

УДК 543.54:547.973

АНТОЦИАНЫ ПЛОДОВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА *RUBUS* L. ИЗ КОЛЛЕКЦИИ БОТАНИЧЕСКОГО САДА БЕЛГУ

В.Н. Сорокопудов, В.И. Дейнека, И.П. Лукина, Л.А. Дейнека*

*Белгородский государственный университет, ул. Победы, 85, Белгород,
308015 (Россия) E-mail: sorokopudov@bsu.edu.ru*

В работе спектрофотометрическим методом исследовано накопление антоцианов в плодах методом ряда сортов *Rubus idaeus* L. (I): 9÷71 мг на 100 г ягод в пересчете на цианидина-3-глюкозид, сорта Кумберленд *R. occidentalis* (II): 203 мг на 100 г ягод, и четырех сортов ежевики (III) (53÷182 мг на 100 г ягод). Методом обращенно-фазовой ВЭЖХ исследован антоциановый комплекс плодов. Установлено, что в плодах (I) содержится комплекс в основном четырех производных цианидина: цианидина-3-глюкозида, цианидина-3-рутинозида, цианидина-3-рутинозида и цианидина-3-глюкозилрутинозида с различным соотношением индивидуальных компонентов. При этом по предложенной в работе схеме сорта (I) можно различать по вкладам глюкозидных и рутинозидных производных. В исследованных плодах (III) практически единственным антоцианом является цианидина-3-рутинозид.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Развитие научного потенциала высшей школы» (грант № 671).

Введение

При разработке хроматографического метода для исследования антоцианового комплекса растительных объектов (с применением относительного анализа удерживания [1–3]) нами было использовано сопоставление экспериментально полученных хроматограмм с приведенными в литературе, поскольку стандартные образцы антоцианов немногочисленны и труднодоступны. При исследовании антоцианов нескольких сортов малины красной (*Rubus idaeus* L.) было установлено [1], что основной антоциан, отвечающий за окраску плодов, – цианидина-3-софорозид (Cy-3-Sopho), что соответствовало данным [4]. В работе [5] Cy-3-Sopho был определен в качестве основного антоциана плодов трех из четырех исследованных сортов малины, в то время как в плодах сорта «Autumn Bliss» основным компонентом оказался цианидина-3-рутинозид (Cy-3-Rut). В этих исследованиях [4–5] второй по значению антоциан – цианидина-3-глюкозид (Cy-3-Glu). Эти же два производные цианидина (3-глюкозид и 3-рутинозид) найдены и в плодах других видов малины: *R. pinnatus* Willd. и *R. rigidus* Sm. [6]. Однако в работе [7] сообщается об обнаружении в плодах малины красной наряду с Cy-3-Glu другого антоциана – 3,5-диглюкозида цианидина (Cy-3,5-diGlu). К такому выводу авторы пришли на основании масс-спектрометрических данных, но такой метод (без анализа фрагментации) не позволяет различать Cy-3-Sopho и Cy-3,5-diGlu, содержащих по два радикала глюкозы в молекулах. Существенно более продуктивен в данном случае анализ продуктов частичного гидролиза, приводящий только к Cy-3-Glu в случае софорозида и двум моноглюкозидам цианидина (в случае указанного 3,5-диглюкозида): 3-Glu и 5-Glu, легко различаемых по хроматографическому поведению [8]. В целом цианидиновая основа пигментов малины может быть использована для установления фальсификации продуктов на ее основе [9]. Цианидиновая основа сохраняется и в случае черноплодных видов малины, накапливающих в несколько раз больше пигментов по сравнению с малиной красной, но среди пигментов кроме глюкозида и рутинозида появляются 3-ксилозид цианидина (Cy-3-Xyl) [10], 3-самбубиозид (Cy-3-Sam) и 3-ксилозилрутинозид (Cy-3-^{2Xyl}Rut) (*R. occidentalis* [11, 12]). В плодах *R. ursinus* × *idaeus* обнаружен еще один

* Автор, с которым следует вести переписку.

антоциан – глюкозилрутинозид (Cy-3-^{2Glu}Rut) [11]. В работе [13] установлено, что этот антоциан входит в комплекс пигментов, определяющих цвет красной малины. Присутствие ксилозил-производных цианидина в плодах черноплодной малины, выращенной в условиях Белгорода, было установлено в [14].

Цель данной работы – исследование антоцианов плодов различных сортов малины и ежевики из коллекции ботанического сада БелГУ.

Экспериментальная часть

Образцы плодов собирали в июле – августе 2005 г. в ботаническом саду БелГУ. Плоды ежевики предоставлены агрофирмой «Росток» (Волоконовский р-н Белгородской области). Экстракцию антоцианов выполняли несколько кратным настаиванием материала в растворах муравьиной кислоты (10 об.%).

Количественное определение антоцианов выполняли спектрофотометрическим методом [15]. Определение качественного состава антоцианов в экстрактах выполняли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. В работе использовали колонку 250×4 мм (сорбент – Сепарон SGX C18) в элюентах системы ацетонитрил – муравьиная кислота – вода. Детектирование (LCD 2563) осуществляли с использованием светофильтра 546 нм.

Обсуждение результатов

В таблице 1 приведены результаты количественного определения суммы антоцианов в пересчете на Cy-3-Glu, полученные спектрофотометрическим методом. Содержание антоцианов в сортах красной малины и в плодах одного и того же сорта в процессе онтогенеза различается достаточно существенно, что отражает зависимость накопления этих пигментов от степени созревания, но в целом диапазон 10–50 мг на 100 г плодов соответствует литературным данным. Достаточно велик диапазон содержания антоцианов в плодах четырех сортов ежевики: от 50 до 180 мг представленный практически в единственном числе Cy-3Glu, и, наконец, наиболее богаты антоцианами плоды черной малины.

В работе [14] при исследовании плодов черной малины было установлено, что антоциановый комплекс плодов этого растения образован Cy-3-Glu, Cy-3-Sopho, Cy-3-Rut, Cy-3-^{2Glu}Rut, Cy-3-Sam и Cy-3-^{2Xyl}Rut. В настоящем исследовании плодов черной малины сорта «Кумберленд», выращенной в ботаническом саду БелГУ, кроме 3-глюкозида и 3-рутинозида цианидина найдены только ксилозил-производные (более 70% на сумму Cy-3-Sam и Cy-3-^{2Xyl}Rut) из представленного выше набора. Возможно, причина этого различия – в происхождении изученных сортов.

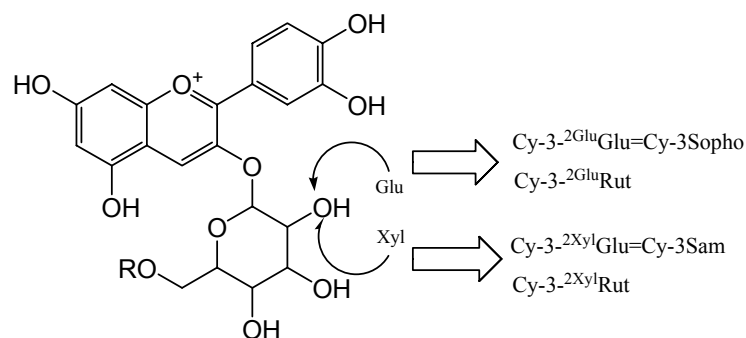
Исследование антоцианового состава плодов черной малины в динамике предполагается провести в дальнейшей работе. Дело в том, что при исследовании антоцианового состава плодов любительского сорта красной смородины было установлено, что основной антоциан комплекса – Cy-3-^{2Xyl}Rut при полном отсутствии Cy-3-^{2Glu}Rut [1]. При более детальном исследовании, выполненном в 2004 г. с использованием плодов того же растения, аналогичный компонентный состав антоцианов (78–80 моль. % Cy-3-^{2Xyl}Rut от суммы антоцианов, на долю Cy-3-Rut при этом приходилось 10–17%) получен в случае ягод, собранных в июле. Но в ягодах, оставленных на кусте до заморозков, обнаружено значительное накопление Cy-3-^{2Glu}Rut (до 32 моль % при доле, приходящейся на Cy-3-^{2Xyl}Rut, 56 моль % и около 9% – на Cy-3-Rut).

Таблица 1. Содержание антоцианов в плодах некоторых растений рода *Rubus* L.

Сорт	* мг на 100 г плодов	Сорт	* мг на 100 г плодов	Сорт	* мг на 100 г плодов
<i>Rubus idaeus</i> L.					
Бабье лето	9	Метеор	46	Пересвет	25
	19		32	Скромница	50
	20		32	Солнышко	13
Бальзам	25	Вольница	20		42
Барнаульская	19		15	Спутница	30
Богатырь	33	Журавлик	71	Харитейдж	20
Бригантина	29	Мираж	20		31
Геракл	12	Патриция	39	Шотландская	13
Ежевика				<i>R. occidentalis</i>	
Торнфри	102	Блейк сатин	95	Кумберленд	203
Гималайская	182	Краснодарская	53		

*В пересчете на цианидина-3-глюкозид.

В цепи метаболизма флавоноидов антоцианы образуются из антоцианидинов под действием соответствующих ферментов [16]. Следует обратить внимание на следующие возможные варианты дальнейших превращений антоцианов. 3-Софорозид и 3-самбубиозид цианидина можно рассматривать как продукты присоединения в 2-положение глюкозного фрагмента цианидин-3-гликозида глюкозы и ксилозы, соответственно (R = H):



Вероятно, те же ферменты могут приводить к образованию аналогичных производных рутинозидов (R = Rha).

Такое предположение объясняет полученные в данной работе результаты (табл. 2). Если в плодах малины красной активна только глюкозилтрансфераза, то при основном «стартовом» антоциане Cy-3-Glu доминирующим метаболитом должен быть Cy-3-Sopho (см. антоциановый состав первых двух сортов в табл. 2). Если в плодах происходит биосинтез Cy-3-Rut, то обязательным следствием должно стать появление Cy-3-^{2Glu}Rut (что соответствует данным, полученным для остальных сортов, представленным в табл. 2). Следовательно, можно предложить деление сортов красной малины на глюкозидные и рутинозидные, причем с учетом предложенной схемы метаболизма лучше использовать суммарный критерий – суммой долей Cy-3-Sopho и Cy-3-Glu (табл. 2) в противопоставление сумме долей Cy-3-Rut и Cy-3-^{2Glu}Rut.

При исследовании видового состава антоцианов в работе была использована колонка с сорбентом Сепарон SGX C18, которая уступает по эффективности разделения, но превосходит по удерживающей способности антоцианов стационарные фазы Диасфер-110-C18 и ReproSil-Pur C18-AQ. Однако тенденция относительного удерживания различных гликозидов цианидина остается неизменной. Так, при увеличении содержания ацетонитрила в подвижных фазах удерживание антоцианов с двумя углеводными радикалами уменьшается быстрее, чем моногликозидов. По этой причине для разделения Cy-3-^{2Glu}Rut и Cy-3-Sopho (как и пары Cy-3-Sam и Cy-3-^{2Xyl}Rut) необходимо использовать подвижные фазы с относительно меньшим содержанием ацетонитрила. При увеличении (в данном случае более 11 об. %) содержания ацетонитрила происходит уменьшение селективности их разделения вплоть до инверсии времен удерживания.

Таблица 2. Компоненты антоцианового комплекса плодов некоторых сортов *Rubus idaeus*

Сорт (вариант)		Мольная доля по площади пиков, % ($\pm 1.2 \div 0.2$ %)					Сумма (1+3)
		Cy-3-Sopho	Cy-3- ^{2Glu} Rut	Cy-3-Glu	Cy-3-Rut	Ост.	
		1	2	3	4		
Вольница	1	74.2	Сл.	25.3	Сл.	0.5	95.5
	2	84.1	1.8	11.6	2.0	0.5	95.7
Журавлик		62.2	0.9	34.2	2.1	0.6	96.4
Бабье лето	1	34.2	38.3	14.4	11.9	1.2	48.6
	2	32.2	43.6	8.4	13.0	2.8	40.6
	3	56.2	18.3	20.3	3.3	1.9	76.2
Бальзам	1	41.4	30.2	15.0	12.4	1.0	56.4
	2	30.8	32.2	17.9	18.5	0.6	48.9
Спутница		33.0	25.8	19.7	20.7	0.8	52.7
Патриция		36.0	36.2	15.1	12.1	0.6	51.1
Скромница		29.8	27.0	19.1	23.4	0.7	48.9
Богатырь		31.2	42.6	10.3	15.3	0.6	41.3
Метеор		25.0	58.4	8.2	7.8	0.6	33.2
Солнышко		24.7	58.1	8.1	8.5	0.6	33.0
Херитейдж	1	27.7	39.2	14.0	18.2	0.9	41.7
	2	15.8	36.3	13.2	33.3	1.4	29.0

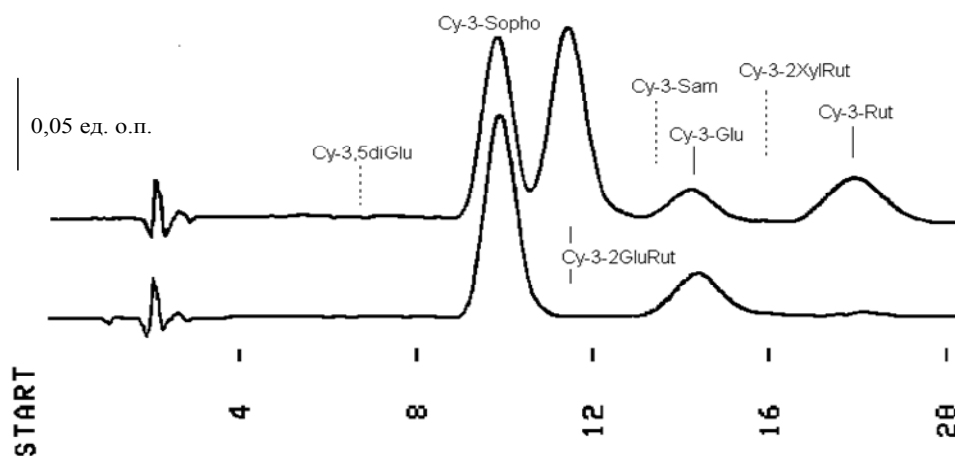
На основе 5-летнего опыта использования ВЭЖХ при исследовании антоцианов различных растительных объектов можно предложить следующие природные легко доступные «стандарты» для подбора необходимого состава подвижной фазы (по концентрации ацетонитрила при использовании произвольного обращенно-фазового сорбента) для исследования антоцианового состава малин:

1) экстракт плодов вишни (*Cerasus vulgaris*) – содержит кроме Cy-3-Glu и Cy-3-Rut, порядок удерживания (но не селективность разделения) которых в реальных составах подвижных фаз не изменяется, и критическую для малин пару: Cy-3-²GluRut и Cy-3-Sopho;

2) экстракт плодов смородины красной (*Ribes rubrum*), один из основных компонентов которой Cy-3-²XylRut (при наличии Cy-3-Glu и Cy-3-Rut и, возможно, Cy-3-²GluRut).

3) экстракт бузины черной (*Sambucus nigrum*), содержащий еще одну критическую пару: Cy-3-Sam и Cy-3-Glu, а также заметно более слабо удерживаемый Cy-3,5-diGlu в смеси с Cy-3-Sam-5-Glu [4].

Пример разделения антоцианов экстрактов плодов красной малины представлен на рисунке. В настоящей работе ни в одном из исследованных образцов не обнаружено заметного количества Cy-3,5-diGlu. Однако относительно ацилированных кумаровыми кислотами гликозидов цианидина [7] следует отметить, что удерживание таких веществ существенно сильнее, чем неацилированных компонентов, и требует увеличения концентрации ацетонитрила в подвижной фазе в 1,5÷2 раза.



Разделение гликозидов цианидина экстрактов плодов *Rubus idaeus*. Условия: колонка 250×4 мм Сепарон SGX C18, подвижная фаза: 10 об. % HCOOH, 11 об. % CH₃CN в воде, 1 мл/мин; детектор – 546 нм.

Пунктирными линиями отмечены положения пиков отсутствующих веществ

Выводы

В работе исследован антоциановый комплекс плодов некоторых видов рода *Rubus* L. Спектрофотометрическим методом определено содержание антоцианов (9 ÷ 71 мг на 100 г ягод в пересчете на цианидина-3-гликозид) в плодах растений, выращенных в условиях Белгородской области. Установлено, что основными компонентами антоцианового комплекса исследованных сортов малины красной являются Cy-3-Glu, Cy-3-Rut, Cy-3-Sopho и Cy-3-²GluRut. Предложено деление красных малин на глюкозидные и рутинозидные с учетом одинакового характера гликозилирования гликозидов при последующем метаболизме. В плодах ежевики содержание антоцианов заметно больше: 53 ÷ 182 мг на 100 г ягод в пересчете на цианидина-3-гликозид, являющийся практически единственным антоцианом плодов.

Список литературы

1. Дейнека В.И., Григорьев А.М., Староверов В.М., Борзенко О.Н. Инкрементный подход в анализе антоцианов. // Химия природных соединений. 2003. №2. С. 137–139.
2. Дейнека В.И., Григорьев А.М. Определение антоцианов методом ВЭЖХ. Некоторые закономерности удерживания // Журнал аналитической химии. 2004. Т. 59. №3. С. 305–309.
3. Дейнека В.И., Григорьев А.М. Относительный анализ удерживания гликозидов цианидина // Журнал физической химии. 2004. Т. 78. №5. С. 923–926.
4. Goiffon J.-P., Mouly P.P., Gaydou E.M. *Analitica Chim. Acta*. 1999. V. 382. P. 39.

5. Begoña de Ancos, E. Gonzalez, M.P. Cano. Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition // *Z. Lebensmitt. Forsch. A*. 1999. V. 208. №1. P. 33–38.
6. Byamukama R., Kiremire B.T., Andersen O.M., Steigen A. Anthocyanins from fruits of *Rubus pinnatus* and *Rubus rigidus* // *J. Food Composit. Anal.* 2005. V. 18. №6. P. 599–605.
7. Wada L., Ou B. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries // *J. Agric. Food Chem.* 2002. V. 50. P. 3495–3500.
8. Goiffon J.-P., Brun M., Bourrier. High-performance liquid chromatography of red fruit anthocyanins // *J. Chromatogr.* 1991. V. 537. P. 101–121.
9. Boyles M.J., Wrolstad R.E. Anthocyanin Composition of Red Raspberry Juice: Influences of Cultivar, Processing, and Environmental Factors // *J. Food Sci.* 1993. V. 58(5). P. 1135–1141.
10. Fan-Chiang H-J and Wrolstad R.E. Anthocyanin Pigment Composition of Blackberries // *J. Food Sci.* 2005. V. 70(3). P. 198–202.
11. Nybom T. Cellulose thin layers for anthocyanin analysis, with special reference to the anthocyanins of black raspberries // *J. Chromatogr. A*. 1968. V. 38. P. 382–387.
12. Tian Q., Aziz R.M., Stoner G.D., Schwartz S.J. Anthocyanin Determination in Black Raspberry (*Rubus occidentalis*) and Biological Specimens Using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry // *J. Food Sci.* 2005. V. 70(1). P. 43–47.
13. Melo M.J., Moncada M.C., Pina F. On the red color of raspberry (*Rubus idaeus*) // *Tetrahedron Letters*. 2000. V. 41. P. 1987–1991.
14. Дейнека В.И., Григорьев А.М., Дейнека Л.А., Ермаков А.М., Сиротин А.А., Староверов В.М. Анализ компонентного состава антоцианов плодов и жирных кислот масел семян некоторых видов семейства *Rosaceae* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Растительные ресурсы*. 2005. Вып. 1. С. 91–98.
15. Giusti M.M., Wrolstad R.E. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. Unit F2.2, Ch. 2. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. S. King, M. Gates & L. Scalettar (Ed.). New York, 2000.
16. Halbwirth H., Martens S., Wienand U., Forkmann G., Stich K. Biochemical formation of anthocyanins in silk tissue of *Zea mays* // *Plant Science*. 2003. V. 164. P. 489–495.

Поступило в редакцию 4 октября 2005 г.