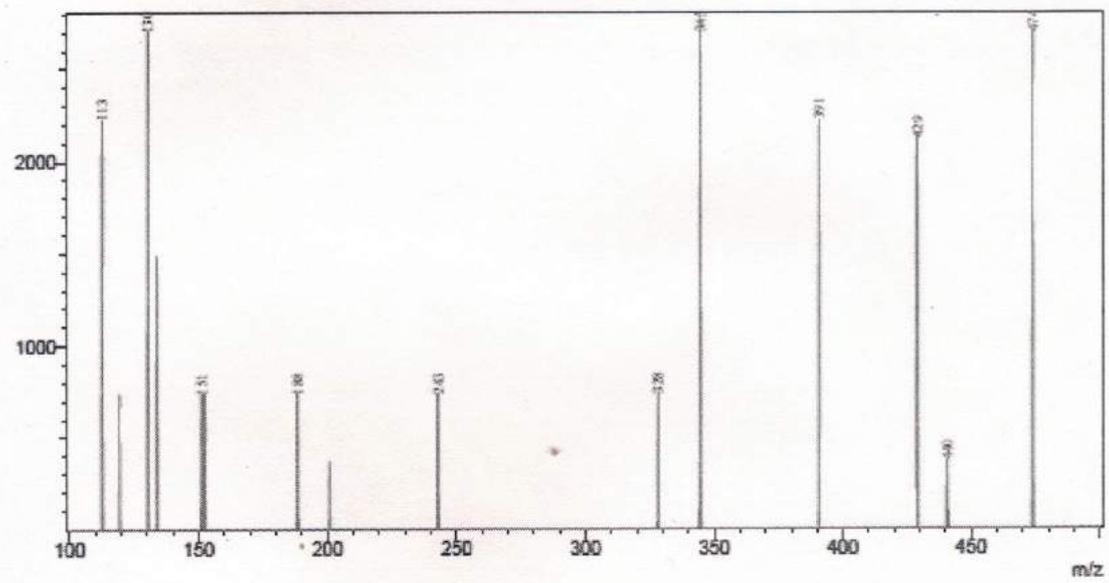


Рис. 20. Масс-спектр пробы Персина ( Product ion scan, ионы-прекурсоры: (+) 475.20 и (-) 456.20)

При изучении ионов фрагментов не было выявлено совпадений. Молекулярные массы приведены в таблице №4.

№ п/п	Проба	Ион-прекурсор, m/z	Ион-продукт (ионы фрагментов) , m/z
1	Амигдалин	(+) 475.20	163.1, 145.1, 127.1, 109.1
		(-) 456.20	482.0, 461.2, 386.6, 286.7, 194.5, 164.9, 161.2, 125.1, 119.2, 113.1,

			101.0.
2	Персин	(+) 475.20	450.4, 341.4, 307.9, 237.6, 218.2, 203.2, 175.1.
		(-) 456.20	412.2, 256.5, 187.4

Таблица №4. m/z ионов-продуктов проб Персина и Амигдалина, при ионах-прекурсорах (+) 475.20 и (-) 456.20

#### 6. Заключение по исследованию

Подобраны условия для анализа Амигдалина и продукта "Персин" методом ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС. В анализированных пробах продукта "Персин" предполагаемый компонент амигдалин не обнаружен.