



УДК 543.54:547.97

## ВЭЖХ в контроле антоцианового состава плодов черной смородины

Дейнека Л.А., Шапошник Е.И., Гостищев Д.А.,  
Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н.

*Белгородский государственный университет, Белгород*

Селеменев В.Ф.

*ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж*

Поступила в редакцию 23.03.2009 г.

### Аннотация

В работе хроматографическим и спектрофотометрическим методами исследовано количественное и качественное накопление антоцианов в плодах семи сортов черной смородины в условиях г. Белгорода. Показано, что антоциановый состав плодов отличается качественным постоянством. Тонкую дифференциацию плодов предложено осуществлять по активности ферментов метаболизма флавоноидов.

**Ключевые слова:** антоцианы, *Ribes nigrum*, ВЭЖХ

The paper is devoted to investigation of anthocyanins accumulation in fruits of seven black currant varieties harvested in Belgorod by means of spectrophotometric and chromatographic methods. The type of the anthocyanins composition seemed to be qualitatively rather constant. A fine differentiation of the varieties is proposed to perform taking into account enzyme of flavonoid pathway biosynthesis activity.

**Key words:** anthocyanins, *Ribes nigrum*, HPLC

### Введение

Черная смородина в настоящее время относится к важным садовым растениям. Родиной *Ribes nigrum* считается центральная и северная Европа [1] а также северная Азия – растения этого региона иногда выделяют в отдельный подвид - *Ribes nigrum* var. *sibiricum* или даже вид - *Ribes cyathiforme*. Популярность этого растения не случайна – во время второй мировой войны в Великобритании источники аскорбиновой кислоты, такие как апельсины, оказались труднодоступными, поэтому правительство стимулировало разведение черной смородины, плоды которой отличаются высоким накоплением этого витамина. С 1942 года практически весь урожай черной смородины перерабатывался на сок для

бесплатного распространения детям (<http://en.wikipedia.org/wiki/Blackcurrant>). Впрочем, первые упоминания о смородине в медицинских трудах датируются XV веком, а на Руси черная смородина известна с XI века [2].

Смородина входит в семейство *Grossulariaceae* (крыжовниковые) в качестве единственного рода, хотя иногда в отдельный род выделяют крыжовник (*Grossularia*). Известно более 150 видов *Ribes*, распространенных в умеренно теплых и субтропических областях северного полушария, а также в горных районах Центральной и Южной Америки до огненной Земли [3]. Это растения, существенно различающиеся по росту, форме листьев, окраске цветков и плодов. Но в каждом регионе России население хорошо знает вкусные ягоды местных видов смородины с региональными названиями: кислица, алданский виноград, моховка, таранушка, поречка [1].

Особое внимание к черной смородине в последнее время связано с обнаружением благоприятного воздействия антоцианов плодов этого растения на зрительный аппарат человека, особенно для снятия утомления от длительной работы у дисплеев современных компьютеров [4]. Поэтому неудивительно, что исследованиям, связанным с антоцианами плодов черной смородины, например, только в журнале «Journal of Agricultural and Food Chemistry» посвящено более 15 статей. Это примечательно, поскольку информацию об антоцианах плодов других видов смородин обнаружить в научной литературе довольно проблематично.

Данная работа посвящена определению антоцианов плодов некоторых сортов черной смородины и некоторых других видов смородины, выращенных в Ботаническом саду Белгородского государственного университета.

## Эксперимент

Плоды черной смородины собирали в Ботаническом саду Белгородского университета в сезоне 2008 г. Антоцианы из плодов экстрагировали 0,1 М раствором соляной кислоты до обесцвечивания нерастворимого остатка.

Спектрофотометрическое определение суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозид выполняли по методике [5].

Для гидролиза экстракт смешивали с 20 %-ным раствором серной кислоты в соотношении 1:1 и выдерживали на кипящей водяной бане до 45 мин.

Перед хроматографическим определением антоцианы очищали от сопутствующих веществ, на патронах ДИАПАК C18.

Для обращено-фазовой ВЭЖХ использовали хроматографическую систему, составленную из насоса высокого давления Beckman 110B, крана дозатора Rheodyne 7100 с петлей объемом 20 мкл, детектора LC/9563 Nicolet, длина волны детектирования 520 нм. Для регистрации и обработки хроматограмм использовали ПП Мультихром 1.5 (Ampersand Ltd. 2005). Хроматографические условия: колонка 250×4 мм, Диасфер-110-C18, 5 мкм; подвижные фазы системы “ацетонитрил – ацетон”, скорость подачи элюента 1 мл/мин.

Спектрофотометрические исследования выполняли в кварцевых кюветах с использованием фотоколориметра КФК-3-01.

## Результаты и их обсуждение

Известно, что накопление биологически активных соединений в различных частях растений данного вида может зависеть от многих факторов, включающих

сорт, степень созревания, условия выращивания и т.д. В таких случаях количественному определению соединений предшествует установление их строения. Анализ результатов определения антоцианов во всех известных публикациях в научной печати показал, что набор четырех главных компонент – 3-глюкозидов и 3-рутинозидов дельфинидина и цианидина, - оказывается неизменным для плодов всех сортов *R. nigrum* с черной окраской, вне зависимости от сорта и региона выращивания. Следовательно, генетически детерминированное подавление синтеза метилтрансфераз, приводящих к появлению в антоциановых комплексах производных пеонида (в цианидиновом ряду) или мальвидина и петунидина (в дельфинидиновом ряду) [6], является важной биохимической характеристикой черной смородины. Кстати гидроксирование кольца В заканчивается на дигидрокверцетине (предшественнике цианидина) и не синтезируется дигидромирицетин (предшественник дельфинидина) в доступных нам видах смородин с красными плодами [7]. Обнаружение в некоторых случаях в плодах черной смородины небольшого количества производных петунидина и пеонида [8] лишь подтверждает этот вывод.

Хроматографический профиль антоцианового комплекса плодов черной смородины также оказался практически неизменным во всех опубликованных работах, несмотря на то, что использовались различные стационарные обращенные фазы и различные элюенты как в изократическом, так и в градиентном исполнении. Времена удерживания увеличивались в ряду антоцианов:

$$t_R(\text{Dp-3-Glu}) < t_R(\text{Dp-3-Rut}) < t_R(\text{Cy-3-Glu}) < t_R(\text{Cy-3-Rut}),$$

где Dp – дельфинидин; Cy – цианидин; Glu – глюкозид; Rut – рутинозид.

По указанным выше причинам возможен отказ от использования труднодоступных и дорогостоящих технологий (масс- или ЯМР-спектроскопии) для подтверждения строения компонентов полученных нами экстрактов. Тем более что новая технология анализа относительного удерживания [9] позволяет воспользоваться обобщенными характеристиками относительного удерживания, в меньшей степени зависящими от свойств стационарных обращенных фаз для данной элюентной системы при изократическом элюировании. Так на рис.1 представлены зависимости удерживания 3-рутинозидов относительно 3-глюкозидов для двух антоцианидинов: цианидина и дельфинидина, - для элюентов системы «вода – ацетонитрил – 10 об. % муравьиной кислоты».

При этом общее для производных цианидина и дельфинидина уравнение

$$\lg k(X-3-Rut) = 1.122 \cdot \lg k(X-3-Glu) + 0.050$$

оказывается справедливым для трех различных марок стационарных фаз четырех хроматографических колонок, и свидетельствует о том, что в разумных составах подвижных фаз глюкозиды будут элюироваться до рутинозидов. Также очевидно, что в условиях обращено-фазовой хроматографии более гидроксированные производные дельфинидина должны элюироваться раньше аналогичных производных цианидина, а в «быстрых» элюентах различие в удерживании глюкозидов и рутинозидов может быть недостаточным для их разделения.

На хроматограммах экстрактов плодов всех исследованных в работе сортов черной смородины были обнаружены четыре основных пика, идентифицируемые как 3-рутинозиды и 3-глюкозиды цианидина и дельфинидина (рис.2).

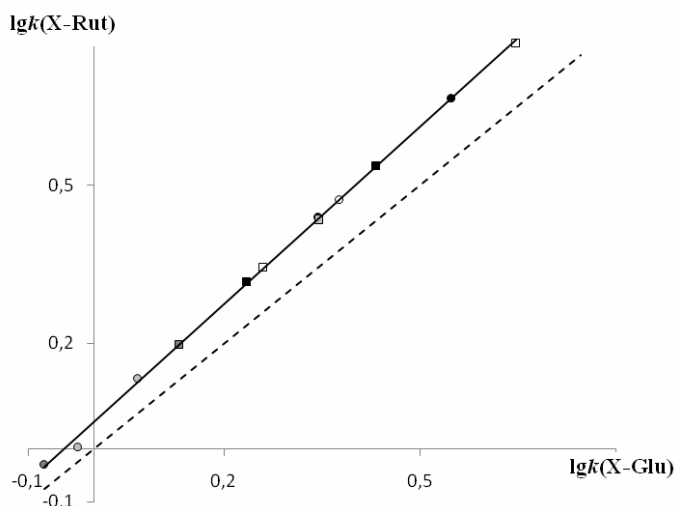


Рис.1. Удерживание 3-рутинозидов относительно 3-глюкозидов двух антоцианидинов

○ - X = Dp; □ - X = Cy; различная заливка соответствует различным стационарным фазам – черная и белая – Диасфер-110-C18 (колонки 250×4 и 150×4 мм); темно-серая – Ultrasphere ODS (колонка 250×4.6 мм); светло-серая – Reprosil-pur C18AQ (колонка 250×4 мм)

Предложенное на рис.2 отнесение было подтверждено частичным гидролизом экстракта (рис.3). В исходных экстрактах доля 3-рутинозидов значительно выше доли 3-глюкозидов, но при отщеплении рамнозильного радикала 3-рутинозиды превращаются в 3-глюкозиды, поэтому уже через 5 мин кипячения концентрации 3-рутинозидов и 3-глюкозидов практически выравниваются, а после 20 мин остается лишь небольшое количество 3-рутинозидов (рис.3).

Образующиеся при этом агликоны удерживаются сильнее, поэтому для контроля их образования следует использовать более быстрые элюенты, в которых уже не разделяются 3-глюкозиды и 3-рутинозиды (рис.4).

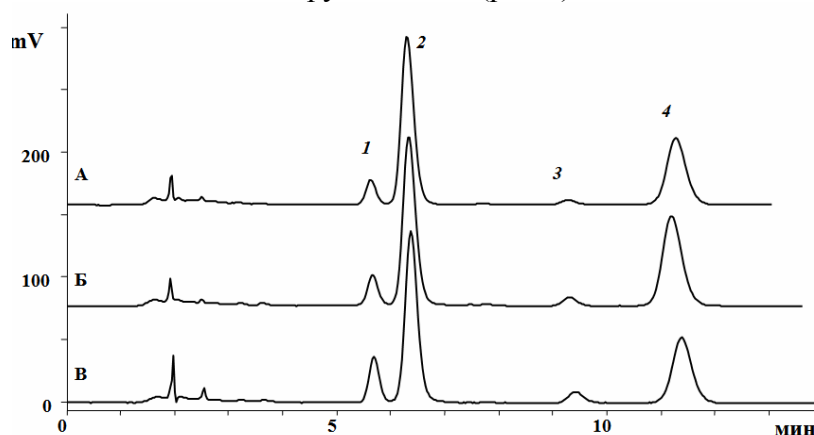


Рис.2. Разделение антоцианов плодов черной смородины  
Сорта: А – «Орловский вальс»; Б – «Зуша»; В – «Белорусская сладкая».  
1 – Dp-3-Glu; 2 – Dp-3-Rut; 3 – Cy-3-Glu; 4 – Cy-3-Rut.

Колонка 250×4 мм, Диасфер-110-C18, 5 мкм, Подвижная фаза 10 об.% ацетонитрила и 10 об % муравьиной кислоты в воде, 1 мл/мин. Детектор УФ: 520 нм

Принадлежность пика 6 на рис.4 цианидину была подтверждена сопоставлением с удерживанием цианидина, полученного восстановлением

кверцетина цинковой пылью в солянокислом растворе. Соответствие пика 5 дельфинидину подтверждено спектрофотометрически – по смещению максимума абсорбции при добавлении  $AlCl_3$  [10].

При отсутствии труднодоступных стандартных (четырёх) соединений, когда абсолютная точность определения лишена смысла, можно воспользоваться иным подходом, который и применяли в настоящей работе. По этому подходу спектрофотометрически [5] определяли общее содержание антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозид, а молярное соотношение между индивидуальными антоцианами оценивали по соотношению площадей соответствующих пиков. Последнее в целом оправдано при использовании изократического элюирования, но при часто используемом градиентном элюировании следует учитывать, что последовательные пики элюируются в подвижной фазе с различной концентрацией органического модификатора. Но при изменении концентрации органического модификатора изменяется и положение максимума абсорбции, и коэффициенты молярного погашения (рис.5).

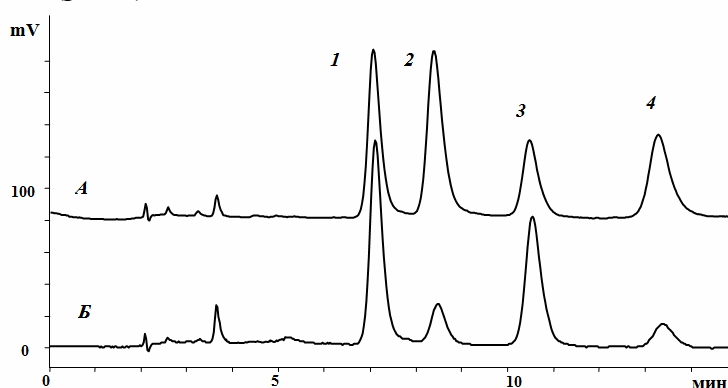


Рис.3. Разделение продуктов частичного гидролиза антоцианов плодов черной смородины

Время гидролиза: А – 5 мин, В – 30 мин. Колонка 250×4 мм, Reprosil-pur-C18AQ, 5 мкм, Подвижная фаза 10 об.% ацетонитрила и 10 об % муравьиной кислоты в воде, 1 мл/мин. Детектор УФ: 520 нм. 1 – Dp-3-Glu; 2 – Dp-3-Rut; 3 – Cy-3-Glu; 4 – Cy-3-Rut

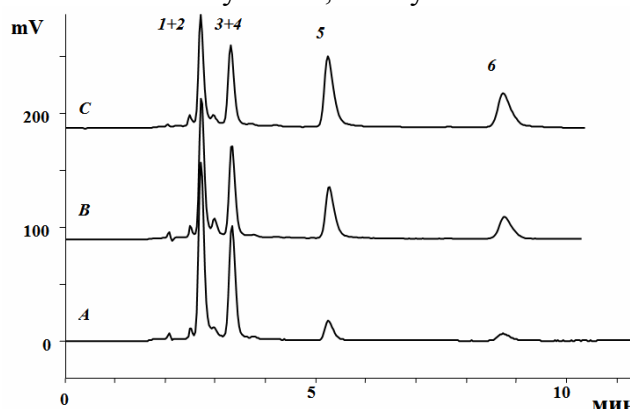


Рис.4. Разделение продуктов частичного гидролиза антоцианов плодов черной смородины

Время гидролиза: А – 5 мин, В – 20 мин, С - 30 мин. Колонка 250×4 мм, Reprosil-pur-C18AQ, 5 мкм, Подвижная фаза 17 об.% ацетонитрила и 10 об % муравьиной кислоты в воде, 1 мл/мин. Детектор УФ: 520 нм. 1 – Dp-3-Glu; 2 – Dp-3-Rut; 3 – Cy-3-Glu; 4 – Cy-3-Rut; 5 – Dp; 6 – Cy

Таким образом, при градиентном элюировании градуировка по каждому из компонентов принципиально необходима, хотя на рис.5 присутствует точка, напоминающая изобестическую (510 нм), при которой коэффициент экстинкции не изменяется с изменением состава растворителя.

Для плодов 7 сортов черной смородины урожая 2008 года уровень накопления антоцианов заметно различается. Наивысшее накопление антоцианов отличает сорта «Лентяй» и «Грация», а в плодах сорта «Бинар» этих соединений найдено вдвое меньше. При этом для всех исследованных сортов высока активность ферментов, гидроксилирующих кольцо В флавонолов и ферментов, синтезирующих рутинозиды. Впрочем, самая низкая активность флавонол-гидроксидаз сопряжена с наименьшим суммарным накоплением антоцианов (для сорта «Бинар»).

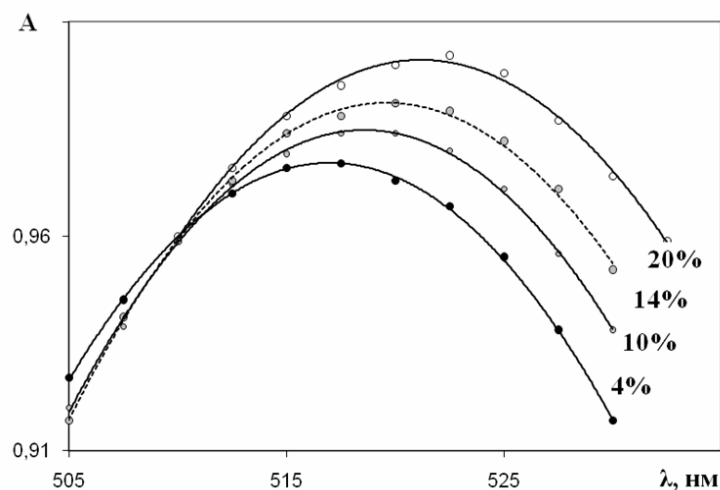


Рис.5. Изменение спектров экстракта плодов черной смородины в водных растворах с 10 об. % муравьиной кислоты и с различным содержанием ацетонитрила

Таблица 1. Антоцианы плодов черной смородины ботанического сада БелГУ

№	Сорт	Антоцианы, моль %, $\pm 1.0$						мг* / 100 г
		Dp3G	Dp3R	Cy3G	Cy3R	Dp	Rut	
1	Белорусская сладкая	11.4	52.3	4.8	31.5	63.7	83.8	251 $\pm$ 18
2	Орловский вальс	6.8	56.8	2.1	34.3	63.5	91.1	249 $\pm$ 5
3	Элевеста	14.0	49.0	5.1	31.9	63.0	80.9	301 $\pm$ 22
4	Зуша	7.1	50.5	2.9	39.5	57.7	90.0	324 $\pm$ 1
5	Лентяй	5.4	51.0	2.0	41.6	56.4	92.6	341 $\pm$ 18
6	Грация	5.8	50.3	2.6	41.2	56.2	91.5	344 $\pm$ 22
7	Бинар	9.2	43.3	5.1	42.4	52.5	85.7	154 $\pm$ 19

\* - в пересчете на цианидин-3-глюкозид.

В таблице приведены два параметра, первый из которых оценивает активность флавонол-гидроксилаз (как суммарная доля производных более гидроксилированного антоцианидина – дельфинидина, *Dp*), а второй – активность ферментов, отвечающих за присоединение рамнозы к глюкозидному радикалу обоих антоцианидин-3-глюкозидов, *R* – сумма долей 3-рутинозидов.

Уровень накопления антоцианов в плодах черной смородины лучших в этом отношении из исследованных сортов заметно выше, чем в сортах селекции британских садоводов [11], но уступает показателям, достигнутым литовскими

специалистами [12]. Возможно, что это является следствием климатических условий выращивания черной смородины, поскольку в разные годы при различных погодных условиях выращивания этой культуры в Белгороде нами были получены различные результаты, в том числе и не превышающие 200 мг на 100 г свежих плодов. Но при этом различия в антоциановом составе оказываются заметно меньше (табл.2).

Таблица 2. Антоцианы плодов черной смородины некоторых стран

№	Страна	Антоцианы, моль %, $\pm 1.0$					
		Dp3G	Dp3R	Cy3G	Cy3R	Dp	Rut
1	Литва [12]	11.24	33.74	8.4	44.14	44.98	77.88
2	Великобритания [11]	9.89	36.90	6.17	47.04	46.79	83.94
3		12.44	44.80	5.45	37.31	57.23	82.11
4		10.02	37.73	6.44	45.81	47.74	83.54
5		9.84	41.12	5.87	40.39	53.59	84.14
6		9.35	41.12	5.87	43.66	50.47	84.78
7	выжимки [13]:	15.8	46.2	4.5	27.1	62.0	73.3
8	выжимки [13]:	16.9	49.4	4.3	27.4	66.3	76.8
9	Япония [4]	14.78	50.11	4.35	30.76	64.89	80.87
10	Норвегия [14]	14.0	36.6	7.1	40.2	50.6	76.8

## Заключение

Таким образом, видовой состав антоцианового комплекса плодов черной смородины отличается постоянством: основные компоненты дельфинидин-3-глюкозид, цианидин-3-рутинозид, цианидин-3-глюкозид и цианидин-3-рутинозид остаются главными компонентами вне зависимости от сорта и условий выращивания. Некоторые вариации в соотношении между этими компонентами могут быть учтены введением двух критериев, основанных на активности ферментов цепи метаболизма флавоноидов.

## Список литературы

1. Якушина Э.И., Куклина А.Г. Кустарники с чудесными плодами. М.: Московский рабочий. -1994. – С.26-42.
2. Жидехина Т. Черная смородина с зелеными ягодами // Наука и жизнь. – 2007. - №8. – С.94-95.
3. Цвелев Н.Н. Семейство крыжовниковые (*Grossulariaceae*). / Жизнь растений. В шести томах. Главный редактор академик А.Л. Тахтаджян. Том пятый. Часть вторая. М.: Просвещение. – 1981. - С.169.
4. Nakaishi H., Matsumoto H., Tominaga S., Hirayama M. Effect of black currant anthocyaniside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans // Altern. Med. Rev. – 2000. – V.5. – P.553-562.
5. Giusti M.M., Wrolstad R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy // Cur. Prot. Food Anal. Chem. – 2001. - F1.2.1-F1.2.13
6. Дейнека Л.А., Литвин Ю.Ю., Дейнека В.И. Критерии для классификации винограда по антоциановому комплексу плодов // Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки. - 2008. - №7(47). Вып.7. - С.71-78.

7. Сорокопудов В.Н., Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Шапошник Е.И. Сопоставление антоцианового состава плодов различных видов смородины // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья. Материалы II Всероссийской конференции. 21-22 апреля 2005 г. / Под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. Барнаул: Изд-во Алт.ун-та, 2005. - Книга I. С.300-302.

8. Slimestad R., Solheim H. Anthocyanins from black currants (*Ribes nigrum* L.) // J. Agric. Food Chem. – 2002. – V.50. – P.328-3231.

9. Дейнека В.И. Карта хроматографического разделения и инкрементные зависимости в методе относительного анализа удерживания в ВЭЖХ //Ж. физ. химии. - 2006. - Т.80, №3. - С. 511-516.

10. Harborne J.B. Spectral methods of characterizing anthocyanins // Biochem J. – 1958. – V.70. P.22-28.

11. Bordonaba J.G., Terry L.A. Biochemical Profiling and Chemometric Analysis of Seventeen UK-Grown Black Currant Cultivars // J. Agric. Food Chem. – 2008. – V.56. – P.7422–7430.

12. Rubinskiene M., Viskelis P., Jasutiene I., Duchovskis P., Bobinas C. Changes in biologically active constituents during ripening in black currants // J. Fruit Ornament Plant Res. – 2006. – V.14. – P. 237-246.

13. Kapasakalidis P.G., Rastall R.A., Gordon M.H. Extraction of Polyphenols from Processed Black Currant (*Ribes nigrum* L.) Residues // J. Agric. Food Chem. – 2006. – V.54 – P. 4016-4021

14. Slimestad R., Solheim H. Anthocyanins from Black Currants (*Ribes nigrum* L.) // J. Agric. Food Chem. – 2002. – V.50. – P. 3228-3231.

---

**Дейнека Людмила Александровна** – к.х.н., доцент Белгородского государственного университета, Белгород, тел. (4722) 301159

**Шапошник Елена Ивановна** – аспирант биолого-химического факультета Белгородского государственного университета, Белгород

**Гостищев Игорь Александрович** – студент биолого-химического факультета Белгородского государственного университета, Белгород

**Дейнека Виктор Иванович** – д.х.н., доцент Белгородского государственного университета, Белгород, тел. (4722) 301159

**Сорокопудов Владимир Николаевич** – д.с.-х.н., профессор Белгородского государственного университета, Белгород, тел. (4722) 301101

**Селеменев Владимир Федорович** - д.х.н, проф., зав. кафедрой аналитической химии Воронежского государственного университета, Воронеж, тел. (4732) 208362

**Deineka Ludmila A.** - Ph.D.(Chemistry), Associate professor of Belgorod State University, e-mail: [deineka@bsu.edu.ru](mailto:deineka@bsu.edu.ru)

**Shaposhnik Elena I.** - post-graduate of Biological-Chemical Department of Belgorod State University

**Gostishchev Igor A.** – Student of Biological-Chemical Department of Belgorod State University

**Deineka Viktor I.** - Dr.Sci.(Chemistry), Associate professor of Belgorod State University

**Sorokopudov Vladimir N.** – Dr.Sci.(agriculture), Professor of Belgorod State University, e-mail: [sorokopudov@bsu.edu.ru](mailto:sorokopudov@bsu.edu.ru)

**Selemenev Vladimir F.** – Dr.Sci. (Chemistry) professor of Voronezh State University, Voronezh, e-mail: [common@anch.vsu.ru](mailto:common@anch.vsu.ru)