

УДК 581.192: 582.912.46:57.014

ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ НАКОПЛЕНИЯ АНТОЦИАНОВ В ПЛОДАХ ЧЕРНИКИ

Н.Ю. Колбас, А.П. Колбас

Брестский государственный университет имени А.С. Пушкина, г. Брест, Беларусь

Состав и содержание антоцианов плодов черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.) изучены методом ВЭЖХ-UV-MS. Выявлено наличие производных цианидина, дельфинидина, петунидина, пеонидина и мальвидина. Общее содержание антоцианов в 1 г сухих плодов составляет $18,64 \pm 0,94$ в пересчете на мг доминирующего антоциана – дельфинидин 3-О-глюкозида.

Введение

Современные литературные сведения указывают, что качественный состав антоцианов растений детерминирован генетически [1, 2], а количественный – экологически. На биосинтез антоцианов и его регуляцию влияют как абиотические (свет, температура, количество влаги и минеральное питание), так и биотические (инфекции и механические повреждения) факторы [1, 3–5].

В литературе имеются данные о биохимическом составе плодов представителей рода *Vaccinium*, семейство *Ericaceae* Juss. [1, 3, 6–8], в том числе произрастающих на территории Республики Беларусь [2, 5]. При этом сведения о компонентном составе антоцианов плодов черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.), произрастающей в Беларуси, нами не найдены.

Использование плодов черники, а также их экстрактов в качестве натуральных красителей предполагает детальное изучение состава их антоцианов. Кроме того, антоцианиновые компоненты успешно используются в контроле качества плодового сырья и продукции на его основе. Отмечены случаи, когда высококачественные плоды черники и ее продукция либо неправильно маркируются, либо фальсифицируются синтетическими аналогами или более дешевыми ягодами.

Целью нашей работы был качественный и количественный анализ антоцианового комплекса плодов черники, произрастающей на территории Брестского района.

Методика и объекты исследования

Плоды *V. myrtillus* заготавливали в стадии коммерческой спелости в июле 2014 и 2015 гг., в окрестностях д. Медно Брестского района ($51^{\circ}87'$ с.ш.; $23^{\circ}74'$ в.д.). После сбора плоды подвергали глубокой заморозке при температуре -40°C , затем сушили сублимацией без доступа света (лиофилизатор Alpha 2–4, «Christ», Германия), после чего измельчали до частиц диаметром 1 мм (вибрационная мельница MM 200, «Retsch», Германия). Антоцианы из растительного сырья извлекали многократной экстракцией 1 %-ной соляной кислотой в 70 %-ном этаноле. Затем экстрагент отгоняли под вакуумом и при температуре $+30^{\circ}\text{C}$ (роторный испаритель LABOROTA 4002 control «Heidolph», Германия), а полученные остатки сушили сублимацией без доступа света. Непосредственно перед анализом сухие остатки растворяли в 50 %-ном метаноле (до концентрации 10 г/л) и фильтровали через мембранный фильтр.

Компонентный состав антоцианов определяли методом ВЭЖХ-UV-MS, используя систему сепарации

и анализа Thermo-Accela High Speed LC. Разделение компонентов осуществляли на хроматографической колонке с обращенной фазой Agilent Nucleosil 100–5C18 ($250 \times 4,0$ мм; размер частиц силикагеля 5,0 мкм). Элюирование вели при температуре $+40^{\circ}\text{C}$ и фиксированной пропускной способности 0,3 мл в минуту, при этом объем инъекционного образца составил 20 мкл. В качестве мобильной фазы А применяли 5 %-ный водный раствор HCOOH ; мобильной фазы В – 5 %-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле со следующим градиентом элюирования: 10–35 % В, 0–25 мин; 35–100 % В, 25–35 мин; 100 % В, 35–40 мин; 100–10 % В, 40–41 мин; стабилизация системы в течение 4 минут (10 % В). Длина волны детектирования составила 520 нм.

Концентрацию каждого антоциана и общее их содержание выражали в пересчете на мг дельфинидин 3-О-глюкозида, приходящегося на грамм сухих плодов (мг Дф-глю/г). Для построения калибровочной кривой использовали эффективный диапазон концентраций стандарта – 6,25, 12,5, 25, 50, 100 и 200 мг/л. Все опыты проводили в трехкратной повторности.

Результаты и их обсуждение

Строение агликона, тип и количество сахаров, положение гликозидной связи, а так же наличие алифатических и ароматических кислот в составе молекул – отличительные признаки отдельных антоцианов. Использование ВЭЖХ-МС анализа позволило разделить и идентифицировать компоненты антоцианового комплекса плодов *V. myrtillus*. Хроматограмма представлена 19 пиками индивидуальных антоцианов (рисунок 1), 17 из которых в ходе анализа были идентифицированы (таблица 1). Антоцианы являются производными пяти агликонов: цианидина (3 компонента), дельфинидина (5), петунидина (3), пеонидина (3) и мальвидина (3). Гликозильный компонент представлен моносахаридами: пентозой – арабинозой, гексозами – глюкозой и галактозой, а также дигликозидом. Только один антоциан плодов *V. myrtillus* содержит ацильный компонент – остаток щавелевой кислоты. Полученные нами данные в целом согласуются с литературными [1, 3, 6–8]. В своем обзоре А. К. Primetta с соавт. (2013) отмечают, что антоциановый комплекс плодов черники, разных географических регионов произрастания, достоверно различается лишь гликозильным компонентом [3]. Отличием качественного состава антоцианов плодов черники, произрастающей в Брестском районе, является наличие Дн-3,5-О-диглюкозида, а также ацилированного Дн-3-О-(6"-оксалил-глюкозида).

Доминирующим антоцианом изученных плодов является Дн-глю, что согласуется с литературными

данными [1, 6–8]. По результатам наших исследований его процентное содержание составляет 16,78 % от суммы площадей всех пиков хроматограммы при $\lambda=520$ нм. Наряду с доминирующим антоцианом, хроматограммы экстрактов плодов черники содержат еще 5 крупных пиков (рисунок 1), которые соответствуют: петунидин-арабинозиду (11,96 % от суммы площадей всех пиков при $\lambda=520$ нм), дельфинидин-оксалил-глюкозиду (11,76 %), цианидин-глюкозиду (10,66 %), цианидин-арабинозиду (9,95 %) и дельфинидин-галактозиду (8,92 %).

За 2014 и 2015 гг. исследований общее количество антоцианов для сухих плодов *V. myrtillus* в среднем составило 18,64 мг Дн-глю/г (таблица 1), что согласуется с литературными данными [1, 3]. В целом на долю дельфинидин-производных приходится 42,16 % от общего содержания антоцианов, цианидин-производных – 24,42 %, петунидин-производных – 13,77 %, пеонидин-производных – 10,52 % и мальвидин-производных – 7,27 %. Относительное содержание минорных антоцианов – 29,97 %. При этом в отличие от литературных данных [1, 3, 6, 7], проанализированные нами плоды черники содержат меньше дельфинидин-галактозида и дельфинидин-арабинозида, но больше Дн-глю, петунидин-арабинозида и пеонидин-глюкозида.

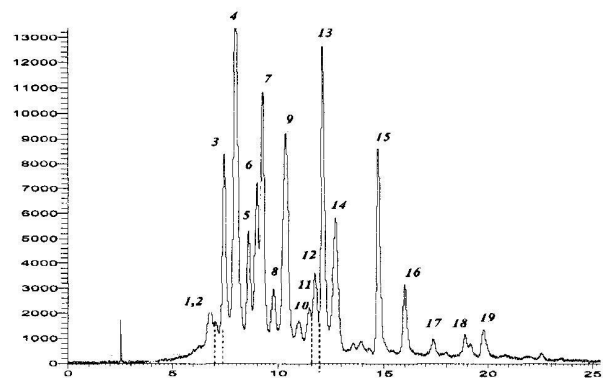


Рисунок 1. – Хроматограмма экстрактов плодов *Vaccinium myrtillus* (по оси абсцисс – uAU, по оси ординат – время удерживания, мин; антоцианы: 1–16 представлены в таблице 1)

Таким образом, плоды исследованной нами черники обыкновенной, произрастающей в юго-западном регионе Беларуси, характеризуются довольно высоким содержанием антоцианов.

Согласно рекомендациям ВОЗ суточная доза антоцианов для взрослого человека должна составлять 240–480 мг в пересчете на стандартизованный

Таблица 1. – Компонентный состав антоцианов плодов *Vaccinium myrtillus*

№ пика	Rt, (мин)	m/z		Антоциан	
		[M ⁺]	Фрагменты	Название	Концентрация (мг Дф-глю /г)*
1	6,8	627	627/303, 465	дельфинидин 3,5-О-диглюкозид	0,23±0,002
2	6,9			NI	0,12±0,001
3	7,4	465	303	дельфинидин 3-О-галактозид	1,66±0,02
4	8	465	303	дельфинидин 3-О-глюкозид	3,13±0,08
5	8,4	449	287	цианидин 3-О-галактозид	0,71±0,006
6	8,8	435	303	дельфинидин 3-О-арабинозид	0,64±0,001
7	9,2	449	287	цианидин 3-О-глюкозид	1,99±0,02
8	9,7	479	317	петунидин 3-О-галактозид	0,25±0,007
9	10,4	419	287	цианидин 3-О-арабинозид	1,85±0,03
10	10,8	479	317	петунидин 3-О-глюкозид	0,09±0,001
11	11,3			NI	0,23±0,005
12	11,8	463	301	пеонидин 3-О-галактозид	0,44±0,002
13	12,1	449	317	петунидин 3-О-арабинозид	2,23±0,01
14	12,6	463	301	пеонидин 3-О-глюкозид	1,41±0,06
15	14,7	537	303	дельфинидин 3-О-(6"-оксалил-глюкозид)	2,19±0,02
16	16,0	493	331	мальвидин 3-О-галактозид	0,84±0,01
17	17,3	433	301	пеонидин 3-О-арабинозид	0,10±0,001
18	18,8	493	331	мальвидин 3-О-глюкозид	0,23±0,001
19	19,8	463	331	мальвидин 3-О-арабинозид	0,29±0,003
Общее количество антоцианов:					18,64±0,94

Примечание: Rt – время удерживания; m/z – отношение молекулярной массы к заряду; [M⁺] – молекулярная масса положительного иона антоциана (а.е.м.), Дф-глю – дельфинидин-3-О-глюкозид; NI – не идентифицирован; * – средние данные за 2014 и 2015 гг. сбора плодов.

экстракт плодов черники, содержащий 25 % антоцианинозидов. По нашим данным для удовлетворения суточной потребности в антоцианах достаточно употребить в пищу не менее 15 г сухих плодов черники.

Выводы

Представленные в статье ВЭЖХ-UV-MS данные о компонентном составе антоцианового комплекса плодов черники могут быть использованы в систематике и таксономии растений, а так же для определения происхождения данного растительного сырья, стандартизации и установления подлинности продукции, созданной на его основе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Åkerstrom, A. Effects of latitude-related factors and geographical origin on anthocyanidin concentrations in fruits of *Vaccinium myrtillus* L. (Bilberries) / A. Åkerstrom [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2010. – Vol. 58, № 22. – p. 11939–11945.
2. Шабуня, П.С. Состав антоцианового комплекса *Vaccinium corymbosum* L. и *Vaccinium uliginosum* L. / П.С. Шабуня [и др.] // Труды БГУ. Серия Физиологич., биохим. и молек. основы функционирования биосистем. – 2011. – Т. 6, ч. 1. – С. 128–135.
3. Primetta, A.K. Anthocyanin fingerprinting for authenticity studies of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) / A.K. Primetta [et al.] // *Food Control* – 2013. – Vol. 30. – P. 662–667.
4. Borochoy-Neori, H. Climate Effects on Anthocyanin Accumulation and Composition in the Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Arils / H. Borochoy-Neori [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2011. – Vol. 59, № 10. – p. 5325–5334.
5. Формирование биохимического состава плодов семейства Ericaceae (Вересковые) при интродукции в условиях Беларуси / Ж.А. Рупасова [и др.]; под ред. В.И. Парфенова. – Мн.: «Белорусская наука», 2011. – 307 с.
6. Jaakola, L. Expression of Genes Involved in Anthocyanin Biosynthesis in Relation to Anthocyanin, Proanthocyanidin, and Flavonol Levels during Bilberry Fruit Development / L. Jaakola [et al.] // *J. Plant physiol.* – 2002. – Vol. 130, Is. 2. – P. 729–739.
7. Bornsek, S.M. Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells / S.M. Bornsek [et al.] // *J. Food Chem.* – 2012. – Vol. 134. – P. 1878–1884.
8. Полина, С.А. Состав антоцианов черники обыкновенной, брусники обыкновенной и клюквы обыкновенной Краснодарского края по данным ВЭЖХ / С.А. Полина, А.А. Ефремов // Химия растительного сырья. – 2014. – № 2. – С. 103–110.

ECOLOGICAL ASPECT OF ANTHOCYANINS ACCUMULATION IN BILBERRY FRUITS

KOLBAS N.Y., KOLBAS A.P.

The anthocyanins compound and total content in blueberries (*Vaccinium myrtillus* L.) were analyzed using HPLC-MC-UV method. Cyanidin, delphinidin, petunidin, peonidin and malvidin derivatives were identified. The total anthocyanin content was 18.64±0.94 mg Delphinidin 3-O-glucoside per g dry weight. Research results can be used to identification, standardization and authentication of wild bilberries and derived products.