



УДК 543.54:547.973

Определение антоцианового состава плодов красной смородины методом обращенно-фазовой ВЭЖХ

Дейнека В.И.¹, Чулков А.Н.², Дейнека Л.А.¹, Сорокопудов В.Н.¹

¹ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
Белгород

²ФГБУ Белгородский филиал «Центр оценки качества зерна и продуктов его переработки», Белгород

Поступила в редакцию 11.05.2015 г.

Методом обращенно-фазовой ВЭЖХ со спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием определен антоциановый состав плодов с красной окраской нескольких сортов смородин, выращиваемых в частных хозяйствах Курска. Построена карта разделения всех компонентов в элюентах системы «ацетонитрил – вода – 10 об. % HCOOH» и показаны возможности метода для определения индивидуальных антоцианов. Обсуждаются аналитические особенности дифференциации антоцианов с использованием хроматографических параметров, электронных спектров и масс-спектров, записанных в режиме электроспрея. Установлено, что найденные антоцианы построены практически исключительно на цианидине, при этом, считая стартовым антоцианом цианидин-3-глюкозид, полный набор антоцианов может быть обеспечен действием трех ферментов.

Ключевые слова: антоцианы, карта разделения, красноплодные смородины, *Ribes*, ВЭЖХ

Determination of anthocyanin composition of red currant fruits by RP HPLC

Deineka V.I.¹, Chulkov A.N.², Deineka L.A.¹, Sorokopudov V.N.¹

¹Belgorod National Research University, Russia, Belgorod

²Belgorod Branch of Federal State-Funded Institution «Federal Centre of Quality and Safety Assurance for Grain and Grain products», Belgorod

By means of RP HPLC with spectrophotometric and mass-spectrometric detection the anthocyanin patterns of red colored currant varieties fruits harvested in Kursk have been determined. The separation map of all main components in eluent system of «acetonitrile – water - 10 vol. % of HCOOH» was built revealing possibilities of the system to determine the individual compounds. Particularities of solute differentiation by means of relative retention parameters, electron spectra as well as mass-spectra for ESI-mode are discussed. All the solutes were found to be composed by a single aglicon – cyanidin; the full spectrum of derivatives was described by cyanidine-3-glucoside transformation under activity of three specific enzymes giving rise to three types of anthocyanin complexes. The first type includes cultivars with all of six possible glycosides which are synthesized by RT (6''-rhamnosyltransferase), 2''XT (2''-xylosyltransferase) and 2''GT (2''-glucosyltransferase). For the second type of complexes a loss of 2''GT is a characteristic fixture, while the third type has a simplest composition due to activity of the lonely RT. The Viksne variety had a largest anthocyanin accumulation (above 140 mg per 100 g of fresh fruits).

Keywords: anthocyanins, separation map, red colored fruit currants, *Ribes*, HPLC

Введение

В нашей лаборатории было проведено многолетнее исследование антоцианов плодов (точнее кожицы плодов) большого числа сортов черной смородины (*Ribes nigrum* L.) и плодов черной окраски некоторых других видов смородин (*R. aureum* Pursh., *R. americanum* Mill., *R. lacustre* (Pers.) Poir.) с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). С учетом анализа литературных данных и полученных нами результатов мы пришли к выводу о том, что плоды этих видов смородины по антоциановому составу качественно схожи между собой: они образованы четырьмя основными компонентами - 3-глюкозидами и 3-рутинозидами дельфинидина и цианидина; реже встречаются сорта, содержащие дополнительно заметное количество производных петунидина. Строго говоря, число минорных пиков на хроматограммах достаточно высоко, но их влияние на многие свойства (антиоксидантную активность или красящую способность) незначительно. По этой причине плоды черной смородины, доступные круглый год в замороженном виде на прилавках магазинов, можно использовать как источник своеобразной дешевой смеси стандартных веществ с легко идентифицируемыми компонентами [1].

Относительно так называемой «красной смородины» литературных данных по антоциановому составу намного меньше, чем по черной смородине. С одной стороны, ограниченный интерес к этим объектам, вероятно, может быть связан с тем, что уровень накопления антоцианов в ее плодах значительно уступает плодам черной смородины, хотя плоды новых сортов красной смородины с темной окраской уже доступны (в том числе и на рынке Белгорода). Но, с другой стороны, число видов смородин с красной окраской плодов велико, и некоторые из них использованы при выведении известных и новых сортов. В таком случае можно было бы предположить интерес к антоциановому составу плодов, по крайней мере, с точки зрения хемосистематики с контролем наследования соответствующих признаков при гибридизации. Наконец, надежное знание антоцианового состава и возможных вариаций в нем является необходимым для определения подлинности и установления фальсификации продуктов переработки растительного сырья.

Данная работа посвящена анализу методом обращенно-фазовой ВЭЖХ антоцианового состава окрашенных в красный цвет плодов ряда сортов и видов смородин, реально выращиваемых в настоящее время, и рассмотрению некоторых условий пробоподготовки, приводящих к появлению артефактов.

Эксперимент

Плоды урожая 2014 г были получены с частного участка в Курской области. Антоцианы экстрагировали из плодов настаиванием в 0.1 М водном растворе HCl и перед хроматографированием очищали методом твердофазной экстракции на патронах ДИАПАК C18 (БиоХимМак СТ, Москва). Суммарное содержание антоцианов находили по дифференциальному спектрофотометрическому методу [4] с пересчетом на цианидин-3-глюкозида хлорид.

Определение антоцианового состава проводили методом ВЭЖХ на оборудовании Agilent 1200 Infinity с двумя детекторами – диодно-матричным (электронные спектры записывали в ячейке детектора) и масс-спектрометрическим с ионизацией электроспреем. Для исследования закономерностей удерживания антоцианов в обращенно-фазовой ВЭЖХ использовали диодно-матричный детектор

и хроматографическую колонку 250×4.6 мм Symmetry C18, 5мкм, а для записи масс-спектров – колонку 150×2.1 мм Kromasil-100 5C18. В работе использовали подвижные фазы, содержащие 10 об. % муравьиной кислоты, заданный объем ацетонитрила и дистиллированную воду; расход составлял 1 мл/мин для традиционной колонки и 150 мкл/мин для микроколонки. Все исследования проводили при термостатировании колонки при 40°C.

Обсуждение результатов

По нашим исследованиям в плодах смородины красной окраски можно обнаружить три различающиеся типа наборов антоцианов (два из которых представлены на рис. 1) с максимальным количеством различных видов, равным шести.

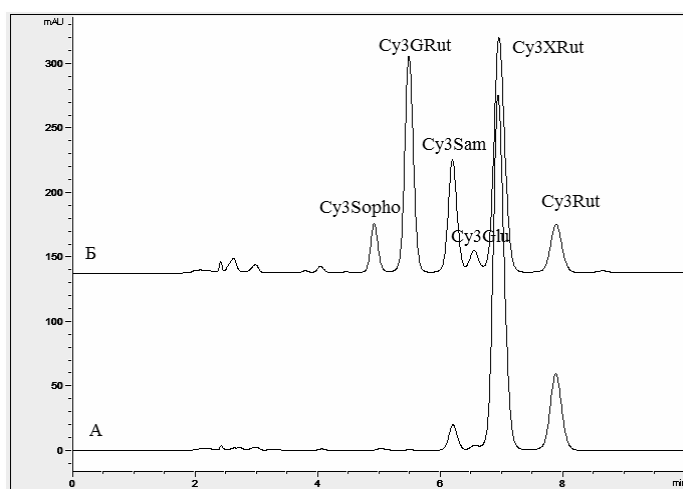


Рис. 1. Хроматограммы антоцианов плодов смородин сортов «Замок Хайтона» и «Чулковская»

Хроматографическая колонка Symmetry® C18 250×4.6 мм; 40°C. Подвижная фаза: 8 об.% ацетонитрила и 10 об.% муравьиной кислоты и 82 % воды, 1 мл/мин.

Анализ спектральных данных пиков основных антоцианов (табл. 1) всех исследованных образцов показал, что эти вещества построены только на одном антоцианидине - цианидине: два обычных (характерных и для *R. nigrum*) компонента - 3-глюкозид, Cy3Glu, **I**, и 3-рутинозид, Cy3Rut, **II**; и еще по два продукта присоединения к ним глюкозы или ксилозы по положению 2 глюкозидного радикала, что приводит к появлению: пары - цианидин-3-софорозида, Cy3Sopho, **III**, вместе с цианидин-3-(2''-глюкозилрутинозидом), Cy3GRut, **IV**, и пары - цианидин-3-самбубиозида, Cy3Sam, **V**, вместе с цианидин-3-(2''-ксилозилрутинозидом), Cy3XRut, **VI**.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что результаты классической работы J.B. Harborne и E. Hall [2] по биохимии смородин с красной окраской плодов, оказываются актуальными и в настоящее время. Т.е. время и постоянно проводимая селекция новых сортов не привели к выходу за пределы наследований свойств, установленных в цитируемой работе. При этом существенно то, что в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ, наиболее часто используемого в настоящее время метода (благодаря возможности записи электронных спектров или масс-спектров при использовании соответствующих детекторов для идентификации компонентов сложных смесей), эти шесть компонентов имеют достаточно близкие времена

удерживания и существует опасность соэлюирования некоторых из указанных антоцианов.

Таблица 1. Основные параметры антоцианов плодов смородины с плодами с красной окраской

№	Название	Параметр	Антоцианы					
			III	IV	V	VI	I	II
1	Параметры относительного удерживания	a_0	-0.26	-0.19	-0.06	-0.02	0	0.09
		a_1	1.16	1.32	1.12	1.28	1.00	1.14
2	Время удерживания, мин, в элюенте	10% HCOOH, 8% CH ₃ CN, 82% H ₂ O	6.30	7.19	7.93	9.34	8.21	10.44
3	λ_{\max} , нм		517.0	518.5	517.0	518.5	515.5	517.5
4	Параметры масс-спектра	m/z	611.1, 287.0	757.2, 287.0	581.1, 287.0	727.2, 287.0	449.1, 287.0	595.2, 287.0

На рис. 2 представлена карта разделения всех перечисленных выше шести производных цианидина, построенная по методу относительного анализа удерживания [3]. В методе относительного анализа удерживания логарифм фактора удерживания каждого из компонентов, $\lg k(i)$, линейно связан с логарифмом фактора удерживания **I**:

$$\lg k(i) = a_0 + a_1 \cdot \lg k(\mathbf{I}).$$

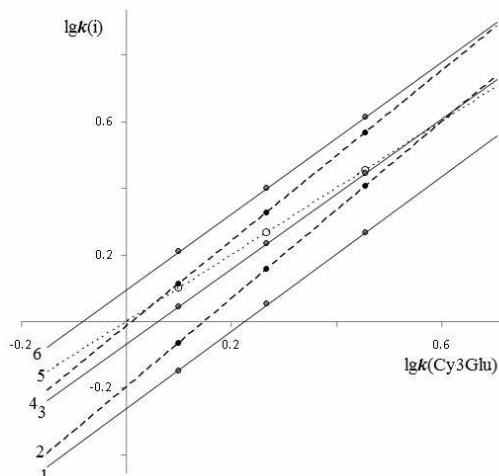


Рис.2. Карта разделения антоцианов красной смородины
Линии трендов для антоцианов: 1- III; 2 - IV; 3 - V; 4 - VI; 5 – I; 6 - II.
Хроматографическая колонка Symmetry® C18 250×4.6 мм; 40°C

Карта разделения составлена для стационарной фазы Symmetry C18 и подвижных фаз системы «10 об.% HCOOH–ацетонитрил–вода», но при смене стационарных фаз, по нашему опыту, такие карты остаются, в крайнем случае, качественно подобными.

Как видно из представленных данных, разделение всех шести компонентов является не простой задачей – существуют составы подвижной фазы, в которых некоторые компоненты соэлюируются и даже происходит инверсия времен удерживания антоцианов. Построение такой карты позволит скорректировать хроматографические условия разделения сложных смесей антоцианов не только

плодов красной смородины, но также плодов вишни (*Cerasus vulgaris* L.), черноплодной малины (*Rubus occidentalis* L.) и калины (*Viburnum* sp.).

Отметим, что по данным, представленным в табл.1, существует три способа дифференциации антоцианов:

1) в электронных спектрах максимум сдвигается на 1-1.5 нм батохромно при добавлении нового радикала углевода;

2) параметр a_1 уравнения относительного удерживания также растет при добавлении радикала углевода, что не удивительно, поскольку этот параметр чувствителен к сумме дисперсионных взаимодействий между сорбентом и сорбатом, которая растет по мере добавления новых атомов;

3) масс-спектры позволяют определить массу не только молекулярных ионов, но и, при частичной фрагментации, которая усиливается при увеличении напряжения на фрагменторе (от 100 до 200 В и выше), - агликона, образующегося при отщеплении всех радикалов углеводов.

По суммарному уровню накопления антоцианов в плодах красные смородины не относятся к богатым источникам, поскольку в них накапливается от 0.021 г (сорт Латурнайс) до 0.106 г (сорт Ильинка) антоцианов (в пересчете на цианидин-3-глюкозида хлорид) на 100 г свежих плодов. Самыми ценными в этом отношении среди них из исследованных в настоящей работе оказались темноокрашенные плоды сорта Виксне – до 0.143 г на 100 г (табл.2).

Таблица 2. Антоцианы плодов некоторых смородин с красной окраской плодов

N	Название	Доля антоцианов по площадям пиков, %						α , относительная активность ферментов, %			мг/100 г плодов*
		III	IV	V	VI	I	II	RT	GT	XT	
1	Голландская красная	5.5	28.0	14.2	37.1	2.8	8.4	73.5	33.5	51.3	26
2	Файя плодородная	5.5	27.8	15.0	37.2	2.8	8.3	73.3	33.3	52.2	22
3	Чулковская	5.2	27.4	14.8	37.4	2.9	8.3	73.1	32.6	52.2	23
4	Красный крест	5.5	27.8	15.0	36.0	3.1	8.6	72.4	33.3	51.0	23
5	Латурнайс	4.6	29.9	12.0	31.1	3.0	9.9	70.9	34.5	43.1	21
6	Крюковская	7.0	24.4	20.8	34.0	3.2	7.3	65.7	31.4	54.8	22
7	Светлана	7.3	24.9	20.9	33.2	3.5	7.5	65.6	32.2	54.1	24
8	<i>R. warszewiczii</i>	9.5	8.4	41.9	28.1	3.5	3.3	39.8	17.9	70.0	49
9	Английская	9.4	8.0	42.4	26.1	4.9	3.6	37.7	17.4	68.5	45
10	Герой	сл.	сл.	3.2	77.0	0.3	17.6	94.6	0.0	80.2	45
11	Неизвестный	сл.	сл.	4.0	71.4	0.9	22.9	94.3	0.0	75.4	28
12	Замок Хаутона	сл.	сл.	4.1	75.5	0.6	17.5	93.0	0.0	79.6	27
13	Лучезарная	сл.	0.2	4.5	66.1	1.2	25.5	91.8	0.2	70.6	32
14	Осиповская	сл.	сл.	7.4	67.1	1.0	19.8	87.9	0.0	74.5	33
15	Виксне	0.1	0.2	15.8	66.5	0.9	17.0	83.7	0.3	84.3	143
16	Бараба	сл.	сл.	30.0	54.1	1.5	12.3	66.4	0.0	84.1	102
17	Хрустящая	сл.	сл.	30.0	53.5	0.9	13.6	67.1	0.0	83.5	44
18	Ильинка	сл.	сл.	30.5	53.5	1.2	12.4	65.9	0.0	84.0	106
19	Виктория	сл.	сл.	4.3	0.9	72.0	19.3	20.2	0.0	5.2	30
20	<i>R. alpinum</i>	сл.	сл.	сл.	2.4	43.6	53.3	55.7	0.0	2.4	46

* - сумма антоцианов, в пересчете на цианидин-3-глюкозида хлорид

Для целей хемосистематики антоциановый состав удобнее представлять не в виде долей, приходящихся на каждый из антоцианов, а суммировать доли антоцианов, образование которых обеспечено действием одного и того же фермента. Так, относительную активность рамнозилтрансферазы, $\alpha(\text{RT})$, можно оценить, суммируя доли **II**, **IV** и **VI**:

$$\alpha(\text{RT}) = \alpha(\text{II}) + \alpha(\text{IV}) + \alpha(\text{VI}).$$

Относительная активность 2''-глюкозилтрансферазы (2''GT) и 2''-ксилозилтрансферазы (2''XT) может быть найдена по формулам, учитывающим долю цианидин-3-софорозида (Cy3Sopho) и цианидин-3-самбубиозида (Cy3Sam), соответственно:

$$\alpha(2''\text{GT}) = \alpha(\text{III}) + \alpha(\text{IV}),$$

$$\alpha(2''\text{XT}) = \alpha(\text{V}) + \alpha(\text{VI}).$$

В соответствие с данными работы [2], антоцианы плодов красной смородины, при гибридизации которой были использованы виды и гибриды *R. × futurum* Jancz., *R. × robustum* Jancz., *Ribes × koehneanum* Jancz. и *Ribes warszewiczii* Jancz., накапливали все шесть антоцианов. Из исследованного в настоящей работе списка плодов красной смородины к таковым относятся плоды смородины Варшевича и еще 8 гибридных сортов, причем два образца смородины Чулковской (второй из них указан под названием смородина Крючковская) имели действительно близкий видовой состав всех шести антоцианов, табл.2. Лишь немногим большей оказалась группа смородин, у которых 2''-глюкозилтрансфераза практически не активна. Такие сорта относят к гибридам, полученным с участием *R. sativum* (Rchb.) Syme., *R. × holocericeum* Otto & A.Dietr., *R. × gondouini* Jancz. и *R. rubrum* L. [2]. А сортов, в которых бы, наоборот, была высока активность 2''-глюкозилтрансферазы и отсутствовала активность 2''-ксилозилтрансферазы (приписывают [2] смородине вида *R. multiflorum* Kit. ex Schult.) среди доступных нам сортов не обнаружено, сорт Виктория по низкой активности обоих указанных ферментов близок к *R. alpinium* L.

Заключение

Таким образом, существуют условия, при которых методом обращенно-фазовой ВЭЖХ могут быть разделены все компоненты антоциановых комплексов смородин с красной окраской плодов. При этом биосинтез всех антоцианов и метод описания состава антоцианового комплекса их может быть обеспечен функционированием (или учетом активности) трех специфических ферментов.

Список литературы

1. Дейнека Л.А., Шапошник Е.И., Гостищев Д.А. и др. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т. 9. Вып.4. С. 529-536.
2. Harborne J.B., Hall E. // Phytochem. 1964. Vol. 3, pp. 453-463.
3. Дейнека В.И. // Ж. физ. химии. 2006. Т.80. № 3. С. 511-516.
4. Lee J., Durst R.W., Wrolstad R.W. // J. AOAC Internat. 2005. Vol. 88, pp. 1269-1278.

References

1. Deineka L.A., Shaposhnik E.I., Gostyshchev D.A. et al., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2009, Vol. 9, No 4, pp. 529-536.

2. Harborne J.B., Hall E., *Phytochem.*, 1964, Vol. 3, pp. 453-463.

3. Deineka V.I., *Russian J. Phys. Chem.*, 2006, Vol. 80, pp. 429-434.

4. Lee J., Durst R.W., Wrolstad R.W., *J. AOAC Internat.*, 2005, Vol. 88, pp. 1269-1278.

Дейнека Виктор Иванович – д.х.н. профессор кафедры общей химии НИУ БелГУ, Белгород

Чулков Андрей Николаевич – сотрудник Белгородского филиала «Центр оценки качества зерна и продуктов его переработки», Белгород

Дейнека Людмила Александровна – к.х.н. доцент кафедры общей химии НИУ БелГУ, Белгород

Сорокопудов Владимир Николаевич – д.с.н. профессор кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии Медицинского института НИУ БелГУ, Белгород

Deineka Victor I. – Dr.Sci. (Chemistry), professor, Belgorod National Research University, Belgorod, E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Chulkov Andrey N. – Belgorod Branch of Federal State-Funded Institution «Federal Centre of Quality and Safety Assurance for Grain and Grain products», Belgorod, E-mail: Ach87@mail.ru.

Deineka Ludmila A. Ph.D. (Chemistry) Belgorod National Research University, Belgorod, E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Sorokopudov Vladimir N. Dr.Sci. (Agriculture), professor, Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy Chair, Belgorod National Research University, Belgorod, E-mail: sorokopudov@bsu.edu.ru