

**Национальная академия наук Беларуси
Центральный ботанический сад**

**Интродукция, сохранение и использование
биологического разнообразия мировой флоры**

Материалы Международной конференции,
посвященной 80-летию Центрального ботанического сада
Национальной академии наук Беларуси
(19–22 июня 2012 г., Минск, Беларусь)

**В двух частях
Часть 2**

**Assessment, Conservation and Sustainable Use
of Plant Biological Diversity**

Proceedings of the International Conference
dedicated to 80th anniversary of the Central Botanical Garden
of the National Academy of Sciences of Belarus
(June 19–22, 2012, Minsk, Belarus)

**In two parts
Part 2**

Минск
2012

УДК 582:581.522.4(082)

ББК 28.5я43

И73

Редакционная коллегия:

*Д-р биол. наук В.В. Титок (ответственный редактор);
д-р биол. наук, академик НАН Беларуси В.Н. Решетников;
д-р биол. наук, ч.-кор. НАН Беларуси Ж.А. Рупасова;
д-р биол. наук, чл.-кор. НАН Беларуси Е.А. Сидорович;
канд. биол. наук Ю.Б. Аношенко; канд. биол. наук А.В. Башилов;
канд. биол. наук А.А. Веевник; канд. биол. наук И.К. Володько;
канд. биол. наук И.М. Гаранович; канд. биол. наук Л.В. Гончарова;
канд. биол. наук А.А. Кузовкова; канд. биол. наук Л.В. Кухарева;
канд. биол. наук Н.М. Лунина; канд. биол. наук Е.В. Спиридович;
канд. биол. наук В.И. Торчик; канд. биол. наук О.В. Чижик;
канд. биол. наук А.Г. Шутова; канд. биол. наук А.П. Яковлев.*

Иллюстрации предоставлены авторами публикаций

И 73 Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры; Материалы Международной конференции, посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. (19–22 июня 2012, Минск, Беларусь). В 2 ч. Ч. 2 / Нац. акад. Наук Беларуси, Централ. ботан. сад; редкол.: В.В. Титок /и др./, Минск, 2012. – 492 с.

В сборнике представлены материалы Международной конференции «Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры», посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси.

В 1-й части публикуются тезисы докладов секций «Теоретические основы и практические результаты интродукции растений» и «Современные направления ландшафтного дизайна и зеленого строительства»

Во 2-й части представлены тезисы докладов секций «Экологическая физиология и биохимия интродуцированных растений», «Генетические и молекулярно-биологические аспекты изучения и использования биоразнообразия растений» и «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира».

УДК 582:581.522.4(082)

ББК 28.5я43

Определение состава ацильных производных антоцианов голубики методом хроматомасс-спектрометрии

Шабуня П.С.¹, Фатыхова С.А.¹, Деева А.М.², Шутова А.Г.²

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь,
e-mail: polinashabunya@nm.ru

²Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

Резюме. Методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием проанализирован состав ацильных производных антоцианов в плодах *Vaccinium uliginosum* L. и восьми сортов *Vaccinium corymbosum* L. Все сорта голубики высокорослой существенно не отличаются между собой по качественному составу ацильных антоцианов. Плоды *Vaccinium uliginosum* L. имеют иной, чем плоды *Vaccinium corymbosum* L., спектр изучаемых соединений.

Summary. The presence of acylated anthocyanins in berries of *Vaccinium uliginosum* L. and 8 varieties of *Vaccinium corymbosum* L. was investigated by HPLC-MS/MS method. All varieties of *Vaccinium corymbosum* L. didn't differ considerably from each other by qualitative composition of acylated anthocyanins. Fruit of *Vaccinium uliginosum* L. had different spectrum of investigated compounds.

Антоцианы являются основной группой полифенольных соединений, содержащихся в ягодах голубики в форме моно- и дигликозидов, а также ацилированных моногликозидов. Для определения состава антоцианов многие исследователи используют кислотный гидролиз гликозидных связей с последующим количественным анализом агликонов методом ВЭЖХ. Хотя этот подход упрощает идентификацию и дает важную информацию о содержании индивидуальных агликонов в анализируемых образцах, он не отражает специфичность структуры гликозидов. В идеале антоцианы должны быть проанализированы в их нативной гликозидной форме. Для таких исследований в последние годы широко используется метод жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием, который позволяет идентифицировать как разделенные, так и коэлюированные вещества антоцианового комплекса.

Целью данной работы было определение качественного состава ацилированных гликозидов антоцианов в плодах *Vaccinium uliginosum* L. и восьми сортов *Vaccinium corymbosum* L. с помощью жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией.

Материалы и методы. Образцы ягод *Vaccinium corymbosum* L. и плоды *Vaccinium uliginosum* L. были собраны на Ганцевичской научно-экспериментальной базе ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» «Журавинка», в южной агроклиматической зоне Республики Беларусь. Свежие образцы замораживались при температуре -20° С. Было отобрано по 200 г плодов голубики каждого сорта и гомогенизировано. Для извлечения антоцианов брали по три пробы гомогената массой 3–5 г. Экстракцию проводили 80%-ным раствором этанола в воде в течение 30 минут под воздействием ультразвукового излучения с получением конечной концентрации 250 г гомогената на 1 л раствора этанола. Затем пробы оставляли на 16 часов при температуре +4° С. Полученные экстракты центрифугировали при 5500 g и сохраняли при температуре +4° С до проведения измерений.

Для идентификации антоцианов разделение компонентов проб проводили при температуре +25° С на колонке Agilent Zorbax SB C18 (2,1 x 100 мм; 1,8 мкм) жидкостного хроматографа Agilent 1200 с диодно-матричным детектором. Подвижная фаза состояла из двух растворителей: **A** – 5% муравьиная кислота (об/об) и **B** – 100% ацетонитрил. В течение анализа состав подвижной фазы изменялся от 6% до 50% фазы B за 25 мин. при скорости течения элюента 0,2 мл/мин. Детектирование вели при длине волны 510 нм. Объем инъекции – 5 мкл. Температура в автосамплере +4° С. С выхода хроматографа образец подавался на вход тандемного масс-спектрометра Agilent 6410 Triple Quad (тройной квадруполь). В качестве интерфейса ионизации был электроспрей Agilent G1948B API-ES в режиме положительных ионов. Для идентификации антоцианов использовали режим детектирования заданных масс (Multi Reaction Monitoring – MRM), когда первый масс-фильтр настроен на пропускание ионов с определенными выбранными значениями m/z, а второй регистрирует получающиеся из этих ионов в ячейке соударений дочерние ионы только с определенной (заданной) массой. MRM-переходы указаны в табл. 1. Параметры работы детектора: температура осушающего газа +350° С; скорость потока осушающего газа – 10 л/мин.; давление на распылителе – 30 psi; напряжение на капилляре – 3000 вольт; напряжение на фрагменторе и энергия в ячейке соударений, соответственно, 135 и 25 вольт. Расшифровку хроматограмм и масс-спектров проводили с использованием компьютерного обеспечения Agilent MassHunter Workstation

Software version B.01.03 (Agilent Technologies Inc., USA).

Результаты и их обсуждение. Ранее нами методом жидкостной хроматографии был проанализирован качественный и количественный состав 15 основных антоцианов в 22 сортах интродуцированной в Беларуси голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.) [1]. При расшифровке полученных хроматограмм и дополнительной идентификации с использованием хроматомасс-спектрометрии было показано, что все сорта можно условно разделить на две группы по соотношению галактозидов и глюкозидов одного и того же агликона. Первая группа сортов характеризовалась примерно одинаковым соотношением галактозидов и глюкозидов, а для сортов второй группы было отмечено пониженное содержание глюкозидов. В литературе указывается [2], что антоцианы имеют довольно строгий порядок выхода при анализе на C18 колонке: для одного и того же агликона характерен следующий порядок выхода гликозидов – галактозид, глюкозид, арабинозид. На основании этого можно идентифицировать на MRM-хроматограммах галактозиды и глюкозиды. Также для гликозидов антоцианов было отмечено, что ацилирование сахаров приводит к уменьшению полярности соединений и, как следствие, увеличивает время удерживания на C18 колонке [2]. Анализируя полученные нами хроматограммы для экстрактов антоцианов плодов голубики, было замечено, что некоторые сорта из обеих групп характеризуются наличием ряда пиков с более поздними временами выхода, чем 15 основных антоцианов. Для этих сортов на многих MRM-хроматограммах наблюдались дополнительные пики, соответствующие переходам агликон-гексоза и агликон-пентоза, появление которых, по нашему мнению, может быть объяснено наличием ацилированных форм антоцианов.

Для поиска и идентификации ацилированных форм антоцианов из каждой группы сортов были выбраны по четыре сорта с наиболее выраженными дополнительными пиками: из группы 1 – «Bluescop», «Rancocas», «Northland», «Herbert»; из группы 2 – «Elizabeth», «Bluerose», «Reka», «Darrow». Также был проанализирован экстракт плодов дикорастущей голубики топяной (*Vaccinium uliginosum* L.). По литературным данным [2–5], в плодах различных видов голубики в качестве ацильных групп антоцианов могут присутствовать оксалил, малонил, пропионил, ацетил, сукцинил, малил, кумарил. Для поиска и идентификации в хроматограммах по общему ионному току ацилированных производных были использованы MRM-переходы, указанные в табл. 1.

Таблица 1. MRM-переходы, использованные для масс-спектрометрического анализа антоцианов

MRM-переход (Da)	Название антоциана и его номер на хроматограмме	MRM-переход ацильных производных антоцианов							
		оксалил	малонил	пропионил	ацетил	сукцинил	малил	кумарил	
465→303	Дельфинидин-галактозид (1a); Дельфинидин-глюкозид (1b)	535→ 303	551→ 303	521→ 303	507→ 303	567→ 303	581→ 303	611→ 303	
435→303	Дельфинидин арабинозид (2)	505→ 303	521→ 303	491→ 303	477→ 303	537→ 303	551→ 303	581→ 303	
449→287	Цианидин-галактозид (3a) Цианидин-глюкозид (3b)	519→ 287	535→ 287	505→ 287	491→ 287	551→ 287	565→ 287	595→ 287	
419→287	Цианидин-арабинозид (4)	489→ 287	505→ 287	475→ 287	461→ 287	521→ 287	535→ 287	565→ 287	
479→317	Петунидин-галактозид (5a) Петунидин-глюкозид (5b)	549→ 317	565→ 317	535→ 317	521→ 317	581→ 317	595→ 317	625→ 317	
449→317	Петунидин-арабинозид (6)	519→ 317	535→ 317	505→ 317	491→ 317	551→ 317	565→ 317	595→ 317	
463→301	Пеонидин-галактозид (7a) Пеонидин-глюкозид (7b)	533→ 301	549→ 301	519→ 301	505→ 301	565→ 301	579→ 301	609→ 301	
433→301	Пеонидин-арабинозид (8)	503→ 301	519→ 301	489→ 301	475→ 301	535→ 301	549→ 301	579→ 301	
493→331	Мальвидин-галактозид (9a) Мальвидин-глюкозид (9b)	563→ 331	579→ 331	549→ 331	535→ 331	595→ 331	609→ 331	639→ 331	
463→331	Мальвидин-арабинозид (10)	533→ 331	549→ 331	519→ 331	505→ 331	565→ 331	579→ 331	609→ 331	

При анализе полученных данных для всех исследованных образцов голубики высокорослой было показано отсутствие оксалильных форм гликозидов антоцианов. Сукцинил-производные были выявлены только для цианидин- и пеонидин-гексоз в сорте «Bluecrop», и для петунидин-гексоз в сорте «Northland». Экстракты плодов проанализированных сортов содержали ацелированные формы исследованных гликозидов антоцианов, кроме мальвидин-пентоз во всех сортах, а также пеонидин-пентоз в сортах «Elizabeth» и «Bluecrop», и дельфинидин-пентозы в сорте «Reka». Также во всех экстрактах обнаруживались производные кумаровой кислоты и гексозных гликозидов антоцианов. Малонил-производные гексозных гликозидов и малил-производные пентозных гликозидов имеют одинаковые MRM-переходы для каждого агликона (табл. 1), поэтому соответствующие пики с большей долей вероятности могут быть отнесены к пентозным гликозидам, так как на MRM-хроматограммах неацелированных производных пентоз присутствовали дополнительные минорные пики с близкими к ацилированным формам временами удерживания. Пропионил-мальвидин-пентозы присутствуют в экстрактах всех сортов, кроме «Bluecrop» и «Northland». Пропионил-цианидин-пентозы присутствуют в экстрактах сортов «Bluerose», «Northland», «Darrow», «Herbert». На рисунке 1А представлена хроматограмма сорта «Bluecrop», на которой отмечены пики ацилированных и неацилированных гликозидов антоцианов.

Качественный состав ацилированных форм антоцианов для *Vaccinium uliginosum* L. отличался от такового для исследуемых сортов *Vaccinium corymbosum* L. (рисунок 1В). Характерные для всех сортов голубики высокорослой производные кумаровой кислоты и гексозных гликозидов антоцианов отсутствовали в экстракте плодов голубики топяной, так же как и ацилированные кумаровой кислотой пентозные гликозиды. Плоды *Vaccinium uliginosum* L. характеризовались полным отсутствием малил- и оксалил-производных антоцианов. Ацилирование малонилом было показано только для цианидин-пентоз, а сукцинилом – для цианидин-гексоз. Также были выявлены пропионил-производные всех пентозных гликозидов анализируемых антоцианов. Из ряда ацелированных форм гликозидов антоцианов не были обнаружены производные гликозидов мальвидина, петунидин- и пеонидин-гексоз.

Отличительной особенностью голубики топяной являлось наличие на MRM-хроматограммах пентозных гликозидов всех агликонов достаточно больших дополнительных пиков, не совпадающих по времени удерживания ни с одним ацилированным производным, что можно объяснить либо присутствием иной чем арабиноза пентозы (либо наличием производных ацилированных) кислотой, не входящей в перечень рассмотренных в настоящей работе.

Заключение. Методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием проанализирован состав ацильных производных антоцианов в плодах *Vaccinium uliginosum* L. и восьми сортов *Vaccinium corymbosum* L. Все сорта голубики высокорослой существенно не отличаются между собой по качественному составу ацильных антоцианов. Плоды *Vaccinium uliginosum* L. имеют иной, чем плоды *Vaccinium corymbosum* L., спектр извлекаемых соединений.

Список литературы:

1. Шабуня П.С. и др. Состав антоцианового комплекса различных сортов *Vaccinium corymbosum* L. и *Vaccinium uliginosum* L. // Труды Белорусского государственного университета. Сер. «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2011. – Т. 4, ч. 2.
2. Nicouea Eugene Emile et al. Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, Vol.55, p. 5626–5635.
3. Wu X., Prior R.L. Systematic Identification and characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in the United States: Fruits and Berries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, Vol.53, p. 2589–2599.
4. Borges G. et al. Identification of Flavonoid and Phenolic Antioxidants in Black Currants, Blueberries, Raspberries, Red Currants, and Cranberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, Vol.58, p. 3901–3909.
5. Mi Jin Cho et al. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by HPLC/MS. J Sci Food Agric, 2004, vol. 84, p. 1771–1782.

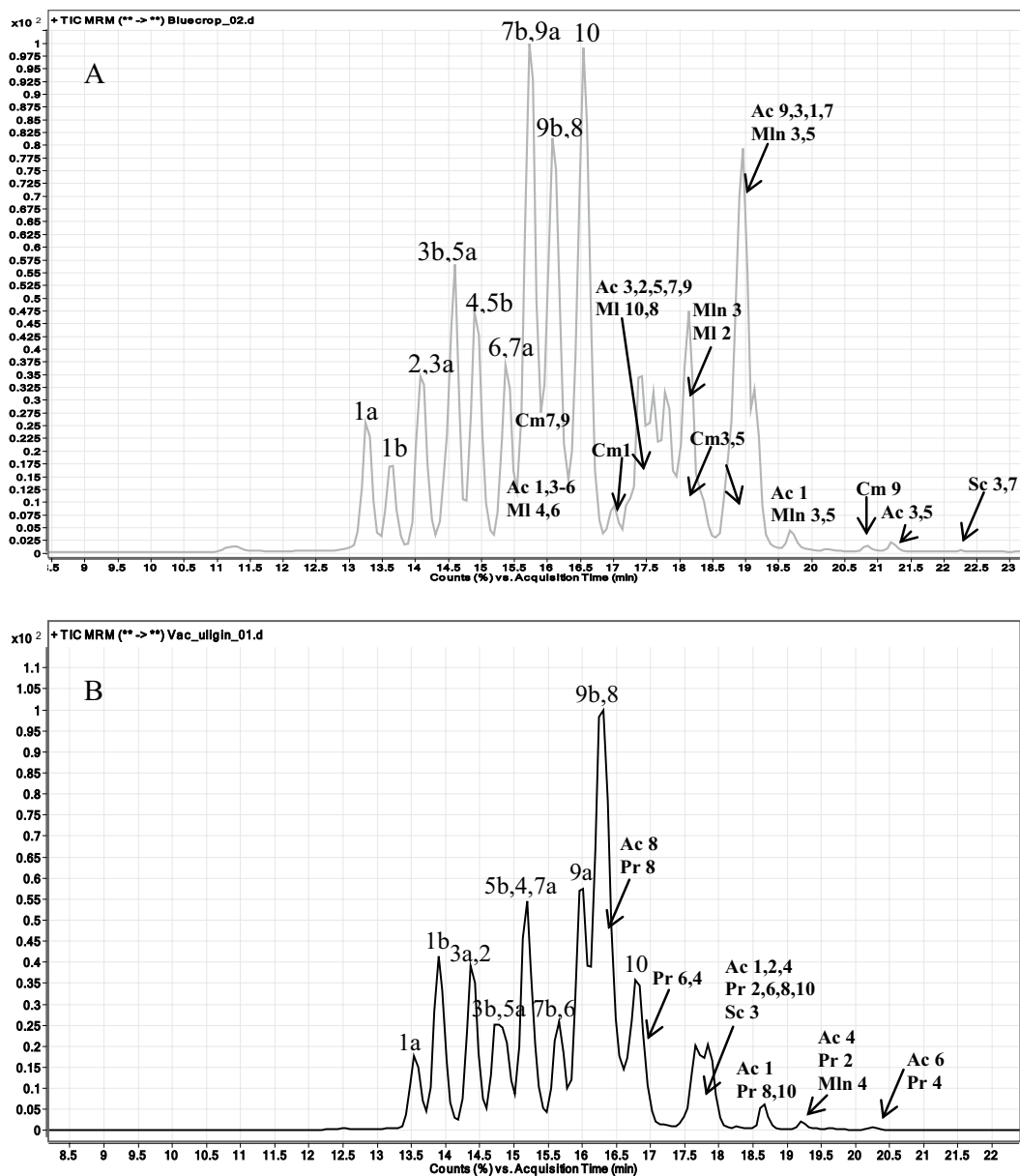


Рис.1. Хроматограммы общего ионного тока для экстрактов плодов сорта «Bluecrop» (A) и *Vaccinium uliginosum* L. (B). Цифрами обозначены неацилированные гликозиды антоцианов (см. таблицу 1). Ac – ацетил, Cm – кумарил, MI – малил, Mln – малонил, Pr – пропионил, Sc – сукцинил.