

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
(НИУ «БелГУ»)

ИНСТИТУТА ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК  
КАФЕДРА ОБЩЕЙ ХИМИИ

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТОЦИАНОВ В НЕТРАДИЦИОННЫХ  
ИСТОЧНИКАХ БЕЛГОРОДСКОЙ ФЛОРЫ**

Выпускная квалификационная работа  
обучающегося по направлению подготовки 04.03.01 Химия  
очной формы обучения, группы 07001417  
Дроголовой Надежды Александровны

Научный руководитель  
к. х. н., доцент  
Дейнека Л.А.

БЕЛГОРОД 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1 Общая характеристика антоцианов .....	5
1.2 Химическое строение.....	6
1.3 Окраска антоцианов.....	10
1.4 Биологическая активность .....	13
1.5 Нетрадиционные источники антоцианов .....	15
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	17
2.1 Методика количественного определения суммы антоцианов методом многократной экстракции .....	17
2.2 Методика количественного определения суммы антоцианов методом растирания растительного сырья.....	18
2.3 Методика проведения подготовки для ВЭЖХ анализа.....	18
3 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	19
3.1 Нетрадиционные источники антоцианов, выделенные из растений ботанического сада «НИУ БелГУ».....	19
3.2 Нетрадиционные источники антоцианов, выделенные из растений городской флоры.....	31
3.3 Цветы – нетрадиционные источники антоцианов.....	33
ВЫВОДЫ.....	36
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	37

## ВВЕДЕНИЕ

Антоцианы являются важными для человека растительными полифенольными соединениями. Доказано их положительное влияние на организм человека, поэтому они используются как биологически активные добавки к пище, известны также лекарственные препараты на их основе.

Антоцианы находятся в различных органах растения. Состав антоцианового комплекса для каждого растения индивидуален. Качественный состав, как правило, для растений одного и того же вида одинаков. Количественный состав антоцианов зависит от множества факторов. Например, у плодов в зависимости от зрелости количество антоцианов различно. У листьев концентрация антоцианов может отличаться от периода их сбора. В общем случае, накопление антоцианов зависит от почвенно-климатических условий произрастания.

В настоящее время наиболее подходящими методами определения содержания антоцианов являются спектрофотометрия и ВЭЖХ. Спектрофотометрия позволяет определить количественное содержание антоцианов, но данный метод не позволяет определить качественное содержание. Для этого применяют ВЭЖХ. Таким образом, при использовании обоих методов можно получить как количественную, так и качественную характеристику содержания антоцианов в исследуемых образцах.

Антоцианы обеспечивают окраску многим растениям, а именно: плодам, цветкам, листьям, стеблям. Но поступление антоцианов в организм человека, в основном, связано с употреблением в пищу плодов. Между тем существуют источники антоцианов, которые не употребляются непосредственно в пищу – это, так называемые, нетрадиционные источники. Примерами таких источников являются краснолистные деревья, цветы, листья растений городской флоры, которые имеют антоциановую окраску только осенью. Многие из этих растений имеют достаточно высокое

содержание антоцианов, что позволяет их использовать в качестве пищевых красителей (Е 163).

Целью данной работы является поиск нетрадиционных источников антоцианов.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Установление качественного и количественного состава антоцианов некоторых краснолистных деревьев ботанического сада НИУ «БелГУ»
2. Установление качественного и количественного состава некоторых плодов растений ботанического сада НИУ «БелГУ»
3. Определение нетрадиционных источников антоцианов в городской флоре Белгорода
4. Определение антоцианов в цветках: лаванды и розы

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Общая характеристика антоцианов

Антоцианы – это гликозиды антоцианидинов и производные одной и той же ароматической структуры – флавилиевого катиона. Этот катион состоит из бензопирилиевого ядра (А) и фенольного кольца (Б). Оксониевая структура антоцианов установлена в 1913 г., а антоцианидинов – в 1914. Агликоны называют антоцианидинами, а гликозиды – антоцианами. Антоцианы растворимы в воде, антоцианидины – нерастворимы. Впервые термин «антоциан» (от греч. anthos — цветок и kyanos — синий, лазоревый) введен Маркартом в 1835 г.

Одним из важнейших пигментов растительных тканей, плодов, ягод, листьев, лепестков цветов являются антоцианы, которые окрашивают их в различные цвета от розового до чёрно-фиолетового с разными сочетаниями и переходами [1]. Они являются самой крупной группой водорастворимых пигментов в царстве растений [2]. Найдены антоцианы в высших растениях почти всех порядков. Синтезируются они в цитоплазме и депонируются в клеточные вакуоли при помощи глутатионовой помпы [3]. В тканях растений встречаются, как правило, в виде гликозидов полигидрокси- и полиметокси-производных солей 2-фенилбензопирилиума или флавилиума [2].

В формирование окраски у растений из всех флавоноидов наибольший вклад вносят именно антоцианы. Была установлена четкая корреляция между окраской цветков и структурой антоцианов, которые в них содержатся. В ходе систематического исследования было обнаружено, что большинство оранжевых цветков содержат пеларгонидин, красно-вишневых – цианидин, а пурпурно-синих – дельфинидин.

Такие красные плоды как земляника, малина, вишня, яблоки обязаны своей окраской именно антоцианам, наличие которых определяет зрелость плодов. Многие плоды, окрашенные в чёрный цвет, имеют такую окраску благодаря очень высокому содержанию антоцианов и на самом деле такие

плоды окрашены в очень насыщенные тона красного. Это утверждение подтверждается тем фактом, что черный виноград даёт красное вино, содержание антоцианов в котором уже значительно ниже. Антоциановая окраска может проявляться и в других частях растений например, таких, как листья (краснокочанная капуста) или стебли (ревень).

Молодые листья и побеги содержат антоцианы, которые поэтому имеют красную окраску в отличие от зелёной у зрелых листьев. Но некоторые виды декоративных растений сохраняют антоцианы до зрелости, тем самым придавая красную окраску листу. Другие же листья приобретают красную окраску только осенью, что происходит благодаря усиленному синтезу антоцианов. А разрушение хлорофилла делает антоциановую окраску более заметной [4].

Довольно часто в одном и том же растении можно встретить целую серию антоцианов, которые построены на основе одного или нескольких антоцианидинов. Так, в цветках и клубнях картофеля обнаружено до 10 антоцианов [5].

## 1.2 Химическое строение

Антоцианы – это гликозиды, содержащие гидроксид- и метоксизамещённые соли флавилия (2-фенилхромениля) (рис. 1.1.).

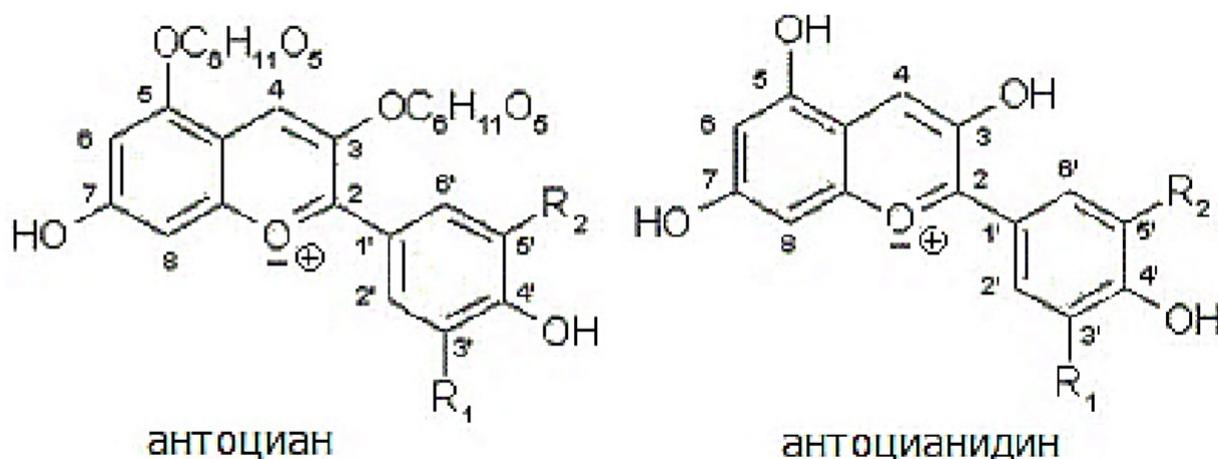


Рис. 1.1. Структура антоцианов и антоцианидинов [6]

Они являются конечными веществами в цепи метаболизма фенилпропаноидных соединений в растениях, причем тип антоциановых основ во многом определяется DFR ферментами (дигидрофлаванол-4-редуктазами), высокоспецифичными по отношению к соответствующим дигидрофлавонолам. Разнообразие углеводных фрагментов обеспечивают основные различия между антоцианами. Эти углеводные фрагменты присоединяются к небольшому количеству основ (агликонов) – антоцианидинов. Антоцианидинами наибольшего количества природных антоцианов являются шесть структур, которые различаются лишь степенью гидроксирования (и / или метоксилирования) кольца В флавилиум катиона (рис. 1.2.):

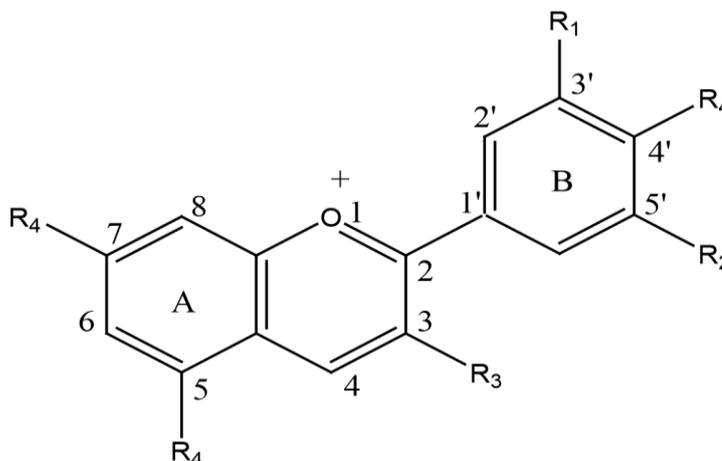


Рис. 1.2. Флавилиум катион

Основные агликоны антоцианов: пеларгонидин (Pg), пеонидин (Pn), цианидин (Cy), мальвидин (Mv), петунидин (Pt), дельфинидин (Dp). Гликозиды трех неметилованных антоцианидинов (Cy, Dp и Pg) являются наиболее широко распространенными в природе. Они присутствуют в 80% окрашенных листьев, 69% фруктов, 50% лепестков цветов [2,7].

На сегодняшний день найдено более 400 антоцианов. Известны 17 антоцианидинов встречающихся в природе. Они приведены в таблице 1.1.

Таблица 1.1.

## Перечень антоцианидинов

Наименование	Место присоединения в молекуле							Цвет
	3	5	6	7	3'	4'	5'	
Апигенинедин	H	OH	H	OH	H	OH	H	Оранжевый
Аурантинидин	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Оранжевый
Капенсинидин	OH	OCH <sub>3</sub>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Красно-синий
<b>Цианидин</b>	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Красно-оранжевый
<b>Дельфинидин</b>	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Красно-синий
Европинидин	OH	OCH <sub>3</sub>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	Красно-синий
Гирсутинидин	OH	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Красно-синий
6-гидроксицианидин	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	Красный
Лутеолинидин	H	OH	H	OH	OH	OH	H	оранжевый
<b>Мальвидин</b>	OH	OH	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Красно-синий
5-метилцианидин	OH	OCH <sub>3</sub>	H	OH	OH	OH	H	Красно-оранжевый
<b>Пеларгонидин</b>	OH	OH	H	OH	H	OH	H	оранжевый
<b>Пеонидин</b>	OH	OH	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Красно-оранжевый

<b>Петунидин</b>	ОН	ОН	Н	ОН	ОСН <sub>3</sub>	ОН	ОН	Красно-синий
Пульчелидин	ОН	ОСН <sub>3</sub>	Н	ОН	ОН	ОН	ОН	Красно-синий
Розинидин	ОН	ОН	Н	ОСН <sub>3</sub>	ОСН <sub>3</sub>	ОН	Н	красный
Трицетинидин	Н	ОН	Н	ОН	ОН	ОН	ОН	красный
6-гидроксидельфинидин	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	Красно-синий
Рициниодин А	ОН	Н	ОН	ОН	Н	ОН	Н	-
Арабидин	Н	Н	ОН	ОН	Н	ОН	ОСН <sub>3</sub>	-
Караурин	Н	Н	ОН	ОН	Н	ОСН <sub>3</sub>	ОСН <sub>3</sub>	-
3'-гидроксиарабидин	Н	Н	ОН	ОН	ОН	ОН	ОСН <sub>3</sub>	-

Индивидуальные антоцианы различаются по количеству гидроксильных групп, природе и количеству присоединенных к молекуле сахаров, положению гликозилирования, природе и количеству алифатических или ароматических кислот, присоединенных к сахарам [2].

Среди метилированных производных самым распространённым является мальвидин, а среди неметилированных – цианидин. Однако в природе известны антоцианы и агликоны, у которых ОН-группы в положениях С - 5 и С - 7 метилированы.

Различные типы гидроксирования ароматических колец А и В отражают (как и для других флавоноидов) смешанный путь биосинтеза антоцианидов.

Антоцианидины из-за своей структуры (незначительная доля полярных гидроксильных групп к общей молекулярной массе катиона флавилия) плохо растворяются в основном природном растворителе – воде, а потому в

растениях антоцианидины существуют в водорастворимой форме в виде гликозидированных производных – антоцианов.

Присоединение остатков сахаров обычно происходит у гидроксильных групп при 3 и 5 атомах углерода, чаще встречаются С-3 гликозиды, реже антоцианы с углеводным остатком у атома углерода С-7 и бывают С-3,5-дигликозиды. В качестве углеводного остатка выступают: глюкоза, галактоза, рамноза, ксилоза, а также арабиноза. Как самый устойчивый и поэтому самый распространённый моносахарид в природе, чаще всего встречается глюкоза. Антоцианы содержат не только моносахариды, но дисахариды (рутиноза, софороза, самбубиоза, литироза), трисахариды. Встречающиеся трисахариды могут иметь линейные и разветвлённые цепи [8].

Кроме того, большей частью разнообразие антоцианов обусловлено различием производных, в которых некоторые из гидроксильных групп углеводного фрагмента ацилированы уксусной, малоновой, кумаровыми, кофейной и другими кислотами [9].

### 1.3 Окраска антоцианов

Окраска, обусловленная антоцианами, особенно цветков и плодов зависит от таких факторов, как строение молекул индивидуальных антоцианов (особенно степень окисленности кольца В); состав индивидуальных антоцианов в данном растительном объекте; содержание антоцианов в данном объекте (концентрация в клетке); рН среды; комплексообразование с ионами металлов; копигментация; число и природа заместителей.

Первые два фактора напрямую связаны с природой данного растительного объекта и могут подвергаться лишь небольшим колебаниям относительно неких средних величин в зависимости от условий произрастания [10].

У антоцианидинов и их гликозидов, обычно выделяемых в кислом растворе в виде флавилиевых солей, электрон гетероциклического атома

кислорода принимает участие в образовании  $\pi$ -связей в гетероароматическом кольце, так что хромофором становится вся молекула.

Поэтому из всех флавоноидов антоцианидины поглощают свет с наибольшей длиной волны и окрашены в оранжевый, красный, пурпурный или синий цвет.

При величинах рН выше 7 в небольшом количестве образуются хиноидные основания (рис. 1.3.), поглощающие в более длинноволновой части спектра и окрашенные в синий цвет; в водных растворах эти основания неустойчивы. Однако они являются антоциановой формой, которая, видимо, стабильна *in vivo* и содержится главным образом в лепестках цветков, которые часто имеют синий цвет более глубокого тона, чем это можно было бы предполагать по спектрам поглощения выделенных антоцианов (в форме флавилиевых солей) [4].

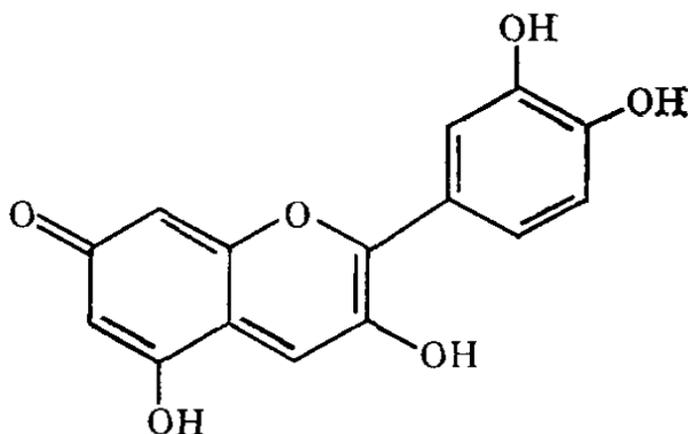


Рис. 1.3. Хиноидное основание

В кислом растворе антоцианидины ведут себя как катионы и образуют соли с кислотами, в щелочном – как анионы и образуют соли с основаниями. В зависимости от рН среды изменяется окраска антоцианов. Соли катионов антоцианов окрашены в красный цвет разных оттенков. Щелочные соли антоцианов окрашены в синий цвет. [1]

Что касается комплексообразования с ионами металлов, было замечено, что голубизна обеспечивается комплексами антоцианов с  $Mg^{2+}$  и  $Al^{3+}$ .

В основе копигментации лежит образование нековалентных комплексов антоциана с копигментами, ответственными за интенсификацию и изменение цвета антоцианов. Копигменты сами по себе либо имеют очень слабое, либо совсем не имеют поглощения в видимой области, но при добавлении их к раствору антоциана вызывают сильное изменение цвета этого раствора (рис. 1.4.).

Копигментация приводит к увеличению интенсивности поглощения (гиперхромии) и положительному сдвигу длины волны максимального поглощения (батохромии) антоциана.

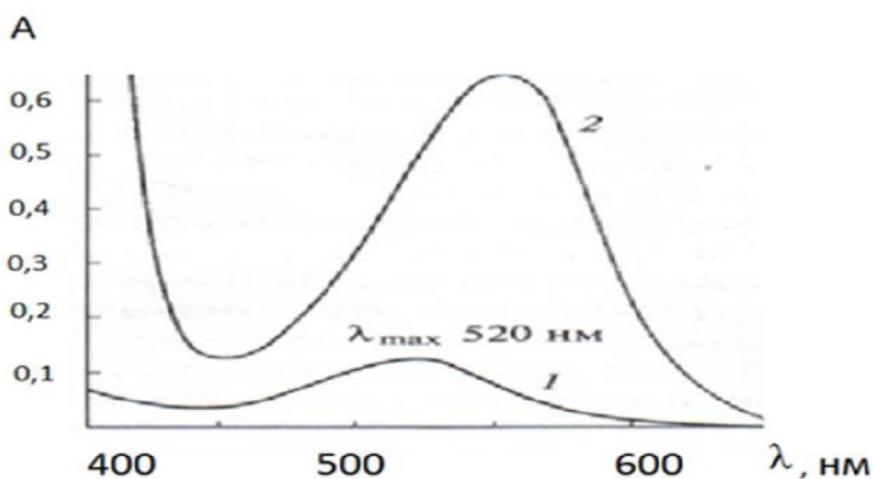


Рис. 1.4. Эффект копигментации: изменение спектра поглощения мальвинхлорида (1) при добавлении гиперозида (2)

В роли копигментов могут выступать представители различных групп соединений. Наиболее часто ими являются флавоноиды или эфиры оксикоричных кислот, так и вещества, целенаправленно вносимые извне. Углеводные остатки дают дополнительные возможности для модификации, обычно за счёт ацилирования их первичных спиртовых групп остатками фенолокислот в одном или нескольких углеводных остатках: парагидроксibenзойной или гидроксикоричными (паракумаровой, кофейной или феруловой).

Такая молекула антоциана представляет собой на первый взгляд довольно громоздкое «сооружение», но в действительности за счет

внутримолекулярной ассоциации происходит укладка в очень компактную пространственную структуру, обусловленную способностью ароматических ацильных групп образовывать внутримолекулярный «сэндвич» с антоцианидином. Подобный вид внутримолекулярной укладки защищает антоцианидиновое ядро от атаки со стороны внешней среды, например, от взаимодействия с водой [10].

На окраску антоцианидинов влияет число и природа заместителей: гидроксильные группы, несущие свободные электронные пары, обуславливают батохромный сдвиг при увеличении их числа. Так, пеларгонидин, цианидин и дельфинидин, несущие в 2-фенильном кольце соответственно одну, две и три гидроксильные группы, окрашены в оранжевый, красный и пурпурный цвета. Гликозилирование, метилирование или ацилирование гидроксильных групп антоцианидинов приводит к уменьшению или исчезновению батохромного эффекта [9].

#### **1.4 Биологическая активность**

Для антоцианов в настоящее время доказаны следующие виды биологической активности:

- защита от сердечно-сосудистых заболеваний: снижение хрупкости и проницаемости капилляров защита от окислительного стресса;
- антиканцерогенные свойства: подавление активности митоген-активируемых протеинкиназ;
- противовоспалительный эффект: подавление экспрессии генов, кодирующих белки, вовлеченные в воспалительные процессы;
- антимикробная активность;
- повышение остроты зрения: восстановление родопсина [9].

Последнее стало возможным, главным образом, из-за более высокого сродства к тканям глаза, что позволяет антоцианам более эффективно воздействовать на эти ткани [10].

Роль антоцианов в предотвращении сердечно-сосудистых заболеваний, связанная с защитой от окислительного стресса, подтверждена экспериментально. Эпидемиологические исследования показали обратную связь между смертностью от заболеваний сердечно-сосудистой системы и уровнем потребления красных вин. При этом этанолу приписывается эффект уменьшения вероятности тромбообразования, а влияние полифенолов определяется их антиоксидантной активностью. В работе [11] установлено, что экстракты полифенолов красных вин ингибируют синтез эндотелина-1 в культуральных клетках эндотелия аорты крупного рогатого скота, специфически модифицируя сигнал тирозинкиназы. Именно ингибирование синтеза эндотелина-1, вероятно, и объясняет уменьшение вероятности развития атеросклероза и, как следствие, уменьшение риска коронарных заболеваний сердца. На примере антоцианов бузины (*Sambucus*) было прямо показано, что антоцианы встраиваются в клетки эндотелия кровеносных сосудов, в значительной мере обеспечивая защиту от оксидантов. Найдено, что дельфинидин (в отличие от цианидина и мальвидина) способствует определяемой эндотелием вазорелаксации аорты крыс. Сырой экстракт черники при оральном или инъекционном введении уменьшал проницаемость капилляров [7].

Было установлено, что антоцианы способны уменьшать скорость деления раковых клеток, препятствуя образованию опухолей. Считается, что они ингибируют циклооксигеназные ферменты за счет высокого антиокислительного потенциала ант. В работе [12] выявлено, что антоцианы блокируют активацию протеин-киназы [13].

Также антоцианы, как антиоксиданты применяются в фармацевтической промышленности в составе офтальмологических препаратов [14-17].

Антоцианы проявляют защитный эффект против плеврита. Установлена их способность гасить воспалительные процессы в легких, снижая активность соответствующих ферментов. Эпидемиологические

исследования подтверждают положительное влияние антоцианов при диабете и панкреатите. По данным работы [18] антоцианы ингибируют окисление липопротеинов низкой плотности [9].

Антоцианы потенциальные колоранты для пищевой и медицинской промышленности благодаря высокой и разнообразной биологической активности этих соединений.

На фоне растущей популярности лекарственных средств и БАД растительного происхождения перспективность антоцианов как объектов изучения не вызывает сомнения [9].

### **1.5 Нетрадиционные источники антоцианов**

Овощи фрукты богатые антоцианами могут употребляться в пищу непосредственно, но есть растения, которые содержат антоцианы в листьях, корнях, стволах, стеблях, которые не употребляются в пищу. Их называют нетрадиционными источниками антоцианов.

Примерами нетрадиционных источников могут служить: краснозерновая форма кукурузы, цветы, краснолистные деревья и растения у которых листья окрашены в красный цвет только осенью.

Исследования, проведенные в работе [19], показывают, что кукуруза перспективный источник антоцианов, так как содержание антоцианов в ней превышает содержание в самых богатых источниках (плоды черники, бузины и аронии). В этих источниках содержится порядка 1000 мг антоцианов на 100 граммов свежего сырья [20], тогда как в обертках, листьях и эпидермисе стебля краснозерновой капусты степень накопления отмечена от 2500 до 4000 мг на 100 г. Основными компонентами антоцианового комплекса являются цианидин-3-глюкозид и его малонированные производные.

Цветы также являются нетрадиционными источниками антоцианов в работах [21-24] изучены антоциановые комплексы лепестков цветов: бархатцев, лилии, хеномелеса и пиона. Накопление антоцианов в лепестках цветков бархатцев сортов *T. patula* составляет около 150 мг на 100 г свежих

лепестков. Установлено, что антоциановый комплекс сложен и содержит наряду с цианидин-3-глюкозидом как более, так и менее гидрофильные компоненты. В сортах лилий с оранжевой (и красной) окраской цветков, красные тона окрасок связаны с присутствием в лепестках в основном цианидин-3-рутинозида. Окраска цветков хеномелеса обусловлена накоплением 3- гликозидов цианидина и пеларгонидина, радикалы галактозы и дигексозида выступают в качестве гликозидных фрагментов. Лепестки цветков пионов накапливают в основном пеонидин-3,5-диглюкозид, другие принципиальные компоненты – пеонидин-3-диглюкозид, цианидин-3,5-диглюкозид, цианидин-3-глюкозид и следовые количества пеларгонидин-3,5-диглюкозида, еще реже обнаруживается пеларгонидин-3-глюкозид. Высокий уровень накопления антоцианов в интенсивно окрашенных сортах позволяет рассматривать их как перспективные источники антоцианов.

Ещё одним перспективным нетрадиционным источником антоцианов являются краснолистные деревья. В качестве примера можно привести барбарис, который имеет ярко-красные, позднее бурые и тёмно-коричневые листья. По данным работы [25] выявлено, что пурпурнолистные формы барбариса обыкновенного обладают разнообразным набором 3-глюкозидов антоцианидинов. В барбарисе оттавском, одной из родительских форм которого является барбарис обыкновенный пурпурнолистный, частично сохраняется признак антоцианового состава.

Малоизученными нетрадиционными источниками антоциановых комплексов являются растения городской флоры у которых листья имеют антоциановую окраску только осенью. Нами были исследованы 2 таких источника антоцианов.

## 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1 Методика количественного определения суммы антоцианов методом многократной экстракции

#### Экстракция №1

Взвешенные на аналитических весах навески заливали 50 мл 0,1М раствором HCl и оставляли в закрытых колбах в холодильнике не 2-3 суток. По истечении времени образцы отфильтровывали на складчатом фильтре. Для полученных экстрактов снимали спектры на спектрофотометре СПЕКС ССП-705-4 в диапазоне длин волн 400 – 700 нм, в кювете толщиной 1 см.

#### Экстракция №2

Оставшееся растительное сырье повторно заливали 50 мл 0,1М раствором HCl и оставляли в закрытых колбах в холодильнике не 2-3 суток. Для полученных экстрактов снимали спектры на спектрофотометре СПЕКС ССП-705-4 в диапазоне длин волн 400 – 700 нм, в кювете толщиной 1 см.

При необходимости (если сырье не обесцветилось) проводили третью и четвертую экстракции.

Содержание антоцианов рассчитывали по формуле, исходя из закона Бугера-Ламберта-Бера:

$$C = \frac{D}{\varepsilon \times l} \times n \times \frac{M}{m} \times V \times 100, \text{ (г/100г)} \quad (2.1)$$

где  $D$  – оптическая плотность раствора;

$\varepsilon$  – коэффициент экстинкции;

$l$  – толщина кюветы, см;

$n$  – разбавление.

$M$  – молярная масса антоциана (цианидин-3-глюкозида);

$m$  – масса навески;

$V$  – объем колбы.

## 2.2 Методика количественного определения суммы антоцианов методом растирания растительного сырья

Взвешенные на аналитических весах навески растирали в ступке под слоем 0,1 М раствора HCl, постепенно собирая окрашенный экстракт и фильтруя его через бумажный фильтр в мерную колбу. Растирание продолжали до тех пор, пока раствор не обесцветится. Полученный экстракт фильтровали через складчатый фильтр, доливали объем в мерной колбе до метки необходимым количеством 0,1 М HCl. Затем снимают спектры на спектрофотометре СПЕКС ССП-705-4 в диапазоне длин волн 400 – 700нм, в кювете толщиной 1 см.

Содержание антоцианов рассчитывали по формуле, исходя из закона Бугера-Ламберта-Бера:

$$C = \frac{D}{\varepsilon \times l} \times n \times \frac{M}{m} \times V \times 100, \text{ (г/100г)} \quad (2.2)$$

где  $D$  – оптическая плотность раствора;

$\varepsilon$  – коэффициент экстинкции;

$l$  – толщина кюветы, см;

$n$  – разбавление.

$M$  – молярная масса антоциана (цианидин-3-глюкозида);

$m$  – масса навески;

$V$  – объем колбы.

## 2.3 Методика проведения подготовки для ВЭЖХ анализа

Полученный экстракт для очистки от балластных веществ пропускали через патрон, предварительно промытый 3 мл ацетона и 15 мл 0,1н. HCl. Для реэкстракции антоцианов с патрона пропускали через патрон раствор элюэнта (30%CH<sub>3</sub>CN + 30% HCOOH) до появления окрашенных капель. Отбирали реэкстракт в виалу на 1/3 ее объема. Затем доливали в виалу 2/3 воды.

### 3 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

#### 3.1 Нетрадиционные источники антоцианов, выделенные из растений ботанического сада «НИУ БелГУ»

Объектами исследований были выбраны листья некоторых краснолистных деревьев и плоды нетрадиционных плодовых деревьев.

##### 3.1.1 Береза краснолистая

Береза краснолистая «Royal frost», *Betula pendula*, представляет собой высокодекоративное растение с красной окраской листьев (рис. 3.1.).



Рис. 3.1. *Betula pendula* «Royal frost»

При экстракции антоцианов из навески листьев массой 1.12 г 0.1 М раствором соляной кислоты в воде за первую экстракцию удалось извлечь около 70 % антоцианов, а в сумме по результатам двух последовательных

экстракций содержание антоцианов составило 0,51 г на 100 г свежих листьев в пересчете на цианидин-3-глюкозид.

По данным метода ВЭЖХ антоциановый комплекс листьев данного растения (рис.3.2.), образован в основном тремя 3-гликозидами, а именно цианидина, главным из которых (по удерживанию) является цинидин-3-самбубиозид, на который приходится 78.0 % от суммы площадей пиков на хроматограмме, остальные производные имеют близкие параметры электронных спектров, указывающие на подобное строение.

Рис. 3.2. Хроматограмма антоцианов листьев березы «Royal frost».  
Вставка – электронные спектры трех основных компонентов антоцианового комплекса

### **3.1.2 Церцис канадский**

В коллекции Ботанического сада НИУ БелГУ имеется два сорта высокодекоративного растения церциса (багрянника) канадского, *Cercis canadensis* (рис. 3.3.): «Forest pensy» и «Meteor».

Оба растения имеют ярко окрашенные листья, уникальные тем, что за первую экстракцию примерно в тех же условиях, что и проводилась

экстракция антоцианов из листьев березы, удается извлечь порядка 10 % суммы антоцианов. В сумме за три последовательные экстракции, наиболее продуктивной из которых является вторая экстракция, удается извлечь заметно больше антоцианов, чем из листьев березы: уровень накопления антоцианов листьях багрянника составил около 0.230 г (сорт «Forest pansy») и 0.120 г (сорт «Meteor») на 100 г свежих листьев.



Рис. 3.3. Церцис канадский

Комплекс антоцианов по данным ВЭЖХ весьма любопытен, и включает пять основных компонентов – 3-глюкозидов дельфинидина, цианидина, петунидина, пеонидина и мальвидина (рис. 3.4.). Отнесение этих соединений к пяти компонентам с одинаковым типом гликозилирования основано на специфическом изменении параметров электронных спектров из вставки на рис. 3.4. Отсутствие заметного количества ацилированных антоцианов делает этот объект великолепным, не требующим (в отличие от виноградов) отделения ацилированных антоцианов для приготовления смеси пяти 3-глюкозидов основных антоцианидинов.

Рис. 3.4. Хроматограмма антоцианов листьев багрянника канадского  
 Вставка на рисунке – электронные спектры антоцианов

Доля индивидуальных антоцианов в листьях обоих сортов довольно близка между собой. Она представлена в таблице 3.1.

Таблица 3.1.

Состав антоциановых комплексов листьев багрянника канадского

№	Антоциан	Доля антоцианов, моль % по площадям пиков для сортов	
		«Meteor»	«Forest pansy»
1	Дельфинидин-3-глюкозид		
2	Цианидин-3-глюкозид		
3	Петунидин-3-глюкозид		
4	Пеонидин-3-глюкозид		
5	Мальвидин-3-глюкозид		

### 3.1.3 Пузыреплодник калинолистный

Пузыреплодник калинолистный, также физокáрпус калинолистный (*Physocarpus opulifolius*), представлен в коллекции Ботанического сада НИУБелГУ несколькими декоративными сортами, «Andre», «Diablo», «Schuch» и «Red Baron». Они относятся к краснолистным формам кустарника (рис. 3.5.).

По содержанию антоцианов в листьях (собранных в июле), легко экстрагируемых из листьев 0.1 М водным раствором HCl, сорта серьезно различались: наивысший уровень накопления антоцианов найден для сорта «Schuch» - 0.529 г на 100 г свежих листьев; сорт «Andre» - 0.377 г на 100 г, сорт «Diablo» - 0.284 г на 100 г и сорт «Red Baron» - 0.181 г на 100 г. При этом для листьев, собранных в сентябре-октябре концентрация антоцианов была значительно выше, достигая 0.628 г (для сорта «Diablo»), 0.647 г (для сорта «Scuch»), 0.856 г (для сорта «Andre»).



Рис. 3.5. Пузыреплодик калинолистный «Andre»

Методом ВЭЖХ установлено, что видовой состав антоцианового комплекса очень прост – более 95 % приходится на характеристичный для многих растений семейства розовые - цианидин-3-галактозид (рис. 3.6.).

Рис.3.6. Хроматограмма экстракта листьев пузыреплодника сорта «Andre»

### 3.1.4 Слива растопыренная

Алыча, или слива растопыренная, или слива вишненоносная (*Prunus divaricata* Ledeb). Плодовое деревянистое растение; вид рода Слива подсемейства Сливовые семейства Розовые. Одна из исходных форм сливы домашней. Дерево или кустарник высотой до 4—10 м, диаметром до 20—25 см, с широкояйцевидной кроной. Представлена сортом с красной окраской листьев (рис. 3.7.).

Антоцианы из пурпурных листьев этого растения легко экстрагируются и на первой стадии экстракции, при этом суммарный уровень их накопления оказывается достаточно высоким, - 0.328 г на 100 г свежих листьев при сборе в июне, повышаясь до 0.445 при сборе в сентябре-октябре.



Рис. 3.7. Слива растопыренная

Видовой состав антоцианов был также определен методом ВЭЖХ и оказался трех-компонентным (рис. 3.8.).

Рис. 3.8. Разделение антоцианов листьев сливы растопыренной  
Вставка – электронные спектры основных компонентов

По электронным спектрам из трех компонентов два представляют собой 3-моногликозида, цианидин-3-галактозид (51.5 %) и цианидин-3-глюкозид (32.1 %), на 3-дигликозид, цианидин-3-рутинозид приходится около 9 %.

### 3.1.5 Клен краснолистный «Crimson king»

Среди краснолистных форм деревьев выделяется клен краснолистный «Crimson king» (рис. 3.9.).



Рис. 3.9. Клен краснолистный «Crimson king»

Темная окраска листьев также связана с накоплением антоцианов, что подтверждается исследованиями экстрактов методом ВЭЖХ (рис. 3.10). Спектрофотометрические исследования показали, что уровень накопления антоцианов достигает 0.328 г на 100 свежих листьев. Среди двух основных антоцианов один является обычным цианидин-3-глюкозидом, тогда как другой уникален среди множества источников антоцианов, - цианидин-3-

глюкозид, ацилированный (по углеводному фрагменту) галловой кислотой неизвестной локализации (до 19 %). При этом, однако, окраска листьев сильно зависит как от времени сбора, так и от степени освещенности листьев на дереве.

Рис. 3.10. Антоцианы листьев клена «Crimson king»

### **3.1.6 Скумпия кожевенная краснолистная**

Скумпия кожевенная (рис. 3.11.), также относится к высокодекоративным растениям.

Скумпия – оригинальный высокий кустарник или низкое дерево семейства сумаховых. В высоту достигает 2,5 метров. В дикой природе встречается на юге России, в Средиземноморье, Малой Азии, в Китае и Гималаях, растет на открытых сухих склонах, каменистых и известковых склонах.

Однако уровень накопления антоцианов в листьях этого растения оказался невысоким, составляя лишь 0.034 г на 100 г свежих листьев.



Рис. 3.11. Скумпия кожевенная

Антоциановый состав этого экстракта, напротив, представлен шестью основными компонентами с заметно различающимися электронными спектрами и требует специальных исследований для установления их строения (рис. 3.12.).

Рис. 3.12. Антоцианы листьев скумпии кожевенной

### 3.1.7 Антоцианы плодов *Prunus mahaleb*

Антипка, или Вишня антипка, или Черёмуха антипка (*Prunus mahaleb*) относятся к популярным в настоящее время источникам антоцианов, накапливаемых в плодах растения.

По результатам экстракции антоцианов из плодов растения было установлено довольно высокое содержание антоцианов – 0.453 г на 100 г свежих плодов с косточкой.

Видовой состав антоцианов, определенный методом ВЭЖХ показал присутствие четырех основных антоцианов, из которых наибольшая доля приходится на цианидин-3-глюкозид (46.3 %), на цианидин-3-рутинозид приходится меньше – 30.9 %, а остальные два образованы добавлением ксилозильного радикала в положение 2'' предыдущих образцов: цианидин-3-самбубиозид – 9.8 %, а доля цианидин-3-ксилозилрутинозида – 11.4 % (рис. 3.13.).

Рис. 3.13. Антоцианы плодов вишни антипки

### 3.1.8 Антоцианы плодов нескольких видов *Amelanchier*

Ирга относится к растениям трибы яблоневые, поэтому антоциановый состав комплексов, накапливаемых в плодах, имеет один и тот же состав, но с различным соотношениями между компонентами (рис. 3.14.).

Рис. 3.14. Антоцианы плодов ирги двух видов

Виды: А – ольхолистная. В – кроваво-красная

По качественному составу можно отметить, что на хроматограмме обнаруживаются: 1 – цианидин-3-галактозид, 2 – цианидин-3-глюкозид, 3 – цианидин-3-арабинозид, 4 – цианидин-3-арабинозид, ацилированный уксусной кислотой, и пик 5 – неизвестного строения.

Количественный состав антоцианов определяли спектрофотометрическим методом. Данные предоставлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2.

## Количественное содержание антоцианов в плодах ирги

№	Название	Содержание антоцианов г/100 г.
1	Ирга ольхилистная	
2	Ирга кровао-красная	
3	Ирга гладкая	
4	Ирга обильноцветущая	
5	Ирга канадская	
6	Ирга овальная	
7	Ирга колосистая	
8	Ирга менден	
9	Ирга канадская, сорт «Красноярская»	

### 3.2 Нетрадиционные источники антоцианов, выделенные из растений городской флоры

Из растений городской флоры были выбраны те деревья, листья которых окрашены в красный цвет только осенью. Наиболее подходящими оказались уксусное дерево и рябина. Сбор листьев данных объектов производился в октябре.

В соответствие с поставленными задачами у данных объектов производился только количественный анализ.

#### 3.2.1 Уксусное дерево

Сумах пушистый или оленерогий (*rhus typhina*) у нас больше известен под названием уксусного дерева (рис. 3.15.).

В результате двукратной экстракции было установлено суммарное содержание антоцианов, которое составляет 0,387 г/100 г.



Рис. 3.15. Уксусное дерево

### 3.2.2 Рябина

Рябина обыкновенная (лат. *Sórbus aucupária*) — дерево или кустарник, вид рода Рябина семейства Розовые (*Rosaceae*) (рис. 3.16.). Широко распространённое малоценное плодовое деревце, заметное своими яркими плодами, остающимися на ветвях растения до глубокой осени и даже иногда на всю зиму.

Содержание антоцианов в листьях рябины, собранных в осенний период составляет 0,154 г/100 г.



Рис. 3.16. Рябина

### **3.3 Цветы – нетрадиционные источники антоцианов**

Объектами исследований были выбраны лепестки лаванды и розы.

#### **3.3.1 Лаванда**

Лаванда (лат. *Lavandula*) – род растений семейства яснотковых (рис. 3.17.).

Экстракция антоцианов из цветков лаванды производилась двумя методами. Первый – это исчерпывающая экстракция с растиранием, в результате которого экспериментально найденное содержание антоцианов составляет 0,200 г/100 г. Второй метод – это метод двукратной экстракции. В результате определения содержания антоцианов данным методом установлено следующее количество 0,238 г/100 г.



Рис. 3.17. Лаванда

### **3.3.2 Роза**

Роза — общее название всех видов и сортов растений, относящихся к роду шиповник (лат. *Rosa*) и культивируемых человеком (рис. 3.18.).

Своё русское название роза получила благодаря латинскому слову *rosa*, звучащему одинаково во многих языках мира. Латинское название растения произошло от греческого *rhodon*, означающего красный.



Рис. 3.18. Роза

У данного образца были исследованы как свежие, так и сухие листья. Экстракция антоцианов из лепестков розы производилась двумя методами: исчерпывающая экстракция с растиранием и метод двукратной экстракции.

Содержание антоцианов, определённое данными методами составляет, соответственно, для свежих листьев 0,431 и 0,527 г/100 г, для высушенных листьев 0,246 и 0,203 г/100 г.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для анализа свежесрезанного растительного сырья лучшим является метод экстракции с многократным настаиванием, а для высушенного сырья – метод с растиранием под слоем экстрагента.

## ВЫВОДЫ

1. Установлен качественный и количественный состав антоцианов листьев краснолистных деревьев ботанического сада НИУ БелГУ. Наибольшее содержание выявлено у пузыреплодника калинолистного.
2. Установлен качественный и количественный состав антоцианов в плодах вишни антипки и 9 видов ирги. Показано, что в плодах вишни антипки содержание антоцианов практически вдвое превышает содержание в плодах ирги.
3. Определено суммарное содержание антоцианов в деревьях городской флоры, а именно в уксусном дереве и рябине в осенний период. Лучшим источником является уксусное дерево, содержание антоцианов в котором составляет 0,387 г/100 г.
4. Определено суммарное содержание антоцианов в лепестках лаванды и розы двумя методами. Выявлено что метод двукратной экстракции является более эффективным для свежего сырья и, напротив, для высушенного сырья наиболее эффективен метод растирания

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аверьянова Е.В., Школьников М.Н., Егорова Е.Ю. Физиологически активные вещества растительного сырья. Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2010. 105 с.
2. Макаревич А.М., Шутова А.Г., Спиридович Е.В., Решетников В.Н. Функции и свойства антоцианов растительного сырья // Труды БГУ 2010. Том 4. Выпуск 2. С. 1 – 11.
3. Дедков В.П., Масленников П.В., Гребенев Н.Н. Содержание антоцианов как показатель нефтяного загрязнения растений и растительных сообществ дюн Куршской косы // Вестник РГУ им. И. Канта. 2006. Вып. 1. Естественные науки. С. 102—108.
4. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов / Перевод с англ. канд. биол. наук В.Д. Цыдендамбаева / Под редакцией проф. М.Н. Запрометова. М.: «Мир», 1986. 422 с.
5. Харламова О.А., Кафка Б.В. Натуральные пищевые красители. М.: «Пищевая промышленность», 1979. 191 с.
6. Чуб В. Для чего нужны антоцианы // Цветоводство. 2008. № 6. С. 22—25.
7. Дейнека Л.А., Шапошников А.А., Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н. Антоцианы: природные антиоксиданты и не только // Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация. 2006. №2, Вып.4. С. 92–100.
8. Болотов В.М., Нечаев А.П., Сарафанова Л.А. Пищевые красители: классификация, свойства, анализ, применение. СПб.: «ГИОРД», 2008. 240 с.
9. Писарев Д.И., Новиков О.О., Селютин О.А., Писарева Н.А. Биологическая активность полифенолов растительного происхождения. Перспектива использования антоцианов в медицинской практике.

- Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация. 2012. № 10 (129).  
Выпуск 18/2. С. 17 – 24.
10. Логвинова Е.Е. Исследование групп биологически активных веществ плодов рябины черноплодной различных сортов. Дисс. ... кандидата фармацевтических наук. – Воронеж, 2016. – 162 с.
  11. Khan N.Q., Lees D.M., Douthwaite J.A., Carrier M.J., Corder R. Comparison of red wine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cell. // *Clinical Sci.* 2002. V.103 (Suppl. 48) P. 725-755.
  12. Hou D-X, Kai K, Li J-J, Lin S, Terahara N, Wakamatsu M, Fujii M, Young, M, Colburn, N. Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: Structure-activity relationship and molecular mechanisms // *Carcinogenesis.* 2004. V.25. P. 29-36.
  13. Mary Ann Lila. Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach // *Journal of Biomed Biotechnol.* 2004 Dec 1. 2004. V.5. P. 306–313.
  14. Дейнека В.И. и др. Исследование антоцианов черники в плодах и препаратах на её основе // *Заводская лаборатория.* 2006. №3. С. 16–20.
  15. Государственный реестр лекарственных средств. Официальное издание по состоянию на 1 апреля 2009 года: в 2-х т. Т.1. М.: «Медицинский совет», 2009. 1359 с.
  16. Куркин В.А. и др. Новые подходы в области стандартизации сырья и препаратов черники обыкновенной // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук.* 2011. Т. 13. № 1. С. 2010–2015.
  17. Степанян Р.В. и др. Получение лекарственных форм из плодов черники кавказской и изучение их влияния на сетчатку глаза // *Новый армянский медицинский журнал.* 2007. Т. 1. №1. С.35-39.

18. Satuc-Garcia M.T., Heinonen M., Frankel F.N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems // *J. Agric. Food Chem.* 1997. V.45. P. 3362–3367.
19. Третьяков М.Ю., Хорошилов С.А., Сидоров А.Н., Чулков А.Н., Дейнека В.И., Дейнека Л.А. Кукуруза как источник антоцианов // *Достижения науки и техники АПК.* 2012. №9. С. 30 – 31.
20. Anthocyanins. Biosynthesis, Functions, and Applications. Ed.: Gould K., Davies K., Winefield C. Springer Science+Business Media, LLC. 2009. 332 p.
21. Дейнека В.И., Третьяков М.Ю., Дейнека Л.А., Сорокопудов В.Н. Некоторые особенности накопления пигментов в цветках *Tagetes SP* // *Научные ведомости БелГУ. Сер. Естественные науки.* 2007. №5. Вып.5.-С. 22–27.
22. Дейнека В.И., Лабунская Н.А., Сорокопудова О.А. Каротиноиды и антоцианы листков околоцветников некоторых видов лилий (*Lilium L.*) // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2008. Т.8. Вып.5. С. 819 – 825.
23. Чулков А.Н., Дейнека В.И., Навальнева И.А., Дейнека Л.А., Сорокопудов В.Н. Антоцианы лепестков цветков *Chamomiles.Japonica* и *S.Maulei* // *Научные ведомости. Серия Естественные науки.* 2011. № 9 (104). Выпуск 15/1. С. 382 – 388.
24. Чулков А.Н., Дейнека В.И., Третьяков М.Ю., Дейнека Л.А., Нецветаева О.В. Исследование антоциановых комплексов лепестков цветков пионов // *Научные ведомости. Серия Естественные науки.* 2011. № 21 (116). Выпуск 17. С. 85 – 90.
25. Сорокопудов В.Н., Хлебников В.А., Дейнека В.И. Антоцианы некоторых растений семейства *Berberidaceae* // *Химия растительного сырья.* 2005. №4. С. 57–60.