

УДК 581.192: 577.13:582.71:543.544.5

Н.Ю. Колбас, В.Н. Решетников

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТОЦИАНОВОГО КОМПЛЕКСА ВОДНО-ЭТАНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ПЛОДОВ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *RUBUS*

В статье представлены результаты ВЭЖХ-МС анализа антоцианов водно-этанольных экстрактов плодов четырех представителей рода *Rubus* L.: *R. caesius* L., *R. fruticosus* L., *R. nessensis* W. Hall и *R. idaeus* L. Всего идентифицировано 17 различных антоцианов, агликоны которых представлены пятью антоцианидинами: цианидином, пеларгонидином, петунидином, дельфинидином и мальвидином; углеводная составляющая – арабинозой, галактозой, глюкозой, софорозой, рутинозой и самбубиозой; ацильные компоненты – остатками *p*-кумаровой, кофейной, малоновой и щавелевой кислот. Доминирующими компонентами являются соединения цианидина, чья доля составляет 94–97 % от всех антоцианов. Общее содержание антоцианов варьировало от 0,2530 до 1,257 в пересчете на мг Цианидин-глюкозида, содержащегося в мл водно-этанольного экстракта. Показана эффективность способа двухступенчатой водно-этанольной экстракции при извлечении антоцианов сочных плодов. Предложено использовать данные экстракты в качестве биологически активных добавок поливалентного действия.

Введение

В последние десятилетия активно изучается роль растительных полифенолов в профилактике и лечении многих заболеваний человека. Одними из представителей этих соединений являются антоцианы – водорастворимые гликозиды полигидроксиполиметоксипроизводных 2-фенилбензопироилиума или флавилиума [1, с. 150]. В настоящее время установлено, что антоцианы обладают антиканцерогенным действием, улучшают состояние соединительных тканей, предотвращают возникновение хрупкости капилляров, уменьшают риск развития сердечно-сосудистых заболеваний [2, с. 98], сахарного диабета [3, с. 201] и проявляют антиоксидантную активность [4, с. 630]. Кроме того, терапевтический эффект антоцианов заключается в профилактике и лечении таких нарушений зрения, как миопия средней и высокой степени, приобретенная гемералопия, диабетическая ретинопатия, мышечная астенопия, некоторые типы деградации сетчатки, катаракта, глаукома. Также эти вещества уменьшают время адаптации к темноте, причем как при ночном, так и при сумеречном зрении [3, с. 204].

Использование в медицине лекарственных средств растительного происхождения имеет ряд преимуществ перед их синтетическими аналогами. Экологическая безопасность растений обеспечивает возможность длительного и безвредного их применения. Эволюционно сложившееся родство между физиологически активными соединениями организма человека и биологически активными веществами (БАВ) растений, обуславливают эффективное комплексное и разностороннее действие фитопрепаратов, а также незначительные побочные эффекты при их применении. Например, свежие плоды ежевики и малины и настои из них обладают жаропонижающим, противовоспалительным, антидиабетическим, антианемическим, успокаивающим и общеукрепляющим действием. Плоды малины входят в состав витаминных и противокашлевых сборов [5, с. 133, с. 191]. В предыдущих исследованиях нами выявлен высокий антиоксидантный потенциал водно-этанольных экстрактов плодов этих растений [6].

Растительный организм содержит сложный комплекс БАВ, поэтому детальное изучение его биохимического состава позволит создавать из различных частей растений фитопрепараты поливалентного действия. Цель данной работы – исследование антоцианового комплекса водно-этанольных экстрактов плодов четырех представителей

рода *Rubus* L.: *Rubus caesius* L., *Rubus fruticosus* L., *Rubus nessensis* W. Hall и *Rubus idaeus* L. В соответствии с поставленной целью нами были сформулированы следующие задачи:

- 1) установить компонентный состав антоцианового комплекса водно-этанольных экстрактов плодов изучаемых видов;
- 2) определить содержание каждого антоциана и общее их количество в полученных экстрактах;
- 3) на основании ранее полученных результатов вычислить степень извлечения антоцианов при двухступенчатой водно-спиртовой экстракции.

Материалы и методы исследования

Представители рода *Rubus* были идентифицированы согласно определителю [7, с. 143–163]. Свежесобранные плоды подвергали глубокой заморозке при температуре -40°C , затем сушили сублимацией без доступа света и измельчали до частиц диаметром 1 мм. БАВ извлекали двухступенчатой экстракцией 50 %-ным этанолом согласно рекомендациям [8] с применением экстрактора ASE-350 («Dionex Corp.», США). Каждый этап экстракции проводили в инертной атмосфере азота, в течении 10 минут, при температуре $+22^{\circ}\text{C}$ и максимальном давлении 1 500–1 700 psi. Для исследования антоцианов анализировали сухие остатки полученных экстрактов. Для этого этанол из аликвотной доли экстракта отгоняли с помощью роторного испарителя LABOROTA 4 002 control («Heidolph», Германия) под вакуумом и при температуре $+30^{\circ}\text{C}$, затем полученные остатки сушили сублимацией без доступа света и далее анализировали.

Качественный и количественный анализ антоцианов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективной детекцией (ВЭЖХ-МС), используя систему сепарации и анализа Accela High Speed LC («Thermo Fisher Scientific», США). Разделение компонентов осуществляли на хроматографической колонке с обращенной фазой C18 Hypersil Gold (50×2,1 мм; размер частиц силикагеля 1,9 мкм; «Thermo Fisher Scientific», США). Элюирование вели при температуре $+40^{\circ}\text{C}$ и фиксированной пропускной способности 0,3 мл в минуту, при этом объем инъекционного образца составил 20 мкл. В качестве мобильной фазы *A* применяли водный раствор муравьиной кислоты (0,1 % раствор – для качественного и 5 % – для количественного анализа антоцианов). *B* – мобильной фазой служил 5 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле со следующим градиентом элюирования: 30 % *B*, 0–10 минут; 30–100 % *B*, 10–11 минут; 100 % *B*, 11–13 минут; 100–0% *B*, 13–14 минут; стабилизация системы в течение 4 минут. Длина волны детектирования составила 520 нм.

Для идентификации антоцианов использовали тандем ВЭЖХ и масс-спектрометрии MSQ Plus («Thermo Fisher Scientific», США). Пробы анализировались при полном сканировании МС-зависимых данных для модели положительно заряженного иона с соотношением молекулярная масса к заряду (m/z) от 100 до 1 000. Программное обеспечение ВЭЖХ-МС анализа – Xcalibur software («Thermo Fisher Corp.», США). Концентрацию каждого антоциана и общее их содержание определяли в пересчете на мг Цианидин-глюкозида, содержащегося в 1 мл водно-этанольного экстракта (мг Ци-гл/мл). Все опыты проводили в трехкратной повторности. Для статистической обработки полученных данных применяли программу R software version 2.9.2.

Результаты и их обсуждение

Использование ВЭЖХ-МС анализа позволило эффективно разделить и идентифицировать компоненты антоцианового комплекса водно-этанольных экстрактов плодов четырех представителей рода *Rubus* и детально проанализировать их количественный состав. Строение агликона, тип и количество сахаров, положение гликозидной свя-

зи, а так же наличие алифатических и ароматических кислот в составе молекулы – отличительные признаки отдельных антоцианов [1, с. 150]. Всего было детектировано и идентифицировано 17 различных антоцианов (таблица 1), агликоны которых представлены пятью антоцианидинами: цианидином, пеларгонидином, петунидином, дельфинидином и мальвидином. Углеводной составляющей изученных антоцианов являются как моносахариды, такие как арабиноза, галактоза и глюкоза, так и дисахариды: софороза, рутиноза и самбубиоза. В качестве ацильных компонентов встречаются остатки *p*-кумаровой, кофейной, малоновой и щавелевой кислот. Хроматограммы водно-этанольных экстрактов плодов *R. caesius* представлены 12 пиками (рисунок 1А), плодов *R. fruticosus* – 9 (рисунок 1В), хроматограммы плодов *R. nessesis* (рисунок 1С) и *R. idaeus* (рисунок 1-Д) имеют по 8 пиков антоцианов.

Таблица 1 – Идентификация антоцианов, детектированных методом ВЭЖХ-МС в водно-этанольных экстрактах плодов четырех представителей рода *Rubus*

№ пика	RT, мин	m/z		антоциан	
		[M ⁺]	фрагменты	название	аббревиатура
1	4,4	287		Цианидин	Ци
2	4,8	611	287	Цианидин 3- <i>O</i> -софорозид	Ци-3-соф
3	4,95	449	287	Цианидин 3- <i>O</i> -галактозид	Ци-3-гал
4	5,05	449	287	Цианидин 3- <i>O</i> -глюкозид	Ци-3-гл
5	5,2	741	271	Пеларгонидин 3- <i>O</i> -глюкозил-рутинозид	Пг-3-гл-рут
6	5,3	595	287/449	Цианидин 3- <i>O</i> -рутинозид	Ци-3-рут
7	5,4	581	287	Цианидин 3- <i>O</i> -самбубиозид	Ци-3-сам
8	5,5	595	287/449	Цианидин 3- <i>O</i> -(6"- <i>p</i> -кумароил-глюкозид)	Ци-3-(6"- <i>p</i> -кум-гл)
9	5,6	449	317	Петунидин 3- <i>O</i> -арабинозид	Пт-3-ар
10	5,7	597	303	Дельфинидин-3- <i>O</i> -самбубиозид	Дф-3-сам
11	5,75	493	331	Мальвидин 3- <i>O</i> -галактозид	Мв-3-гал
12	5,9	611	287	Цианидин 3- <i>O</i> -кофеил-глюкозид	Ци-3-(6"-коф-гл)
13	5,95	419	287	Цианидин 3- <i>O</i> -арабинозид	Ци-3-ар
14	6,2	535	287/449	Цианидин 3- <i>O</i> -(6"-малонил-глюкозид)	Ци-3-(6"-мал-гл)
15	6,5	594	303	Дельфинидин 3- <i>O</i> -(6"-диоксалил-глюкозид)	Дф-3-(6"-диокс-гл)
16	6,7	593	287	Цианидин 3- <i>O</i> -(6"-диоксалил-глюкозид)	Ци-3-(6"-диокс-гл)
17	6,9	479	317	Петунидин 3- <i>O</i> -галактозид	Пт-3-гал

Примечание – RT – время удержания; m/z – отношение молекулярной массы к заряду, [M⁺] – молекулярная масса положительного иона антоциана (а.е.м.)

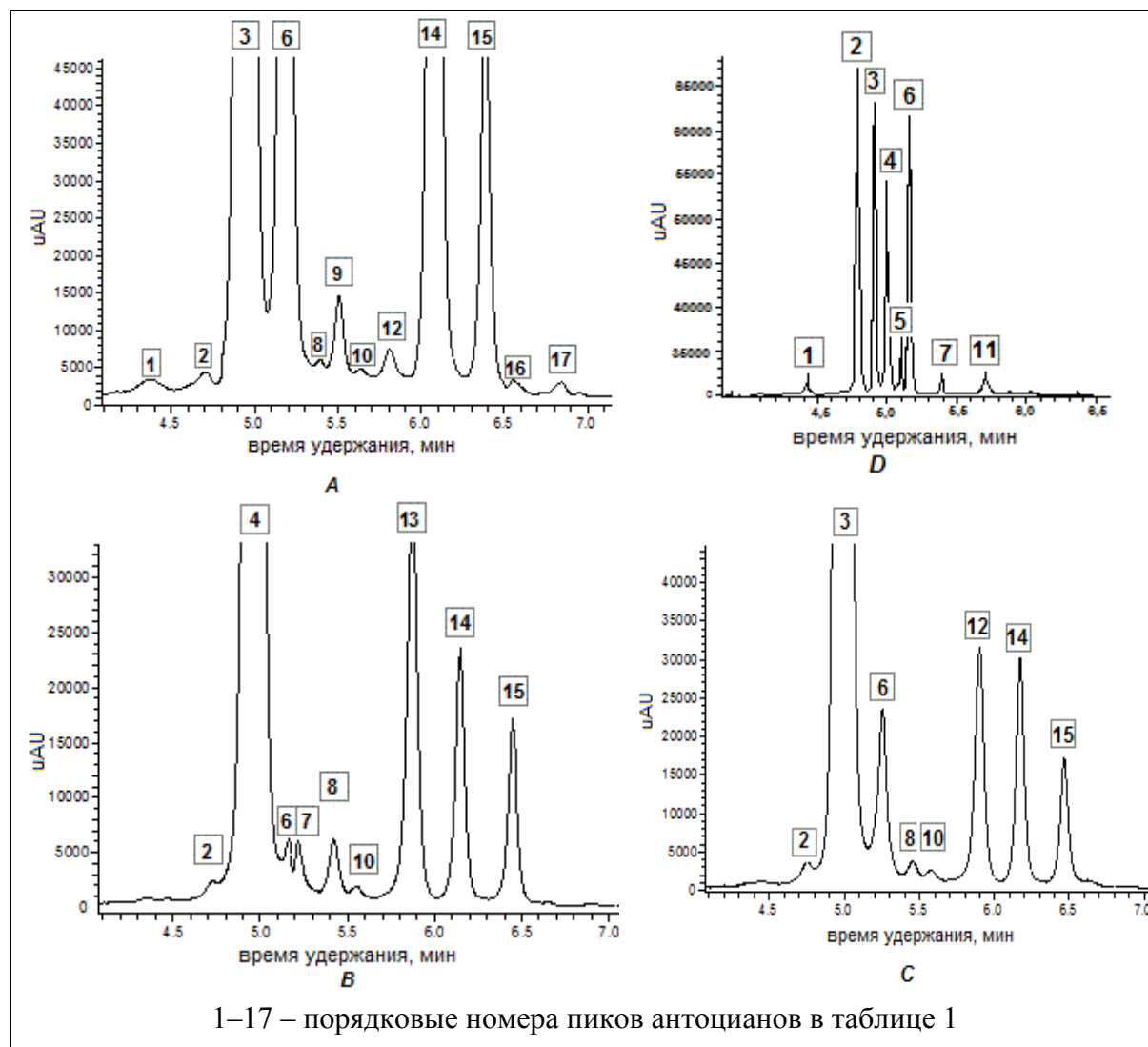


Рисунок 1 – Хроматограммы антоцианов водно-этанольных экстрактов плодов четырех представителей рода *Rubus*: A – *R. caesius*; B – *R. fruticosus*; C – *R. nessensis*; D – *R. idaeus*

Отмечена видовая специфичность компонентного состава антоцианов: цианидин содержится в водно-этанольных экстрактах плодов четырех изученных нами видов, дельфинидин встречается в темноплодных видах, петунидин – только в плодах *R. caesius*, а пеларгонидин и мальвидин идентифицированы в плодах *R. idaeus*.

Количественный состав антоцианов водно-этанольных экстрактов плодов каждого из изученных видов включает основные и второстепенные компоненты (таблица 2). Цианидин 3-*O*-галактозид является доминирующим антоцианом экстрактов плодов *R. caesius* и *R. nessensis*, его содержание составило соответственно 56,53 и 87,38 % от суммы площадей всех зарегистрированных пиков хроматограммы при длине волны 520 нм. Для водно-этанольных экстрактов плодов *R. caesius* характерны еще два ведущих антоциана: Цианидин 3-*O*-рутинозид и Цианидин 3-*O*-(6"-малонил-глюкозид), чье относительное содержание составило 16,84 и 18,81 % соответственно. Цианидин 3-*O*-глюкозид – преобладающий антоциан (86,05 %) водно-этанольных экстрактов плодов *R. fruticosus*. Среди 8 антоцианов, идентифицированных в плодах *R. idaeus*, четыре являются доминирующими: Цианидин 3-*O*-софорозид, Цианидин 3-*O*-галактозид, Циани-

дин 3-*O*-глюкозид и Цианидин 3-*O*-рутинозид, в целом отличия площадей этих пиков не значительны и составляют от 19,85 до 27,91 %.

При производстве фитопрепаратов и биологически активных добавок улучшающих зрение чаще используют экстракты плодов черники и черной смородины. При исследовании антоцианов плодов черной смородины Н. Matsumoto с соавторами [9] установлено, что Цианидин 3-*O*-глюкозид и Цианидин 3-*O*-рутинозид способствуют регенерации родопсина в сетчатке лягушки, следовательно, улучшают чувствительность сетчатки к различным уровням светового излучения, усиливают остроту зрения при низкой освещенности и снижают утомляемость глаз. При этом наибольшей активностью отличался Цианидин 3-*O*-рутинозид. Соединения дельфинидина не воздействовали на восстановление родопсина. По мнению авторов [9] именно особенности качественного и количественного состава антоцианов плодов черной смородины обуславливают их влияние на сумеречное зрение. В составе плодов черной смородины выявлено в среднем 7 антоцианов [10; 11, с. 7851], при этом более 62 % – это соединения дельфинидина, более 36 % приходится на соединения цианидина, более 1 % – на соединения петунидина и около 0,35 % представлено соединениями пеонидина. Литературные сведения о положительном влиянии плодов черники на синтез родопсина нами не найдены. Анализ литературных данных [12, с. 9823; 13, с. 504] качественного и количественного состава антоцианов этих плодов показал, что около 36 % приходится на соединения дельфинидина, примерно по 25 % – на соединения мальвидина и петунидина, 7,68 % – на соединения пеонидина и лишь 6,8 % – на соединения цианидина. В исследованных нами водно-этанольных экстрактах плодов четырех представителей рода *Rubus* 94–97 % антоцианов составляют соединения цианидина.

Общее количество антоцианов плодов исследуемых растений варьировало от 0,2530 до 1,257 мг Ци-гл/мл водно-этанольного экстракта (таблица 2). Изученные растения можно распределить в порядке уменьшения общего содержания антоцианов водно-этанольных экстрактов их плодов следующим образом:

R. caesius > *R. nessensis* > *R. fruticosus* > *R. idaeus*.

В соответствии с «Нормами физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения РФ» [14, с. 28] суточная потребность в биофлавоноидах для взрослого человека составляет 250 мг, для детей от 7 до 18 лет – 150–250 мг. 10 % от суточной дозы биофлавоноидов должно приходиться на антоцианы. Таким образом, прием 10 мл водно-этанольных экстрактов темноплодных видов *Rubus* в сутки может обеспечить организм человека в антоцианах, а употребление такого же объема экстракта плодов *R. idaeus* составит примерно 20 % от суточной дозы.

Для определения эффективности использованной нами двухступенчатой водно-спиртовой экстракции БАВ мы сопоставили результаты данного исследования с полученными нами ранее сведениями о качественном и количественном составе антоцианов плодов тех же представителей рода *Rubus* [15]. Нами установлена 100 %-ная идентичность между компонентным составом антоцианового комплекса плодов и их водно-этанольных экстрактов для каждого из изученных видов. Степень извлечения антоциана рассчитывали как процентное содержание данного компонента в пересчете на 1 мл водно-этанольного экстракта от его содержания в плодах (таблица 2). При двухступенчатой водно-спиртовой экстракции степень извлечения всего количества антоцианов составила 68,9–74,1 % для темноплодных видов рода *Rubus* и 98,8 % – для плодов *R. idaeus*.

Заключение

В результате проведенного ВЭЖХ-МС анализа получены оригинальные данные о компонентном составе антоцианового комплекса водно-этанольных экстрактов плодов четырех представителей рода *Rubus*: *R. caesius*, *R. nessensis*, *R. fruticosus* и *R. idaeus*.

Использованный способ двухступенчатой водно-спиртовой экстракции показал достаточно высокую эффективность при извлечении антоцианов из такого растительного сырья, как сочные плоды. Полученные результаты о высоком содержании соединений цианидина дают основу для последующих клинических испытаний способности водно-этанольных экстрактов изученных плодов воздействовать на регенерацию родопсина, а также предотвращать возникновение и развитие некоторых нарушений зрения. Имеющиеся сведения о терапевтических свойствах, антиоксидантной активности и полученные данные о достаточно высоком содержании антоцианов позволят в перспективе применять водно-этанольные экстракты плодов изученных растений как биологически активные добавки поливалентного действия.

Авторы выражают благодарность за предоставление оборудования и помощь при проведении анализа методом ВЭЖХ директору лаборатории прикладной химии института «Изучения Винограда и Вина»(г. Бордо, Франция) профессору, доктору П.-Л. Тэссэдру и аспиранту этой же лаборатории М.-А. Монтейро де Араужо Сильве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mazza, G. In Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains / G. Mazza, E. Miniati. – CRC Press : Boca Raton – 1993. – P. 149–199.
2. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National health and nutrition examination survey epidemiologic follow-up study / L. Bazzano [et al] // Am. J. Clinical. Nutr. – 2002. – Vol. 76. – P. 93–99.
3. Ghosh, D. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function (Review Article) / D. Ghosh, T. Konishi // Asia Pac. J. Clin. Nutr. – 2007. – Vol. 16, № 2. – P. 200–208.
4. Kähkönen, M.P. Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons / M.P. Kähkönen, M.J. Heinonen // J. Agric. Food Chem. – 2003. – Vol. 51, № 3. – P. 628–633.
5. Лекарственные растения. Энциклопедия / Сост. И.Н. Путырский, В.Н. Прохоров. – Минск : Книжный Дом, 2005. – 656 с.
6. Колбас, Н.Ю. Научно-исследовательская работа студентов по определению антирадикальной активности растительных экстрактов / Н.Ю. Колбас // сб. стат. Рег. науч.-методич. конф. «Новое в методике преподавания химических и экологических дисциплин», 27 ноября 2009 г., каф. химии, УО БрГУ им. А.С. Пушкина. – Брест : БрГТУ. – 2009. – С. 50–53.
7. Определитель высших растений Беларуси / Под ред. В.И. Парфенова. – Минск : Дизайн ПРО, 1999. – 472 с.
8. Настои и композиции водно-спиртовые из растительного сырья. Общие технические условия: СТБ 924-2008. – Введен 01.12.2008. – Минск : Государственный комитет по стандартизации Республики Беларусь, 2008. – 16 с.
9. Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin / H. Matsumoto [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2003. – Vol. 51, № 26. – P. 3560–3563.
10. Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities / M.P. Kähkönen [et al] // J. Sci. Food Agric. – 2003. – Vol. 83. – P. 1403–1411.
11. Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity / X. Wu [et al] // J. Agric. Food Chem. – 2004. – Vol. 52, № 26. – P. 7846–7856.
12. Anthocyanins in Selected Native Australian Fruits / M. Netzel [et al] // J. Agric. Food Chem. – 2006. – Vol. 54, № 26. – P. 9820–9826.

13. Zheng, W. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries / W. Zheng, Sh.Y. Wang // J. Agric. Food Chem. – 2003. – Vol. 51, № 2. – P. 502–509.

14. Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации. Рациональное питание. Методические рекомендации: МР 2.3.1.2432 -08. – Введ. 18.12.2008. – 39 с.

15. Kolbas, N. Anthocyanins and antioxidant capacity of blackberry / N. Kolbas, M. Monteiro de Araujo Silva, P.-L. Teissedre // International Conference «Renewable Wood and Plant Resources: Chemistry, Technology, Medicine», 21–24 June 2011, Saint-Petersburg, Russia. – P. 92.

N.Y. Kolbas, V.N. Reshetnikov. Characteristic of Anthocyanin Complex of Water-Ethanol Extracts of Fruits of Certain Representatives of Genus *Rubus*

This study is focused on identification of anthocyanins, estimation of their total content in water-ethanol extracts of fruits blackberry (*R. fruticosus*, *R. caesius* and *R. nessensis*) and raspberry (*R. idaeus*). A total of 17 anthocyanins were detected and identified by HPLC-MS analysis. The aglycon forms were represented by five anthocyanidins: cyanidin, delphinidin, pelargonidin, petunidin and malvidin. The prevalent sugar moieties were glucose, galactose, arabinose, rutinose, sophorose and sambubiose. The acyl components were *p*-coumaric, caffeic, malic and oxalic acids. Compounds of cyanidin were dominant components (94-97% of all anthocyanins). Total anthocyanins content ranged (in mg Cyanidin-glucoside per ml) from 0.2530 to 1.257. The two-way water-ethanol extraction for the extraction of anthocyanins from the berries was used and was effective. It was proposed to use the given extracts as biologically active additives of polyvalent action.

Рукапіс паступіў у рэдкалегію 01.09. 2011 г.