

ВЕСЦІ **НАЦЫЯНАЛЬнай** **АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ**

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК 2012 № 1

ИЗВЕСТИЯ **НАЦИОНАЛЬНОЙ** **АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ**

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК 2012 № 1

ЗАСНАВАЛЬНІК – НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

Часопіс выдаецца са студзеня 1956 г.

Выходзіць чатыры разы ў год

PROCEEDINGS **OF THE NATIONAL ACADEMY** **OF SCIENCES OF BELARUS**

BIOLOGICAL SERIES 2012 N 1

FOUNDER IS THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

The Journal has been published since January 1956

Issued four times a year

УДК 581.192: 577.13:582.71:543.544.5

Н. Ю. КОЛБАС¹, М.-А. СИЛВА², П.-Л. ТЭССЭДР², В. Н. РЕШЕТНИКОВ³

АНТОЦИАНЫ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЛОДОВ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА RUBUS

¹Брестский государственный университет им. А. С. Пушкина, Брест, e-mail: n.kolbas@gmail.com,

²Институт изучения Винограда и Вина, Бордо, Республика Франция,

³Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск

(Поступила в редакцию 12.09.2011)

Введение. В последние годы возрос интерес к изучению биологической активности соединений, относящихся к различным классам растительных фенолов, таких как гидроксикоричные кислоты [1, 2], стильбены [3] и флавоноиды [3, 4]. Антоцианы составляют одну из групп флавоноидов, являясь водорастворимыми пигментами, они не только обеспечивают многообразие окраски, но и повышают стрессоустойчивость растений, предотвращают повреждение фоточувствительных молекул и фотосинтетического аппарата растительной клетки от избыточного солнечного излучения [5]. В настоящее время доказан терапевтический эффект антоцианов: они обладают антиканцерогенным действием, уменьшают риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, улучшают остроту зрения [6], а также проявляют антиоксидантную активность (АОА) [7]. Благодаря своей биологической активности эти соединения довольно широко применяются в пищевой, фармацевтической, косметической промышленности и медицине.

В настоящее время при производстве продуктов питания, косметических и фармакологических препаратов все чаще синтетические красители заменяют натуральными [8], что делает особенно актуальным поиск нетоксичных, легкодоступных растительных источников с высоким содержанием антоцианов. В качестве таких растительных источников могут выступать плоды рода *Rubus* L. (семейство *Rosaceae* Juss.). Однако из-за довольно высокого полиморфизма данного рода необходимо более детально изучить биохимический состав его отдельных представителей для выявления наиболее перспективных источников биологически активных веществ, в том числе и антоцианов. Существенная информация о количественном и качественном составе антоцианов может быть получена из их спектральных характеристик. Строение агликона, тип и количество сахаров, положение гликозидной связи, а также наличие алифатических и ароматических кислот в составе молекулы – отличительные признаки отдельных антоцианов [9].

Цель данного исследования – определить компонентный состав антоцианового комплекса плодов четырех представителей рода *Rubus* L. с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографического анализа с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС), а также изучить корреляционную связь между общим количеством антоцианов и АОА исследуемых плодов.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования являлись плоды темноплодных видов *Rubus caesius* L., *Rubus fruticosus* L., *Rubus nessensis* W. Hall и красноплодного вида *Rubus idaeus* L., заготовленные в 2010 г. (виды были определены по В. И. Парфенову [10] и G. Bonnier [11]).

Антоцианы из растительного сырья извлекали многократной экстракцией 1%-ной хлороводородной кислотой в метаноле с помощью экстрактора ASE-350 («Dionex Corporation», США) в инертной атмосфере азота, при температуре 22 °С и максимальном давлении 1500–1700 psi.

ВЭЖХ проводили 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 («Thermo Fisher Scientific», США; 50×2,1 мм; размер частиц силикагеля 1,9 мкм). Элюирование вели при температуре 40 °С и фиксированной пропускной способности 0,3 мл в минуту, при этом объем инъекционного образца составил 20 мкл. В качестве мобильной фазы *A*, согласно методике [12], применяли водный раствор муравьиной кислоты (0,1%-ный раствор – для качественного анализа антоцианов и 5%-ный – для количественного), мобильной фазой *B* был 5%-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле с использованием следующего градиента элюирования: 30 % *B*, 0–10 мин; 30–100 % *B*, 10–11 мин; 100 % *B*, 11–13 мин; 100–0 %, 13–14 мин и с последующей стабилизацией системы в течение 4 мин. 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 заряженных ионов с соотношением молекулярная масса/заряд (m/z) от 100 до 1000. Программное обеспечение анализа – Xcalibur software («Thermo Fisher Corp.», США). Концентрацию каждого антоциана и общее их содержание определяли в пересчете на мг цианидин 3-О-глюкозида, содержащегося в 100 г сырой навески растительного материала (мг *Cy-3-glu*/100 г СН).

Для наиболее полного выявления антиоксидантного потенциала [13] использовали три различных метода определения АОА *in vitro*: *ABTS* [14], *ORAC* [15] и *FRAP* [16]. Все опыты проводили в трехкратной повторности. Для статистической обработки полученных данных применяли программу R software.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенного ВЭЖХ-МС-анализа нами были детектированы 17 различных антоцианов, из них 12 пиков представлены в хроматограммах плодов *R. caesius* (рис.1), 9 – в плодах *R. fruticosus* (рис. 2) и по 8 пиков – в плодах *R. nessensis* и *R. idaeus* (рис. 3). При анализе полученных хроматограмм и сопоставлении литературных данных [17–19] все выявленные антоцианы были идентифицированы (табл. 1). Агликоны представлены пятью антоцианидинами: цианидином, пеларгонидином, петунидином, дельфинидином и мальвидином. Отмечена видовая специфичность наличия того или иного антоцианидина. Так, цианидин

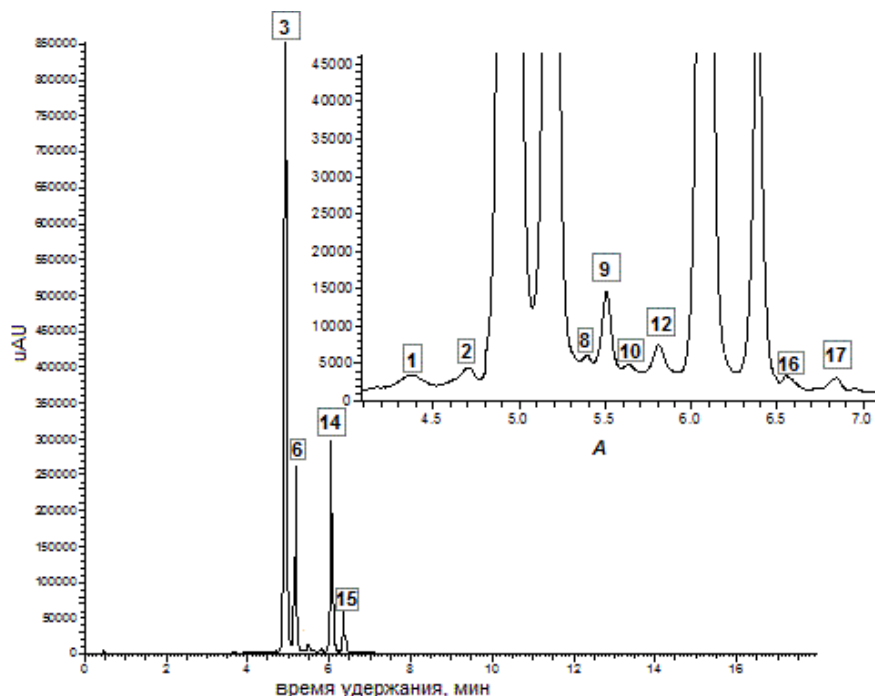


Рис. 1. Хроматограмма антоцианового комплекса плодов *Rubus caesius* L.: А – второстепенные компоненты; 1–3, 6, 8–10, 12, 14–17 – порядковые номера пиков антоцианов в табл. 1

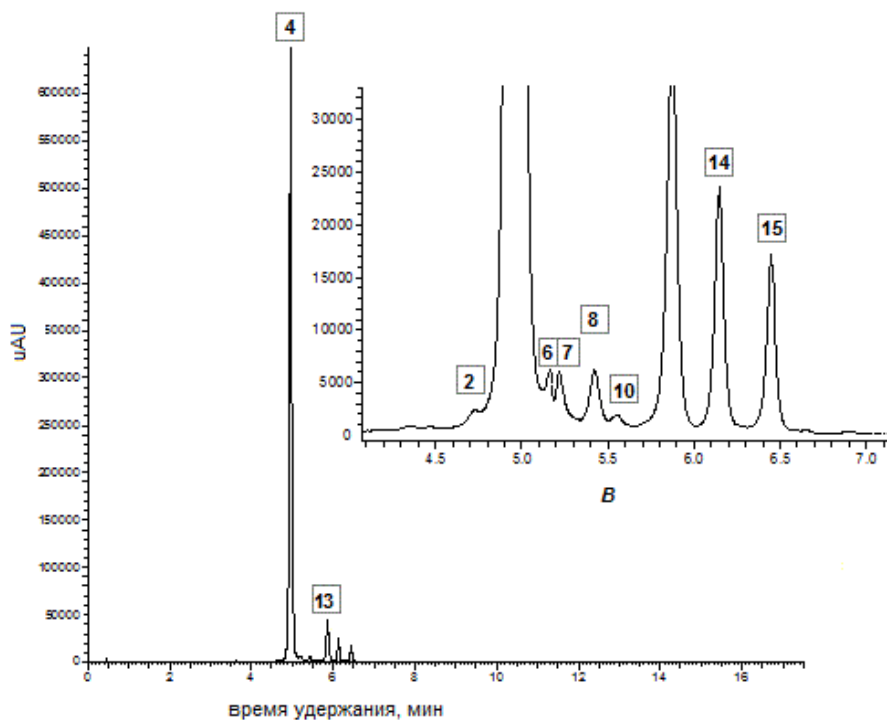


Рис. 2. Хроматограмма антоцианового комплекса плодов *Rubus fruticosus* L.: В – второстепенные компоненты; 2, 4, 6–8, 10, 13–15 – порядковые номера пиков антоцианов в табл. 1

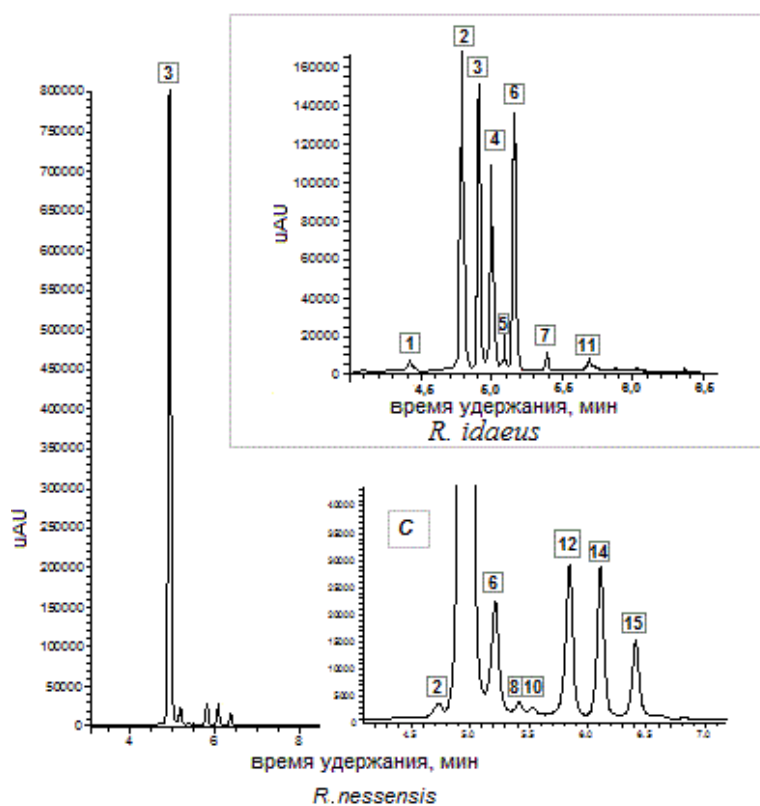


Рис. 3. Хроматограмма антоцианового комплекса плодов *Rubus nessensis* W. Hall. и *Rubus idaeus* L.: С – второстепенные компоненты *R. nessensis*; 1–8, 10–12, 14, 15 – порядковые номера пиков антоцианов в табл. 1

входит в состав антоцианов плодов четырех изученных нами представителей рода *Rubus*, дельфинидин встречается в темноплодных видах, петунидин – только в плодах *R. caesius*, а пеларгонидин и мальвидин – в плодах *R. idaeus*. Углеводная составляющая изученных антоцианов представлена как моносахаридами (арабинозой, галактозой и глюкозой), так и дисахаридами (софорозой, рутинозой и самбубиозой). В качестве ацильных компонентов встречаются остатки *p*-кумаровой, кофейной, малоновой и щавелевой кислот.

Т а б л и ц а 1. Идентификация антоцианов, детектированных методом ВЭЖХ-МС в плодах некоторых представителей рода *Rubus*

Номер пика	RT, мин	m/z		Компонент	
		[M ⁺]	фрагменты	название	аббревиатура
1	4,4	287		Цианидин	<i>Cy</i>
2	4,7	611	287	Цианидин 3- <i>O</i> -софорозид	<i>Cy-3-soph</i>
3	4,9	449	287	Цианидин 3- <i>O</i> -галактозид	<i>Cy-3-gal</i>
4	5	449	287	Цианидин 3- <i>O</i> -глюкозид	<i>Cy-3-glu</i>
5	5,1	741	271	Пеларгонидин 3- <i>O</i> -глюкозил-рутинозид	<i>Pg-3-glu-rut</i>
6	5,2	595	287/449	Цианидин 3- <i>O</i> -рутинозид	<i>Cy-3-rut</i>
7	5,3	581	287	Цианидин 3- <i>O</i> -самбубиозид	<i>Cy-3-sam</i>
8	5,4	595	287/449	Цианидин 3- <i>O</i> -(6''- <i>p</i> -кумароил-глюкозид)	<i>Cy-3-(6''-p-coum-glu)</i>
9	5,5	449	317	Петунидин 3- <i>O</i> -арабинозид	<i>Pt-3-ara</i>
10	5,6	597	303	Дельфинидин-3- <i>O</i> -самбубиозид	<i>Dp-3-sam</i>
11	5,7	493	331	Мальвидин 3- <i>O</i> -галактозид	<i>Mv-3-gal</i>
12	5,8	611	287	Цианидин 3- <i>O</i> -кофейл-глюкозид	<i>Cy-3-(6''-caf-glu)</i>
13	5,9	419	287	Цианидин 3- <i>O</i> -арабинозид	<i>Cy-3-ara</i>
14	6,1	535	287/449	Цианидин 3- <i>O</i> -(6''-малонил-глюкозид)	<i>Cy-3-(6''-mal-glu)</i>
15	6,4	594	303	Дельфинидин 3- <i>O</i> -(6''-диоксалил-глюкозид)	<i>Dp-3-(6''-diox-glu)</i>
16	6,6	593	287	Цианидин 3- <i>O</i> -(6''-диоксалил-глюкозид)	<i>Cy-3-(6''-diox-glu)</i>
17	6,8	479	317	Петунидин 3- <i>O</i> -галактозид	<i>Pt-3-gal</i>

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

Среди исследованных представителей рода *Rubus* антоциановый комплекс плодов *R. idaeus* является наиболее изученным [18–20], что объясняется довольно широким ареалом этого вида, а также активным использованием в плодоводстве. Полученные нами данные о цианидиновой составляющей антоцианового комплекса плодов этого вида подтверждены литературными сведениями. Однако нами установлено, что наличие мальвидина, отсутствие дельфинидина в качестве агликонов, а также присутствие остатков *p*-кумаровой кислоты в составе молекул антоцианов плодов являются отличительными особенностями растений *R. idaeus*, произрастающих на территории Республики Беларусь. Что касается темноплодных представителей рода *Rubus*, то сведения о качественном составе их антоцианового комплекса носят фрагментарный характер; часто авторы не указывают видовую принадлежность объекта своего исследования, а лишь ограничиваются названием «ежевика» [21, 22].

Количественный состав антоцианов плодов каждого из изученных видов включает главные и второстепенные компоненты (табл. 2). *Cy-3-gal* является главным компонентом антоцианового комплекса плодов *R. caesius* и *R. nessensis*, его содержание составило соответственно 56,29 и 87,4 % от суммы площадей всех зарегистрированных пиков хроматограммы при длине волны 520 нм, без учета коэффициента чувствительности. Для плодов *R. fruticosus* ведущим антоцианом является *Cy-3-glu* (86,05 %). Кроме того, плоды *R. caesius* содержат еще два главных антоциана: *Cy-3-rut* и *Cy-3-(6''-mal-glu)*, их относительное содержание составило 16,91 и 18,89 % соответственно. Среди восьми антоцианов, идентифицированных в плодах *R. idaeus*, четыре являются ведущими: *Cy-3-soph*, *Cy-3-gal*, *Cy-3-glu* и *Cy-3-rut*. В целом отличия площадей этих пиков не значительны и составляют 19,61–27,61 %.

Т а б л и ц а 2. Количественный состав, общее количество антоцианов и антиоксидантная активность плодов четырех представителей рода *Rubus*

Компонент	<i>R. caesius</i>	<i>R. fruticosus</i>	<i>R. nessensis</i>	<i>R. idaeus</i>
<i>Cy</i>	2,67 ± 0,27	–	–	1,07 ± 0,05
<i>Cy-3-soph</i>	2,51 ± 0,28	1,69 ± 0,06	2,92 ± 0,09	24,91 ± 0,26
<i>Cy-3-gal</i>	300,09 ± 10,56	–	432,43 ± 27,51	22,01 ± 0,38
<i>Cy-3-glu</i>	–	342,66 ± 12,52	–	17,86 ± 0,3
<i>Pg-3-glu-rut</i>	–	–	–	2,30 ± 0,05
<i>Cy-3-rut</i>	90,51 ± 3,47	3,76 ± 0,11	14,9 ± 0,49	22,54 ± 0,47
<i>Cy-3-sam</i>	–	2,66 ± 0,11	–	1,03 ± 0,03
<i>Cy-3-(6''-p-coum-glu)</i>	2,27 ± 0,1	4,44 ± 0,12	3,02 ± 0,1	–
<i>Pt-3-ara</i>	6,17 ± 0,2	–	–	–
<i>Dp-3-sam</i>	2,39 ± 0,35	1,87 ± 0,14	2,71 ± 0,03	–
<i>Mv-3-gal</i>	–	–	–	1,06 ± 0,02
<i>Cy-3-(6''-caf-glu)</i>	4,74 ± 0,2	–	17,93 ± 0,68	–
<i>Cy-3-ara</i>	–	23,30 ± 0,68	–	–
<i>Cy-3-(6''-mal-glu)</i>	101,09 ± 4,15	13,60 ± 0,53	16,11 ± 0,62	–
<i>Dp-3-(6''-diox-glu)</i>	21,49 ± 0,97	10,02 ± 0,33	9,32 ± 0,38	–
<i>Cy-3-(6''-diox-glu)</i>	2,06 ± 0,22	–	–	–
<i>Pt-3-gal</i>	1,70 ± 0,07	–	–	–
Параметр				
ОКА	538,48 ^a ± 20,18	405,05 ^b ± 14,18	499,34 ^a ± 28,55	95,72 ^c ± 0,5481
АОА				
Метод <i>ABTS</i> ¹	6,22 ^a ± 0,09	8,17 ^b ± 0,13	7,01 ^d ± 0,36	3,41 ^c ± 0,06
Метод <i>ORAC</i> ¹	3,54 ^a ± 0,05	4,77 ^b ± 0,29	4,15 ^{a, b} ± 0,19	2,26 ^c ± 0,07
Метод <i>FRAP</i> ²	8,06 ^a ± 0,24	10,67 ^b ± 0,26	9,98 ^b ± 0,22	5,35 ^c ± 0,02

П р и м е ч а н и е. Количественные данные компонентов и общее количество антоцианов (ОКА) приведены в пересчете на мг Цианидин 3-глюкозида/100 г сырой навески (СН) плодов; прочерк «–» – отсутствие компонента.

¹АОА, оцененная методами *ABTS* и *ORAC*, выражена в ммоль Тролокс эквивалента/100 г СН,

²АОА метода *FRAP* в ммоль Fe⁺ 2 / 100 г СН,

a, b, c, d Статистические различия.

Общее содержание антоцианов в плодах исследуемых растений варьировало от 95,72 до 538,48 мг *Cy-3-glu*/100 г СН (табл. 2). Анализ литературных данных позволил сопоставить полученные результаты для двух видов из четырех изученных. Для *R. idaeus* полученные результаты оказались несколько выше, чем средние литературные, которые весьма разнятся (37,04 [18], 68,7 [19], 46, 58 [20], 9–71 [23] мг *Cy-3-glu*/100 г СН), что можно объяснить различиями в пробоподготовке плодов, экстракции их антоцианов, а также разными условиями произрастания растений. Нами не найдены количественные данные ВЭЖХ антоцианового комплекса для *R. fruticosus*, а имеющиеся в литературе данные рН-дифференциального метода определения антоцианов [24] намного ниже (87,1 [22] и 88,68 [25] мг *Cy-3-glu*/100 г СН) результатов, полученных нами (405,05 ± 14,18). Это подтверждает данную ранее характеристику ВЭЖХ как точной и высокочувствительной системы анализа [26].

Изученные растения можно распределить в порядке уменьшения общего содержания антоцианов их плодов следующим образом:

$$R. caesius > R. nessensis > R. fruticosus > R. idaeus.$$

Значения АОА плодов представлены в табл. 2. Они варьировали для методов *ABTS* и *ORAC* (в ммоль Тролокс эквивалента/100 г СН) от 3,41 до 8,17 и от 2,26 до 4,77 соответственно, результаты метода *FRAP* составили от 5,35 до 10,67 ммоль Fe⁺ 2 / 100 г СН плодов. Все три метода показали одинаковую тенденцию снижения АОА в ряду:

$$R. fruticosus > R. nessensis > R. caesius > R. idaeus.$$

В целом для изученных растений установлена корреляционная зависимость между общим количеством антоцианов и АОА их плодов, оцененной методами *ABTS* ($R^2 = 0,6373$, при $P < 0,01$)

и ORAC ($R^2 = 0,501$, при $P < 0,01$), но не установлена для метода FRAP. Этот аспект требует более детального изучения с увеличением количества исследуемых видов растений.

Заключение. Использование ВЭЖХ-МС-анализа позволило эффективно разделить и идентифицировать компоненты антоцианового комплекса плодов четырех представителей рода *Rubus* и детально проанализировать их количественный состав. Получены оригинальные данные об антоцианах плодов *R. nessensis*, *R. caesius* и *R. idaeus*, произрастающих на территории Республики Беларусь. Растения *R. caesius* могут служить в качестве исходной формы при создании сортов ежевики с повышенным содержанием антоцианов. Полученные результаты могут быть использованы для создания базы данных с последующим применением в систематике и таксономии растений, а также для стандартизации и установления подлинности продукции, созданной на основе плодов изученных растений.

Литература

1. *Andreasen M., Landbo F. A.-K., Christensen L. P. et al.* // J. Agric. Food Chem. 2001. Vol. 49, N 8. P. 4090–4096.
2. *Шутова А. Г.* // Растит. ресурсы. 2007. Т. 43. Вып. 1. С. 112–125.
3. *Fraga C. G.* Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition, and pharmacology. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2010. P. 163–165, 287, 349–351.
4. *Костюк В. А., Потапович А. И.* Биорадикалы и биоантиоксиданты. Мн., 2004. С. 163.
5. *Макаревич А. М., Шутова А. Г., Спиродович Е. В., Решетников В. Н.* // Тр. БГУ. Сер. физиол., биохим. и молек. осн. функцион. биосистем. 2010. Т. 4. Вып. 2. С. 147–157.
6. *De Pascual-Teresa S., Schanchez-Ballesta M. T.* // Phytoch. Rev. 2008. Vol. 7. P. 284–299.
7. *Kähkönen M. P., Heinonen M. J.* // J. Agric. Food Chem. 2003. Vol. 51, N 3. P. 628–633.
8. *Maier T.* // Eur Food Res Technol. 2009. N 229. P. 949–960.
9. *Mazza G., Miniati E.* // Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. CRC Press: Boca Raton, 1993. P. 149–199.
10. Определитель высших растений Беларуси / Под ред. В. И. Парфенова. Мн., 1999. С. 143–163.
11. *Bonnier G., Douin R.* La grande flore en couleurs de Gaston Bonnier. Paris: Belin, 1990. Т. 1. P. 400.
12. *Chira K., Schmauch G., Saucier C. et al.* // J. Agric. Food Chem. 2009. Vol. 57, N 2. P. 545–553.
13. *Prior R. L., Wu X., Schaich K.* // J. Agric. Food Chem. 2005. Vol. 53, N 10. P. 4290–4302.
14. *Re R., Pellegrini N., Proteggente A. et al.* // J. Free Rad. Bio. 1999. Vol. Med. 26. P. 1231–1237.
15. *Davalos A., Gomez-Cordoves C., Bartolome B.* // J. Agric. Food Chem. 2004. Vol. 52, N 1. P. 48–54.
16. *Szöllösi R., Szöllösi Varga I.* // Acta Biologica Szeg. 2002. Vol. 46 (3–4) P. 125–127.
17. *Giusti M. M., Rodriguez-Saona L. E., Griffin D. et al.* // J. Agric. Food Chem. 1999. Vol. 47, N 11. P. 4657–4664.
18. *De Ancos B., Ibanez E., Reglero G., Cano M. P.* // J. Agric. Food Chem. 2000. Vol. 48, N 3. P. 873–879.
19. *Määttä-Riihinen K., Kamal-Eldin A., Törrönen A. R.* // J. Agric. Food Chem. 2004. Vol. 52, N 20. P. 6178–6187.
20. *Mullen W., Marks S. C., Crozier A.* // J. Agric. Food Chem. 2002. Vol. 50, N 18. P. 5197–5201.
21. *Fukumoto L. R., Kusumi T., Masuda K. et al.* // J. Agric. Food Chem. 2000. Vol. 48, N8. P. 3597–3604.
22. *Sariburun E., Şahin S., Demir C. et al.* // J. Food Sci. 2010. Vol. 75, N 4. P. 328–335.
23. *Giusti M. M., Wrolstad R. E.* Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy // Cur. Protocols in Food Analytical Chem. 2001. F1.2.1-F1.2.13.
24. *Сорокопудов В. Н., Дейнека В. И., Лукина И. П., Дейнека Л. А.* // Химия растит. сырья. 2005. № 4. С. 61–65.
25. *Benvenuti S., Pellati F., Melegari M., Bertelli D.* // J. Food Sci. 2004. Vol. 69, N 3. P. 164–169.
26. *Truong V.-D., Deighton N., Thompson R. T. et al.* // J. Agric. Food Chem. 2010. Vol. 58, N 1. P. 404–410.

N. Y. KOLBAS, M.-A. SILVA, P.-L. TEISSEDRÉ, V. N. RESHETNIKOV

ANTHOCYANINS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FRUITS CERTAIN REPRESENTATIVES OF GENUS RUBUS

Summary

It was identification of anthocyanins, estimation of their total content in blackberry (*Rubus fruticosus* L., *Rubus caesius* L. and *Rubus nessensis* W. Hall.) and raspberry (*Rubus idaeus* L.) as well as on the evaluation of fruit antioxidant activity. 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. Significant differences between the qualitative composition of anthocyanins have been detected in examined fruits. Total anthocyanins ranged (in mg cyanidin 3-*O*-glucoside per 100 g of fresh weight) from 95.72 to 538.48. Mean values of antioxidant capacity by ABTS and ORAC methods (in mmol Trolox equivalent per 100 g of fresh weight) were 3.41–8.17 and 2.26–4.77 respectively. Mean FRAP values varied from 5.35 to 10.67 mmol Fe²⁺/100 g FW of fruits. On the based of our data the recommendations on practical application of fruits were proposed.