

## ХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ НЕКОТОРЫХ СОРТОВ РЯБИНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ – *SORBUS AUCUPARIA*

**Д.И. Писарев**  
**О.О. Новиков**  
**В.Н. Сорокопудов**  
**М.А. Халикова**  
**Е.Т. Жиликова**  
**О.В. Огнева**

*Белгородский государственный университет*

*e-mail: Pisarev@bsu.edu.ru*

В статье изложены данные о химическом изучении плодов некоторых сортов рябины обыкновенной как перспективного источника биологически активных полифенолов – антоцианов. Антоцианы – природные красители, обладающие высокой антирадикальной активностью. При химическом изучении методами масс-спектрометрии, тонкослойной хроматографии и УФ-спектрофотометрии в плодах рябины поздней обнаружены гликозиды цианидина. При проведении количественного определения суммы антоцианов и флавоноидов удалось выявить наиболее перспективный сорт рябины – «Красная из Мичуринска» содержание антоцианов которой составило  $1,45 \pm 0,008\%$ , а флавоноидов  $0,42 \pm 0,015\%$ .

Ключевые слова: рябина обыкновенная, антоцианы, флавоноиды, цианидин, масс-спектрометрия, УФ-спектрофотометрия, тонкослойная хроматография.

Рябина относится к поливитаминным культурам. Одно из первых мест среди плодово-ягодных культур она занимает по содержанию Р-активных веществ. Р-витаминная активность характерна для группы химических соединений флавонолов (рутин, кверцетин, изокверцетин); халконов (гесперидин, метилхалкон) и дигидрохалконов (флоридзин); катехинов; антоцианов; лейкоантоцианов; кумаринов, которые обладают общим действием – капилляроукрепляющим и гипотензивным. Р-активные вещества рябины представлены флавонолами, антоцианами, лейкоантоцианами и катехинами. В рябине доминируют катехины, у некоторых видов – лейкоантоцианы. Количество антоцианов по мере формирования и созревания плодов рябины увеличивается идентично уменьшению лейкоантоцианов [2, 3].

Литературные данные о химическом составе плодов рябины указывают на их высокую пищевую ценность, так как они содержат много сахаров, кислот, сорбита и других веществ.

В качестве сырьевых объектов для изучения полифенолов нам было предложено сырьё четырёх сортовых форм рябины: Сорбинка, Титан, Алая Крупная и Красная из Мичуринска, из которых следовало отобрать наиболее перспективный. С этой целью проведены фитохимические тесты, позволяющие оценить, во-первых, качество исходного сырья, во-вторых, содержание антоцианов.

**Сорт рябины «Сорбинка»** отобран из популяции рябины моравской. Деревья сдержанного роста, крона обратнойцевидная, средней густоты. Плоды крупные, от 2,2 до 2,6 г, округлые, почти одномерные. Вкус приятный, слабокислый.

**Сорт рябины «Титан»** получен от скрещиваний рябины обыкновенной с грушей и яблоней краснолистной. Деревья сдержанного роста, высотой до 4,5 м. Плоды собраны в полувисячие щитки округлой или трехгранной формы по 40-50 штук.

**Сорт рябины «Алая крупная»** получен от скрещиваний рябины обыкновенной со смесью пыльцы сортов груши. Деревья сдержанного роста. Цветет и плодоносит ежегодно, урожайность высокая. Плоды массой 2,4-2,6 г, ало-красные, собраны в очень крупные щитки (более 400 г) по 150-160 штук; созревают в начале сентября. Сорт устойчив к почвенным и воздушным засухам, вредителям и болезням.

**Сорт рябины «Красная из Мичуринска»** – вегетативный клон сорта Титан. Отличается от вышеуказанного большей сильнорослостью, разреженностью кроны, несколько более крупными щитками и меньшей зимостойкостью.



Сбор плодов всех четырёх сортов производили на территории Ботанического сада БелГУ в период их полного созревания (август – сентябрь 2008 года). Сушили сырье в естественных условиях, а затем в сушильном шкафу до содержания влаги 5%.

Антоцианы – это растительные пигменты, флавилий-катионы, близкие по структуре к флавоноидам, придающие красную, коричневую, оранжевую, фиолетовую или синюю окраску тканям растений, цветам, плодам. Антоцианы разрешены в качестве пищевых добавок (Е 163).

Антоцианы накапливаются во многих высших растениях, наиболее богатыми и доступными их источниками являются плоды многих представителей семейства розоцветные: рябина, шиповник, черёмуха и т.д. Плоды рябины обыкновенной являются фармакопейным сырьем, используются в качестве поливитаминного средства, а также благодаря составу, богатому БАВ, имеют широкое применение в народной медицине [1].

Биохимический состав плодов как отдельных видов рябины, так и сортов изучен достаточно полно. Однако в разных регионах отдельные биохимические показатели значительно варьируют.

Одним из показателей качества плодов рябины является количественное содержание флавоноидов. Поэтому для первичной оценки качества исследуемых образцов проводили количественное определение содержания флавоноидов. Предварительно флавоноиды обнаруживали в спиртовом извлечении с помощью *цианидиновой реакции* (восстановление цинковой пылью в кислотной среде). Флавоноиды при восстановлении магнием или цинком в присутствии концентрированной хлористоводородной кислоты образуют красное окрашивание.

В основу количественного определения флавоноидов в сырье положен метод спектрофотометрического анализа в непосредственном извлечении из сырья, основанный на химическом взаимодействии флавоноидов с алюминия хлоридом безводным в среде кислоты хлористоводородной, разведённой с образованием окрашенных продуктов – хелатных комплексов. При этом максимум поглощения первой полосы смещается на 35 – 50 нм к видимой области (батохромный сдвиг) по сравнению с исходным флавоноидом. При добавлении кислоты хлористоводородной нестабильные комплексы в орто-дигидроксигруппах разрушаются, а комплексы между карбонильной группой при С4 и гидроксильными группами при С3 и С5 сохраняются.

У спиртовых извлечений из исследуемых образцов максимум поглощения при добавлении  $AlCl_3 + HCl$  находится при 408–410 нм, совпадающий с максимумом поглощения рутина, поэтому расчёт содержания флавоноидов проводили в пересчёте на данный компонент.

Точную навеску сырья массой 1,0 г помещали в плоскодонную колбу и заливали 20 мл растворителя (70% этиловый спирт), присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 30 минут с момента закипания воды в бане. Полученное извлечение фильтровали в мерную колбу на 100 мл. Извлечение охлаждали и фильтровали через вату в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию остатка проводили ещё четыре раза порциями по 20 мл, собирая фильтрат в ту же мерную колбу на 100 мл. После охлаждения объём извлечения доводили спиртом этиловым 70% до метки и перемешивали (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл отмеривали 5 мл раствора А, прибавляли 5 мл 5% раствора алюминия хлорида в спирте этиловом 96%, 4 капли кислоты хлористоводородной 0,1 н, доводили объём раствора спиртом этиловым 96% до метки и помещали в тёмное место. Через 40 минут измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре СФ-56 в диапазоне длин волн 350–450 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 5 мл извлечения, 4 капель кислоты хлористоводородной 0,1 н и доведённый спиртом этиловым 96% до метки в колбе на 25 мл.

Параллельно измеряли оптическую плотность Государственного стандартного образца (ГСО) рутина, приготовленного по методике ГФ XI изд., т. 2, с. 323 «Трава зверобоя» [4].

Полученные УФ-спектры всех четырёх образцов приведены на рис. 1, 2, 3, 4.

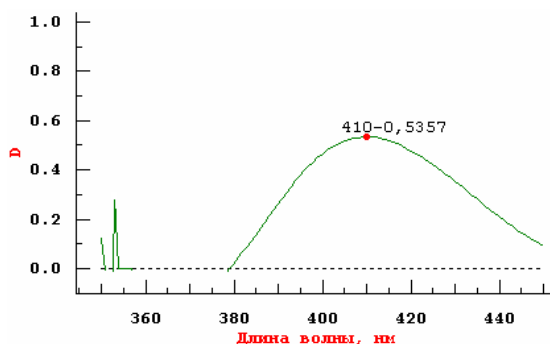


Рис. 1. УФ-спектр поглощения суммы флавоноидов рябины сорта «Алая крупная»

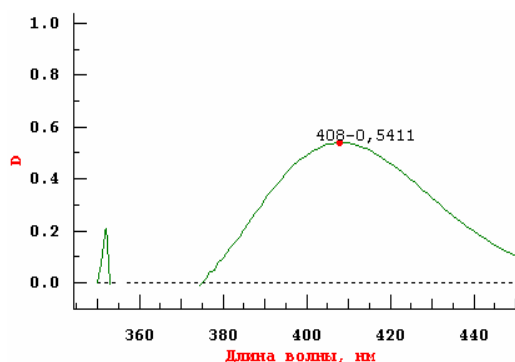


Рис. 2. УФ-спектр поглощения суммы флавоноидов рябины сорта «Красная из Мичуринска»

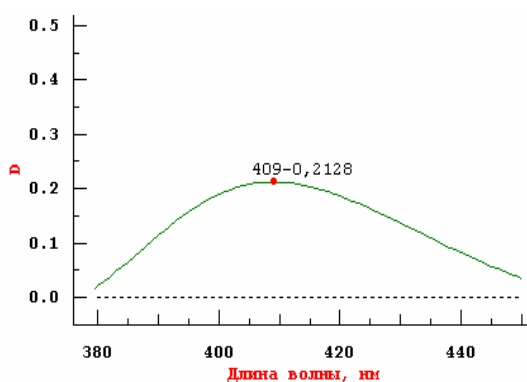


Рис. 3. УФ-спектр поглощения суммы флавоноидов рябины сорта «Сорбинка»

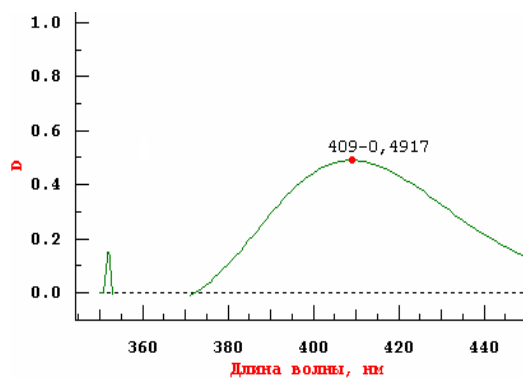


Рис. 4. УФ-спектр поглощения суммы флавоноидов рябины сорта «Титан»

Расчёт количественного содержания суммы флавоноидов для каждого образца проводили по формуле 1 :

$$X = \frac{A_x \times C_{ct} \times W \times 100}{A_{ct} \times m \times V} \times 100\% \quad (1),$$

где  $A_x$  – оптическая плотность исследуемого раствора;  $C_{ct}$  – концентрация стандартного раствора;  $W$  – разведение;  $A_{ct}$  – оптическая плотность стандартного раствора;  $m$  – масса навески;  $V$  – объем аликвоты.

Результаты анализа представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Результаты спектрофотометрического определения флавоноидов в различных сортах рябины обыкновенной**

Сорт рябины обыкновенной	Суммарное содержание флавоноидов, %
Алая крупная	0,41±0,036
Красная из Мичуринска	0,42±0,015
Сорбинка	0,16±0,008
Титан	0,38±0,0024

Для изучения качественного содержания антоцианов плодов рябины навеску сырья массой 20 г помещали в плоскодонную колбу и заливали 200 мл растворителя (96% этиловый спирт с 1% содержанием хлористоводородной кислоты). Затем содержимое колбы отфильтровывали и полученный экстракт упаривали под вакуумом на водяной бане. Далее упаренный экстракт смешивали с порошком талька, избирательно сорбирующим антоцианы. Суспензию этой смеси переносили на воронку Бюхнера и сначала элюировали дистиллированной водой, отделяя примеси, а затем подкисленным этанолом элюировали антоцианы, после чего фракцию, содержащую антоцианы, упаривали. Таким образом мы получили обогащенный антоциановый комплекс, свободный от прочих веществ. Чистоту полученной фракции подтверждали с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol» в системе этилацетат – ледяная уксусная кислота – муравьиная кислота – вода (100:10:10:26). Полученная хроматограмма представлена на рис. 5.

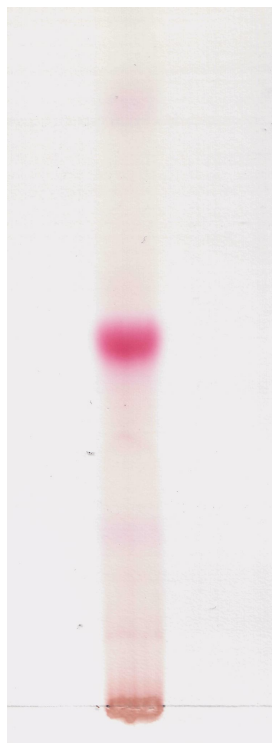


Рис. 5. Хроматограмма антоцианов рябины

На хроматограмме наблюдалось одно пятно, что свидетельствует о наличии в сумме одного антоциана. Идентификацию данного компонента осуществляли с помощью масс-спектрометрии. Существенное отличие масс-спектрометрии от других аналитических физико-химических методов состоит в том, что оптические, рентгеновские и некоторые другие методы детектируют излучение или поглощение энергии молекулами или атомами, а масс-спектрометрия непосредственно детектирует сами частицы вещества.

Детекцию масс-спектра проводили на приборе масс-спектрометр «Autoflex II» «MALDI TOF/TOF» фирмы Bruker Daltonics – вакуумного прибора, который использует физические законы движения заряженных частиц в магнитных и электрических полях с помощью ионизации лазером.

Пробу полученной суммы наносили на мишень «MTP 384 target plate matt steel T F», высушивали и сверху наносили каплю матрицы. В качестве матрицы использовали  $\alpha$ -цианокоричную кислоту, регистрацию спектров вели с помощью программы «Flex Control», обработку данных осуществляли в программе «Flex Analis». В результате получен спектр, на котором наблюдается наиболее интенсивный пик иона с зарядом  $m/z = 287,316$ , соответствующий пику агликона – цианидина, и менее интенсивный пик иона  $m/z = 449,214$ , отвечающий пику его гликозида (рис. 6).

Таким образом, при помощи масс-спектрометрического метода анализа мы определили, что основным антоцианом в плодах рябины обыкновенной сорта Красная из Мичуринска является цианидин-3-глюкозид с молекулярной массой 287,25 г/моль.

Количественное определение антоцианов в исследуемых образцах проводили по собственному характерному поглощению антоцианов, находящемуся в диапазоне длин волн  $\lambda = 490\text{--}550$  нм. Для этого навеску сырья массой 1,0 г помещали в плоскодонную колбу и заливали 20 мл растворителя – 1% раствором кислоты хлористоводородной в спирте этиловом 50%, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 30 минут с момента закипания воды в бане. Полученное извлечение фильтровали в мерную колбу на 100 мл. Извлечение охлаждали и фильтровали через вату в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию остатка проводили

ещё четыре раза порциями по 20 мл, собирая фильтрат в ту же мерную колбу на 100 мл. После охлаждения объём извлечения довели экстрагентом до метки и перемешивали.

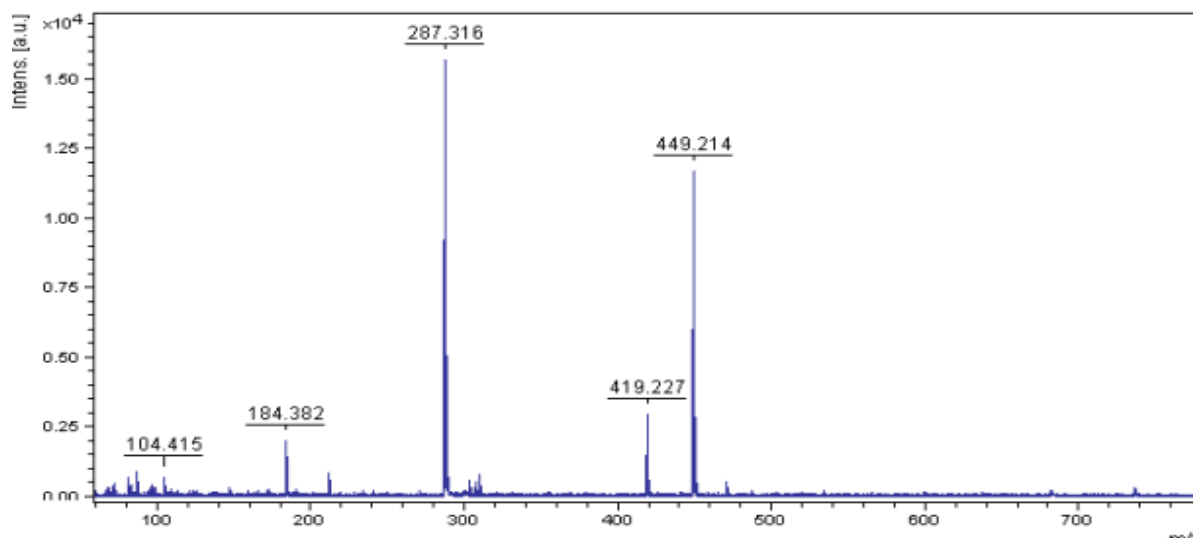


Рис. 6. Масс-спектр цианидина-3-глюкозида

Полученное извлечение фотометрировали на спектрофотометре СФ-56 в диапазоне длин волн  $\lambda = 400\text{--}600$  нм, в качестве раствора сравнения использовали 1% раствор кислоты хлористоводородной в спирте этиловом 50%. Полученные УФ-спектры испытуемых образцов представлены на рис. 7, 8, 9, 10.

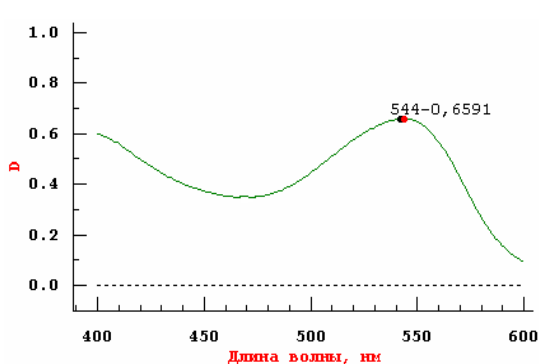


Рис. 7. УФ-спектр антоцианов рябины сорта «Красная из Мичуринска»

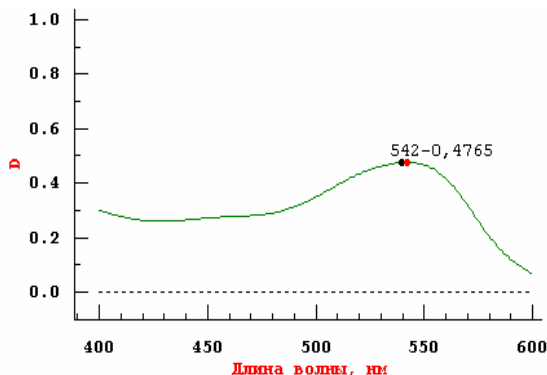


Рис. 8. УФ-спектр антоцианов сорта «Сорбинка»

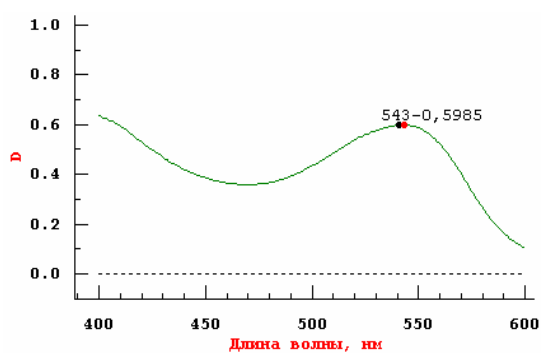


Рис. 9. УФ-спектр антоцианов рябины сорта «Титан»

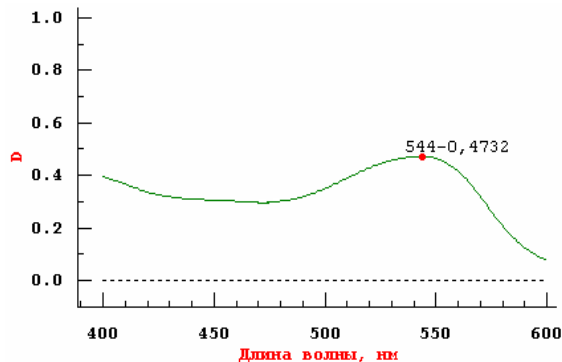


Рис. 10. УФ-спектр антоцианов рябины сорта «Алая крупная»



Количественное содержание суммы антоцианов для каждого сорта рассчитывали по формуле 2:

$$X = \frac{D \times 100 \times 25}{E \times a \times 10} \times 100 \% \quad (2),$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора; E – молярный коэффициент поглощения цианидина-3-глюкозида; a – масса навески; 100, 25, 10 – разведение.

При расчетах мы использовали E = 453 нм, это значение коэффициента для цианидин-3-глюкозида.

Данные анализа представлены в табл. 2.

Таблица 2

**Результаты спектрофотометрического определения антоцианов  
в различных сортах рябины обыкновенной**

Сорт рябины обыкновенной	Суммарное содержание антоцианов, %
Алая крупная	1,04
Красная из Мичуринска	1,45
Сорбинка	1,05
Титан	1,32

Таким образом, исходя из результатов фитохимического анализа сырья всех четырёх сортов, можно сделать вывод о том, что для получения натурального коллоранта необходимо использовать плоды сорта «Красная из Мичуринска», так как суммарное содержание флавоноидов и антоцианов выше, чем у всех остальных сортов.

*Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг., государственный контракт №П425 от 12.05.2010 г.*

**Литература**

1. Акопов, И.Э. Важнейшие отечественные лекарственные растения и их применение: Справочник / И.Э. Акопов. – Ташкент, 2007. – 452 с.
2. Бондаренко, О.Л. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащие флавоноиды, кумарины, хромоны: дис. ... канд. фарм. наук / О.Л. Бондаренко. – Харьков. – 1990. – 195 с.
3. Гавриленко, А.В. Биохимия и физиология витаминов / А.В. Гавриленко. – М.: Медицина, 1999. – 126 с.
4. Государственная фармакопея XI издания. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырьё. – М.: Медицина, 1996. – 398 с.

**CHEMICAL STUDY OF BIO ACTIVE POLYPHENOLS OF SOME VARIETIES  
OF MOUNTAIN ASH – SORBUS AUCUPARIA**

D.I. Pisarev  
O.O. Novikov  
V.N. Sorokopudov  
M.A. Khalikova  
E.T. Zhilyakova  
O.V. Ogneva

**Belgorod State University**

**e-mail: Pisarev@bsu.edu.ru**

The article presents data on the chemical study of the fruits of some varieties of mountain ash, as a promising source of biologically active polyphenols – anthocyanins. Anthocyanins – natural dyes, which has high antiradical activity. In chemical studies by mass spectrometry, thin layer chromatography and ultraviolet spectrophotometry in the fruits of mountain ash later found cyanidin glycosides. In conducting the quantitative determination of the amount of anthocyanins and flavonoids were able to identify the most promising varieties of ash – Red Michurinsk of the "content of anthocyanins which was  $1,45 \pm 0,008\%$ , and flavonoids  $0,42 \pm 0,015\%$ .

Key words: mountain ash, anthocyanins, flavonoids, cyanidin, mass spectrometry, ultraviolet spectrophotometry, thin layer chromatography.