Министерство здравоохранения Российской Федерации
Государственное бюджетное образовательное учреждение
Высшего профессионального образования
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени И.М.СЕЧЕНОВА

*На правах рукописи*

Перова Ирина Борисовна

# ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ И СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ АНТОЦИАНИНОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, профессор
Раменская Галина Владиславовна

Москва – 2015

ВВЕДЕНИЕ..... 9
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ПО ИССЛЕДУЕМЫМ ОБЪЕКТАМ. МЕТОДЫ АНАЛИЗА АНТОЦИАНИНОВ. ..... 18
1.1.1. Общие сведения об антоцианинах ..... 18
1.1.2. Распространенность антоцианинов..... 20
1.1.3. Биосинтез антоцианинов в растениях.....20
1.1.4. Биологические функции антоцианинов в растениях.....22
1.1.5. Фармакологические свойства антоцианинов…….....23
1.1.6. Фармакогностические и фармакологические характеристики растений, содержащих антоцианины..... 26
1.1.6.1. Черника обыкновенная*Vaccinium myrthyllus* L. ..... 26
1.1.6.2. Арония черноплодная *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot……....29
1.1.6.3. Черная смородина *Ribes nigrum* L.. ..... 31
1.1.6.4. Калина обыкновенная *Viburnum opulus* L. ..... 33
1.1.6.5. Лимонник китайский *Schizandra chinensis* (Turcz.) Baill…….34
1.1.6.6. Кизил обыкновенный *Cornus mas* L…..37
1.2. Методы анализа антоцианинов……..…..38
1.2.1. Физические свойства антоцианинов..... 38
1.2.2. Химические свойства антоцианинов ..... 39
1.2.3. Выделение антоцианинов..... 42
1.2.4. Методы разделения и очистки антоцианинов..... 44
1.2.5. Методы идентификации антоцианинов..... 45
1.2.5.1. Спектроскопия в УФ и видимой области.....….45
1.2.5.2. Хроматографические методы анализа……...48
1.2.5.2.1 ТСХ...……..……....48
1.2.5.2.2. ВЭЖХ……..……..……...49
1.2.5.2.3. Масс-спектрометрическое детектирование (МСД) в ВЭЖХ…….…52

1.2.5.3. Спектроскопия ЯМР……..……...……...54
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1. ..... 55
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ ..……...……..56
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ..... 56
2.1. Объекты исследования ..... 59
2.2. Оборудование и реактивы……...61
2.3. Стандартные образцы…….....61
2.4. Методы определения суммарного содержания мономерных антоцианинов……...64
2.4.1. Методика определения суммарного содержания антоцианинов методом pH-дифференциальной СФМ……...…….64
2.4.2. Методика определения суммарного содержания антоцианинов методом прямой СФМ…….……..……66
2.4.3. Сравнение результатов определения суммарного содержания антоцианинов методом прямой и pH-дифференциальной СФМ……....67
2.4.4. Подбор оптимальных условий для экстракции антоцианинов из растительного сырья и продуктов его переработки…...69
2.4.5. Основные валидационные параметры pH-дифференциальной СФМ……...……..…74
2.5. Разработка методики определения специфического профиля антоцианинов методом ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-MS……...…...…79
2.6. Методики определения сопутствующих полифенольных соединений в объектах исследования…….…..……....94
2.7. Методика определения дибензоциклооктадиеновых лигнанов в плодах лимонника китайского и продуктах на его основе……...…..95
ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ И ПРОФИЛЯ АНТОЦИАНИНОВ В ОБЪЕКТАХ ИССЛЕДОВАНИЯ…...……...…97
3.1. Результаты анализа антоцианинов и сопутствующих полифенольных соединений в плодах черники обыкновенной и экстрактах

на их основе……..……..……97
3.1.1. Суммарное содержание антоцианинов в плодах черники обыкновенной и экстрактах на их основе в пересчете на цианидин-3-глюкозид……..…….....97
3.1.2. Профиль индивидуальных антоцианинов черники обыкновенной и экстрактов на ее основе...…….…...100
3.1.3. Результаты анализа сопутствующих полифенольных соединений плодов черники обыкновенной……..…..…….…..107
3.2. Результаты анализа антоцианинов и сопутствующих полифенольных соединений в плодах аронии черноплодной и продуктах на их основе……..……...…….....110
3.2.1. Суммарное содержание антоцианинов в плодах аронии черноплодной и продуктах на из основе в пересчете на цианидин-3-глюкозид…….……...110
3.2.2. Профиль индивидуальных антоцианинов аронии черноплодной и продуктов на её основе..…….…….…….....112
3.2.3. Результаты анализа сопутствующих полифенольных соединений плодов аронии черноплодной……..113
3.3. Результаты анализа антоцианинов и сопутствующих полифенольных соединений в плодах смородины черной и продуктах на их основе……..…….116
3.3.1.Суммарное содержание антоцианинов в плодах черной смородины и продуктах на их основе в пересчете на цианидин-3-глюкозид…….……...……116
3.3.2. Профиль индивидуальных антоцианинов черной смородины и продуктов на их основе…….……....119
3.3.3. Результаты анализа сопутствующих полифенольных соединений плодов черной смородины и продуктов на их основе….124
3.4. Результаты анализа антоцианинов и сопутствующих полифенольных соединений в плодах калины обыкновенной ……..…....127

3.4.1. Суммарное содержание антоцианинов в плодах калины обыкновенной в пересчете на цианидин-3-глюкозид.……...127
3.4.2. Профиль индивидуальных антоцианинов калины обыкновенной…….……...128
3.4.3. Результаты анализа сопутствующих полифенольных соединений плодов калины обыкновенной……..…….132
3.5. Результаты анализа антоцианинов и лигнанов в плодах лимонника китайского и продуктах на его основе…….……...…135
3.5.1. Суммарное содержание антоцианинов в плодах лимонника китайского и продуктах на его основе в пересчете на цианидин-3-глюкозид.....135
3.5.2. Профиль индивидуальных антоцианинов лимонника китайского и продуктов на его основе……..…..……..136
3.5.3. Результаты анализа лигнанов в плодах лимонника китайского и продуктах на его основе…….…....139
3.6. Результаты анализа антоцианинов и сопутствующих полифенольных соединений в плодах кизила обыкновенного.....143
3.6.1. Суммарное содержание антоцианинов в плодах кизила обыкновенного в пересчете на цианидин-3-глюкозид…..….143
3.6.2. Профиль индивидуальных антоцианинов кизила обыкновенного……..…….…….....144
3.6.3. Результаты анализа сопутствующих полифенольных соединений плодов кизила обыкновенного…….…….....145
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ. ..... 143
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....149
ПРИЛОЖЕНИЕ 1……160
ПРИЛОЖЕНИЕ 2……...….166
ПРИЛОЖЕНИЕ 3……...…….168

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AHP – American Herbal Pharmacopoeia, Американская Травяная Фармакопея

Ara – arabinoside, арабинозид

BP 2014 – British Pharmacopoeia 2014, Британская Фармакопея 2014 г. издания

ChP 2010 – The Pharmacopoeiaof the People's Republic of China (PPRC) 2010, Государственная Фармакопея Китайской народной республики (ГФКНР) 2010 г. издания

CID – Collision-induced dissociation, индуцированная низкоэнергетическими столкновениями диссоциация молекул

Cyd – cyanidin, цианидин

Diglu – diglucoside, диглюкозид

Dpd – delphinidin, дельфинидин

EP 8$^{th}$ – European Pharmacopoeia 8$^{th}$ edition, Европейская Фармакопея 8-го издания

Gal – galactoside, галактозид

Glu – glucoside, глюкозид

IT – iontrap, ионная ловушка

JP 16$^{th}$ – Japanese Pharmacopoeia 16$^{th}$ edition, Японская Фармакопея 16-го издания

Mvd – malvidin, мальвидин

m/z – отношение массы к заряду

Pgd – pelargonidin, пеларгонидин

Ph. Fr. 11ème – Pharmacopée Français 11 èmeedition, Французская Фармакопея 11-гоиздания

Pnd – peonidin, пеонидин

Ptd – petunidin, петунидин

QqQ – triplequadrupole, тройной квадруполь

Samb – sambubioside, самбубиозид

TOF – time-of-flight, времяпролетный масс-спектрометрический детектор

Xyl – xyloside, ксилозид

Vis – visible, видимая область спектра

АРА – антирадикальная активность

АЦ – антоцианины

АЦП – антоцианопласты

АЧ – арония черноплодная

БАВ – биологически активные вещества

БАД – биологически активные добавки к пище

БХ – бумажная хроматография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГРЛС – Государственный реестр лекарственных средств

ДМД – спектрофотометрический детектор на диодной матрице

КД – коэффициент деградации

КО – калина обыкновенная

ЛК – лимонник китайский

ЛП – лекарственный препарат

ЛПНП – липопротеиды низкой плотности

ЛРС – лекарственное растительное сырьё

МС – масс-спектрометрия

МСД – масс-спектрометрическое детектирование

НД – нормативная документация

ОФ – обращеннофазовый

ПАЦ – проантоцианидины

ПАЧ – плоды аронии черноплодной

ПКИЗО – плоды кизила обыкновенного

ПКО – плоды калины обыкновенной

ПЛК – плоды лимонника китайского

ПМР – протонно-магнитный резонанс

ПФ – полифенольные соединения

РЛС – реестр лекарственных средств

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТФУК – трифторуксусная кислота

ТФЭ – твердофазная экстракция

УФ (UV) – ультрафиолетовая область спектра

ФС – Фармакопейная Статья

ЧО – черника обыкновенная

ЧС – черная смородина

ЭЧ – экстракт черники

ЭЧС – экстракт черной смородины

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

Антоцианины (водорастворимые гликозиды антоцианидинов) относятся к классу широко распространенных полифенольных вторичных метаболитов растений – флавоноидов. Антоцианины обладают целым рядом конкретных фармакологических свойств, проверенных в строго контролируемых опытах in vitro, in vivo, в доклинических и клинических исследованиях. Показана роль антоцианинов в улучшении трофики зрительного аппарата и ночного зрения, в снижении риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний и сосудистых осложнений при сахарном диабете 2 типа. Эти свойства антоцианинов непосредственно связаны с их защитной функцией против окислительного стресса, гипогликемической и гиполипидемической активностью. Описаны способности антоцианин-содержащих экстрактов участвовать в противовоспалительной активности и снижении перекисного окисления липидов, снижении проницаемости и хрупкости капилляров и укреплении мембран [20, 22, 26, 34, 38, 43, 44, 54, 55, 62, 64, 74, 76-78, 84, 87].

Фармакопейными источниками антоцианинов являются плоды черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.), плоды аронии черноплодной (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott), плоды черной смородины (*Ribes nigrum* L.), плоды калины обыкновеной (*Viburnum opulus* L.), плоды лимонника китайского (*Schizandra chinensis* (Turcz.) Baill.).

В ГФ XI изд., а также в проекты Фармакопейных статей (ФС) для ГФ XIII изд. включены только плоды черники высушенные, в которых регламентируется содержание дубильных веществ (ГФ XI изд.) и антоцианинов (проект ФС «Плоды черники высушенные» для ГФ XIII изд.), тогда как в Фармакопеи ряда стран Европы включены ФС на ЛРС плоды черники свежие, стандартизуемые по содержанию антоцианинов. Необходимость применения в качестве источника мономерных антоцианинов свежего или замороженного сырья обусловлена тем, что в процессе

высушивания плодов происходят процессы гидролиза и полимеризации антоцианинов, в результате чего содержание мономерных антоцианинов резко снижается, а полимерные пигменты, обладающие низкой биодоступностью, не оказывают характерных для антоцианинов фармакологических эффектов. Стандартизация высушенных плодов черники по содержанию мономерных антоцианинов более достоверно характеризует биологическую ценность сырья, а также обосновывает требования к режиму сушки плодов, позволяющие максимально сохранить мономерные антоцианины.

Плоды аронии черноплодной, смородины черной, лимонника китайского разрешены в РФ для лекарственного применения, но до настоящего времени не включены в ГФ.

На плоды аронии черноплодной свежие и высушенные разработаны проекты ФС для включения в ГФ XIII изд., содержащие малоинформативные и неселективные методы качественного и количественного анализа мономерных антоцианинов в сырье.

В РФ традиционно заготавливают плоды смородины черной высушенные. Плоды смородины черной свежие, одними из основных действующих веществ которых являются антоцианины, включены в Британскую Фармакопею 2014 (BP 2014), во Французскую Фармакопею 11 изд. (Ph. Fr. 11ème), Европейскую Фармакопею 8 изд. (EP 8$^{th}$), и стандартизуются толькопо содержанию аскорбиновой кислоты.

Содержащиеся в плодах лимонника китайского дибензоциклооктадиеновые лигнаны (схизандрины) и антоцианины являются как индикаторными компонентами, так и действующими веществами, обуславливающими гепатопротекторные, антидиабетические, антиоксидантные и антирадикальные свойства сырья и ЛП на его основе. Поэтому в ЛРС на основе плодов лимонника наряду со схизандринами целесообразно регламентировать содержание и состав антоцианинов.

ФС ГФ XI изд. «Плоды калины» не соответствует современным требованиям к стандартизации ЛРС, так как в ней отсутствуют нормативы содержания и методы анализа действующих и/или индикаторных компонентов. В этой связи целесообразно стандартизовать ЛРС и ЛП на основе калины обыкновенной по содержанию антоцианинов для оценки подлинности и потенциальной биологической активности.

В связи с новыми данными по фармакологической активности плодов кизила обыкновенного, во многом обусловленной присутствием в них антоцианиновых пигментов, целесообразно изучить содержание и профиль антоцианинов в перспективном пищевом растительном сырье на основе плодов кизила обыкновенного.

В настоящее время сухие экстракты черники, аронии, черной смородины, содержащие до 30% антоцианинов, в виде различных лекарственных форм нашли широкое применение в комплексной терапии и профилактике нарушений зрения, сахарного диабета 2 типа, сосудистых нарушений. Разрабатываются технологии выделения антоциановой фракции из антоцианин-содержащего растительного сырья с целью последующего внедрения в фармацевтическое и пищевое производство.

На фармацевтическом рынке РФ представлен ряд ЛП и БАД к пище на основе плодов черники, аронии, черной смородины, калины, лимонника и кизила, сухих стандартизованных по содержанию антоцианинов экстрактов черники и черной смородины в основном зарубежного производства. В России имеется обширный ареал произрастания антоцианин-содержащих растений (черника, арония, черная смородина, калина, лимонник, кизил), производственные возможности для получения обогащенных антоцианинами экстрактов и разработки ЛП на их основе с целью импортозамещения.

Важной предпосылкой оценки качества и биологической ценности отечественного антоцианин-содержащего ЛРС является проведение комплексного исследования, включающего определение общего содержания

антоцианинов, профиля индивидуальных антоцианинов, сопутствующих полифенольных соединений, а также оценка антирадикальных свойств.

**Степень разработанности темы исследования**

Из исследованных в диссертационной работе видов антоцианин-содержащего ЛРС в отечественной литературе представлены только, как правило, завышенные данные о суммарном содержании антоцианинов в плодах черники, полученные с помощью неселективного метода прямой СФМ. Состав индивидуальных мономерных антоцианинов изучался в этих работах с помощью малопригодного для выполнения поставленной задачи метода ТСХ, ввиду недостаточной эффективности разделения последнего и неспецифичных методов детектирования [13]. Встречаются единичные работы по изучению содержания мономерных антоцианинов сырье на основе черники обыкновенной и продуктах переработки смородины черной методом pH-дифференциальной СФМ [12, 14]. Однако до настоящего времени в РФ не было проведено систематических работ по исследованию общего содержания и специфического состава мономерных антоцианинов в отечественном фармакопейном ЛРС на примере группы плодов черники обыкновенной, аронии черноплодной, смородины черной, калины обыкновенной, лимонника китайского, а также перспективного для медицинских целей пищевого сырья на основе плодов кизила обыкновенного с помощью современных высокоспецифичных и селективных методов анализа (pH-дифференциальная СФМ и ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором на диодной матрице (ВЭЖХ-ДМД) и масс-спектрометрическим детектором).

**Цель и задачи исследования**

Целью данной работы является систематическое исследование с помощью современных методов анализа общего содержания и профиля индивидуальных антоцианинов отечественного ЛРС, экстрактов и других продуктов его переработки с целью их стандартизации и разработки критериев качества.

Для реализации цели ставятся следующие задачи:

- адаптировать методику определения общего содержания мономерных антоцианинов методом pH-дифференциальной СФМ для ЛРС и продуктов его переработки, сравнить pH-дифференциальный метод с действующими фармакопейными методами количественного определения антоцианинов;

- разработать методики определения специфического профиля антоцианинов в ЛРС и продуктах его переработки для научных и рутинных задач;

-определить суммарное содержание и состав индивидуальных антоцианинов в объектах исследования, установить границы природных вариаций содержания антоцианинов в изучаемом ЛРС как для использования этих показателей при разработке нормативной документации, так и для разработки подходов к выявлению фальсификации сырья;

- изучить влияние гомологичных примесных плодов на содержание и состав антоцианинов в ЛРС на основе объектов исследования;

-изучитьсопуствующий полифенольный комплекс ЛРС (флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, проантоцианидины, общие полифенолы);

- оценить корреляцию данных по содержанию антоцианинов и сопутствующих ПФ в растительном сырье с результатами тестов на антирадикальные свойства.

**Научная новизна результатов исследования**

Разработаны оригинальные методики идентификации индивидуальных антоцианинов методом ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС и ВЭЖХ-ДМД. С помощью разработанных оригинальных методик ВЭЖХ-ДМД и ВЭЖХ-МС идентификации и высокоспецифичного метода pH-дифференциальной СФМ впервые систематически изучены общее содержание и специфический профиль мономерных антоцианинов в отечественном ЛРС на основе плодов черники обыкновенной, аронии черноплодной, черной смородины, калины обыкновенной, лимонника китайского, а также перспективного для использования в традиционной медицине пищевого растительного сырья на

основе плодов кизила обыкновенного. Впервые установлены границы естественных вариаций относительного содержания мономерных антоцианинов в объектах исследования. Впервые изучен комплекс сопутствующих полифенольных соединений в объектах исследования.

**Теоретическое значение результатов работы**

Результаты проведенного эксперимента, представленные в диссертационной работе, могут служить теоретическими основами для исследования антоцианин-содержащих лекарственных растений, в том числе хемотаксономической классификации, а также разработки технологий производства стандартизованных экстрактов и ЛП на их основе.

**Практическое значение результатов работы**

Разработанные методики использовались на базе ФГБНУ «НИИ питания» при регистрации и санитарно-гигиенической экспертизе более 100 образцов лекарственного и пищевого растительного сырья, и продуктов на его основе с целью государственной регистрации экстрактов и БАД к пище растительного происхождения. Результаты работы включены в межгосударственный стандарт ГОСТ 32709-2014 «Продукция соковая. Методы определения антоцианинов». Результаты работы могут быть использованы при подготовке частных ФС и ФСП на антоцианин-содержащее ЛРС.

**Методология и методы исследования**

В процессе эксперимента были использованы методы ВЭЖХ со спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-MC, ВЭЖХ-ДМД-ESI-MC/MC и ВЭЖХ-ДМД), прямой и pH-дифференциальной спектрофотометрии.

**Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендуемых ВАК России.

**Степень достоверности результатов**

При проведении исследований использовано современное сертифицированное оборудование, на которое выданы действующие свидетельства о поверке; определены точность, правильность и воспроизводимость результатов исследований.

**Апробация работы**

Результаты исследований доложены на XVI Международном съезде «Фитофарм 2012» (июль 2012, Санкт-Петербург), XIV Всероссийском Конгрессе диетологов и нутрициологов «Питание и здоровье» (декабрь 2012, Москва), на XVII Международном съезде «Фитофарм 2013» (июль 2013, Вена), на научных конференциях кафедры фармацевтической и токсикологической химии Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (2012 – 2015 гг.); 12-ой Международной конференции «Мир соков 2013» (апрель 2013, Казань); 13-ой Международной конференции «Мир соков 2014» (апрель 2014, Москва); XVIII Международном съезде «Фитофарм 2014» (июль 2014, Санкт-Петербург). Апробация работы проходила на кафедре фармацевтической и токсикологической химии (24 декабря 2014, Москва).

**Личный вклад автора**

Автор принимал непосредственное участие в организации и проведении работ на этапах постановки цели и задач исследования, разработки методологических подходов к выполнению поставленных задач, анализа отечественной и зарубежной научной литературы, нормативной документации. Лично автором были проведены экспериментальные исследования, анализ полученных результатов и их статистическая обработка. Автору принадлежит ведущая роль в написании публикаций и проекта общей фармакопейной статьи (ОФС). Диссертация написана лично автором.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертационной работы соответствуют формуле специальности «14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия».

Результаты проведенного экспериментального исследования соответствуют области исследований специальности, конкретно пунктам 2, 3 и 6 паспорта специальности фармацевтическая химия, фармакогнозия.

**Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематикой и планом «Развитие научных и научно-методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств», номер государственной регистрации 01201261653.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Адаптирование методики определения общего содержания мономерных антоцианиов для ЛРС и продуктов его переработки методом pH-дифференциальной спектрофотометрии.
2. Разработка методик идентификации и определения профиля индивидуальных антоцианинов в ЛРС и продуктах его переработки методом ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-MS и ВЭЖХ-ДМД.
3. Результаты определения суммарного содержания и специфического профиля антоциановых пигментов в ЛРС на основе плодов черники обыкновенной, аронии черноплодной, смородины черной, калины обыкновенной, лимонника китайского и продуктах его переработки, а также перспективного пищевого сырья на основе плодов кизила обыкновенного и продуктах его переработки.
4. Разработка проекта ОФС «Определение содержания и состава мономерных антоцианинов в лекарственном растительном сырье, растительных экстрактах и лекарственных растительных препаратах».

**Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 171 стр. машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов исследования и их обсуждения, выводов и библиографического указателя, включающего 107 источников, из

которых 92 на английском языке. Работа сопровождается 41 рисунком, 47 таблицами и 3 приложениями.

Во введении обоснована актуальность работы, поставлены цель и задачи исследования, сформулированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость.

В Главе I проведен обзор литературных данных распространенности, биологическим и фармакологическим свойствам антоцианинов; фармакологическим характеристикам объектов исследования; физическим и химическим свойствам антоцианинов; выделению, очистке и современным методам качественного и количественного анализа антоцианинов.

Глава II посвящена адаптации для ЛРС и валидации pH-дифференциального метода анализа суммы антоцианинов, разработке оригинальных ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС и ВЭЖХ-ДМД методик определения профиля индивидуальных антоцианинов в объектах исследования.

В Главе III представлены результаты анализов общего содержания и профиля мономерных антоцианинов, общего содержания и профиля сопутствующих полифенольных соединений в объектах исследования, а также результаты DPPH-теста на антирадикальную активность извлечений из исследуемого ЛРС и их обсуждение.

Сформулированы выводы по проведенной работе и представлен список литературы. Приложения к диссертации содержат типичные ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС и ВЭЖХ-ДМД хроматограммы объектов исследования, а также проект ОФС «Определение содержания и состава мономерных антоцианинов в лекарственном растительном сырье, растительных экстрактах и лекарственных растительных препаратах».

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ПО ИССЛЕДУЕМЫМ ОБЪЕКТАМ. МЕТОДЫ АНАЛИЗА АНТОЦИАНИНОВ

## 1.1.1.Общие сведения об антоцианинах

Антоцианы (от греческого anthos – цвет, окраска и kyanos – синий) или антоцианины – широкая группа водорастворимых растительных пигментов, обусловливающих красную, синюю и фиолетовую окраску плодов, цветков, листьев и других частей растений.

Антоцианины относятся к классу флавоноидов (производных 2-фенилбензопирана или 2-фенилхромана) и представляют собой гликозиды катионов флавилия - антоцианидинов (рис. 1). В основе структуры антоцианидинов лежит $C_6$-$C_3$-$C_6$ углеродный скелет, состоящий из хромана, к которому в положении 2 присоединено фенольное кольцо (рис. 1). Замещенное бензольное кольцо, непосредственно связанное с пираном, обозначается как кольцо А, фенольное кольцо, присоединенное к бензопирану во 2-м положении – как кольцо В, а само пирановое кольцо – как кольцо С. Антоцианины отличаются от других групп флавоноидов наличием формального положительного заряда на атоме кислорода пиранового кольца.

Было выделено и идентифицировано около 30 антоцианидинов [42], однако в основе около 90% антоцианинов лежат шесть основныхантоцианидинов, структуры которых представлены в Таблице 1.

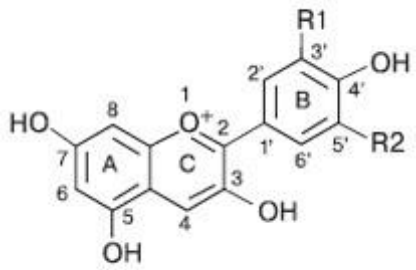



Рисунок 1. Антоцианидин (катион флавилия).

Таблица 1

Структуры основных антоцианидинов

| $R_1$ | $R_2$ | Агликон | Сокращенное название | Цвет | $\lambda_{vis\text{-}max}$*, нм |
|---|---|---|---|---|---|
| H | H | Пеларгонидин | Pgd | Оранжево-красный, лососевый | 512 |
| OH | H | Цианидин | Cyd | Красный, малиновый | 524 |
| $OCH_3$ | H | Пеонидин | Pnd | Малиновый, пурпурно-синий | 524 |
| OH | OH | Дельфинидин | Dpd | Пурпурный, мальвовый, синий | 528 |
| $OCH_3$ | OH | Петунидин | Ptd | Пурпурный | 532 |
| $OCH_3$ | $OCH_3$ | Мальвидин | Mvd | Пурпурный | 534 |

*Растворитель 10:90 $HCl_{конц}$/60% водный метанол

Антоцианидины редко встречаются в природе в свободном виде.В цветках, плодах и других частях растений они находятся в виде гликозидов – антоцианинов. По литературным данным идентифицировано более 600 природных антоцианинов, которые различаются 1) количеством и расположением гидроксильных и метоксильных групп в молекуле антоцианидина; 2) природой, числом и положениями, в которых сахара присоединяются к агликонам; и 3) степенью ацилирования сахаров и природой ацилирующего агента [33, 42, 47].

Гликозидная часть обычно присоединяется к гидроксилам бензопирана в положениях $C_3$ и $C_5$, реже в положении $C_7$ и к кольцу С в положениях $C_{3'}$, $C_{4'}$, $C_{5'}$. В состав гликозидной части входят моно-, ди- или трисахариды. Моносахариды представлены гексозами (глюкоза, галактоза, рамноза и др.) и пентозами (арабиноза, ксилоза и др.). Ди- и трисахариды образованы в основном из вышеперечисленных моносахаридов. Наиболее распространенными дисахаридами являются рутиноза (α-L-рамнопиранозил-(1→6)-β-D-глюкопираноза), софороза (β-D-глюкопиранозил-(2→1)-α-D-глюкопираноза), самбубиоза (β-D-ксилопиранозил-(1→2)-β-D-

глюкопираноза), вицианоза (α-L-арабинопиранозил-(1→6)-β-D-глюкопираноза) и латироза (β-D-ксилопиранозил-(1→2)-β-D-галактопираноза). Среди трисахаридов наиболее часто встречаются глюкорутиноза и ксилорутиноза.

Гликозиды могут быть этерифицированы гидроксикоричными кислотами (п-кумаровой, кофейной, феруловой, синаповой и 3,5-дигидроксикоричными кислотами), гидроксибензойными кислотами (п-гидроксибензойной и галловой) и алифатическими кислотами (малоновой, яблочной, щавелевой, янтарной, уксусной, винной и др.) преимущественно в положении $C_3$, в результате чего образуются моно- или полиацилированные антоцианины.

### 1.1.2. Распространенность антоцианинов

Антоцианины являются наиболее распространенными водорастворимыми пигментами большинства высших растений. Общее содержание мономерных антоцианинов в растениях может доходить до 2%.

В естественном состоянии АЦ растворены в вакуолярном соке эпидермальных и субъэпидермальных, реже палисадных и губчатых мезофильных клеток плодов, цветков и околоцветников, листьев, стеблей, корнеплодов и др. В вакуолях АЦ локализованы внутри специальных мембраносвязанных телец – антоцианопластов (АЦП). В АЦП проходит синтез антоцианинов. АЦП окружены прозрачной мембраной, которая способствует поддержанию в них более высокой концентрации пигментов, чем в вакуоли. По мере созревания растения АЦ транспортируются через мембрану из АЦП в вакуоль, и только в видесвободных вакуолярных включений придают клеткам специфическую окраску [42, 47, 85].

### 1.1.3. Биосинтез антоцианинов в растениях

Антоцианины синтезируются через фенилпропановый путь [47, 51]. Предшественник флавоноидов и антоцианинов фенилаланин образуется путем челночного фото-ассимилирования от цикла Кальвина через шикиматный путь и биотрансформацию хоризмата[47].

В большинстве случаев антоцианины представляют собой О-гликозиды, и первый этап гликозилирования - в положении $C_3$ - стабилизирует агликоны. Однако во многих растениях 3-О-моногликозиды не являются конечными продуктами, накапливающимися в клетках, и они подвергаются дальнейшему ацилированию и метилированию. Последнее является конечным этапом биосинтеза антоцианинов. Этим биосинтез антоцианинов принципиально отличается от других групп флавоноидов (флавонолов, флавонов, изофлавонов), у которых гидроксилирование и метилирование происходит на стадии образования агликонов.

Наиболее полно изучен биосинтез антоцианинов в плодах черники. Окраска черники в норме варьируется от синего до иссиня-черного цвета. Однако в природе обнаружены редкие случаи мутации, когда ягоды черники имели белый или розовый цвет. Изменение цвета может быть результатом мутации структурных или регуляторных генов, вовлеченных в биосинтез антоцианов [51].

Зрелые плоды черники, аронии, черной смородиныиз всех классов флавоноидов содержат наибольшее количество антоцианинов. При этом в кожуре плодов черники и аронии антоцианинов значительно больше, чем в мякоти. Что касается других классов флавоноидов, то на ранних стадиях созревания в плодах накапливаются олиго- и полимерные проантоцианидины, флавонолы и флавоны, содержание которых падает в процессе созревания. Проантоцианидины защищают незрелые плоды от возможности быть съеденными слишком рано, так как они обладают сильно вяжущим вкусом, а также от грибкового поражения.

На синтез антоцианинов могут влиять факторы окружающей среды, такие как интенсивность и природа светового излучения; резкие перепады температур; осмотический стресс; минеральный и pH-дисбаланс; механичекие повреждения; атака травоядных и патогенных микрооорганизмов; загрязнение окружающей среды; применение гербицидов и др. [30, 33,44, 47, 51, 69, 81].

### 1.1.4. Биологические функции антоцианинов в растениях

Антоцианинам как вторичным метаболитамрастений приписывается выполнение ряда важных функций, которые можно разделить на две основные группы: отношения растение/насекомое (животное) и реакция на воздействие стрессовых факторов окружающей среды [33, 51, 69, 81, 85].

Антоциановые пигменты придают тканям растений широкий диапазон цветовых оттенков: от сине-фиолетовых до красновато-оранжевых. Антоцианы могут образовывать комплексы с ко-пигментами, способными к интенсификации и модификации цвета, обусловленного пигментом. Ко-пигментами являются практически все полифенольные соединения, а также пурины, алкалоиды и катионы металлов. На окончательную окраску тканей растения, помимо всего вышеперечисленного, могут повлиять температура и pH вакуолярной жидкости [47].

В случае цветков обусловленная антоцианинами яркая окраска служит для привлечения насекомых и других опылителей. В плодах антоцианины являются своеобразными «индикаторами спелости», подчеркивающими контраст с неспелыми плодами, привлекая птиц и животных, которые съедают плоды и, таким образом, распространяют семена растений.

В вегетативных тканях (листьях, стеблях) биологическое значение антоцианинов – предмет продолжающейся до настоящего времени дискуссии. Так как антоцианины поглощают видимое (сине-зеленое) и ультрафиолетовое излучение (UV-B) и являются мощными антиоксидантами и гасителями свободных радикалов, лидирует гипотеза о том, что антоцианины защищают фотосинтетический аппарат от воздействия избыточного видимого или ультрафиолетового излучения и фотооксидативного стресса [62, 69, 85].Эта гипотеза распространяется и на плоды: черника, голубика, клюква, брусника и другие ягоды, произрастающие на севере России (Карелия, Архангельск, Мурманск и др.) или в высокогорных областях в условиях долгого светового дня, которые

накапливают больше антоцианинов, чем те же ягоды, произрастающие в регионах с более благоприятными климатическими условиями [28, 30, 50].

Другие гипотезы о биологических функциях антоцианинов включают предположения, что антоцианины могут влиять на температуру листьев или служить сдерживающим фактором для травоядных и других потенциальных хищников, менее привлекательны с точки зрения физиологии растений [81, 85].

### 1.1.5. Фармакологические свойства антоцианинов

Антоцианины являются одними из основных фармакологически активных компонентов плодов черники, аронии, черной смородины, калины, лимонника и кизила.

Использование антоцианинов черники в лечебных целях началось в 40-х годах XX в. Научные исследования второй половины XX в. показали, что антоцианины черники обладают антиоксидантной и антирадикальной активностью; улучшают зрительные способности при пигментной дистрофии сетчатки и гемералопии; способствуют стабилизации зрения при прогрессирующей миопии, диабетической и/или гипотензивной ретинопатии, полиневритах, связанных с сосудистой недостаточностью, замедляют развитие катаракты при совместном назначении с витамином Е. Хорошо документирована роль этих пигментов в улучшении ночного зрения и адаптации к темноте. Результатами экспериментальных и клинических исследований подтверждена способность антоцианов черники ускорять регенерацию светочувствительного пигмента родопсина, улучшать трофику сетчатки глаза, стимулировать микроциркуляцию сосудистых тканей, восстанавливать тканевые механизмы защиты сетчатки [25, 33, 71, 72].С появлением технологий, позволяющих обеспечить производство стандартизованных экстрактов из свежих плодов черники, расширяется область фармакологического применения свежих плодов черники- для лечения сосудистых и глазных заболеваний. Плоды черники свежие и

стандартизованный экстракт черники были включены в европейскую, британскую, итальянскую, французскую и другие фармакопеи [27, 40, 82].

За последние 10-15 лет появилось много публикаций по общим биохимическим, клеточным и фармакологическим свойствам антоцианинов изиных лекарственных и пищевых растений – черноплодная рябина, черная смородина, голубика, брусника, клюква, жимолость, бузина черная, калина, кизил, лимонник китайский и другие [29, 52-55, 57, 58, 60, 64, 65, 84, 97, 104].

Широко исследована роль антоцианинов в предотвращении и комплексной терапии целого ряда заболеваний, возникновение и развитие которых связывают с оксидативным стрессом (сердечно-сосудистые заболевания, возрастные дегенеративные заболевания, заболевания глаз, ЖКТ и другие), непосредственно связанная с их способностью гасить свободные радикалы и ингибировать перекисное окисление липидов, оказывая цитопротекторное и противовоспалительное действия [21, 26, 34,43, 44, 48,58, 59, 62, 91, 97].

При сахарном диабете антоцианины из черноплодной рябины, черной смородины, черники, кизилазащищают β-клетки поджелудочной железы от индуцированного глюкозой окислительного стресса, стимулируют секрецию инсулина β-клетками, снижают уровень глюкозы, ЛПНП и триглицеридов в крови и моче, уровень гликемии и гликозированного гемоглобина, предотвращают развитие диабетической катаракты [43, 54, 55, 58, 59, 68, 73, 84, 85, 103].

В клинических испытаниях и тестах in vitro продемонстрировано, что антоцианины черноплодной рябины и черной смородины оказывают прямое вазорелаксирующее действие на артерии и венычерез инозитолфосфатный путь, активируя эндотелиальную синтазу оксида азота NO (eNOS) и усиливая ее активность; снижают вязкость крови; снижают повышенную проницаемость капилляров и улучшают капиллярную фильтрацию [21, 22, 38, 76-78].

Фармакокинетика антоцианинов зависит от их структуры, от химического состава растительного материала, от введенной дозы, от пола, возраста, состояния здоровья испытуемых и ряда других факторов.

После внутривенного и перорального введения антоцианины быстро распределяются в различных тканях организма. Выделение происходит с мочой и желчью. Во многих работах сообщается, что антоцианины всасываются в ЖКТ и выводятся в неизменном виде. В результате недавних исследований установлено, что процессы абсорбрции и метаболизма антоцианинов протекают более интенсивно, чем предполагалось ранее. Было идентифицировано более 35 метаболитов антоцианинов, включая продукты деградации (протокатеховая кислота и флороглюцинальдегид), метаболиты I фазы (дегидроксилированные и восстановленные производные) и II фазы (конъюгаты с глюкуроновой, серной кислотами, глицином, метилированные производные) [41, 66, 67, 79].

По данным различных исследований, после разового перорального введения максимальная концентрация антоцианинов ($C_{max}$) в плазме составила от 1,4 до 592,0 нмоль/л через 0,25-2,8 ч ($t_{max}$), период полувыведения ($t_{1/2}$) - от 2 до 7 ч [41, 66, 67, 79]. Большое количество идентифицированных метаболитов антоцианинов, появление нескольких метаболитов через двое суток после введения и широкий диапазон времен их полувыведения предполагают, что клиренс антоцианинов представляет собой комплексный процесс, включающий энтерогепатическую циркуляцию и микробный метаболизм с длительным периодом кишечной абсорбции в тонком и толстом кишечнике.

Фармакологическая суточная доза антоцианинов для взрослого человека - от 80 мг. Согласно «Изменениям в Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)» адекватный уровень потребления антоцианинов составляет 50 мг, а верхний допустимый уровень потребления 150 мг. Парафармацевтики на основе экстрактов черники,

черной смородины, аронии и других богатых антоцианинами плодов должны обеспечивать не менее 15% от рекомендуемого техническим регламентом уровня потребления пигментов.

Обогащенные антоцианинами экстракты и лекарственные препараты в рекомендуемых фармакологических дозах обладают низкой токсичностью и не имеют серьезных побочных эффектов. По литературным данным, испытания, включавшие 2295 участников, не показали никаких серьезных побочных эффектов: наблюдалось только несколько случаев слабо выраженных отрицательных реакций, таких как желудочно–кишечные расстройства и кожные высыпания [37].

### 1.1.6. Фармакогностические и фармакологические характеристики растений, содержащих антоцианины

#### 1.1.6.1.Черника обыкновенная *Vaccinium myrthillus L.*

Черника обыкновенная *Vaccinium myrtilius* L. (рис.3) – низкорослый полукустарник семейства Вересковые (*Ericaceae*).

Рисунок 3. Внешний вид растения черника обыкновенная *Vaccinium myrtillus L.*

Географическое распространение.

Род *Vaccinium* включает более 100 видов и более 450 разновидностей, из которых на территории РФ в диком виде произрастает около 7 видов, в том числе один кавказский и три дальневосточных.

Черника обыкновенная широко распространена на территории лесной, таежной и лесотундровой зон России, в Сибири. Произрастает в сосновых борах, черничных ельниках, елово-широколиственных лесах, на сфагновых болотах. Введение в культуру дикорастущейчерники обыкновенной *Vaccinium myrtillus* L. не увенчалось успехом, так как затраты на культивирование были настолько высокими, что заготовка таких плодов оказалась нерентабельной. Затем были проведены селекционные работы, в результате которых в культуру удалось ввести только гибридные, выведенные методом селекции сорта. Однако гибридные плоды не отличались столь высоким содержанием антоцианинов, как дикорастущие.

**Лекарственное растительное сырье.**

В РФ от растения черника обыкновенная заготавливают 2 вида ЛРС: плоды черники высушенные (Fructus Myrtilli siccus) и побеги черники (Cormus Myrtilli). Как было упомянуто в разделе **1.5**, в ряд фармакопей стран Европы включено ЛРС плоды черники свежие (Fructus Myrtilli recens) и листья черники (Folia Myrtilli) [3, 6, 9, 27, 40, 82].

В медицинской промышленности РФ также разрешена заготовка сырья от черники кавказской *V. arctostaphylos* L. (рис. 4) [6, 9].

Географическое распространение.

Черника кавказская распространена на Кавказе и в Северной Малой Азии. Растет в горах преимущественно на высоте 600-2000 м над уровнем моря, в колхидных буковых, пихтово- и елово-буковых, реже в каштановых и дубовых лесах, полянах.

Рисунок 4. Внешний вид растения черника кавказская *Vaccinium arctostaphylos* L.

**Химический состав черники.**

Наряду с хорошо изученными макро- и микронутриентами плоды черники содержат значительное количество минорных биологически активных веществ: антоцианины (гликозиды дельфинидина, цианидина, петунидина, пеонидина и мальвидина); флавонолы; флаван-3-олы: катехин, эпикатехин, галлокатехин, эпигаллокатехин; проантоцианидины (А и В типа) и гидролизуемые дубильные вещества; гидроксикоричные кислоты (п-кумаровая, кофейная, хлорогеновая).

В побегах черники с листьями содержатся проантоцианидины, флавонолы, антоцианины (гликозиды цианидина), гидроксикоричные кислоты (п-кумаровая, кофейная, хлорогеновая), фенолы и их производные (арбутин, гидрохинон), тритерпеновые кислоты (урсоловая и олеановая).

**Фармакологическая активность черники.**

Каждый из 3 видов сырья, заготавливаемый от растения Черника обыкновенная, имеет свои области применения в медицине.

Высушенные плоды черники хорошо известны своими противовоспалительными и антидиарейными свойствами. Настои и отвары высушенных ягод такжеприменяют наружно при ангинах, стоматитах, катаре верхних дыхательных путей.

Побеги черникио бладают инсулиноподобным действием, используемым при лечении сахарного диабета 2 типа легкой и средней тяжести. Листья черники оказывают противовоспалительное, противомикробное, мочегонное и желчегонное действия.

Свежие плоды черники проявляют антиоксидантную, капилляропротекторную, противовоспалительную, гипогликемическую, гиполипидемическую, антиагрегантую и другие виды фармакологической активности.

**Лекарственные препараты на основе черники.**

Из высушенных плодов черники готовят отвар. Побеги черники входят в противодиабетические лекарственные сборы "Арфазетин" и «Мирфазетин», выпускаемые Российской промышленностью. В Государственном Реестре Лекарственных Средств (ГРЛС) РФ зарегистрированы три ЛП на основе свежих и свежезамороженных плодов черники: «Миртилене форте» (S.I.F.I., Италия) в форме капсул, «Стрикс» (Ferrosan, Дания) в форме таблеток, «Миртикам» (Камелия НПП, Россия) в форме гомеопатического сиропа и таблеток для рассасывания [106].

### 1.1.6.2. Арония черноплодная *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott

Арония черноплодная *Aronia melanocarpa (Michx.) Elliott* (рис. 5)-плодовый кустарник или дерево семейства Розоцветные (*Rosaceae*).

Географическое распространение.

Родина аронии черноплодной – восточная часть Северной Америки, откуда она в конце XIX в. была завезена в Европу. В России введением аронии в культутру занимался И.В. Мичурин, который в 1935 г. передал ростки на Алтайскую исследовательскую станцию садоводства, а затем и в другие регионы. Благодаря своей неприхотливости и морозоустойчивости

черноплодная рябина распространена почти во всех географических зонах России: в Европейской части, Западной и Восточной Сибири, на Урале.

Рисунок 5. Внешний вид растения арония черноплодная *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott

**Лекарственным сырьём** являются плоды аронии черноплодной свежие (Fructus Aroniae melanocarpae recens) и плоды аронии черноплодной высушенные (Fructus Aroniae melanocarpae siccus) [6, 9, 105].

**Химический состав аронии черноплодной.**

Арония черноплодная содержит моносахариды (глюкоза, фруктоза), сорбит, пектины, антоцианины, флавоноиды, фенолокислоты, органические кислоты (яблочная, лимонная, шикимовая) и аскорбиновую кислоту, конденсированные танины, каротиноиды, токоферолы.

**Фармакологическая активность аронии черноплодной.**

Плоды аронии оказывают гипотензивное, гипогликемическое, противоспалительное, противомикробное, капилляро-, гастро-, гепато- и кардиопротекторное, антиатеросклеротическое, антиоксидантное и другие действия. Сок из свежих плодов черноплодной рябины применяют наружно для лечения ожогов, в том числе солнечных.

Высушенные плоды аронии – противовоспалительное и антидиарейное средство. Как и в случае с черникой, настои и отвары из высушенных плодов аронии применяются для полосканий при воспалительных заболеваниях десен и ротоглотки.

**Лекарственные препараты на основе аронии черноплодной.**

В качестве ЛП употребляют сами свежие плоды аронии и сок аронии. Их сушеных плодов готовят отвар [6, 9]. Сок и плоды аронии входят в ЛП промышленного производства сироп «БИОАРОН С» (PHYTOPHARM KLENKA, Joint Stock Company, Польша) и эликсир «КЕДРОВИТ» (ЗАО ФП МЕЛИГЕН, Россия) [106].

### 1.1.6.3. Черная смородина *Ribes nigrum L.*

Черная смородина *Ribes nigrum L.*(рис. 6) – листопадный кустарник семейства Крыжовниковые *Grossulariaceae*.

Рисунок 6. Внешний вид растения черная смородина *Ribes nigrum L.*

Географическое распространение.

Распространена по всей европеской части России, в Сибири (от Урала до озера Байкал), в Средней Азии. Произрастает по береговым зарослям, во

влажных лесах, в ольшаниках, по окраинам болот и на влажных лугах; широко культивируется.

**Лекарственное растительное сырье.**

В РФ от растения черная смородина загототавливают 2 вида ЛРС - плоды черной смородины высушенные (Fructus Ribis nigri siccus) и листья черной смородины высушенные (Folia Ribis nigri siccus) [4, 6]. ЛРС плоды черной смородины свежие (Fructus Ribis nigri recens) и листья черной смородины (Folia Ribis nigri) включены в ВР 2014, в Ph. Fr. 11 ème и ЕР 8th [27, 40, 82].

**Химический состав черной смородины.**

Плоды содержат пектины, моносахариды (глюкоза и фруктоза), органические кислоты (яблочную, лимонную, изолимонную, янтарную, винную), аскорбиновую кислоту до 300 мг/100 г, антоцианины (гликозиды дельфинидина и цианидина), флавоноиды, дубильные вещества конденсированной и гидролизуемой природы, каротиноиды, витамины группы В. Семена черной смородины богаты липидами, жирнокислотная фракция которых включает линолевую, гамма-линоленовую, бета-линоленовую и стеаридоновую кислоты.

Во всех частях растения присутствует эфирное масло, в состав которого входят терпены (α-терпинеол, линалоол и др.), алифатические и ароматические спирты и эфиры, фенилпропаноиды.

**Фармакологическая активность черной смородины.**

Высушенные плоды черной смородины обладают антидиарейными, вяжущими и противовоспалительными свойствами. Свежие плоды и сок черной смородины проявляют антиоксидантную, капилляропротекторную и гипотензивную, гипогликемическую и гиполипидемическую, общеукрепляющую и поливитаминную активность.

Листья черной смородины обладают противомикробными, мочегонными, желчегонными и потогонными свойствами.

**Лекарственные препараты на основе черной смородины.**

ЛП являются сами свежие плодычерной смородины, сок и сироп на их основе; высушенные плоды для приготовления настоя [6, 9, 21]. Плоды черной смородины входят в состав комплексных промышленных фитопрепаратов настойки «ГЕРБОТОН» (ООО ГИППОКРАТ, Россия) и эликсира «ТРАВОХОЛ» (ООО ГИППОКРАТ, Россия) [106]. Экстракт черной смородины зарегистрирован в Реестре лекарственных средств (РЛС) в качестве сырья для БАД [107].

### 1.1.6.4. Калина обыкновенная *Viburnum opulus L.*

Калина обыкновенная *Viburnum opulus L.* (рис. 7) – наиболее распространенный вид дикорастущих и декоративных плодовых кустарников, и деревьев рода *Viburnum* семейства Жимолостные (*Caprifoliaceae*).

Рисунок 7. Внешний вид растения калина обыкновенная *Viburnum opulus* L.

Географическое распространение.

Распространена в Европейской части России, Западной и Восточной Сибири, на Среднем и Южном Урале, на Кавказе и в Крыму. Произрастает в

хвойных, лиственных и смешанных лесах, кустарниковых зарослях, по оврагам, берегам рек, озер и на болотах с торфяным грунтом.

**Лекарственное растительное сырье.**

В РФ от растения калина обыкновенная заготавливают 2 вида фармакопейного ЛРС: плоды калины обыкновенной высушенные (Fructus Viburni siccus) и кора калины (Cortex Viburni) [3].

**Химический состав калины обыкновенной.**

Плоды калины содержат макрокомпоненты (белки, жиры и моно- и дисахариды, пектины), органические кислоты (яблочная, лимонная, хинная, шикимовая), аскорбиновую кислоту, иридоиды, антоцианины, флавонолы, дигидроксикоричные кислоты, гидролизуемые и конденсированные дубильные вещества, ди-, три- и сесквитерпены, каротиноиды, витамин К и др. В коре накапливаются проантоцианидины, а также гидролизуемые дубильные вещества, иридоиды, ди-, три- и сесквитерпены, салицин, витамины группы К, смолы.

**Фармакологическая активностькалины обыкновенной.**

Плоды калины обладают противовоспалительной, спазмолитической, гипотензивной, антибактериальной, диуретической, иммуностимулирующей, антиоксидантной и другими видами фармакологической активности. Кору калины применяют в качестве кровоостанавливающего и вяжущего средства.

**Лекарственные препараты на основе калины.**

В ГРЛС зарегистрированы 2 ЛП, действующим началом которых являются плоды калины - «Плоды калины» для приготовления настоя и «Сироп калины» (ЗАО ВИФИТЕХ, Россия) [106, 107].

### 1.1.6.5. Лимонник китайский *Schizandra chinensis* (Turcz.) Baill.

Лимонник китайский *Schizandra chinensis* (Turcz.) Baill. (рис. 8) – многолетнее деревянистое растение семейства Лимонниковые *Schizandraceae*. На протяжении нескольких тысячелетий все части растения применяются в китайской медицине. Плоды лимонника китайского в Китае называются Bei-

Wuweizi - «ягодой пяти вкусов» - за сочетание сладкого, кислого, соленого, горького и острого вкуса; в Корее Omija, в Японии Gomishi.

Рисунок 8. Внешний вид растения лимонник китайский *Schizandra chinensis* (Turcz.) Baill.

Географическое распространение.

В России распространен на Дальнем Востоке, в Приморском и Хабаровском краях, в Амурской области и на Сахалине. Растет на дренированных, богатых перегноем почвах. Плодоносящие заросли лимонника чаще всего встречаются по берегам рек и ручьев, а также вдоль лесных дорог. Широко культивируется.

**Лекарственное растительное сырье.**

В РФ ЛРС являются высушенные плоды и семена лимонника китайского, однако в ГФ XI изд. содержится ФС только на высушенные семена лимонника китайского (Semina Schisandrae chinensis siccus). ФС на ЛРС «Плоды лимонника высушенные» (Fructus Schisandrae chinensis siccus) включена в Японскую Фармакопею 16-го изд. (JP 16$^{th}$), Государственную

Фармакопею Китайской народной республики 2010 г. изд. (ChP 2010), Американскую Травяную Фармакопею (AHP) [3, 17, 93, 94].

**Химический состав лимонника китайского.**

В плодах содержатся сахара, эфирные масла, липиды, жирнокислотная часть которых включает линолевую, линоленовую, олеиновую кислоты, органические кислоты (яблочная, лимонная и винная), антоцианины, сесквитерпены, тритерпены, дубильные вещества, аскорбиновая кислота, токоферолы, а также лигнаны (схизандрин и др.). Основные фармакологические свойства ЛРС на основе лимонника обуславливает наличие схизандринов и антоцианинов. В семенах накапливается более 30% жирного масла, а также лигнаны, эфирные масла, токоферолы.

**Фармакологическая активность лимонника китайского.**

Лимонник китайский обладает стимулирующим действием на центральную нервную систему, сердечно-сосудистую и дыхательную систему: улучшает нервно-мышечную проводимость, повышает артериальное давление, уменьшает частоту сердечных сокращений и усиливает их амплитуду, учащает ритм и увеличивает амплитуду дыхательных движений. Препараты лимонника являются тонизирующими, адаптогенными и общеукрепляющими средствами. Также лимонник оказывает гипогликемическое действие и расширяет периферические сосуды.

**Лекарственные препараты на основе лимонника китайского.**

ЛП являются высушенные плоды лимонника для приготовления настоя. Российской медицинской промышленостью выпускается настойка из плодов лимонника (Tinctura fructuum Schizandrae) (ОАО Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербурга) и настойка из семян лимонника (Tinctura seminum Schizandrae) (ОАО Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербурга, ОАО ТВЕРСКАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ФАБРИКА, ООО НПП КАМЕЛИЯ, ЗАО ВИФИТЕХ, ОАО ДАЛЬХИМФАРМ, ОАО ВЛАДИВОСТОКСКАЯ ФАРМФАБРИКА, ООО ТУЛЬСКАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ФАБРИКА и др.) 1:5 на 95% спирте [106].

Экстракт лимонника в форме таблеток зарегистрирован в РЛС в качестве БАД к пище [107].

### 1.6.6. Кизил обыкновенный *Cornus mas* L.

Кизил обыкновенный *Cornus mas* L. (рис. 9) - наиболее распространенный в России вид древесных и кустарниковых растений семейства Кизиловые (*Cornaceae*).

Рисунок 9. Внешний вид растения кизил обыкновенный *Cornus mas* L.

Географическое распространение.

В диком виде кизил обыкновенный произрастает на Кавказе, широко культивируется в Крыму, черноземных областях России, а также в садовых хозяйствах средней полосы России.

**Лекарственное растительное сырье.**

Такие виды кизила как кизил душистый *C. amonum*, кизил блестящий *C. sericea*, кизил морщинистый *C. circinata* и кизил цветущий *C. florida*, в течение нескольких столетий входили в национальный фармакологический справочник США; кизил лекарственный *C. officinalis* включен в JP 16$^{th}$, ChP 2010 и загеристрирован в РЛС в качестве сырья для БАД [93, 94, 95,107].

Плоды кизила обыкновенного применяются в традиционной медицине для лечения лихорадки, диареи, заболеваний почек. Изучение биологической активности экстрактов плодов кизила обыкновеного показало наличие выраженной антиоксидантной, противовоспалительной, антимикробной активности. В доклинических и клинических исследованиях показано антидиабетическое, антиатеросклеротическое, гиполипидемическое действие плодов кизила, во многом обусловленное присутствием в них антоциановых пигментов [19, 48, 54, 68, 73]. Новые данные по фармакологической активности в сочетании с широким распространением кизила обыкновенного на территории РФ делает плоды кизила обыкновенного перспективным кандидатом в отечественное фармакопейное ЛРС.

**Химический состав кизила обыкновенного.**

Среди макрокомпонентов плодов кизила преобладают моносахара, пектины. Минорные БАВ представлены органическими кислотами и аскорбиновой кислотой, полифенолами (антоцианины, флавоноиды, гидроксикоричныекислоты, фенолокислоты и их производные), дубильными веществами, иридоидами.

**Фармакологическая активность кизила обыкновенного.**

Кроме перечисленных выше видов фармакологической активности, плоды кизила обладают противовоспалительным, антибактериальным, спазмолитическим и нейропотекторным свойствами.

**Лекарственные препараты на основе кизила обыкновенного.**

Целесообразно в качестве ЛП по аналогии с аронией и черной смородиной рекомендовать свежие плоды кизила, сок и сироп на их основе, а также возможно получать промышленные экстракты из плодов кизила.

### 1.2. Методы анализа антоцианинов

#### 1.2.1. Физические свойства антоцианинов

Антоцианины представляют собой кристаллические порошки от красно-оранжевого до пурпурно-синего цвета. Однако вследствие высокой гигроскопичности они практически не существуют в кристаллической форме,

набирая влагу и превращаясь в аморфную субстанцию. Свободные агликоны растворимы в органических растворителях - метаноле, этаноле, бутаноле, ацетоне, диметилсульфоксиде, мало растворимы в разбавленных кислотах и щелочах, этилацетате, практически нерастворимы в воде, нерастворимы в эфире, хлороформе, бензоле и других липофильных растворителях. Антоцианидины нестабильны и быстро разрушаются. Гликозилирование повышает растворимость антоцианидиновв воде и их структурную стабильность. Гликозиды также растворяются в разбавленных кислотах и щелочах, спиртах (метанол, этанол), ацетоне, ацетонитриле [31, 33, 42, 49, 81]. Под воздействием кислорода воздуха, температуры, прямых солнечных лучей и ферментов антоцианины окисляются и буреют с образованием полимерных пигментов, проантоцианидинов и продуктов деградации. Температура плавления антоцианинов 210-260°C [39].

### 1.2.2. Химические свойства антоцианинов

Антоциановые пигменты – нестабильные и реакционно-способные природные соединения. Стабильность антоцианинов зависит от ряда факторов, таких как концентрация антоцианинов и их структура, растворитель, pH, температура, кислород, свет, ферменты и сопутствующие компоненты растительного матрикса [31, 33, 42, 70].

Гликозидная часть и ацильные группы, прикрепленные к антоцианидинам, а также положения, в которых они прикреплены, оказывают существенное влияние на стабильность антоцианинов. Общая тенденция – гидроксилирование молекулы повышает её стабильность, а метилирование гидроксильных групп – снижает. Антоцианины, содержащие в своей структуре остатки ди- и трисахаридов более стабильны, чем гликозилированные моносахаридами. Среди моногликозилированных антоцианинов глюкозиды более стабильны, чем арабинозиды, а арабинозиды более стабильны, чем галактозиды и ксилозиды. Ацилирование гликозидных остатков приводит к возрастанию стабильности молекул по сравнению с неацилированными антоцианинами.

Антоцианы в водной среде подвергаются обратимым структурным транформациям - изомеризации и таутомеризации в связи с переходом протона (рис. 10), и ведут себя как pH-индикаторы: красные при низких значениях pH, сине-фиолетовые при нейтральных и слабощелочных значениях, и бесцветные при высоких значениях pH.

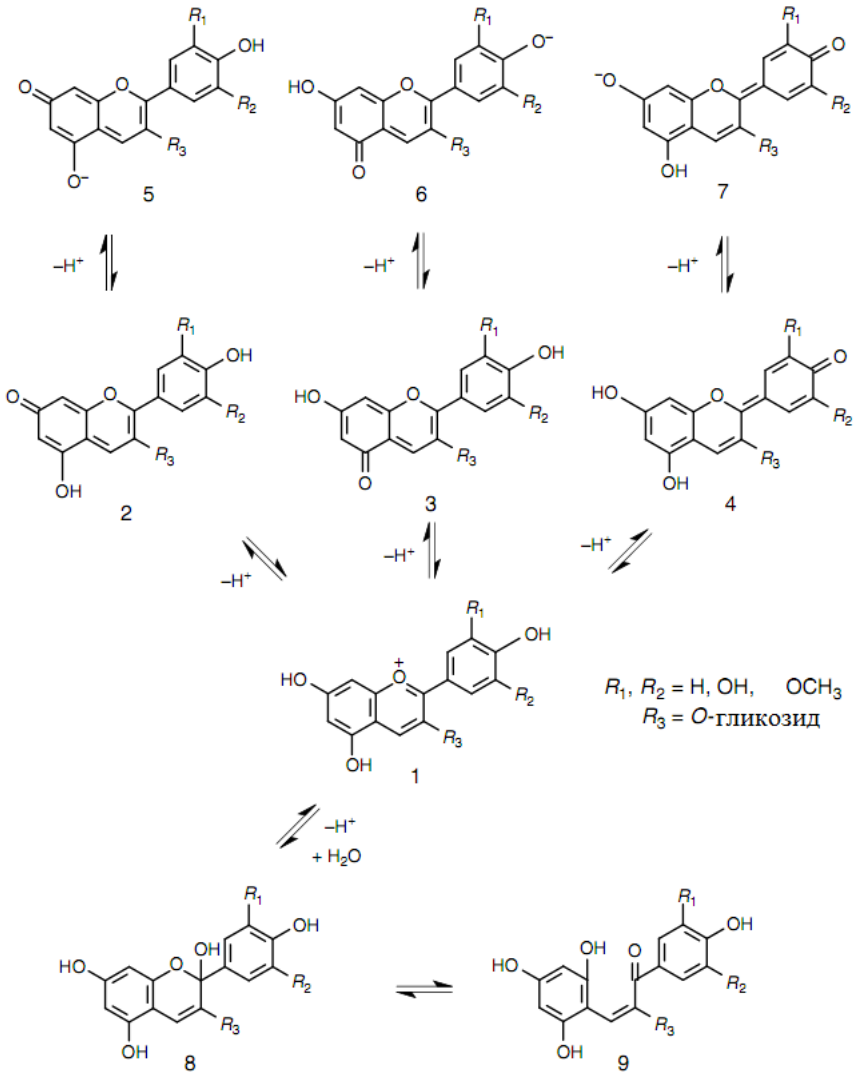



Рисунок 10. Структурные трансформации антоцианов в водном растворе

В кислой и нейтральной среде существует равновесие между четыремя формами антоцианинов: красным флавилиевым катионом $AH^+$ (1), красным или синим хиноидным основанием (2-4), бесцветным карбинолом (8) и бесцветным халконом (9).

При pH=1-2 антоцианины существуют преимущественно в форме окрашенного катиона флавилия ($AH^+$), гликозилированного по положению С3 (1). В клетках растений флавилиевые катионы обычно находятся в виде солей с органическими и неорганическими кислотами.

Растворимость солей флавилия в слабокислом и нейтральном водном растворе (pH=3-6) обусловлена образованием промежуточных нейтральных (2-4), а в нейтральном и слабощелочном растворе (pH=7-8) - ионизированных хиноидных оснований сине-фиолетового цвета (5-7). Однако, большинство 3-гликозидов и 3,5-дигликозидов переходят в более стабильную карбинольную (8) и халконовую форму (9). При значениях pH от 3 до 6 происходит быстрая и практически полная гидратация катиона флавилия по положению $C_2$ с образованием бесцветного карбинола. В конечном итоге карбинол переходит в открытую форму – халкон (тоже бесцветный) и достигается химическое равновесие.

Температура также влияет на стабильность антцианинов: при повышении температуры скорость деградации антоцианинов возрастает. Повышение температуры (выше 50º С) при pH=2-4 приводит к частичному гидролизу гликозидной связи и потере гликозидного остатка. На первой стадии термического разрушения антоцианов свободный агликон быстро обесцвечивается, переходя в форму халкона. На конечном этапе термического разрушения антоцианинов образуются коричневые продукты деградации, особенно в присутствии кислорода [42, 47, 63, 100]. Понижение температуры положительно влияет на содержание антоциановых пигментов: хранение плодов при температуре 0-15°С приводит к небольшому увеличению содержания антоцианов [42].

Доступ кислорода способствует разрушению антоцианинов, особенно при высоких (более 5) значениях pH. Негативное воздействие кислорода проявляется в прямом или непрямом окислении, при котором окисленные промежуточные формы реагируют с антоцианинами, что ведет к увеличению

образования бесцветных и коричневых продуктов деградации [42]. Антоцианины как антиоксиданты взаимодействуют с пероксид-радикалами.

Влияние света на антоцианины двояко: с одной стороны, свет необходим для биосинтеза антоцианинов, а с другой он увеличивает скорость деградации пигментов. Антоцианины лучше сохраняют цвет в темноте.

Присутствие в растениях ферментов снижает стабильность антоцианинов. Наиболее распространенными ферментами, разщепляющими антоцианины, являются гликозидазы. Они гидролизуют гликозидную связь, высвобождая алгиконы, которые затем быстро разрушаются. Естественно встречающиеся в плодах пероксидазы и фенолазы, такие как фенолоксидаза и полифенолоксидаза, также снижают содержание антоцианинов в сырье и экстрактах. Важную роль в энзиматической деградации антоцианинов играют хиноны. Энзимы сначала окисляют другие фенольные соединения до соответсвующих хинонов, которые затем реагируют с антоцианинами с образованием коричневых продуктов конденсации. Из всех форм, в которых существуют антоцианины в водном растворе, наиболее подвержены энзиматической деградации хиноидные основания. Структура антоцианинов влияет на их устойчивость к воздействию ферментов. Гликозиды мальвидина менее чувствительны к полифенолоксидазе, чем гликозиды дельфинидина. Цианидин непосредственно реагирует с полифенолоксидазой, а пеларгонидин не реагирует вообще.

Естественно присутствующая в плодах и добавленная аскорбиновая кислота ускоряет расщепление антоцианинов, стимулируя обесцвечивание антоцианинов и образование полимерных пигментов. Однако стабильность ацилированных антоцианинов в присутствии аскорбиновой кислоты возрастает.

### 1.2.3. Выделение антоцианинов

Выделение антоцианинов из растительного сырья является важной стадией, влияющей на достоверность и воспроизводимость результатов вследствие лабильной природы этих соединений: высокой реакционной

способности, чувствительности к pH среды и нагреванию, приводящему к гидролизу и последующей деградации молекул антоцианинов. Основные требования к методу экстракции – максимальный выход антоциановых пигментов с минимальным количеством примесей и минимальным разрушением или изменением молекул антоцианинов в процессе экстракции. При этом процесс экстракции не должен быть слишком сложным, длительным и дорогим.

Вследствие нестабильности в нейтральных и щелочных растворах антоцианины обычно экстрагируют подкисленными растворителями в мягких условиях. В качестве растворителей используют кислоты, воду, полярные органические растворители – метанол, этанол, ацетон, ацетонитрил или их смеси, в которых доля органических растворителей составляет от 50 до 100%, а доля кислот не более 7%. Экстрагенты подкисляют как сильными (трифторуксусная, соляная), так и слабыми кислотами (муравьиная, лимонная). Однако исследования показали, что экстракция в кислой среде может привести к частичному или полному гидролизуантоцианинов. Поэтому рекомендуется сравнивать результаты экстрагирования подкисленными растворами метанола, этанола или воды и нейтральными растворителями, чтобы убедиться в отсутствии завышения содержания мономерных антоцианинов за счет гидролиза, полимерных форм и/или проантоцианидинов в процессе экстракции [31, 33, 46, 49].

В нормативной документации стран Европы, Азии и США на антоцианин-содержащее ЛРС антоцианины чаще всего экстрагируют 0,1-2% раствором соляной кислоты в метаноле. Метанол – наиболее часто используемый растворитель для выделения антоцианинов.

Ronald E. Wrolstad и соавторы разработали ацетон-хлороформный метод экстракции антоцианов из растительного сырья. Метод основан на экстракции антоцианинов водным ацетоном с последующим жидкость-жидкостным распределением с хлороформом. При этом антоцианины концентрируются в водной фазе, тогда как липиды, хлорофиллы и другие

нерастворимые в воде соединения переходят в органическую фазу. Данный метод позволяет предотвратить гидролиз ацилированных антоцианов, который может иметь место при использовании в качестве экстрагента 0,01-0,1% раствор соляной кислоты в метаноле [46].

Согласно ГФ XI изд. вып. 2 антоцианины из цветков василька синего экстрагируют 1% соляной кислотой. В проекте фармакопейной статьи ГФ XIII изд. на свежие плоды аронии черноплодной предлагается использовать 1% соляную кислоту в 96% этаноле, экстракция проводится при комнатной температуре 120 мин. Из сушеных плодов черники и аронии антоцианины извлекают 1% соляной кислотой в 60% спирте при нагревании на кипящей водяной бане в течение 60 мин [3, 13, 105]. В плодах черники, аронии, черной смородины, калины наряду с антоцианинами содержится значительное количество проантоцинидинов, которые при нагревании с кислотой гидролизуются с образованием антоцианидинов и катехинов, что ведет к систематическому завышению результатов. Поэтому высокое содержание соляной кислоты в экстрагенте и избыточный нагрев нежелательны.

### 1.2.4. Методы разделения и очистки антоцианинов

Для разделения и очистки экстрактов из растительного сырья применяются твердофазная экстракция (ТФЭ), колоночная хроматография, препаративная ВЭЖХ.

ТФЭ – один из наиболее распространенных методов очистки и концентрирования анализируемых веществ. Для изолирования веществ применяют картриджи, наполненные силикагелем, окисью алюминия, ионообменными смолами, С8- и С18-производными силикагеля и макропористый неионизированный акриловый полимер (Serolit PAD IV и Amberlite XAD-7). Растительный экстракт, содержащий антоцианины, помещают в С18 картриджи, предварительно активированные промыванием метанолом. 0,01% водным раствором соляной кислоты смывают неадсорбирующиеся на $C_{18}$ сахара и органические кислоты. Оставшуюся воду удаляют в токе азота в течение 2-3 мин. Менее полярные фенолы,

флавоноиды и гидроксикоричные кислоты удаляют из картриджа промыванием двумя объемами этилацетата. Антоцианы элюируют 0,01% раствором соляной кислоты в метаноле. Удаление сопутствующих соединений обеспечивает более надежное разделение методом ВЭЖХ и более достоверную спектральную, МС- и ЯМР-идентификацию антоцианинов в экстрактах из растительного сырья.

Одним из важнейших методов разделения и очистки растительных полифенолов, в том числе антоцианинов, является колоночная хроматография. Для фракционирования и разделения антоцианов использовали колонки Amberlite XAD-7 и Sephadex LH-20. Неочищенные экстракты помещали в колонку-адсорбент и элюировали различными смесями подкисленных полярных растворителей [31, 42, 46].

В настоящее время для очистки, разделения, концентрирования и препаративного выделения антоцианинов применяют препаративную ВЭЖХ.

### 1.2.5. Методы идентификации антоцианинов

Анализ подлинности, чистоты и количественное определение антоциановых пигментов проводят с помощью спектральных (СФМ) и хроматографических методов (ТСХ, ВЭЖХ), ЯМР и ПМР [31, 42, 46, 49].

**1.2.5.1. Спектроскопия в УФ и видимой области.** Применение спектральных данных для идентификации антоцианинов описано в разделе **1.2.5.2.**

Спектральные характеристики антоцианинов позволяют определить их количественное содержание в различных матриксах. В отечественной фармакопее и зарубежных фармакопеях используется прямой метод [3, 27, 40, 82, 105], основанный на измерении оптической плотности антоцианинов при длине волны максимума поглощения для объекта исследования. Однако более достоверным и специфичным является метод pH-дифференциальной спектрофотометрии (официальный метод Ассоциации Официальных Аналитических Химиков AOAC 2005.02), основанный на специфической для антоцианинов обратимой структурной трансформации хромофора, и,

следовательно, поглощения, в зависимости от pH раствора [8, 10, 11, 46, 49, 61, 100]. При pH=1 антоцианины и антоцианидины находятся в виде катиона флавилия, обусловливающего ярко-красную окраску раствора, с увеличением pH до 4,5 катион переходит в форму карбинола и становится бесцветным (рис. 11).

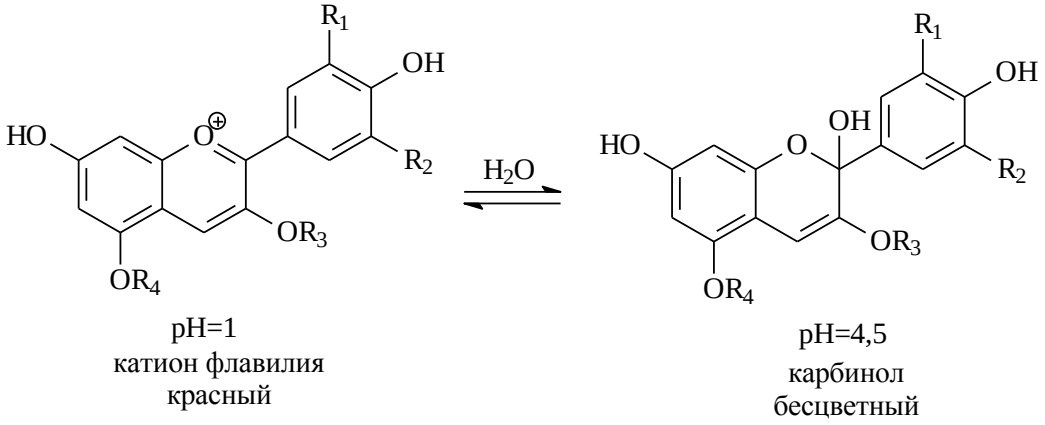



Рисунок 11. Таутомерные переходы антоцианинов в буферных растворах с pH=1 и pH=4,5

Данный метод позволяет быстро и точно определить содержание мономерных антоцианинов в присутствии полимерных антоциановых пигментов и неферментативно окисленных пигментов, а также других мешающих соединений (в том числе синтетических красителей, которые могут быть добавлены в экстракты, ЛП и БАД к пище с целью фальсификации) которые не подвергаются обратимой трансформации при изменении pH, и таким образом, исключаются из расчета поглощения [46, 61, 100].

Расчет суммарного содержания антоцианинов проводится по коэффициенту молярной экстинкции, удельному показателю поглощения или коэффициенту перечета и молекулярной массе цианидин-3-глюкозида, как наиболее распространенного в природе антоцианина с установленным коэффициентом молярной экстинкции в различных растворителях, в том числе в буфере с pH=1 [46], или преобладающего в образце антоцианина. В

ГФ XI изд. вып. 2 и фармакопейных статьях на плоды черники и аронии при расчете содержания антоцианинов используют удельный показатель поглощения цианидин-3,5-дигликозида (453) и цианидин-3-глюкозида (100 и 600) соответственно. В зарубежных фармакопеях также указаны удельные показатели поглощения цианидин-3-глюкозида или коэффициенты пересчета. Более целесообразно применять для расчета содержания антоцианинов не «виртуальное» обозначение экстраполированной оптической плотности цианидин-3-глюкозида, поскольку величины оптической плотности 100 и 600 не являются непосредственно измеряемой величиной, а коэффициент молярной экстинкции, определяемый на основе исходного уравнения закона Ламберта-Бугера-Бера: $D=\varepsilon \times C \times l$. При этом молярная концентрация С подбирается таким образом, чтобы величина оптической плотности была в наиболее достоверно измеряемой области, находящейся в середине линейного диапазона спектрофотометра, а именно в районе 1. Подобный подход дает более воспроизводимые данные о поглощении хромофора цианидин-3-глюкозида в буферном растворе с pH=1, величина которого составляет 26900 л/моль×см [46]. В исследуемом лекарственном растительном сырье встречается более 25 индивидуальных антоцианинов, отличающихся как по структуре агликонов, так и по типу гликозидной части, и, соответственно, по максимумам поглощения и коэффициентам молярной экстинкции. Разноообразие спектральных свойств и относительная нестабильность индивидуальных антоцианинов делает практически нецелесообразным их количественное определение, основанное на методе абсолютной калибровки по стандарту каждого индивидуального антоцианина, для большинства которых индивидуальные стандартные образцы коммерческине доступны.

Интегральное определение антоциановых пигментов с помощью метода pH-дифференциальной СФМ, было аттестовано как официальный метод AOAC по всем основным показателям согласно российским и международным требованиям к валидации аналитических методов [1, 2, 15,

18, 32, 61]. Содержание антоцианинов этим методом приводится в пересчете на цианидин-3-глюкозид при длине волны максимума поглощения λ=510 нм, и с использованием коэффициента молярной экстинкции цианидин-3-глюкозидав буфере с pH=1 ε=26900л/моль×см.

pH-дифференциальный метод является быстрым, точным, специфичным и позволяет оценить общее содержание мономерных антоцианинов. Профиль индивидуальных антоцианинов определяют с помощью хроматографических методов.

**1.2.5.2. Хроматографические методы анализа.**

Первоначально хроматографическое разделение антоцианинов проводили простой бумажной хроматографией (БХ) и тонкослойной хроматографией (ТСХ). Разделение выполняли на фильтровальной бумаге Whatman или хроматографической пластинке, используя хроматографическую камеру и подходящую подвижную фазу.

**1.2.5.2.1 ТСХ**

В качестве анализа подлинности антоцианинов ТСХ включена в проекты ФС ГФ XIII на плоды черники высушенные, плоды аронии черноплодной свежие и высушенные, а также ФС на плоды черники свежие и сухой стандартизованный экстракт черники в ЕР 8$^{th}$, ВР 2014 и другие фармакопеи стран Европы. Во всех перечисленных ФС, кроме статьи на стандартизованный экстракт черники, используется подвижная фаза типа н-бутанол-безводная кислота (уксусная или муравьиная)-вода в различных соотношениях: от 4:1:2 в ГФ XIII до 65:16:19 в ВР 2014. Состав подвижной фазы для ТСХ антоцианинов в экстракте черники – вода-уксусная кислота-соляная кислота (82:15:3) позволяет разделить дельфинидин-3-глюкозид (миртиллин) и цианидин-3-глюкозид (хризантемин) [27, 40, 82, 105]. Видимые пятна можно вырезать, перерастворить в водном или водно-органическом растворителе для дальнейшего анализа. Однако ограниченная разделяющая способность, низкая чувствительность, зависимость от условий окружающей среды (температура, влажность и др.) и трудность в работе с

антоцианинами, чувствительными к свету и кислороду воздуха, делает применение данного метода нецелесообразным для определения профиля индивидуальных антоцианинов в растительном сырье и экстрактах.

**1.2.5.2.2.ВЭЖХ**

Обращенно-фазовая (ОФ) ВЭЖХ является основным методом анализа антоцианинов. Метод позволяет разделить близкие по структуре индивидуальные антоцианины с использованием различных типов детекторов, таких как спектрофотометрический и масс-спектрометрический детектор.

Анализ ВЭЖХ проводится на ОФ колонках с силикагелем, химически связанным с С18. Для разделения обычно применяется бинарная подвижная фаза: фаза А – подкисленная муравьиной, уксусной, ТФУК или фосфорной кислотой вода, фаза В – нейтральный или подкисленный, водный или неводный метанол или ацетонитрил, или их смеси (табл.2).

Добавление кислоты для поддержания низких значений pH необходимо для улучшения эффективности разделения, поскольку при pH>2 возможно размывание пиков вследствие частичной трансформации красного катиона флавилия в сине-фиолетовые хиноидные структуры, что приводит к плохому разделению пиков и более низкому пределу детектирования.

В ОФ ВЭЖХ разделение антоцианинов определяется полярностью и стереохимическими особенностями их структуры. Время удерживания антоцианинов зависит от трех компонентов: природы агликона, числа и природа гликозидных остатков, числа и природы ацильных остатков.

При стандартных условиях ОФ ВЭЖХ антоцианидины элюируются в следующем порядке (здесь и далее: в порядке увеличения времени удерживания): дельфинидин, цианидин, петунидин, пеларгонидин, пеонидин и мальвидин. Гидроксильные группы уменьшают удерживание антоцианидина в колонке, тогда как метоксильные увеличивают.

Таблица 2

Условия проведения ВЭЖХ антоцианинов в объектах исследования

| **Условия проведения анализа** | **Метод** | **Объект** | **Ссылка** |
|---|---|---|---|
| Колонка: SUPELCOHYPERSILODS (C18) 5U 150.0×4.6 мм с предколонкой Hypersil ODS 10×4.6 мм, 5 μм. ПФ: А – ацетонитрил, В – 4.0% водный раствор $H_3PO_4$. Градиент. Скорость потока 1 мл/мин. Объем вводимой пробы 10 μл. Детектирование при λ=520 nm. | ВЭЖХ-ДМД | Плоды черники обыкно-венной | [28] |
| Колонка: CapcellPakC18 UG120 150 × 4.6 мм, 5μм. ПФ: А – 0.1% ТФУ/$H_2O$, 50% CH3CN/0.1%ТФУ/50%$H_2O$. Градиент. Температура колонки 40ºС. Скорость потока 0.5 мл/мин. Детектирование приλ=500-540 нм. ПараметрыМС: напряжение на капилляре 5 кВ, температура газа-осушителя 320ºС, сканирование масс от 50 до 1000 m/z в режиме регистрации положительных ионов. | ВЭЖХ-ДМД-ESI-MS | Плоды черники обыкно венной, аронии черноплод-ной, черной смородины | [75] |
| Колонка: ODS Hypersil 250×4 мм, 5 μм. Подвижная фаза: А ($H_2O$:HCOOH 9:0.5) и В (H2O:MeOH:HCOOH 4:5:0.5). Градиент. Скорость потока 0,75 мл/мин. Объем вводимой пробы 15 μл. Детектирование при λ=520 нм. | ВЭЖХ-ДМД | Плоды калины обыкновенной | [56] |
| Колонка: Phenomenex Luna C-18 250 x4.6 мм, 5μm. Подвижная фаза: А – HCOOH (4.5%) и В - ацетонитрил. Градиент. Детектирование при λ=520 нм. | ВЭЖХ-ДМД | Плоды аронии черноплодной | [88] |
| Колонка: RP HiQ sil-C18250 × 4.6 мм, 5 μm. ПФ: А – 3% $CH_3COOH$, В - ацетонитрил. Градиент, изократика. Температура колонки 25°С.Скорость потока 1 мл/мин. Объем вводимой пробы 10 μл. Детектирование при λ=520нм. Параметры МС: напряжение на капилляре 4,5 кВ, температура 250°С, давление на распылителе 0,38 Мпа. | ВЭЖХ-ДМД-ESI-MS | Плоды лимонника китайского | [63] |

Число и места прикрепления гликозидных остатков влияют на порядок элюирования антоцианинов следующим образом: сначала выходят тригликозиды, за ними 3,7-дигликозиды, 3,5-дигликозиды, 3-дигликозиды. Затем порядок элюирования определяет природа гликозида: сначала галактозиды, вицианозиды, латирозиды, самбубиозиды, глюкозиды, арабинозиды, рутинозиды, ксилозиды. Это преимущество ВЭЖХ перед ТСХ, разделяющие свойства которой значительно хуже.

Антоцианы, отличающиеся только ацильным остатком, выходят после соответствующих неацилированных антоцианинов, и элюирование происходит согласно полярности молекул антоцианинов. Стереохимия при ацилировании антоцианинов также влияет на порядок выхода. Так, цис-изомеры кумароилгликозидов элюируются, как правило, раньше, чем транс-изомеры [36].

Идентификацию пиков на хроматограмме образца проводят по временам удерживания, спектральным данным, молекулярным ионам, путем сравнения с хроматограммами данного вида плодов известного происхождения и с литературными данными о составе основных антоцианов исследуемого растительного сырья.

Спектральные данные в УФ и видимой области позволяют селективно идентифицировать антоцианины среди других групп флавоноидов, предположить природу агликона, определить положение, в котором к нему прикреплены гликозидные остатки, определить природу, число и место прикрепления ацильных остатков.

Спектр антоцианинов, как представителей класса флавоноидов, содержит два характеристических максимума поглощения А (ближняя УФ или видимая часть спектра) и В (УФ часть спектра), обусловленные наличием в структуре фрагментов фенилпропана и бензопирана соответственно. Общий для всех флавоноидов максимум В у антоцианинов находится в области 280 ± 5 нм ($\lambda_{UVmax}$), характеристический максимум А, на

основе которого антоцианины дифференцируют от других групп флавоноидов, - в области 500-550 нм ($\lambda_{VISmax}$).

На основе сдвигов максимумов поглощения в видимой области ($\lambda_{VISmax}$) можно примерно оценить являются ли антоцианы производными цианидина и/или пеонидина (пурпурный цвет), дельфинидина, петунидина, мальвидина (фиолетовый цвет) и пеларгонидина (оранжево-красный цвет) (см. табл. 1). Производные пеларгонидина имеют максимум поглощения при меньших длинах волн, чем производные цианидина, а производные цианидина – при меньших длинах волн, чем производные дельфинидина [31, 42, 46].

Ацилирование антоцианинов остатками гидроскикоричных кислот можно определить по появлению дополнительного максимума поглощения или плеча при 310-330 нм, тогда как при ацилировании гидроксибензойными кислотами, поглощающими при 270-290 нм, или алифатическими кислотами, поглощающими при длинах волн <210 нм, этот максимум отсутствует [33, 42].

Ввиду относительной нестабильности антоцианидинов и малой доступности индивидуальных антоцианинов в большинстве работ по количественной ВЭЖХ антоцианинов используется метод с использованием стандарта цианидин-3-глюкозида.

Как правило, результаты ВЭЖХ используют для определения профиля индивидуальных антоцианинов, в то время как для определения суммарного содержания антоцианинов используют данные pH-дифферециальной спектрофотометрии.

**1.2.5.2.3. Масс-спектрометрическоедетектирование в ВЭЖХ**

Масс-спектрометрическое детектирование (МСД). Масс-спектрометрия (МС), как дополнение к ВЭЖХ-ДМД, является мощным инструментом для идетификации антоцианинов. Среди множества типов ионизации, существующих в МС, в анализе антоцианинов обычноприменяется только один тип ионизации - ионизация электроспреем (ESI). Масс-спектрометрия с ионизацией электроспреем (ESI-MS) – мягкий тип ионизации, который

позволяет избежать фрагментации и получать интактные молекулярные ионы дажевысокомолекулярных и комплексных, в том числе термолабильных, нелетучих и полярных соединений в растворе, какими являются антоцианины [45].

Формальный положительный заряд на атоме кислорода бензопиранового кольца С предполагает сканирование масс антоцианинов в режиме регистрации положительных ионов, при котором детектируются молекулярные ионы $[M]^+$. Для антоцианинов также возможна ионизация в режиме регистрации отрицательных ионов, при которой получают депротонированный молекулярный ион $[M-H]^-$.Однако в этом случае чувствительность и интенсивность пиков будут значительно ниже.

Применяемая в составе подвижной фазы для оптимизации разделения антоцианинов при ВЭЖХ-ДМД фосфорная кислота и фосфорные буферные растворы не совместимы с ВЭЖХ-ESI-MS, так как они способствуют увеличению фона, подавлению сигнала и быстрому загрязнению источника ионов, что приводит к снижению чувствительности и воспроизводимости результатов. Необходимая кислотность подвижной фазы при ВЭЖХ-ESI-MS обеспечаивается за счет использования водных растворов муравьиной, уксусной или трифторуксусной кислоты (ТФУК).

Тандемная масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС/МС) широко применяется для идентификации антоцианинов в растениях. В ВЭЖХ-МС/МС происходит формирование фрагментов в результате индуцированной низкоэнергетическими столкновениями диссоциации молекул (CID), котораяможет быть достигнута за счет использования ионной ловушки (IT) и тройного квадруполя (QqQ).С помощью этих приборов можно выбратьи фрагментировать ион с определенным отношением массы к заряду (m/z). Контролируемая фрагментация антоцианинов обеспечивает дополнительное подтверждение при идентификации агликона, природы, количества и порядка присоединенных остатков сахаров и ацильных групп. Предварительно можно определить, в каком положении к антоцианидину

прикреплены сахара и ацильные остатки. О-гликозидная связь легко расщепляется низкой энергией CID с нейтральной потереймассы сахара, так как атом водорода от сахара переходит к антоцианидину. В результате в масс-спектре выделенного иона появляются два фрагмента: заряженный, соответствующий антоцианидину, и нейтральный, соответствующий молекулярной массе сахара минус 18 (потеря гидроксила и протона). Тип гликозида можно определить путем мониторинга потерь нейтральных масс. Для дальнейшей идентификации типа гликозилирования антоцианидинов необходим комплексный подход, включающий как рассмотрение данных масс-спектрометрии, так и порядка элюирования, литературных данных и данных ЯМР-спектроскопии для препаративно выделенных индивидуальных АЦ.

**1.2.5.3. Спектроскопия ЯМР.** Эффективным средством идентификации структур антоцианинов является ЯМР.$^{13}$С ЯМР-спектроскопия применяется для определения природы диастеромеров, последовательности, положения и конфигурации остатков сахаров в антоцианинах. β-конфигурация характерна для глюко-, галакто- и ксилопиранозильных остатков, α-конфигурация - для рамно- и арабинопиранозильных остатков. Установление структур сахаров проводят по характерным сдвигам. Протонный магнитный резонанс (ПМР) нашел применение в изучении само-ассоциации антоцианинов.

Применение спектроскопии ЯМР в анализе антоцианинов ограничено необходимостью препаративного выделения достаточных количеств чистых соединений.

**Выводы по главе I:**

1. Рассмотрены фармакологические свойства антоцианинов.

2. Для исследования выбраны наиболее ценные и доступные источники антоцианинов: плоды черники обыкновенной, аронии черноплодной, черной смородины, калины обыкновенной, лимонника китайского, а также кизила обыкновенного; приведены их ботанические, фармакогностические и фармакологические характеристики.

3. Проанализированы литературные данные по физическим и химическим свойствам антоцианинов.

4. Рассмотрены способы выделения антоцианинов из растительного сырья, методы очистки экстрактов, физико-химические и хроматографические методы анализа антоцианинов в экстрактах, их спектральные характеристики, способы детектирования.

5. Проведено сравнение современных и высокоспецифичных методов анализа антоцианинов с методами анализа, включенными в отечественную и зарубежные фармакопеи.

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

(Результаты собственных исследований и их обсуждение)

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объекты исследования

В работе были исследованы плоды черники, калины, аронии, черной смородины, лимонника и кизила, экстракты и продукты их переработки, а также примесные виды плодов (табл.3).

Таблица 3

Данные о наименовании, производителе и форме выпуска образцов

| № | Наименование образца | Место и год сбора/Производитель | Форма |
|---|---|---|---|
| 1. | Плоды черники обыкновенной замороженные | Карелия, г. Костомукша, 2011 г., «Ягоды Карелии» | Сырье |
| 2. | Плоды черники обыкновенной замороженные | Карелия, г. Костомукша 2012 г., «Ягоды Карелии» | Сырье |
| 3. | Плоды черники обыкновенной замороженные | Карелия, г. Костомукша 2013 г., «Ягоды Карелии» | Сырье |
| 4. | Плоды черники обыкновенной замороженные | Мурманск, 2012 г. | Сырье |
| 5. | Плоды черники обыкновенной замороженные | Финляндия, 2012 г., «Sortes» | Сырье |
| 6. | Плоды черники обыкновенной замороженные | Харьковская область, Украина, 2012 г. | Сырье |
| 7. | Плоды черники обыкновенной замороженные | Львовская область, Украина, 2012 г., «Galberry» | Сырье |
| 8. | Плоды черники обыкновенной замороженные | Вологодская область, 2012 г. | Сырье |
| 9. | Плоды черники высушенные | «ФитоФарм», 2013 г. | Сырье |
| 10. | Плоды черники высушенные | «Гемма Вит», 2013 г. | Сырье |
| 11. | Плоды черники высушенные | Барнаул, 2012 г., «Азбука трав» | Сырье |
| 12. | Плоды черники высушенные | Московская область, 2014 г. | Сырье |
| 13. | Плоды голубики болотной замороженные | Карелия, г. Костомукша, 2013 г., «Ягоды Карелии» | Сырье |
| 14. | Плоды вороники черной замороженные | Карелия, г. Костомукша 2012 г., «Ягоды Карелии» | Сырье |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 15. | Плоды вороники черной замороженные | Карелия, г. Костомукша 2013 г., «Ягоды Карелии» | Сырье |
| 16. | Плоды брусники обыкновенной замороженные | Карелия, г. Костомукша 2013 г., «Ягоды Карелии» | Сырье |
| 17. | Плоды клюквы болотной замороженные | Карелия, г. Костомукша 2013 г., «Ягоды Карелии» | Сырье |
| 18. | Сухой экстракт черники, 25% антоцианинов (из черники №1) | ЗАО «Натуральные Ингредиенты», Москва | Экстракт |
| 19. | Сухой экстракт черники, 25% антоцианинов | ЗАО «Натуральные Ингредиенты», Москва | Экстракт |
| 20. | Экстракт черники (густой) | ООО «Грумант», Россия | Экстракт |
| 21. | Сухой экстракт плодов черники | ООО «КиТ», Алтайский край, г. Бийск | Экстракт |
| 22. | Экстракт черники, 10% антоцианинов | «Natex», Австрия | Экстракт |
| 23. | Экстракт черники, 10% антоцианинов | ООО «Натэк-Продукт», Москва | Экстракт |
| 24. | Плоды аронии черноплодной свежие | Воронежская область, 2012 г. | Сырье |
| 25. | Плоды аронии черноплодной свежие | Воронежская область, 2013 г. | Сырье |
| 26. | Плоды аронии черноплодной свежие | Тверская область, 2012 г. | Сырье |
| 27. | Плоды аронии черноплодной свежие | Московская область, Домодедовский район, 2014 г. | Сырье |
| 28. | Сок аронии черноплодной | Из плодов №27 | Сок |
| 29. | Жом аронии черноплодной | Из плодов №27 | Жом |
| 30. | Плоды аронии черноплодной высушенные | Московская область, 2013 г. | Сырье |
| 31. | Плоды ирги ольхолистной свежие | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 32. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Лентяй» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 33. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Пигмей» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 34. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Велой» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 35. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Севчанка» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 36. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Алтайская поздняя» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 37. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Гулливер» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 38. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Изюмная» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 39. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Ксюша» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 40. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Шаровидная» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 41. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Геркулес» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 42. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Плотнокистная» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 43. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Ажурная» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 44. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Рита» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 45. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Софья» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 46. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Нара» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 47. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Былинная» («Верность») | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 48. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Зуша» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 49. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Деликатес» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 50. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Экзотика» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 51. | Плоды черной смородины замороженные, сорт «Лама» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 52. | Плоды черной смородины замороженные | Вологодская область, 2012 г. | Сырье |
| 53. | Плоды черной смородины свежие | Рязанская область, 2013 г. | Сырье |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 54. | Плоды черной смородины свежие | Московская область, Домодедовский район, 2014 г. | Сырье |
| 55. | Сок черной смородины | Из плодов №54 | Сок |
| 56. | Жом черной смородины | Из плодов №54 | Жом |
| 57. | Плоды черной смородины высушенные | Московская область, 2014 г. | Сырье |
| 58. | Экстракт черной смородины, 20% антоцианинов | «EUSAColors», Франция | Экстракт |
| 59. | Экстракт черной смородины | ООО «Натэк-Продукт», Москва | Экстракт |
| 60. | Плоды калины замороженные К-1-13 | Тамбовская область, Мичуринск, 2013 г. | Сырье |
| 61. | Плоды калины замороженные К-2-13 | Тамбовская область, Мичуринск, 2013 г. | Сырье |
| 62. | Плоды калины замороженные К-3-13 | Тамбовская область, Мичуринск, 2013 г. | Сырье |
| 63. | Плоды калины замороженные К-4-13 | Тамбовская область, Мичуринск, 2013 г. | Сырье |
| 64. | Плоды калины замороженные К-5-13 | Тамбовская область, Мичуринск, 2013 г. | Сырье |
| 65. | Плоды калины замороженные К-6-13 | Тамбовская область, Мичуринск, 2013 г. | Сырье |
| 66. | Плоды калины замороженные К-7-13 | Тамбовская область, Мичуринск, 2013 г. | Сырье |
| 67. | Плоды калины замороженные К-8-13 | Тамбовская область, Мичуринск, 2013 г. | Сырье |
| 68. | Плоды калины замороженные | Московская область, Домодедовский район, 2013 г. | Сырье |
| 69. | Плоды калины замороженные | Московская область, 2013 г. | Сырье |
| 70. | Плоды калины замороженные | Тверская область, 2013 г. | Сырье |
| 71. | Плоды калины свежие | Московская область, 2014 г. | Сырье |
| 72. | Плоды калины замороженные | Московская область, Домодедовский район, 2014 г. | Сырье |
| 73. | Плоды калины высушенные | Алтайский край, г. Барнаул, 2013 г., ООО «Компания «ХОРСТ» | Сырье |
| 74. | Плоды лимонника китайского замороженные | Московская область, 2013 г. | Сырье |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 75. | Плоды лимонника китайского высушенные | Хабаровский край, 2012 г. | Сырье |
| 76. | Плоды лимонника китайского высушенные | Хабаровский край, 2013 г. | Сырье |
| 77. | Плоды лимонника китайского высушенные | Хабаровский край, 2014 г. | Сырье |
| 78. | Настойка плодов лимонника | Из плодов №75 | ЛП |
| 79. | Плоды кизила обыкновенного замороженные, сорт «Азовский-1» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 80. | Плоды кизила обыкновенного замороженные, сорт «Болгарский» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 81. | Плоды кизила обыкновенного замороженные, сорт «Волгоградский грушевидный» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 82. | Плоды кизила обыкновенного замороженные, сорт «Волгоградский» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 83. | Плоды кизила обыкновенного замороженные, сорт «Крымский» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 84. | Плоды кизила обыкновенного замороженные, сорт «Мовир» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 85. | Плоды кизила обыкновенного замороженные, сорт «Мовир грушевидный» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 86. | Плоды кизила обыкновенного замороженные, сорт «Находка» | Тамбовская область, Мичуринск, 2012 г. | Сырье |
| 87. | Плоды кизила обыкновенного замороженные зрелые | Кавказ, 2012 г. | Сырье |
| 88. | Плоды кизила обыкновенного замороженные недозрелые | Кавказ, 2012 г. | Сырье |

### 2.2. Оборудование и реактивы

Исследования проводились на базе ФГБНУ «НИИ питания» с использованием следующего оборудования:

- спектрофотометр “Shimadzu” UV-1800 (Shimadzu Corporation, Япония) с диапазоном длин волн 190-1100 нм;

- система ВЭЖХ «Agilent 1100 series» (США) со спектрофотометрическим ДМД, времяпролетным «Agilent 6200 series» (ВЭЖХ-TOF-MS) и тройным квадрупольным «Agilent 6410 series» (ВЭЖХ-MS/MS) масс-спектрометрическими детекторами. В качестве неподвижной фазы использовалась хроматографические колонки Phenomenex Luna C18 250×4,6 mm 5 μ, Nucleosil 100A C18 250×4,6 мм 5 μ, ProteCol C18 HPH 125 250×4,6 мм 5 μ. Полученные хроматограммы обрабатывали при помощи программ «Mass Hunter Workstation Software Qualitative analysis Version B.02.00» и «ChemStation for LC 3D systems Rev. B.04.03[16]».

В работе применялось вспомогательное оборудование: весы Sartorius BP 121S; pH-метр Metter Toledo MP 220; УЗ–баня Codyson CD-4820, дистиллятор ДЭ-10; лабораторная мельница IKA A-10; баня водяная лабораторная с электрическим подогревом; центрифуги Eppendorf Centrifuge 5424 и Rotina 420.

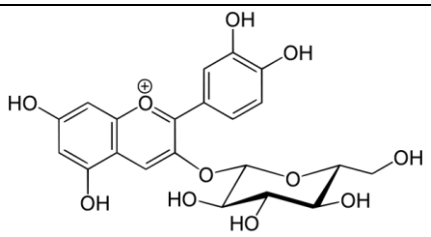
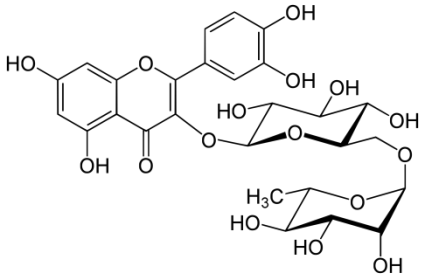
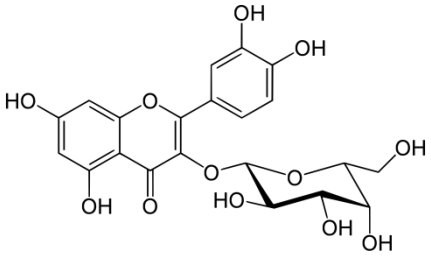
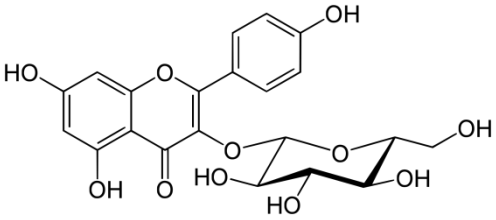
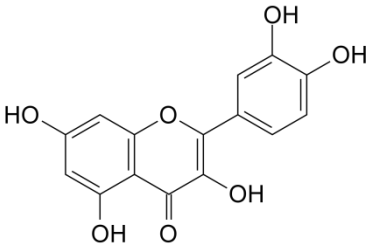
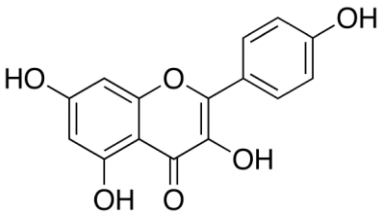
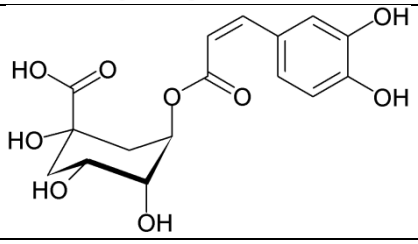
При приготовлении подвижных фаз, буферных растворов и пробоподготовке образцов использовались: ацетонитрил и метанол для ВЭЖХ «HPLC Gradient - grade»; спирт этиловый ректифицированный; о-фосфорная кислота марки «ОС.Ч.»; трифторуксусная кислота (ТФУК) марки «Peptide Grade»; соляная кислота марки «ОС.Ч.»; муравиьиная кислота ГОСТ 5878-73; калия хлорид марки «Х.Ч.»; натрия ацетат марки «Х.Ч.»; вода дистиллированная.

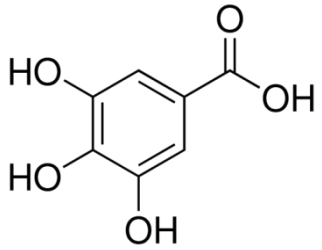
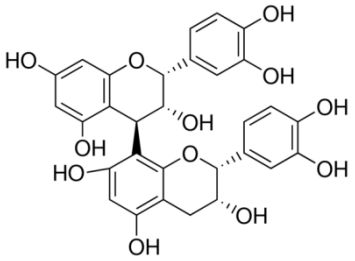
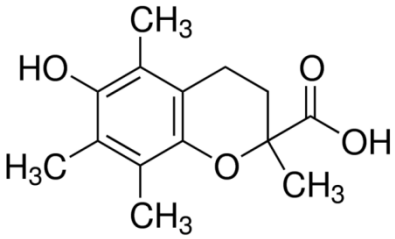
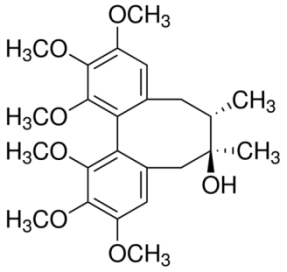
### 2.3. Стандартные образцы

При разработке методик и проведении аналитических исследований в качестве стандартных образцов были использованы коммерчески доступные индивидуальные вещества (табл.4).

Таблица 4

Стандартные образцы

| Наименование, синонимы | Структурная формула | Фирма-производитель |
|---|---|---|
| Цианидин-3-глюкозид<br>Хризантемин<br>Куроманин |  | Polyphenols,<br>CAS 7084-24-4,<br>>97% (ВЭЖХ) |
| Рутин<br>Кверцетин-3-рутинозид |  | Sigma,<br>CAS 207671-50-9,<br>≥94% (ВЭЖХ) |
| Гиперозид<br>Кверцетин-3-галактозид |  | Sigma,<br>CAS 482-36-0,<br>≥97% (ВЭЖХ) |
| Кемпферол-3-глюкозид<br>Астрагалин |  | Sigma,<br>CAS480-10-4,<br>≥97% (ВЭЖХ) |
| Кверцетин |  | Sigma,<br>CAS117-39-5,<br>≥95% (ВЭЖХ) |
| Кемпферол |  | Sigma,<br>CAS 520-18-3,<br>≥97% (ВЭЖХ) |
| Хлорогеновая кислота<br>5-кофеоилхинная кислота |  | Aldrich,<br>CAS 327-97-9,<br>≥95% (титрование) |

| | | |
|---|---|---|
| Галловая кислота |  | Sigma-Aldrich, CAS 5995-86-8, ≥99% (ВЭЖХ) |
| Процианидин $B_2$ |  | INDOFINE Chemical Company, CAS 29106-49-8, ≥90% (ВЭЖХ) |
| Тролокс (±)-6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота |  | Aldrich, CAS 53188-07-1, 97% |
| Схизандрин Wuweizi спирт A Wuweizichun A |  | Sigma, CAS 7432-28-2, ≥98% (ВЭЖХ) |

*Приготовление стандартных растворов*

Для приготовления стандартных растворов с концентрацией 0,090 мг/мл 10,1 мг цианидин-3-глюкозид хлорида помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в метаноле, подкисленном 0,1% соляной кислотой, и доводили подкисленным 0,1% соляной кислотой метанолом объем до метки. Стандартные растворы хранили при температуре -27 ºС не более 6 месяцев.

Для приготовления стандартных растворов остальных соединений с концентрацией 0,05 мг/мл 5,05-5,56 мг вещества (в зависимости от чистоты субстанции) помещали в мерные колбы на 100 мл, растворяли в метаноле и доводили метанолом объем до метки. Стандартные растворы хранили при температуре -27 ºС не более 6 месяцев.

*Приготовление рабочих стандартных растворов*

Для приготовления рабочих стандартных растворов с концентрациями 3, 6, 9, 12, 15 и 18 мкг/мл 3,3, 6,7, 10, 13,3, 16,7 и 20 мл исходного стандартного раствора помещали в мерную колбу вместимотью 100 мл, доводили объем до метки метанолом. Рабочие стандартные растворы хранили в холодильнике при температуре +2 - +6 ºС не более месяца.

## 2.4. Методы определения суммарного содержания мономерных антоцианинов

### 2.4.1. Методика определения суммарного содержания антоцианинов методом pH-дифференциальной СФМ

Антоцианины подвергаются обратимой структурной трансформации при изменении pH раствора, выражающейся в принципиально разных спектрах поглощения. При pH=1 антоцианины находятся преимущественно в виде заряженного катиона флавилия, тогда как при pH=4,5 – в виде бесцветного карбинола (на рис. 11). Разность оптических плотностей при pH=1 и pH=4,5 пропорциональна содержанию мономерных антоцианинов.

*Подготовка к выполнению измерений*

*Приготовление буферного раствора с pH 1,0.* Растворяют 1,49 г KCl в 100 мл дистиллированной воды. Смешивают 25 мл раствора KCl с 67мл 0,2М раствора HCl (для получения 0,2М соляной кислоты осторожно приливают 1,7 мл концентрированной HCl к 100 мл дистиллированной воды). Проверяют значение pH и доводят кислотой до 1,0.

*Приготовление буферного раствора с pH 4,5.* Растворяют 1,64 г ацетата натрия в 100 мл воды, соляной кислотой доводят значение pH до 4,5.

Срок хранения буферных растворов не более 3 месяцев.

*Подготовка проб для анализа*

Сухие и густые экстракты, БАД к пище на их основе. Точную навеску экстракта, содержимого капсул или растертых таблеток, содержащих примерно 20 мг антоцианинов, помещают в мерную колбу вместимомтью 100 мл, добавляют 75 мл дистиллированной воды. Экстракцию проводят на

ультразвуковой бане в течение 5 мин. Затем доводят дистиллированной водой до метки.

БАД на основе высушенных ягод. Навеску измельченного образца массой около 5,0 г помещают в колбу на 100 мл, добавляют 75 мл 70% этанола, пробу интенсивно встряхивают и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 15 мин. Экстракт охлаждают до комнатной температуры и доводят до метки 70% этанолом.

Примечание. Поскольку антоцианы адсорбируются на фильтрах, растворы не фильтруют, при необходимости центрифугируют [8, 10, 11, 46].

*Выполнение измерений*

Отбирают по 1 мл подготовленной пробы, помещают в мерные колбы на 25мл. Одну колбу заполняют до метки буферным раствором с pH 1.0, другую – буферным раствором с pH 4.5, выдерживают 15 мин при комнатной температуре. Базовую (нулевую) линию спектрофотометра снимают по раствору сравнения – дистиллированной воде при всех длинах волн, при которых будут проводить измерения (510-700 нм). В 2 кюветы помещают разбавленные буферными растворами с pH=1 и pH=4,5 пробы и поочередно снимают спектры и измеряют оптические плотности при длинах волн 510 нм и 700 нм против раствора сравнения.

Примечание. Измерения следует проводить в промежутке от 15 мин до 1 ч после приготовления разбавленных проб, так как при более длительном выдерживании наблюдается тенденция к увеличению измеряемых показаний. Буферные растворы с pH=1 и pH=4,5 имеют нулевое поглощение при аналитических длинах волн (510 и 700 нм), поэтому нецелесообразно увеличивать трудоемкость и длительность процедуры, измеряя оптические плотности разбавленных проб против соответствующих буферных растворов. Авторами-разработчиками метода и нами было проведено сравнение результатов, полученных при использовании воды и соответствующих буферных растворов в качестве растворов сравнения, и различий в конечных величинах суммы мономерных антоцианинов не было обнаружено [46].

Разведение следует подбирать таким образом, чтобы оптическая плотность раствора с pH=1,0 при длине волны 510 нм находилась в пределах 0,2 - 1,0. Содержание суммы антоцианинов (в %) в пересчете на цианидин-3-глюкозид вычисляют по формуле:

$$C(\sum\text{антоцианинов},\%) = \frac{D \times Mw \times 25 \times 100 \times 100\%}{\varepsilon \times l \times m},$$

Где оптическая плотность $D = (D_{510нм} - D_{700нм})_{pH1,0} - (D_{510нм} - D_{700нм})_{pH4,5}$, ε и Mw – коэффициент молярной экстинкции и молекулярная масса антоцианина, используемого в качестве стандарта (для цианидин-3-глюкозида 26900 и 449,2 соответственно), *25* – разведение буферными растворами, мл, *100* – объем растворителя, мл, *l* – длина кюветы, см, *m* – масса образца, мг.

**2.4.2. Методика определения суммарного содержания антоцианинов методом прямой СФМ**

Согласно ЕР 8th, к точной навеске измельченных свежих или замороженных ягод 5,0 г необходимо добавить 95 мл метанола, перемешивать на аппарате «Магнитная мешалка» в течение 30 минут; профильтровать раствор в мерную колбу на 100 мл и довести до метки метанолом; полученный раствор развести 1:50 0,1% раствором хлороводородной кислоты в метаноле; измерить оптическую плотность при 528 нм, в качестве раствора сравнения использовать 0,1% раствор хлороводородной кислоты в метаноле. Сумма антоцианов рассчитывается по формуле:

$$\frac{A \times 5000}{718 \times m}$$

где: 718 – удельная абсорбция цианидин-3-глюкозид хлорида при 528 нм (экстраполированная оптическая плотность 1% раствора цианидин-3-глюкозида хлорида при 528 нм); A – оптическая плотность разбавленного раствора при 528 нм; m – масса навески в граммах [39].

### 2.4.3. Сравнение результатов определения суммарного содержания антоцианинов методом прямой и pH-дифференциальной СФМ

На примере замороженных плодов черники обыкновенной (Карелия) методами прямой (согласно EP $8^{th}$) и pH-дифференциальной СФМ было определено содержание антоциановых пигментов (табл. 5). Как видно из таблицы 5, метод прямой СФМ дает систематическое завышение результатов определения суммарного содержания антоциановых пигментов.

Таблица 5

Результаты определения суммарного содержания антоцианинов в чернике методом прямой и pH-дифференциальной СФМ

| № | Метод прямой СФМ | Метод pH-дифференциальной СФМ |
|---|---|---|
| | Содержание антоцианинов, % | |
| 1. | 0,578 | 0,450 |
| 2. | 0,521 | 0,485 |
| 3. | 0,465 | 0,413 |
| 4. | 0,497 | 0,399 |
| 5. | 0,514 | 0,414 |
| 6. | 0,568 | 0,411 |
| 7. | 0,501 | 0,447 |
| 8. | 0,541 | 0,399 |
| 9. | 0,513 | 0,421 |
| 10. | 0,524 | 0,420 |
| $X_{сред.}$ | **0,522** | **0,426** |
| $S^2$ | 0,0011 | 0,0007 |
| S | 0,0335 | 0,0270 |
| Δx | 0,021 | 0,017 |
| ε% | 3,97 | 3,93 |

где: $X_{сред.}$ – среднее значение; $S^2$ – дисперсия; S – стандартное отклонение; Δx – полуширина доверительного интервала; ε% – относительная ошибка среднего значения.

Результаты анализа зависят от пробоподготовки образцов. В EP $8^{th}$ в качестве экстрагента используется метанол, обладающий высокой экстрагирующей способностью по отношению и к полярным, и к

неполярным соединениям. Завышенный результат определения суммы антоцианинов в замороженных плодах черники, полученный по методике EP 8th связан с присутствием в метанольном экстракте и АЦ, и посторонних веществ, поглощающих при 500-550 нм (полимерные окрашенные формы, неферментативно окисленные пигменты и др.).

При использовании метода pH-дифференциальной СФМ поглощение полимерных и неферментативно окисленных форм пигментов исключается из расчета содержания антоцианинов, а измерение оптической плотности при 700 нм исключает влияние фона [46, 100]. В среднем, коэффициент деградации КД (degradation index, DI) плодов черники, представляющий собой отношение содержания АЦ, полученное при использовании в расчете только оптической плотности в буферном растворе с pH=1 (прямой метод) к содержанию АЦ, полученному pH-дифференциальным методом, составил 0,522/0,426=1,23. КД фактически является показателем завышения содержания мономерных АЦ при прямом спектрофотометрическом определении и характеризует также степень деградации мономерных антоцианинов (в %), которая может быть оценена по формуле:

$$\left(1 - \frac{1}{\text{КД}}\right) \times 100\%$$

Графически выраженная зависимость коэффициента дерадации от степени разрушения мономерных антоцианинов (в %) в процессе хранения и технологической обработки показана на рисунке 12.

Использование метода прямой СФМ приводило к существенному (приблизительно на 19%) завышению результатов определения суммы антоцианинов даже в замороженных плодах черники с низким содержанием неферментативно окисленных и полимерных форм пигментов. В высушенном сырье и продуктах технологической обработки сырья с потенциально более высоким содержанием полимерных форм антоцианинов и окисленных пигментов завышение было более значительным (от 36 до 77%).

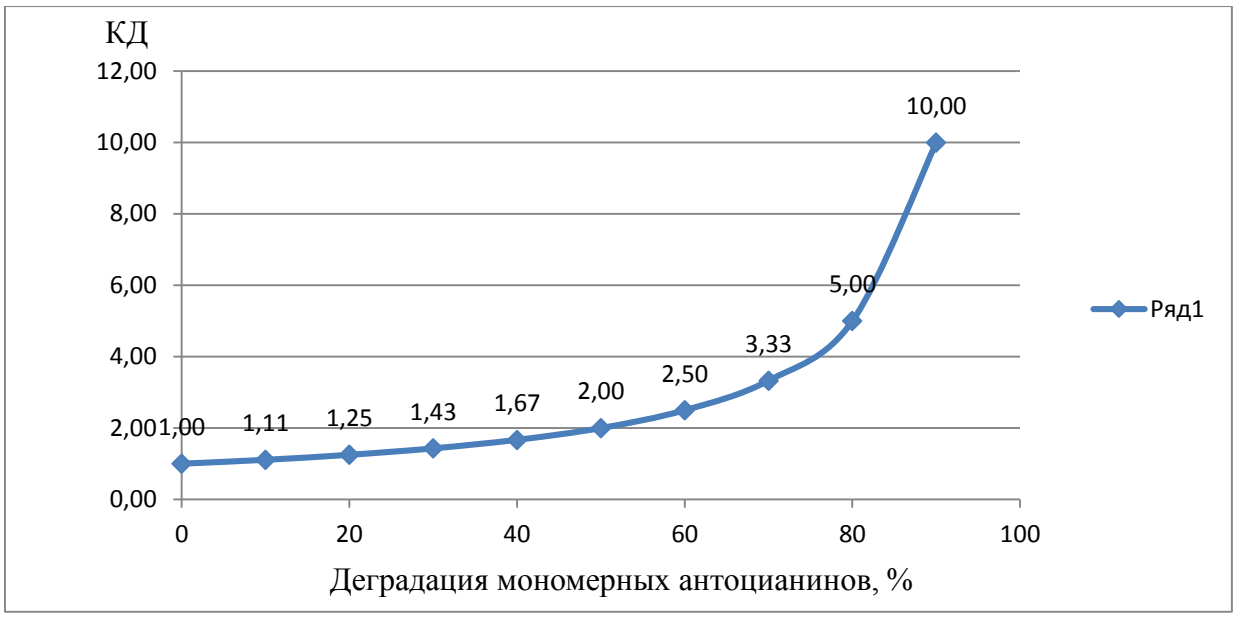



Рисунок 12. График зависимости коэффициента деградации от степени разрушения мономерных антоцианинов (в %)

Таким образом, было показано, что метод прямой СФМ дает систематически завышенные результаты суммарного содержания антоцианинов в ЛРС. Далее в настоящей работе оценку интегрального содержания аноцианинов в объектах исследования проводили методом pH-дифференциальной СФМ.

**2.4.4. Подбор оптимальных условий для экстракции антоцианинов из растительного сырья и продуктов его переработки**

Как уже говорилось в разделе **2.3.** вследствие относительной нестабильности, чувствительности к нагреванию и свету экстракцию антоцианинов следует проводить в мягких условиях. Выход антоциановых пигментов зависит от способа экстракции, времени и растворителя.

Наиболее распространеными растворителями для экстракции антоцианинов являются 1% или 0,1% раствор соляной кислоты в метаноле, абсолютный этанол, подкисленные или нейтральные водно-этанольные смеси и вода.

В предварительных испытаниях исследованы различные экстрагенты: вода дистиллированная, водно-спиртовые смеси различной концентрации

(30%, 50%, 70%, 80% и 96% этанола), метанол, нейтральные и подкисленные 0,04% соляной кислотой. Предпочтительнее использовать именно соляную кислоту, так как она входит в состав буферных растворов с pH=1 и pH=4,5.

Контроль полноты экстракции осуществлялся методом pH-дифференциальной СФМ при 510 и 700 нм. Длины волн максимумов поглощения в водных, водно-спиртовых и метанольных экстрактах объектов исследования при разбавлении буферными растворами в 10-25 разразличались незначительно. Оптическая плотность при данных длинах волн заметно отличалась в зависимости от концентрации спирта. Для большинства образцов, кроме плодов калины и лимонника, в водные извлечения перешло наименьшее количество антоцианинов по сравнению с водно-этанольными извлечениями, в которых содержание антоцианинов возрастало вместе с концентрацией спирта до значения концентрации 70%. При использовании 0,04% HCl в метаноле выход пигментов также был выше. В экстрактах с содержанием 80% и 96% этанола наблюдалось уменьшение оптической плотности при длине волны 510 нм (табл. 6).

Несмотря на то, что этанол является несколько менее эффективным и менее летучим растворителем, он более предпочтителен для экстракции антоцианинов из лекарственного и пищевого растительного сырья, так как на фармацевтических предриятиях при производстве стандартизованых сухих экстрактов, настоек, гомеопатических препаратов из антоцианин-содержащего растительного сырья черники, черной смородины, аронии, калины и лимонника в качестве экстрагента используется этанол или водно-этанольные смеси, обычно 70% или 50-55% этанол.

Кроме того, использование токсичного метилового спирта как в фармацевтическом, так и в пищевом производстве, как правило, не допускается из соображений техники безопасности. Оптимальным растворителем для экстракции антоцианинов был выбран 0,04% HCl в 70% этаноле.

Таблица 6

Влияние состава экстрагента на полноту экстракции антоцианинов из объектов исследования

| Экстрагент | | Содержание антоцианинов, % | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | черника | арония | черная смородина | калина | лимонник |
| Вода | нейтральная | 0,180 | 0,413 | 0,181 | 0,029 | 0,019 |
| | подкисленная 0,04% HCl | 0,217 | 0,427 | 0,184 | 0,030 | 0,021 |
| 30% этанол | нейтральный | 0,222 | 0,430 | 0,173 | 0,028 | 0,017 |
| | подкисленный 0,04% HCl | 0,254 | 0,479 | 0,180 | 0,029 | 0,019 |
| 50% этанол | нейтральный | 0,289 | 0,487 | 0,175 | 0,029 | 0,018 |
| | подкисленный 0,04% HCl | 0,342 | 0,525 | 0,182 | 0,030 | 0,020 |
| 70% этанол | нейтральный | 0,309 | 0,538 | 0,176 | 0,030 | 0,020 |
| | подкисленный 0,04% HCl | 0,376 | 0,569 | 0,184 | 0,031 | 0,021 |
| 80% этанол | нейтральный | 0,303 | 0,529 | 0,176 | 0,028 | 0,018 |
| | подкисленный 0,04% HCl | 0,367 | 0,557 | 0,183 | 0,030 | 0,020 |
| 96% этанол | нейтральный | 0,300 | 0,521 | 0,174 | 0,027 | 0,019 |
| | подкисленный 0,04% HCl | 0,372 | 0,550 | 0,183 | 0,029 | 0,020 |
| Метанол | нейтральный | 0,306 | 0,537 | 0,177 | 0,029 | 0,020 |
| | подкисленный 0,04% HCl | 0,401 | 0,588 | 0,193 | 0,031 | 0,023 |

Соотношение сырьё-экстрагент зависит от концентрации антоцианинов в образце. В плодах с высоким содержанием пигментов (>0,2%) - черника, арония оптимальное соотношение сырьё-экстрагент 1:100 – 1:20, для калины и лимонника, содержание антоцианинов в которых <0,2% соотношение сырьё-экстрагент 1:10 – 1:20. Черная смородина может относиться к обеим группам, поскольку содержание антоцианов в ней варьируется от 0,05% до 0,40% в зависимости от размера, сортаплодов и региона заготовки.

На предварительном этапе исследований при подборе оптимальных условий на примере свежезамороженных плодов черники были изучены различные способы экстракции: нагревание на водяной бане с обратным

холодильником, экстракция с использованием магнитной мешалки и экстракция на ультразвуковой бане (табл. 7 и 8).

Таблица 7

Влияние способа экстракции на полноту извлечения антоцианинов из замороженных плодов черники

| № опыта | Содержание антоцианинов, мг/100 г свежего веса | | |
|---|---|---|---|
| | Нагревание на водяной бане с обратным холодильником | Экстракция на УЗ бане при комнатной температуре | Экстракция на магнитной мешалке при комнатной температуре |
| 1. | 450,3 | 413,7 | 402,2 |
| 2. | 485,1 | 397,5 | 415,4 |
| 3. | 413,4 | 440,4 | 379,3 |
| 4. | 399,2 | 403,9 | 403,7 |
| 5. | 414,0 | 438,2 | 410,0 |
| 6. | 410,5 | 415,5 | 425,5 |
| 7. | 446,7 | 420,1 | 368,9 |
| 8. | 398,9 | 428,8 | 412,4 |
| 9. | 420,5 | 410,7 | 408,8 |
| 10. | 420,1 | 430,9 | 364,2 |

Таблица 8

Статистическая обработка результатов экстракции антоцианинов различными способами, f=10, P=0,95, T(p,f)=2,23

| Способ экстракции | $X_{сред.}$ | $S^2$ | S | Δx | ε% |
|---|---|---|---|---|---|
| Нагревание на кипящей водяной бане с обратным холодильником | 425,9 | 730,3 | 27,0 | 16,7 | 3,9 |
| Экстракция на УЗ бане при комнатной температуре | 420,0 | 206,2 | 14,4 | 8,9 | 2,1 |
| Экстракция на магнитной мешалке при комнатной температуре | 399,0 | 433,9 | 20,8 | 12,9 | 3,2 |

где: $X_{сред.}$ – среднее значение; $S^2$ – дисперсия; S – стандартное отклонение; Δx – полуширина доверительного интервала; ε% – относительная ошибка среднего значения.

Во всех случаях проводилась трехкратная экстракция точной навески плодов (~5,0 г) в течение 15 мин, затем извлечения объединялись в мерной колбе на 100 мл, охлаждались до комнатной температуры и доводились до метки. Согласно примечанию в разделе **3.3.1**, способом очистки объединенного извлечения было выбрано центрифурирование при 15000 об/мин в течение 10 мин.

Из таблиц 7 и 8 видно, что результаты определений суммы антоцианинов нагреванием на водяной бане с обратным холодильником и обработкой на УЗ бане близки. Поэтому избыточный нагрев (около $100^0$C) нежелателен, так как может привести к частичному гидролизу антоцианов и проантоцианидинов, и систематическому завышению результатов анализа.

В качестве оптимального способа экстракции антоцианинов была выбрана обработка на УЗ бане при комнатной температуре, которая дает более воспроизводимые результаты с меньшей ошибкой определения.

В процессе преварительных исследований установлено, что оптимальное время экстракции антоцианинов из растительного сырья не менее 1,5-2,0 ч.

Так как фильтрация экстрактов при извлечении антоцианинов не рекомендуется, целесообразно проводить экстракцию сразу в центрифужных пробирках на 50 мл и центрифугировать каждое извлечение.

*Пробоподготовка свежих, свежезамороженных и высушенных плодов*
Сырье предварительно измельчают. Свежие и замороженные плоды блендируют, тщательно растирают в ступке или обрабатывают УЗ гомогенизатором до однородной массы. Высушенные плоды предварительно измельчают в лабораторной мельнице или кофемолке до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 0,2 мм.

Точные навески 5,0 г свежих или замороженных плодов черники, аронии и черной смородины, 2,0 г высушенных плодов черники, аронии и черной смородины, 10,0 г свежих или замороженных плодов калины, лимонника и кизила, 5,0 г сушеных плодов калины, лимонника и кизила

помещают в цетрифужные пробирки вместимостью 50 мл, добавляют 30 мл 0,04% HCl в 70% этаноле, интенсивно всряхивают, помещают на УЗ баню на 30 мин. Затем центрифугируют при 4500 об/мин в течение 10 мин и переносят экстракт в мерную колбу на 100 мл. Экстракцию повторяют 3 раза. К остаткам сырья добавляют небольшое количество растворителя, интенсивно встряхивают, ценртифугируют, переносят в мерную колбу, доводят до метки, перемешивают. 2 мл объединенного экстракта помещают в центрифужную пробирку и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 10 мин. Далее готовят разведения и проводят измерения как описано в методике в разделе **2.4.1.**

### 2.4.5. Основные валидационные параметры pH-дифференциальной СФМ

pH-дифференциальный метод является официальным методом интегрального определения мономерных антоцианинов AOAC 2005.02., в область применения которого входят соки, сокосодержащие напитки, натуральные красители и вина [18]. Усовершенствованный в диссертации pH-дифференциальный метод определения суммы мономерных антоцианинов включен в межгосударственный стандарт ГОСТ 32709-2014 «Продукция соковая. Методы определения антоцианинов», который распространяется на фруктовые соки и нектары, фруктовые концентрированные соки, фруктовые пюре и концентрированные пюре, морсы и концентрированные морсы, сокосодержащие напитки из фруктов и ягод, окрашенных в красные, малиновые и сине-фиолетовые цвета, включая соковую продукцию обогащенную и для детского питания [10, 11].

Валидация pH-дифференциального метода по всем основным показателям (специфичность, линейность, диапазон применения, правильность, прецизионность, повторяемость и робастность) проводилась в соответствии со строгими правилами AOAC в аналитических лабораториях Министерства сельского хозяйства США (USDA) и других лабораториях США, Канады, Великобритании, Германии, Норвегии, Латвии [1, 2, 15, 32,

61]. Диапазон линейности и диапазон определяемых концентраций антоцианинов согласно данным AOAC составляет 20-3000 мг/л. Относительное стандартное отклонение повторяемости ($RSD_r$) варьирует от 1,06% (сок бузины) до 4,16% (коктейль из клюквы). Относительное стандартное отклонение воспроизводимости ($RSD_R$) варьирует от 2,69% (стандарт цианидин-3-глюкозида) до 10,12% (сок клубники). Коэффициент вариации метода меняется от 0,30 (стандарт цианидин-3-глюкозида) до 1,33 (сок бузины) [61].

В своей работе по валидации pH-дифференциального метода Dandena и Liemane сравнили содержание антоцианинов в соке и жоме черники, рассчитанное по калибровочному графику цианидин-3-глюкозида и рассчитанное с помощью коэффициента молярной экстинкции цианидин-3-глюкозида. Результаты эксперимента подтвердили диапазон линейности и диапазон определяемых концентраций, установленный ранее AOAC, - 20-3000 мг/л (мг/кг) и показали высокую степень корреляции между суммой антоцианинов, рассчитанной по калибровочному графику и коэффициенту молярной экстинкции, коэффициент корреляции составил 0,9999 для сока черники и 0,9998 для жома черники. Также был показан высокий процент правильности определения антоцианинов, который для обоих образцов был близок к 100%. Прецизионность была выражена стандартным отклонением, которое составило 0,30% для сока черники и 1,88% для жома черники. Относительное стандартное отклонение повторяемости ($RSD_r$) для сока черники составило 0,27%, для жома черники - 1,8%. При определнии робастности метода было показано, что стандартное отклонение презиционности для каждого образца не было превышено [32].

В процессе разработки ГОСТ 32709-2014 «Продукция соковая. Методы определения антоцианинов» по определению антоцианинов в соках при непосредственном участии автора проводилась валидация pH-дифференциального метода по показателям линейность, диапазон

применения, предел обнаружения и количественного обнаружения, правильность, повторяемость и воспроизводимость [10, 11].

После адаптации методики для ЛРС нами также была проведена валидация метода pH-дифференциальной СФМ. Специфичность методики была оценена путем снятия спектров раствора сравнения (вода очищенная), буферных растворов с pH=1 и pH=4,5 и соответствующих стандартных растворов цианидин-3-глюкозида в буферных растворах. При аналитических длинах волн (510 нм и 700 нм) оптическая плотность буферных растворов и раствора сравнения не отличалась от базовой линии и не вносила вклад в оптическую плотность испытуемых растворов.

Получена калибровочная кривая стандарта цианидин-3-глюкозида (рис. 13) по 6 точкам, коэффициент корреляции линейной зависимости составил 0,9999.

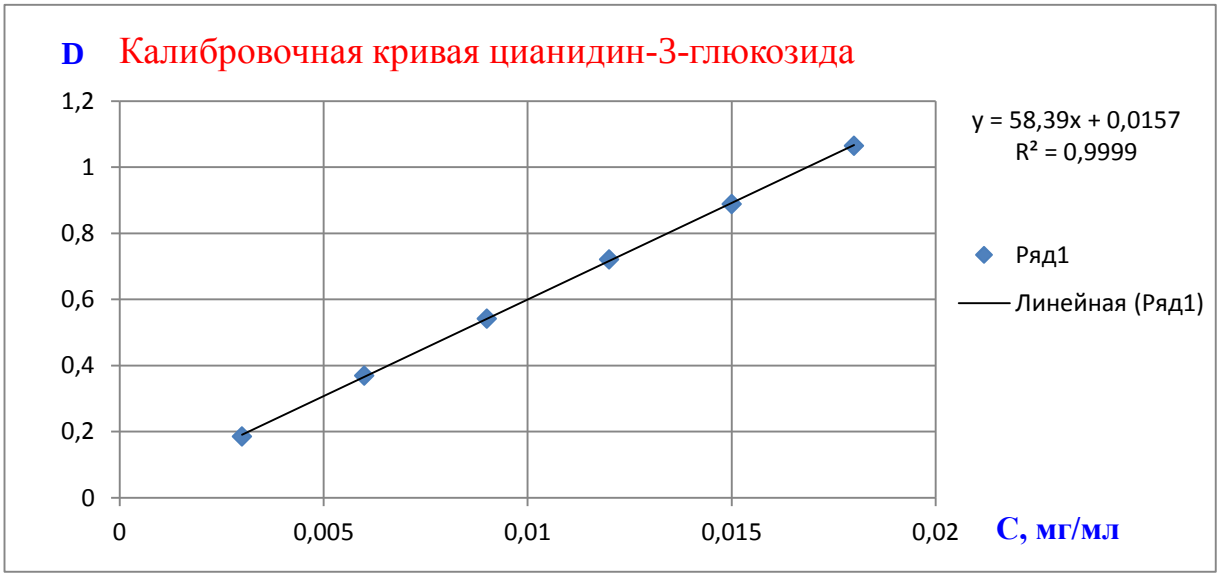



Рисунок 13. Калибровочная кривая по стандарту цианидин-3-глюкозида

Были определены предел обнаружения, предел количественного обнаружения и диапазон линейных концентраций (табл. 9). Предел обнаружения метода составил 1,0 мг/кг, предел количественного обнаружения – 5,0 мг/кг, диапазон линейных концентраций - от 5 до 5000 мг/кг при коэффициенте корреляции, близком к 1.

Таблица 9

Параметры валидации методики определения суммарного содержания антоцианинов

| Антоцианин | Предел обнаружения (сигнал-шум 2:1), мг/кг | Предел количественного определения (сигнал-шум 10:1), мг/кг | Диапазон линейных концентраций, мг/кг | Коэффициент линейности |
|---|---|---|---|---|
| Цианидин-3-глюкозид | 1,0 | 5,0 | 5-5000 | 0,998 |

Для оценки правильности и прецизионности методики были рассчитаны метрологические характеристики по результатам 7 параллельных измерений стандартных растворов цианидин-3-глюкозида (табл. 10). Относительная ошибка определения для цианидин-3-глюкозида составила от 0,25 до 3,04%, а доверительный диапазон для всех трех концентраций включает 100% значение величины [2].

Таблица 10

Метрологические характеристики определения суммарного содержания антоцианов методом pH-дифференциальной СФМ

| $X_{ном}$ cyd-3-glu, мг | f | $X_{min}$, мг | $X_{max}$, мг | $X_{сред.}$, мг | $S^2$ | S | P | t (p,f) | Δx | ε% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 50 | 7 | 46,97 | 52,84 | 50,93 | 4,367 | 2,090 | 0,95 | 2,36 | 1,55 | 3,04 |
| 1500 | 7 | 1461,2 | 1527,8 | 1500,9 | 500,31 | 22,37 | 0,95 | 2,36 | 16,6 | 1,10 |
| 4500 | 7 | 4472,0 | 4520,0 | 4498,3 | 225,4 | 15,0 | 0,95 | 2,36 | 11,1 | 0,25 |

где: $X_{ном}$ – истинное содержание; $X_{min}$– минимальное значение; $X_{max}$– максимальное значение; $X_{сред.}$ – среднеезначение; $S^2$ – дисперсия; S – стандартное отклонение; P – доверительная вероятность; t (α,f) – коэффициент Стьюдента; Δx – полуширина доверительного интервала; ε% – относительная ошибка среднего значения.

Для оценки правильности дополнительно использовали метод добавок стандарта цианидин-3-глюкозида. Результаты определения суммы антоцианинов представлены в таблице 11. Как видно из таблицы 11, среднее значение находится в диапазоне 98-102%, а относительная ошибка определения не превышает 2%.

Таблица 11

Результаты определения суммарного содержания антоцианинов в плодах аронии черноплодной методом добавок

| Найдено антоцианинов, % | Добавлено цианидин-3-глюкозида, % | Задано антоцианинов и цианидин-3-глюкозида, % | Найдено антоцианинов и цианидин-3-глюкозида, % | Относительная ошибка, % |
|---|---|---|---|---|
| 0,477 | 0,123 | 0,600 | 0,589 | -1,83 |
| 0,569 | 0,131 | 0,700 | 0,711 | +1,55 |
| 0,888 | 0,112 | 1,000 | 1,012 | +1,19 |

Результаты определения промежуточной прецизионности методики представлены в таблице 12. Как видно из таблицы 12, отклонение от среднего значения суммы антоцианинов в обеих сериях измерений не превышает 2%.

Таким образом, адаптированная для изучения отечественного ЛРС pH-дифференциальная СФМ, валидированная по основным валидационным характеристикам, является приемлемым и целесообразным методом определения суммарного содержания мономерных антоцианинов в растительном сырье и продуктах его переработки.

Таблица 12

Оценка промежуточной прецизионности методики количественного определения суммарного содержания антоцианинов

| Показатель | Лаборатория 1 (Лаборатория метаболомного и протеомного анализа ФГБНУ «НИИ питания») | Лаборатория 2 (Лаборатория химии пищевых продуктов ФГБНУ «НИИ питания») |
|---|---|---|
| n | 7 | 7 |
| $X_{min}$, мг | 49,72 | 49,48 |
| $X_{max}$, мг | 50,71 | 50,59 |
| $X_{сред.}$, мг | 50,13 | 50,18 |
| S | 0,34 | 0,38 |
| RSD, % | 0,68 | 0,77 |
| $X_{сред.intra}$ | 50,16 | |
| $S_{intra}$ | 0,36 | |
| $RSD_{intra}$, % (n=14) | 0,72 | |

где: $X_{min}$ – минимальное значение; $X_{max}$ – максимальное значение; $X_{сред.}$ – среднеезначение; S – стандартное отклонение; RSD – относительное стандартное отклонение; $X_{сред.intra}$– среднее значение в обеих сериях измерений; $S_{intra}$– стандартное отклонение промежуточной прецизионности; $RSD_{intra}$- относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности.

### 2.5. Разработка методики определения специфического профиля антоцианинов методом ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-MS

Профиль индивидуальных антоцианинов является видовым «отпечатком пальцев», играет важную роль в хемотаксономии растений, а также влияет на фармакологические, в том числе антиоксидантные свойства растения. Определение состава индивидуальных антоцианинов позволяет выявить фальфисикацию дорогостоящих растений с высокой биологической активностью и продуктов их переработки, для которых нельзя провести микроскопию для подтверждения подлинности, более дешевыми и часто менее биологически активными. Так, например, в процессе санитарно-

гигиенической экспертизы и регистрации растительных экстрактов, БАД и фиточаев на их основе, на базе испытательного центра ФГБНУ «НИИ питания» сухие экстракты черники, черной смородины и фиточаи на основе плодов черники часто оказывались фальсифицированы экстрактами бузины черной и фиточаями с аронией вместо черники.

Пробоподготовка образцов. Навеску 2,0 г измельченных плодов черники, аронии, смородины черной, 5,0 г измельченных плодов калины, лимонника, 0,02 г очищенных и стандартизованных сухих экстрактов свежих плодов черники, смородины черной, содержащих примерно 5 мг антоцианинов помещают в коническую колбу со шлифом, добавляют 20 мл воды очищенной. Экстракцию проводят на УЗ бане при комнатной температуре в течение 15 мин, тщательно перемешивают. 1,5-2 мл полученного экстракта помещают в центрифужную пробирку и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 10 мин.

На основе спектров антоциановых пигментов в УФ и видимой области в качестве аналитических длин волн для ДМД антоцианинов были выбраны 2 длины волны: 520 нм - средняя длина волны из диапазона длин волн максимумов антоцианинов (500-550 нм), близкая к длинам волн максимумов основных антоцианинов, содержащихся в объектах исследования, и 280 нм – общая для всех антоцианинов.

В процессе разработки методики при подборе компонентов подвижной фазы рассматривали допустимые для МСД кислоты: муравьиную, уксусную и ТФУК. Оптимальное для качества разделения антоцианинов и функционирования колонки значение pH подвижной фазы находится в пределах 1,1-2,2, поэтому в дальнейшем использовали более сильные кислоты - муравьиную и ТФУК.

В качестве компонента В чаще всего сравнивали нейтральные и подкисленные компонентом А ацетонитрил, метанол и их смеси. В анализе антоцианинов градиентное элюирование предпочтительнее изократического, поскольку в изократическом режиме ацилированные антоцианины и/или

свободные агликоны часто не успевают элюироваться из колонки или выходят одним пиком.

Разделение антоцианинов проводилось на колонках Phenomenex Luna C18 250×4,6 мм 5 μ, Nucleosil C18 100A 250×4,6 мм, 5 μ, Hypersil ODS C18 250×4,6 мм 5 μ и ProteCol C18 HPH 125 250×4,6 мм, 5 μ, которые согласно спецификациям производителей выдерживают низкие значения pH подвижной фазы.

В ходе предварительных испытаний были исследованы разнообразные подвижные фазы:

1. А – 1% водный раствор муравьиной кислоты (pH 2,13-2,17), В – метанол (градиентное элюирование от 90:10 до 60:40 за 50 мин)
2. А – 0,1% водный раствор ТФУК (pH 1,05-1,10), В – метанол (градиентное элюирование от 90:10 до 60:40 за 50 мин)
3. А – 1% водный раствор муравьиной кислоты (pH 2,13-2,17), В – ацетонитрил (градиентное элюирование от 90:10 до 60:40 за 50 мин)
4. А – 0,1% водный раствор ТФУК (pH 1,05-1,10), В – ацетонитрил (градиентное элюирование от 90:10 до 60:40 за 50 мин)
5. А – 1% водный раствор муравьиной кислоты (pH 2,13-2,17), В – смесь метанол : ацетонитрил 1:1 (градиентное элюирование от 90:10 до 60:40 за 50 мин)
6. А – 0,1% водный раствор ТФУК (pH 1,05-1,10), В – смесь метанол : ацетонитрил 1:1 (градиентное элюирование от 90:10 до 60:40 за 50 мин)

Практически все исследованные системы показали приемлемое разделение антоциановых пигментов аронии, черной смородины, калины и лимонника. В плодах черники содержится более 20 близких по химической структуре индивидуальных антоцианинов, обладающих близкой хроматографической подвижностью, и ни на одной из фаз не удалось добиться полного разделения антоцианинов. При использовании систем 1, 2, 5 и 6 разделение антоцианинов в целом для большинства объектов исследования было менее полным, чем в подвижных фазах 3 и 4,

содержащих только ацетонитрил. В то же время в системах 2, 4 и 6 наблюдалось тенденция к частичному слиянию антоцианинов черной смородины по сравнению с системами, содержащими муравьиную кислоту. В системах 3 и 4 наблюдалось наиболее эффективное разделение антоцианинов черники. В системе 4 форма пиков была несколько лучше, чем в системе 3, однако при этом ТФУК как ион-парный реагент способствовала значительному увеличению времени удерживания пигментов и времени анализа, соответственно. К тому же ТФУК оказывает неблагоприятное воздействие на МСД: вследствие высокого поверхностного натяжения препятствует эффективному распылению и, находясь в газовой фазе в виде ионных пар с антоцианинами, подавляет их ионизацию, снижая интенсивность сигнала. С учетом вышесказанного в качестве оптимальной подвижной фазы была выбрана система 3 - 1% водный раствор муравьиной кислоты (pH 2,13-2,17), B – ацетонитрил. Перед использованием подвижную фазу фильтровали под вакуумом через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

В результате эксперимента были подобраны следующие условия хроматографического разделения антоцианинов в чернике, аронии, черной смородине: колонка Phenomenex Luna C18 250×4,6 mm 5 μ. Подвижная фаза: A – 1% водный раствор муравьиной кислоты (pH 2,13-2,17), B – ацетонитрил. Линейный градиент: 0 мин - 10% B, 10 мин – 12% B, 20 мин – 15% B, 30 мин – 20% B, 40 мин – 30% B, 50 мин – 40% B, 51-60 мин – 10% B. Общее время анализа 60 мин. Скорость потока растворителя 0,5 мл/мин. Температура колонки 40ºC, температура автосемплера 20ºC. Объем вводимой пробы 20 μл. ДМД при 520 нм и 280 нм. Спектры снимали в диапазоне от 200 до 700 нм.

Для плодов калины, которые содержат только неацилированные гликозиды цианидина с очень близкой хроматографической подвижностью, в дальнейшем оптимизировали градиент: 0 мин – 12% B, 20 мин – 15% B, 30 мин – 20% B, 31-40 мин – 12% B.

При подборе оптимальных условий масс-детектирования и фрагментации антоцианинов с учетом литературных данных исследованы следующие рабочие параметры источника ионизации:

- напряжение на капилляре –3,0 кВ, 3,5 кВ, 4,0 кВ, 4,5 кВ, 5,0 кВ;
- поток газа-осушителя (азот) – 9 л/мин, 12 л/мин;
- температура газа-осушителя - 250°С, 275°С,300°С,325°С,350°С;
- давление на распылителе –0,27 МПа, 0,38 МПа, 0,41 МПа.

Ионизацию проводили электроспреем (см. раздел **2.5.2.**), сканирование масс – в режиме регистрации положительных ионов в диапазоне 100-1500 m/z.

Для повышения чувствительности и специфичности методики были изучены масс-спектры индивидуальных антоцианинов, а также проведена их фрагментация второго и третьего порядка методом ВЭЖХ-МС/МС, результаты которой совпали с представленными в таблице 13.

В результате эксперимента были выбраны оптимальные параметры масс-спектрометрии антоцианинов: напряжение на капилляре - 3,5 кВ, поток газа-осушителя (азот) – 9 л/мин, температура - 325°С, давление на распылителе – 0,27 МПа, сканирование масс – в режиме регистрации положительных ионов $[M]^+$ в диапазоне от 100 до 1500 m/z. Примеры типичных ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС хроматограмм черники, аронии, черной смородины, лимонника, калины и кизила при λ=520 нм, хроматограмм выделенных ионов антоцианинов и их масс-спектры, УФ и видимые спектры представлены в Приложении 1.

Идентификацию пиков на хроматограмме проводили по молекулярным массам, временам удерживания, УФ- и видимым спектрам, а также путем сравнения с литературными данными о составе антоцианинов в аналогичном сырье [8, 24, 26, 28, 35, 45, 53, 56, 63, 75, 88, 90, 98].

ВЭЖХ-МС характеристики антоцианинов представлены в таблице 13.

Во всех масс-спектрах индивидуальных антоцианинов в различных соотношениях присутствовали фрагменты агликонов. У антоцианинов,

являющихся по своей структуре три- и дисахаридами (ксилозилрутинозиды, рутинозиды, самбубиозиды, вицианозиды и латирозиды), в масс-спектрах также обнаружены характерные фрагменты, образованные в результате отщепления остатков рамнозы, ксилозы и арабинозы вследствие более слабых 1→6 и 1→2 гликозидных связей.

Таблица 13

Результаты ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС индивидуальных антоцианинов в объектах исследования

| № | Антоцианин | k’ | ESI-MS$^+$ m/z | Детектируемый ион |
|---|---|---|---|---|
| Черника обыкновенная | | | | |
| 1. | Дельфинидин-3-галактозид | 1,07 | 465,10<br>303,05 | $[M]^+$<br>$[M - галактоза]^+$ |
| 2. | Дельфинидин-3-глюкозид | 1,31 | 465,10<br>303,05 | $[M]^+$<br>$[M - глюкоза]^+$ |
| 3. | Цианидин-3-галактозид | 1,72 | 449,11<br>287,05 | $[M]^+$<br>$[M - галактоза]^+$ |
| 4. | Дельфинидин-3-арабинозид | 1,76 | 435,10<br>303,05 | $[M]^+$<br>$[M - арабиноза]^+$ |
| 5. | Цианидин-3-глюкозид | 2,07 | 449,11<br>287,05 | $[M]^+$<br>$[M - глюкоза]^+$ |
| 6. | Петунидин-3-галактозид | 2,19 | 479,12<br>317,06 | $[M]^+$<br>$[M - галактоза]^+$ |
| 7. | Цианидин-3-арабинозид | 2,52 | 419,10<br>287,05 | $[M]^+$<br>$[M - арабиноза]^+$ |
| 8. | Петунидин-3-глюкозид | 2,54 | 479,12<br>317,06 | $[M]^+$<br>$[M - глюкоза]^+$ |
| 9. | Дельфинидин-3-ксилозид | 2,76 | 435,10<br>303,05 | $[M]^+$<br>$[M - ксилоза]^+$ |
| 10. | Пеонидин-3-галактозид | 3,00 | 463,12<br>301,07 | $[M]^+$<br>$[M - галактоза]^+$ |
| 11. | Петунидин-3-арабинозид | 3,06 | 449,11<br>317,06 | $[M]^+$<br>$[M - арабиноза]^+$ |
| 12. | Мальвидин-3-галактозид | 3,41 | 493,13<br>331,08 | $[M]^+$<br>$[M - галактоза]^+$ |
| 13. | Пеонидин-3-глюкозид | 3,43 | 463,12<br>301,07 | $[M]^+$<br>$[M - глюкоза]^+$ |
| 14. | Цианидин-3-ксилозид | 3,65 | 419,10<br>287,05 | $[M]^+$<br>$[M - ксилоза]^+$ |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 15. | Мальвидин-3-глюкозид | 3,76 | 493,13<br>331,08 | $[M]^+$<br>[M - глюкоза]$^+$ |
| 16. | Петунидин-3-ксилозид | 3,83 | 449,11<br>317,06 | $[M]^+$<br>[M - ксилоза]$^+$ |
| 17. | Пеонидин-3-арабинозид | 4,13 | 433,12<br>301,07 | $[M]^+$<br>[M - арабиноза]$^+$ |
| 18. | Мальвидин-3-арабинозид | 4,22 | 463,12<br>331,08 | $[M]^+$<br>[M - арабиноза]$^+$ |
| 19. | Пеонидин-3-ксилозид | 4,94 | 433,12<br>301,07 | $[M]^+$<br>[M - ксилоза]$^+$ |
| 20. | Мальвидин-3-ксилозид | 5,22 | 463,12<br>331,08 | $[M]^+$<br>[M - ксилоза]$^+$ |
| Арония черноплодная | | | | |
| 1. | Цианидин-3-галактозид | 1,83 | 449,11<br>287,05 | $[M]^+$<br>[M - галактоза]$^+$ |
| 2. | Цианидин-3-глюкозид | 2,20 | 449,11<br>287,05 | $[M]^+$<br>[M - глюкоза]$^+$ |
| 3. | Цианидин-3-арабинозид | 2,63 | 419,10<br>287,05 | $[M]^+$<br>[M - арабиноза]$^+$ |
| 4. | Цианидин-3-ксилозид | 3,72 | 419,10<br>287,05 | $[M]^+$<br>[M - ксилоза]$^+$ |
| 5. | Цианидин | 4,80 | 287,05 | $[M]^+$ |
| Черная смородина | | | | |
| 1. | Дельфинидин-3-глюкозид | 1,41 | 465,10<br>303,05 | $[M]^+$<br>[M - глюкоза]$^+$ |
| 2. | Дельфинидин-3-рутинозид | 1,61 | 611,16<br>465,10<br>303,05 | $[M]^+$<br>[M - рамноза]$^+$<br>[M - рутиноза]$^+$ |
| 3. | Цианидин-3-глюкозид | 2,17 | 449,11<br>287,05 | $[M]^+$<br>[M - глюкоза]$^+$ |
| 4. | Цианидин-3-рутинозид | 2,44 | 595,16<br>449,11<br>287,05 | $[M]^+$<br>[M - рамноза]$^+$<br>[M - рутиноза]$^+$ |
| 5. | Петунидин-3-рутинозид | 2,91 | 625,17<br>479,12<br>317,06 | $[M]^+$<br>[M - рамноза]$^+$<br>[M - рутиноза]$^+$ |
| 6. | Пеларгонидин-3-рутинозид | 3,31 | 579,17<br>433,12<br>271,05 | $[M]^+$<br>[M - рамноза]$^+$<br>[M - рутиноза]$^+$ |
| 7. | Пеонидин-3-рутинозид | 3,74 | 609,18<br>463,12<br>301,07 | $[M]^+$<br>[M - рамноза]$^+$<br>[M - рутиноза]$^+$ |
| 8. | Дельфинидин-3-(6″-п- | 6,41 | 611,51 | $[M]^+$ |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | кумароил)глюкозид | | 303,05 | [M –п-кумароилглюкоза]$^+$ |
| 9. | Цианидин-3-(6″-п-кумароил)глюкозид | 6,78 | 595,16<br>287,05 | [M]$^+$<br>[M –п-кумароилглюкоза]$^+$ |
| 10. | Петунидин-3-(6″-п-кумароил)глюкозид | 6,89 | 625,17<br>317,06 | [M]$^+$<br>[M –п-кумароилглюкоза]$^+$ |
| Лимонник китайский | | | | |
| 1. | Цианидин + 2 пентозы + гексоза | 0,57 | 713,12<br>287,05 | [M]$^+$<br>[M - 2 пентозы – гексоза]$^+$ |
| 2. | Цианидин + 2 гексозы + пентоза | 1,09 | 743,14<br>287,05 | [M]$^+$<br>[M - 2 гексозы - пентоза]$^+$ |
| 3. | Цианидин + 2 гексозы + рамноза | 1,61 | 757,15<br>287,05 | [M]$^+$<br>[M - 2 гексозы - рамноза]$^+$ |
| 4. | Цианидин-3-латирозид | 1,93 | 581,11<br>287,05 | [M]$^+$<br>[M-латироза]$^+$ |
| 5. | Цианидин-3-ксилозилрутинозид | 2,06 | 727,20<br>581,11<br>287,05 | [M]$^+$<br>[M- рамноза]$^+$<br>[M-ксилозилрутиноза]$^+$ |
| 6. | Цианидин-3-рутинозид | 2,31 | 595,11<br>449,10<br>287,05 | [M]$^+$<br>[M- рамноза]$^+$<br>[M- рутиноза]$^+$ |
| Калина обыкновенная | | | | |
| 1. | Цианидин+2гексозы +пентоза | 0,52 | 743,14<br>287,05 | [M]$^+$<br>[M - 2 гексозы – пентоза]$^+$ |
| 2. | Цианидин+2пентозы +гексоза | 0,61 | 713,12<br>287,05 | [M]$^+$<br>[M - 2 пентозы – гексоза]$^+$ |
| 3. | Цианидин+2гексозы | 0,67 | 611,12<br>287,05 | [M]$^+$<br>[M - 2 гексозы]$^+$ |
| 4. | Цианидин+2пентозы +гексоза | 0,74 | 713,12<br>287,05 | [M]$^+$<br>[M - 2 пентозы - гексоза]$^+$ |
| 5. | Цианидин-3-вицианозид | 0,83 | 581,11<br>287,05 | [M]$^+$<br>[M- вицианоза]$^+$ |
| 6. | Цианидин-3-латирозид | 0,91 | 581,11<br>287,05 | [M]$^+$<br>[M-латироза]$^+$ |
| 7. | Цианидин-3- | 0,98 | 727,20 | [M]$^+$ |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ксилозилрутинозид | | 581,11<br>287,05 | [M- рамноза]$^+$<br>[M-ксилозилрутиноза]$^+$ |
| 8. | Цианидин-3-самбубиозид | 1,04 | 581,11<br>287,05 | [M]$^+$<br>[M- самбубиоза]$^+$ |
| 9. | Цианидин-3-глюкозид | 1,11 | 449,10<br>287,05 | [M]$^+$<br>[M- глюкоза]$^+$ |
| 10. | Цианидин-3-рутинозид | 1,26 | 595,11<br>449,10<br>287,05 | [M]$^+$<br>[M- рамноза]$^+$<br>[M- рутиноза]$^+$ |
| Кизил обыкновенный | | | | |
| 1. | Дельфинидин-3-глюкозид | 1,54 | 465,10<br>303,05 | [M]$^+$<br>[M - глюкоза]$^+$ |
| 2. | Цианидин-3-галактозид | 1,72 | 449,11<br>287,05 | [M]$^+$<br>[M - галактоза]$^+$ |
| 3. | Цианидин-3-глюкозид | 2,07 | 449,10<br>287,05 | [M]$^+$<br>[M - глюкоза]$^+$ |
| 4. | Пеларгонидин-3-галактозид | 2,43 | 433,11<br>271,06 | [M]$^+$<br>[M - галактоза]$^+$ |
| 5. | Пеларгонидин-3-глюкозид | 2,89 | 433,11<br>271,06 | [M]$^+$<br>[M - глюкоза]$^+$ |

Оценка специфичности методики была проведена путем сравнения ВЭЖХ-хроматограмм исследуемых объектов с хроматограммами растворителей (вода очищенная, подвижная фаза А или подкисленный подвижной фазой А 70% водный этанол). Хроматограммы растворителей при аналитических длинах волн (λ=520 и 280 нм) не отличались от базовой линии и не содержали никаких пиков, кроме пика ввода.

Нами были определены параметры пригодности хроматографической системы (табл. 14). Из таблицы 14 следует, что эффективность колонки составила от 17389 до 64092 теоретических тарелок, селективность колонки для всех антоцианинов была ≥1,0, разрешение находилось в диапазоне от 0,07 до 8,23.

Таблица 14

Параметры разделения антоцианинов в объектах исследования в условиях градиентного элюирования, мертвый объем $t_0$=5,4 мин

| № | Антоцианин | $t_R$, мин. | k` | N | Asym | α | $R_s$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Черника обыкновенная | | | | | | | |
| 1. | Дельфинидин-3-галактозид | 11,2 | 1,07 | 17389 | 1,03 | 1,12 | 0,74 |
| 2. | Дельфинидин-3-глюкозид | 12,5 | 1,31 | 19628 | 1,01 | 1,18 | 1,57 |
| 3. | Цианидин-3-галактозид | 14,7 | 1,72 | 23264 | 0,98 | 1,01 | 0,12 |
| 4. | Дельфинидин-3-арабинозид | 14,9 | 1,76 | 27995 | 1,02 | 1,11 | 1,06 |
| 5. | Цианидин-3-глюкозид | 16,6 | 2,07 | 39687 | 0,99 | 1,04 | 0,55 |
| 6. | Петунидин-3-галактозид | 17,2 | 2,19 | 36247 | 1,01 | 1,10 | 0,95 |
| 7. | Цианидин-3-арабинозид | 19,0 | 2,52 | 41782 | 1,02 | 1,00 | 0,07 |
| 8. | Петунидин-3-глюкозид | 19,1 | 2,54 | 39924 | 0,99 | 1,06 | 2,00 |
| 9. | Дельфинидин-3-ксилозид | 20,3 | 2,76 | 35389 | 0,99 | 1,06 | 1,44 |
| 10. | Пеонидин-3-галактозид | 21,6 | 3,00 | 44981 | 1,00 | 1,03 | 0,30 |
| 11. | Петунидин-3-арабинозид | 21,9 | 3,06 | 40355 | 1,00 | 1,09 | 2,00 |
| 12. | Мальвидин-3-галактозид | 23,8 | 3,41 | 44895 | 1,02 | 1,00 | 0,10 |
| 13. | Пеонидин-3-глюкозид | 23,9 | 3,43 | 47418 | 1,01 | 1,05 | 1,41 |
| 14. | Цианидин-3-ксилозид | 25,1 | 3,65 | 50038 | 0,99 | 1,02 | 0,57 |
| 15. | Мальвидин-3-глюкозид | 25,7 | 3,76 | 51590 | 1,07 | 1,02 | 0,29 |
| 16. | Пеонидин-3-арабинозид | 26,1 | 3,83 | 51024 | 1,03 | 1,06 | 1,60 |
| 17. | Петунидин-3-ксилозид | 27,7 | 4,13 | 58918 | 0,98 | 1,02 | 0,45 |
| 18. | Мальвидин-3-арабинозид | 28,2 | 4,22 | 61052 | 1,02 | 1,14 | 4,11 |
| 19. | Пеонидин-3-ксилозид | 32,1 | 4,94 | 63270 | 1,03 | | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | 1,05 | 3,75 |
| 20. | Мальвидин-3-ксилозид | 33,6 | 5,22 | 64092 | 0,99 | | |
| Арония черноплодная | | | | | | | |
| 1. | Цианидин-3-галактозид | 15,3 | 1,83 | 30021 | 0,99 | 1,13 | 1,33 |
| 2. | Цианидин-3-глюкозид | 17,3 | 2,20 | 35971 | 0,98 | 1,13 | 1,53 |
| 3. | Цианидин-3-арабинозид | 19,6 | 2,63 | 46045 | 1,05 | 1,30 | 3,69 |
| 4. | Цианидин-3-ксилозид | 25,5 | 3,72 | 54733 | 1,02 | 1,23 | 5,04 |
| 5. | Цианидин | 31,3 | 4,80 | 62502 | 1,01 | | |
| Черная смородина | | | | | | | |
| 1. | Дельфинидин-3-глюкозид | 13,0 | 1,41 | 27571 | 1,01 | 1,08 | 0,61 |
| 2. | Дельфинидин-3-рутинозид | 14,1 | 1,61 | 29204 | 1,04 | 1,21 | 1,88 |
| 3. | Цианидин-3-глюкозид | 17,1 | 2,17 | 32775 | 0,99 | 1,09 | 0,77 |
| 4. | Цианидин-3-рутинозид | 18,6 | 2,44 | 44935 | 0,97 | 1,13 | 0,89 |
| 5. | Петунидин-3-рутинозид | 21,1 | 2,91 | 46792 | 1,02 | 1,10 | 1,00 |
| 6. | Пеларгонидин-3-рутинозид | 23,3 | 3,31 | 52087 | 1,01 | 1,10 | 1,12 |
| 7. | Пеонидин-3-рутинозид | 25,6 | 3,74 | 54021 | 1,03 | 1,56 | 8,23 |
| 8. | Дельфинидин-3-(кумароил)глюкозид | 40,0 | 6,41 | 58750 | 0,94 | 1,05 | 2,11 |
| 9. | Цианидин-3-(кумароил)глюкозид | 42,0 | 6,78 | 58599 | 0,95 | 1,01 | 0,71 |
| 10. | Петунидин-3-(кумароил)глюкозид | 42,6 | 6,89 | 55485 | 0,97 | | |
| Лимонник китайский | | | | | | | |
| 1. | Цианидин + 2 пентозы + гексоза | 8,5 | 0,57 | 20533 | 0,98 | 1,33 | 2,24 |
| 2. | Цианидин + 2 гексозы + пентоза | 11,3 | 1,09 | 29180 | 0,99 | 1,25 | 2,29 |
| 3. | Цианидин + 2 гексозы + рамноза | 14,1 | 1,61 | 35277 | 0,97 | 1,12 | 1,67 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4. | Цианидин-3-латирозид | 15,8 | 1,93 | 44401 | 1,00 | 1,04 | 0,56 |
| 5. | Цианидин-3-ксилозил-рутинозид | 16,5 | 2,06 | 47029 | 0,99 | 1,08 | 0,82 |
| 6. | Цианидин-3-рутинозид | 17,9 | 2,31 | 53080 | 1,01 | | |
| Калина обыкновенная | | | | | | | |
| 1. | Цианидин+2гексозы +пентоза | 8,2 | 0,52 | 19023 | 0,98 | 1,06 | 0,59 |
| 2. | Цианидин+2пентозы +гексоза | 8,7 | 0,61 | 21885 | 0,99 | 1,03 | 0,33 |
| 3. | Цианидин+2гексозы | 9,0 | 0,67 | 31191 | 1,03 | 1,04 | 0,53 |
| 4. | Цианидин+2пентозы +гексоза | 9,4 | 0,74 | 19139 | 1,01 | 1,05 | 0,56 |
| 5. | Цианидин-3-вицианозид | 9,9 | 0,83 | 54347 | 0,99 | 1,04 | 0,33 |
| 6. | Цианидин-3-латирозид | 10,3 | 0,91 | 13339 | 1,00 | 1,04 | 0,32 |
| 7. | Цианидин-3-ксилозилрутинозид | 10,7 | 0,98 | 24799 | 0,98 | 1,03 | 0,29 |
| 8. | Цианидин-3-самбубиозид | 11,0 | 1,04 | 39701 | 1,01 | 1,04 | 0,44 |
| 9. | Цианидин-3-глюкозид | 11,4 | 1,11 | 28150 | 0,99 | 1,07 | 0,48 |
| 10. | Цианидин-3-рутинозид | 12,2 | 1,26 | 20633 | 0,98 | | |
| Кизил обыкновенный | | | | | | | |
| 1. | Дельфинидин-3-глюкозид | 13,7 | 1,54 | 19469 | 0,99 | 1,07 | 1,18 |
| 2. | Цианидин-3-галактозид | 14,7 | 1,72 | 22896 | 0,95 | 1,13 | 2,11 |
| 3. | Цианидин-3-глюкозид | 16,6 | 2,07 | 27592 | 1,02 | 1,11 | 1,41 |
| 4. | Пеларгонидин-3-галактозид | 18,5 | 2,43 | 35917 | 0,97 | 1,14 | 1,56 |
| 5. | Пеларгонидин-3-глюкозид | 21,0 | 2,89 | 44989 | 1,03 | | |

Поскольку при отсутствии стандартов невозможно определить разницу в откликах пиков индивидуальных антоцианинов на хроматограмме, то принято считать, что у всех антоцианинов приблизительно одинаковые отклики. Относительное содержание расчитывают в % от 100% площадей

всех пиков антоцианинов на хроматограмме. Для антоцианинов, которые не удалось полностью разделить хроматографически, относительное содержание рассчитывалось по выделенным масс-ионам.

После установления профиля индивидуальных антоцианинов методом ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС для производственного и лабораторного контроля можно выполнять рутинный анализ методом ВЭЖХ-ДМД без МСД. Условия ВЭЖХ-ДМД: колонка Phenomenex Luna C18 250×4,6 mm 5 μ. Подвижная фаза: А – 4% водный раствор о-фосфорной кислоты (pH 2,10-2,15), В – ацетонитрил. Использование о-фосфорной кислоты в методике ВЭЖХ-ДМД не влияет на порядок выхода антоцианинов и обусловлено более высокой эффективностью разделения антоцианинов на ПФ, содержащих фосфорную кислоту. Линейный градиент: 0 мин - 10% В, 10 мин – 15% В, 15 мин – 20% В, 30 мин – 30% В, 40 мин – 40% В, 41-50 мин – 10% В. Общее время анализа 50 мин. Скорость потока растворителя 1,0 мл/мин. Температура колонки 40ºС, температура автосемплера 20ºС. Объем вводимой пробы 20 μл. ДМД при 520 нм и 280 нм. Спектры снимали в диапазоне от 200 до 700 нм. Примеры ВЭЖХ-ДМД хроматограмм антоцианинов черники, аронии, черной смородины, калины и лимонникапри λ=520 нм представлены в Приложении 2. Номера пиков на рисунках соответствуют номерам антоцианинов в таблице 15.

Нами были определены параметры пригодности хроматографической системы (табл. 15). Из таблицы 15 следует, что эффективность колонки составила от 10701 до 52111 теоретических тарелок, селективность колонки для всех антоцианинов была ≥1,0, разрешение находилось в диапазоне от 0,50 до 7,29.

Таблица 15

Параметры разделения антоцианинов в объектах исследования в условиях градиентного элюирования, мертвый объем $t_0$=2,7 мин

| № | Антоцианин | $t_R$, мин. | k` | N | Asym | α | $R_s$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Черника | | | | | | | |
| 1. | Дельфинидин-3-галактозид | 6,4 | 1,37 | 14942 | 0,94 | 1,11 | 0,87 |
| 2. | Дельфинидин-3-глюкозид | 7,1 | 1,63 | 17913 | 0,96 | 1,14 | 1,25 |
| 3. | Цианидин-3-галактозид | 8,1 | 2,00 | 18579 | 0,85 | 1,11 | 1,50 |
| 4. | Дельфинидин-3-арабинозид | | | | | | |
| 5. | Цианидин-3-глюкозид | 9,0 | 2,33 | 19728 | 0,99 | 1,03 | 0,67 |
| 6. | Петунидин-3-галактозид | 9,3 | 2,44 | 19361 | 1,02 | | |
| 7. | Цианидин-3-арабинозид | 10,1 | 2,74 | 25054 | 0,97 | 1,09 | 1,00 |
| 8. | Петунидин-3-глюкозид | | | | | | |
| 9. | Пеонидин-3-галактозид | 11,4 | 3,22 | 27471 | 1,20 | 1,13 | 1,30 |
| 10. | Петунидин-3-арабинозид | | | | | | |
| 11. | Мальвидин-3-галактозид | 12,4 | 3,59 | 29047 | 1,02 | 1,09 | 1,05 |
| 12. | Пеонидин-3-глюкозид | | | | | | |
| 13. | Мальвидин-3-глюкозид | 13,4 | 3,96 | 32145 | 1,03 | 1,08 | 0,87 |
| 14. | Мальвидин-3-арабинозид | 14,7 | 4,44 | 38376 | 1,02 | 1,10 | 1,24 |
| Арония | | | | | | | |
| 1. | Цианидин-3-галактозид | 8,1 | 2,00 | 16169 | 0,98 | 1,11 | 1,06 |
| 2. | Цианидин-3-глюкозид | 9,0 | 2,33 | 18261 | 1,03 | 1,12 | 1,10 |
| 3. | Цианидин-3-арабинозид | 10,1 | 2,74 | 28859 | 1,00 | 1,30 | 3,00 |
| 4. | Цианидин-3-ксилозид | 13,1 | 3,85 | 19661 | 1,02 | 1,22 | 3,63 |
| 5. | Цианидин | 16,0 | 4,93 | 49118 | 1,04 | | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Черная смородина | | | | | | | |
| 1. | Дельфинидин-3-глюкозид | 7,1 | 1,63 | 17166 | 0,98 | 1,08 | 0,60 |
| 2. | Дельфинидин-3-рутинозид | 7,7 | 1,85 | 17484 | 0,95 | 1,17 | 1,37 |
| 3. | Цианидин-3-глюкозид | 9,0 | 2,33 | 19550 | 0,99 | 1,09 | 1,00 |
| 4. | Цианидин-3-рутинозид | 9,8 | 2,63 | 20504 | 0,99 | 1,11 | 1,05 |
| 5. | Петунидин-3-рутинозид | 10,9 | 3,04 | 21503 | 1,02 | 1,09 | 1,25 |
| 6. | Пеларгонидин-3-рутинозид | 11,9 | 3,41 | 24895 | 1,01 | 1,10 | 1,71 |
| 7. | Пеонидин-3-рутинозид | 13,1 | 3,85 | 28515 | 0,98 | 1,39 | 7,29 |
| 8. | Дельфинидин-3-(кумароил)глюкозид | 18,2 | 5,74 | 36637 | 1,04 | 1,10 | 3,17 |
| 9. | Цианидин-3-(кумароил)глюкозид | 20,1 | 6,44 | 44402 | 0,98 | 1,08 | 2,91 |
| 10. | Петунидин-3-(кумароил)глюкозид | 21,7 | 7,04 | 52111 | 0,99 | | |
| Лимонник | | | | | | | |
| 1. | Цианидин + 2 пентозы + гексоза | 5,0 | 0,85 | 12992 | 1,01 | 1,32 | 3,56 |
| 2. | Цианидин + 2 гексозы + пентоза | 6,6 | 1,44 | 17051 | 1,02 | 1,21 | 1,87 |
| 3. | Цианидин + 2 гексозы + рамноза | 8,0 | 1,96 | 18836 | 1,12 | 1,09 | 1,08 |
| 4. | Цианидин-3-латирозид | 8,7 | 2,22 | 19337 | 0,97 | 1,03 | 0,50 |
| 5. | Цианидин-3-ксилозил-рутинозид | 9,0 | 2,33 | 19038 | 0,98 | 1,08 | 1,00 |
| 6. | Цианидин-3-рутинозид | 9,7 | 2,59 | 29960 | 1,00 | | |
| | Калина | | | | | | |
| 1. | Цианидин+2гексозы +пентоза | 6,1 | 1,44 | 10701 | 1,20 | 1,15 | 1,64 |
| 2. | Цианидин+2пентозы +гексоза | 7,0 | 1,80 | 13084 | 1,12 | | |
| 3. | Цианидин+2гексозы | | | | | | |
| 4. | Цианидин+2пентозы +гексоза | | | | | 1,07 | 1,03 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5. | Цианидин-3-вицианозид | 7,6 | 2,04 | 16186 | 0,92 | 1,07 | 1,14 |
| 6. | Цианидин-3-латирозид | 8,1 | 2,24 | 18538 | 1,11 | 1,07 | 0,63 |
| 7. | Цианидин-3-ксилозилрутинозид | 8,3 | 2,32 | 19882 | 0,94 | | |
| 8. | Цианидин-3-самбубиозид | | | | | 1,05 | 0,62 |
| 9. | Цианидин-3-глюкозид | 8,5 | 2,40 | 15362 | 0,99 | 1,06 | 1,04 |
| 10. | Цианидин-3-рутинозид | 9,0 | 2,60 | 14490 | 0,97 | | |
| Кизил обыкновенный | | | | | | | |
| 1. | Дельфинидин-3-глюкозид | 6,4 | 1,37 | 16054 | 1,01 | 1,16 | 1,05 |
| 2. | Цианидин-3-галактозид | 7,4 | 1,74 | 18809 | 0,92 | 1,21 | 1,13 |
| 3. | Цианидин-3-глюкозид | 8,3 | 2,07 | 19525 | 0,99 | 1,10 | 0,95 |
| 4. | Пеларгонидин-3-галактозид | 9,1 | 2,37 | 23317 | 0,95 | 1,11 | 1,19 |
| 5. | Пеларгонидин-3-глюкозид | 10,1 | 2,74 | 25184 | 0,98 | | |

Подобранные оптимальные условия экстракции и хроматографирования антоцианинов с помощью ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-MS и ВЭЖХ-ДМД позволили разработать специфические методики определения состава антоциановых пигментов в растительном сырье, продуктах его переработки.

**2.6. Методики определения сопутствующих полифенольных соединений в объектах исследования**

Суммарное содержание проантоцианидинов (ПАЦ) в пересчете на процианидин $B_2$ оценивали модифицированным методом Бейта-Смитта [5].

Суммарное содержание полифенольных соединений в пересчете на галловую кислоту (ГК) проводилось модифицированным методом Фолина-Чокальтеу [8].

Разработана оригинальная методика определения профиля флавоноидов и производных дигидроксикоричных кислотметодом ВЭЖХ-

ДМД-ESI-TOF-MS. Плоды экстрагировали 50% водным этанолом в отношении 1:5 (свежее и замороженное сырье) или 1:10 (высушенное сырье) на водяной бане с обратным холодильником при температуре 95°С в течение 1ч. Анализ проводили в следующих условиях: колонка ProteCol C18 HPH125 250×4,6 мм, 5 мкм, подвижная фаза А – 1% раствор муравьиной кислоты, В – ацетонитрил (0 мин 20% В, 40 мин 40% В, 41 мин 20% В, 60 мин 20% В). Температура колонки 30°С, скорость потока растворителя 0,5 мл/мин, объем вводимой пробы 10 мкл, длины волн детектора 360 нм, 330 м и 290 нм. Сканирование масс - в режиме регистрации положительных ионов в диапазоне m/z 100–1000. Рабочие параметры источника ионизации: напряжение на капилляре - 3,5 кВ, поток газа-осушителя (азот) – 9 л/мин, температура - 325°С, давление на распылителе – 0,27 МПа. Идентификацию флавоноидов и дигидроксикоричных кислот проводили по временам удерживания, УФ-спектрам и молекулярным массам по сравнению с коммерчески доступными стандартными образцами (табл. 4).

Антирадикальные свойства 70% водно-этанольных извлечений (см. раздел **2.4.4.**) оценивали в DPPH-тесте invitro и выражали в мг тролоксового эквивалента (ТЭ) на 100 г плодов [23].

### 2.7. Методика определения дибензоциклооктадиеновых лигнанов в плодах лимонника китайского и ЛП на его основе

Разработана оригинальная методика определения дибензоциклооктадиеновых лигнанов в плодах лимонника китайского методом ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС. Условия проведения анализа: колонка ProteCol C18 HPH125 250×4,6 мм, 5 μ; подвижная фаза: 0,1% раствор муравьиной кислоты (А), ацетонитрил (В); линейный градиент: 0 мин – 50% В, 50 мин - 95% В, 51-60 мин – 50% В; скорость потока растворителя 0,5 мл/мин, температура колонки 20ºС, температура автосемплера 20ºС, объем вводимой пробы 10 μл; детектирование при λ=254 нм и λ=235 нм. Спектры снимали в диапазоне от 190 до 400 нм. Параметры масс-спектрометрии: напряжение на капилляре - 3,5 кВ, поток газа-осушителя (азот) – 12 л/мин,

температура - 325°С, давление на распылителе – 0,27 МПа, сканирование масс – в режиме регистрации положительных ионов в диапазоне от 100 до 1500 m/z. В качестве стандарта использовали схизандрин (табл. 4).

*Пробоподготовка образцов*

Плоды лимонника предварительно измельчают (см. раздел **2.4.4.**). Точную навеску 3,0 г измельченных замороженных плодов лимонника и 1,0 г измельченных высушенных плодов лимонника помещают в круглодонную колбу на 100 мл, добавляют 80 мл 70% этанола и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 1 ч. Затем обрабатывают на УЗ бане при комнатной температуре в течение 5 мин, охлаждают до комнатной температуры, перемещают в мерную колбу на 100 мл, доводят 70% этанолом до метки. 1,5-2 мл извлечения помещают в центрифужную пробирку и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 10 мин.

# ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ И ПРОФИЛЯ АНТОЦИАНИНОВ В ОБЪЕКТАХ ИССЛЕДОВАНИЯ

## 3.1. Результаты анализа антоцианинов и сопутствующих полифенольных соединений в плодах черники обыкновенной и экстрактах на их основе

### 3.1.1. Суммарное содержание антоцианинов в плодах черники обыкновенной и экстрактах на их основе в пересчете на цианидин-3-глюкозид

По адаптированной методике проведен количественный анализ мономерных антоцианинов в 23 образцах плодов черники обыкновенной (ПЧО) и экстрактах черники (ЭЧ). Примесями к плодам черники, в первую очередь, могут быть другие плоды семейства Вересковые *Ericaceae* с аналогичным ареалом обитания, - голубика болотная (*Vaccinium uliginosum*), вороника черная (*Empetrum nigrum*), брусника обыкновенная (*Vaccinium vitis-idaea*), клюква болотная (*Vaccinium oxycoccus*).

Результаты исследований приведены в таблицах 16 и 17.

Как видно из таблицы 16, суммарное содержание АЦ в замороженных ПЧО, собранных в различных регионах России, варьирует от 0,376% до 0,807%, что сопоставимо с их содержанием в ПЧО, собранных в Украине. В финской чернике найдено наименьшее количество антоциановых пигментов – 0,332%. Высокое содержание АЦ в российской чернике (более 0,3%) по сравнению с черникой из других стран Европы, таких как Финляндия, Швеция, Норвегия, Черногория, Литва, Латвия и Белоруссия, отмечено также в литературе [28, 30].

В замороженных плодах коэффициент деградации не превышал 1,15, что свидетельствует о небольшом содержании – не более 13% полимерных и неферментативно окисленных пигментов.

Из таблицы 16 следует, что в гомологичных плодах семейства Вересковые обнаружено меньшее по сравнению с черникой количество АЦ.

Поэтому присутствие примесей гомологичных плодов в большинстве случаев ведет к занижению содержания АЦ в сырье.

Таблица 16

Содержание мономерных антоцианиновв плодах черники и примесных плодах

| № | Образец | Содержание,% |
|---|---|---|
| 1. | ПЧО замор., Карелия, 2011 г. | 0,420 |
| 2. | ПЧО замор., Карелия, 2012 г. | 0,376 |
| 3. | ПЧО замор., Карелия, 2013 г. | 0,486 |
| 4. | ПЧО замор., Мурманск | 0,807 |
| 5. | ПЧО замор., Финляндия | 0,332 |
| 6. | ПЧО замор., Харьковская обл., Украина | 0,381 |
| 7. | ПЧО замор., Львовская обл., Украина | 0,577 |
| 8. | ПЧО замор., Вологодская обл. | 0,577 |
| 9. | ПЧО высушенные, «ФитоФарм», Анапа | 0,150 |
| 10. | ПЧО высушенные, «Гемма Вит», Санкт-Петербург | 0,930 |
| 11. | ПЧО высушенные, «Азбука трав», Алтайский край | 0,124 |
| 12. | ПЧО высушенные, Московская обл. | 1,507 |
| 13. | Плоды голубики болотной замор., Карелия, 2013 г. | 0,268 |
| 14. | Плоды вороники черной замор., Карелия, 2012 г. | 0,389 |
| 15. | Плоды вороники черной замор., Карелия, 2013 г. | 0,232 |
| 16. | Плоды брусники обыкновенной замор., Карелия, 2013 г. | 0,095 |
| 17. | Плоды клюквы болотной замор., Карелия, 2013 г. | 0,045 |

В высушенных плодах черники содержание мономерных АЦ отличалось приблизительно в 12 раз – от 0,124% до 1,507%. При этом в образцах №9 и №11 коэффициенты деградации составили 1,62 и 1,57 соответственно, а в образцах №10 и №12 – 1,22 и 1,26 сооответственно. Таким образом, доля полимерных пигментов в образцах №9 и 11 (36-38%) в 2 и более раза выше, чем в образцах №10 и №12 (18-21%), что в первую очередь, обусловлено режимом сушки сырья. Для максимального сохранения мономерных антоцианинов для плодов черники следует применять щадящий температурный режим сушки (не более 40-50 ºС).

На основе результатов анализа суммарного содержания мономерных АЦ, полученных высокоспецифичным валидированным методом pH-

дифференциальной СФМ, при разработке проекта ФС «Плоды черники свежие» и «Плоды черники высушенные» в разделах «Числовые показатели» целесообразно установить нормативы содержания мономерных антоцианинов в пересчете на цианидин-3-глюкозид – не менее 0,2% и не менее 0,1% соответственно.

В сухих 25%-ных стандартизованных экстрактах черники, которые применяются для производства ЛП и БАД к пище, концентрация антоцианинов должна находиться в диапазоне 25,0-27,0% (методом pH-дифференциальной СФМ), что с учетом доли полимерных пигментов приближается к нормативам ЕР $8^{th}$ – 32,4-39,6% антоцианинов (методом прямой СФМ). Экстракты черники №1 и №2 по содержанию антоцианинов соответствуют спецификации производителя (табл.17).

Таблица 17

Содержание мономерных антоцианинов в экстрактах черники

| № | Образец | Содержание,% |
|---|---|---|
| 1. | Сухой ЭЧ, 25%антоцианинов, ЗАО «Натуральные Ингредиенты» | 25,21 |
| 2. | Сухой ЭЧ, 25%антоцианинов, ЗАО «Натуральные Ингредиенты» | 25,50 |
| 3. | ЭЧ (густой), ООО «Грумант» | 2,62 |
| 4. | Сухой ЭЧ, >1% антоцианинов, ООО «КиТ» | 6,05 |
| 5. | ЭЧ, 10% антоцианинов, «Natex» | 9,99 |
| 6. | ЭЧ, 10% антоцианинов, ООО «Натэк-Продукт» | 11,00 |

При использовании современных технологий получения высококонцентрированных (от 10 до 25% мономерных антоцианинов) сухих экстрактов коэффициент деградации составлял величину не более 1,16. То есть доля полимерных и неферментативно окисленных пигментов не превышает 86%, что практически не отличается от свежих и замороженных плодов.

Хотя экстракты черники с более низким содержанием АЦ (от 1 до10%) применяются при производства БАД к пище, следует иметь в виду, что при рекомендуемых дозировках они не обеспечивают поступления количеств мономерных АЦ, сопоставимых с количествами АЦ, проявлявших доказанную клиническую эффективность [43, 71, 72].

### 3.1.2. Профиль индивидуальных антоцианинов черники обыкновенной и экстрактов на ее основе

Методом ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС в плодах черники было обнаружено порядка 35 АЦ, из которых 20 - неацилированные АЦ, а остальные минорные 15 - ацилированные АЦ. Относительное содержание минорных ацилированных антоцианинов во всех образцах не превышает 1-2% от общего содержания пигментов.

20 неацилированных АЦ черники представляют собой 3-галактозиды, 3-глюкозиды, 3-арабинозиды и 3-ксилозиды дельфинидина, цианидина, петунидина, пеонидина и мальвидина (табл. 18). Диапазон естественных вариаций индивидуальных АЦ российской черники представлен в таблице 19. Плоды черники, собранные в Украине и Финляндии, по составу антоцианинов идентичны российским плодам, и по содержанию основных антоцианинов вписываются в установленный диапазон естественных вариаций для отечетсвенного сырья.

Из таблицы 18 видно, что основными и наиболее характеристическими АЦ плодов черники являются дельфинидин-3-галактозид (3,1-14,6%), дельфинидин-3-глюкозид (3,9-16,3%), цианидин-3-галактозид (2,8-10,6%), цианидин-3-глюкозид (7,8-16,2%), петунидин-3-галактозид (2,5-6,3%), цианидин-3-арабинозид (5,6-7,7%), петунидин-3-глюкозид (7,5-10,0%), мальвидин-3-галактозид (0,7-9,2%), пеонидин-3-глюкозид (2,6-10,4%) и мальвидин-3-глюкозид (8,6-29,4%).

Всвежих плодах преобладает цианидин-3-глюкозид (12,3-16,2%), в высушенных плодах – дельфинидин-3-глюкозид (15,8-16,3%) и мальвидин-3-глюкозид (8,6-29,4%).

Следовое количество свободных агликонов было обнаружено в образцах №9-12. В свежем и замороженном сырье свободные агликоны свидетельствуют о перезрелом состоянии плодов, ненадлежащих условиях хранения и транспортировки. В высушенном сырье и экстрактах допускается незначительное содержание агликонов, обычно не более 1%.

Профиль антоцианинов в образце №10 не соответствует профилю антоцианинов черники обыкновенной, но соответствует аронии черноплодной (табл. 13, 22). Таким образом, выявлена фальсификация ЛРС ПЧО высушенные другим ЛРС – плодами аронии черноплодной высушенными.

Антоциановый профиль голубики (табл. 18) идентичен антоциановому профилю черники. Однако при более низком суммарном содержании пигментов в голубике наблюдается выраженное преобладание мальвидин-3-глюкозида, а также преобладание 3-галактозидов над 3-глюкозидами дельфинидина (по литературным данным и неопубликованным данным авторов), цианидина и петунидина.

В качестве основных антоцианинов вороники черной были идентифицированы 3-галактозиды дельфинидина, цианидина, петунидина и мальвидина (табл. 18). В присутствии примеси вороники при незначительном изменении абсолютного содержания пигментов будет наблюдаться относительное увеличение доли 3-галактозидов вышеперечисленных антоцианидинов.

В присутствии примесных плодов брусники и клюквы при сниженном общем содержании пигментов в сырье будет завышена доля 3-галактозидов и 3-арабинозидов цианидина и пеонидина в случае клюквы и цианидина в случае брусники (табл. 18). 3-галактозид цианидина считается характеристическим антоцианином рода *Vaccinium* L. [82].

Таблица 18

Состав антоцианиновчерники и гомологичных плодов, %

| № | Образец | Dpd-3-gal | Dpd-3-glu | Cyd-3-gal | Dpd-3-ara | Cyd-3-glu | Ptd-3-gal | Cyd-3-ara | Ptd-3-glu | Dpd-3-xyl | Pnd-3-gal | Ptd-3-ara | Mvd-3-gal | Pnd-3-glu | Cyd-3-xyl | Mvd-3-glu | Pnd-3-ara | Ptd-3-xyl | Mvd-3-ara | Mvd-3-xyl |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | ПЧО замор., Карелия, 2011г. | 9,2 | 9,4 | 10,1 | 11,4 | 12,9 | 6,3 | 6,7 | 9,1 | <0,1 | 1,7 | 1,0 | 4,2 | 6,5 | 0,1 | 9,5 | 0,2 | <0,1 | 1,5 | <0,1 |
| 2. | ПЧО замор., Карелия, 2012г. | 8,8 | 14,4 | 8,6 | 5,8 | 12,3 | 4,6 | 6,6 | 10,0 | 0,2 | 2,1 | 1,5 | 4,9 | 5,0 | <0,1 | 10,8 | 0,7 | <0,1 | 2,3 | 0,1 |
| 3. | ПЧО замор., Карелия, 2013г. | 9,6 | 9,8 | 10,4 | 8,6 | 13,0 | 3,9 | 7,4 | 8,1 | <0,1 | 1,9 | 1,6 | 4,4 | 6,2 | <0,1 | 12,5 | 0,1 | <0,1 | 2,3 | <0,1 |
| 4. | ПЧО замор., Мурманск | 8,4 | 8,9 | 8,8 | 12,2 | 13,2 | 6,2 | 7,3 | 10,0 | <0,1 | 1,7 | 1,9 | 3,6 | 7,4 | <0,1 | 10,1 | <0,1 | <0,1 | 0,2 | <0,1 |
| 5. | ПЧО замор., Финляндия | 7,9 | 8,3 | 8,7 | 10,8 | 14,2 | 4,7 | 6,4 | 8,7 | <0,1 | 1,4 | 2,3 | 4,5 | 7,8 | <0,1 | 11,2 | 0,2 | <0,1 | 2,8 | <0,1 |
| 6. | ПЧО замор., Харьковская обл., Украина | 10,0 | 10,5 | 9,3 | 11,2 | 13,5 | 4,8 | 7,7 | 8,6 | <0,1 | 1,7 | 2,3 | 4,0 | 6,5 | <0,1 | 9,8 | <0,1 | <0,1 | 0,1 | <0,1 |
| 7. | ПЧО замор., Львовская обл.,Украина | 7,0 | 9,8 | 8,5 | 10,5 | 16,1 | 6,3 | 6,6 | 9,4 | <0,1 | 0,2 | 0,2 | 5,8 | 7,8 | <0,1 | 11,2 | 0,1 | <0,1 | 0,4 | <0,1 |
| 8. | ПЧО замор., Вологодская обл. | 3,1 | 3,9 | 6,9 | 8,1 | 16,2 | 5,1 | 5,6 | 8,7 | <0,1 | 1,8 | 1,9 | 9,2 | 10,4 | <0,1 | 15,7 | <0,1 | <0,1 | 3,1 | <0,1 |
| 9. | ПЧО высуш., «ФитоФарм» | 6,9 | 15,8 | 2,8 | 4,2 | 9,7 | 3,5 | 6,5 | 8,9 | 1,4 | 0,8 | 1,0 | 0,9 | 2,6 | 0,5 | 27,3 | - | 0,7 | 2,6 | 1,4 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10. | ПЧО высуш., «Гемма Вит» | - | - | 66,0 | - | 3,3 | - | 27,1 | - | - | - | - | - | - | 3,4 | - | - | - | - | - |
| 11. | ПЧО высуш., «Азбука трав» | 6,0 | 16,3 | 2,4 | 3,7 | 7,8 | 2,5 | 6,6 | 9,2 | 1,0 | 0,5 | 1,1 | 0,7 | 2,8 | 0,5 | 29,4 | - | 0,4 | 2,1 | 1,1 |
| 12. | ПЧО высуш., Московская область | 14,6 | 15,8 | 10,6 | 8,7 | 9,6 | 4,4 | 7,6 | 7,5 | <0,1 | 1,1 | 2,1 | 2,3 | 4,5 | 0,7 | 8,6 | - | <0,1 | 1,6 | 1,0 |
| 13. | Плоды голубики болотной замор., Карелия, 2013 г. | 6,9 | 15,0 | 7,2 | 4,9 | 7,2 | 10,3 | 2,6 | <0,1 | <0,1 | 2,4 | 0,8 | 5,5 | 2,8 | <0,1 | 28,8 | 0,3 | 0,5 | 3,9 | 0,9 |
| 14. | Плоды вороники черной замор., Карелия, 2012 г. | 19,4 | - | 25,3 | - | - | 10,3 | 4,9 | - | - | 8,8 | - | 26,9 | - | - | - | 1,9 | - | 2,5 | - |
| 15. | Плоды вороники черной замор., Карелия, 2013 г. | 23,9 | - | 25,9 | - | - | 10,5 | 4,7 | - | - | 8,0 | - | 22,5 | - | - | - | 2,0 | - | 2,5 | - |
| 16. | Плоды брусники обыкновенной замор., Карелия, 2013 г. | - | - | 72,3 | 9,4 | - | - | 17,5 | - | - | - | - | - | - | 0,8 | - | - | - | - | - |
| 17. | Плоды клюквы болотной замор., Карелия, 2013 г. | - | - | 18,8 | 2,0 | - | - | 19,5 | - | - | 31,4 | - | - | 5,7 | - | - | 21,0 | - | 1,1 | - |

Таблица 19

Диапазон естественных вариаций индивидуальных антоцианинов отечественной черники (%)

| Антоцианин | Dpd-3-gal | Dpd-3-glu | Cyd-3-gal | Dpd-3-ara | Cyd-3-glu | Ptd-3-gal | Cyd-3-ara | Ptd-3-glu | Dpd-3-xyl | Pnd-3-gal | Ptd-3-ara | Mvd-3-gal | Pnd-3-glu | Cyd-3-xyl | Mvd-3-glu | Pnd-3-ara | Ptd-3-xyl | Mvd-3-ara | Mvd-3-xyl |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Диапазон естественных вариаций по данным анализов | 3,1-14,6 | 3,9-16,3 | 2,4-10,6 | 3,7-12,2 | 7,8-16,2 | 2,5-6,3 | 5,6-7,7 | 7,5-10,0 | 0-1,4 | 0,5-2,1 | 1,0-2,3 | 0,7-9,2 | 2,6-10,4 | 0-0,7 | 8,6-29,4 | 0-0,7 | 0-0,7 | 0,2-3,1 | 0-1,4 |

Таблица 20

Состав основных антоцианинов экстрактов черники, %

| № | Образец | Dpd-3-gal | Dpd-3-glu | Cyd-3-gal | Dpd-3-ara | Cyd-3-glu | Ptd-3-gal | Cyd-3-ara | Ptd-3-glu | Dpd-3-xyl | Pnd-3-gal | Ptd-3-ara | Mvd-3-gal | Pnd-3-glu | Cyd-3-xyl | Mvd-3-glu | Pnd-3-ara | Ptd-3-xyl | Mvd-3-ara | Mvd-3-xyl |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | Сухой ЭЧ, 25% антоцианинов (из ПЧО, Карелия, 2011 г.) | 8,8 | 9,2 | 10,0 | 11,1 | 13,2 | 6,1 | 6,8 | 9,3 | 0,1 | 1,5 | 0,9 | 4,0 | 6,6 | 0,2 | 9,8 | 0,5 | <0,1 | 1,6 | <0,1 |
| 2. | Сухой ЭЧ, 25% антоцианинов, ЗАО «Натуральные Ингредиенты» | 11,0 | 12,1 | 9,5 | 7,6 | 11,0 | 4,6 | 5,7 | 8,6 | 0,7 | 2,5 | 1,4 | 4,0 | 7,7 | 0,5 | 8,7 | 0,4 | <0,1 | 3,8 | <0,1 |
| 3. | ЭЧ (густой), ООО «Грумант» | 8,6 | 9,4 | 8,0 | 4,9 | 11,4 | 3,9 | 4,3 | 6,0 | <0,1 | 1,2 | 1,6 | 4,2 | 5,9 | 0,3 | 6,3 | 0,2 | 0,2 | 1,4 | <0,1 |
| 4. | Сухой ЭЧ, ООО «КиТ» | 11,5 | 10,3 | 9,5 | 10,5 | 14,3 | 4,7 | 5,8 | 7,6 | <0,1 | 1,6 | 1,8 | 3,9 | 5,5 | 0,4 | 8,3 | 1,2 | <0,1 | 2,5 | 0,5 |
| 5. | ЭЧ, 10% антоцианинов, «Natex» | - | - | - | - | 40,8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6. | ЭЧ, 10% антоцианинов, ООО «Натэк-Продукт» | 12,1 | 12,8 | 10,3 | 9,1 | 12,1 | 4,1 | 4,8 | 11,3 | <0,1 | 2,0 | 2,3 | 4,4 | 3,5 | <0,1 | 8,3 | 0,2 | <0,1 | 1,8 | 0,6 |

Профиль антоцианинов сухих ЭЧ №1-4 и №6 соответствуют профилю антоцианинов черники обыкновенной (табл. 20). Состав АЦ экстракта черники №1 незначительно изменился по сравнению с исходным сырьем: обнаружено небольшое снижение содержания 3-галактозидов дельфинидина, цианидина, петунидина, пеонидина и мальвидина, и увеличение содержания мальвидин-3-глюкозида. В экстрактах черники №2 и №6, в отличие от замороженных плодов и остальных ЭЧ, преобладает дельфинидин-3-глюкозид (12,1% и 12,8% соответственно).

Согласно EP 8$^{th}$, в сухих стандартизованных ЭЧ содержание свободных агликонов в пересчете нацианидин хлорид не должно превышать 1%. В исследуемых образцах сухих экстрактов черники №2 и №6 агликоны не были обнаружены, в экстрактах №1, 4, 6 присутствовало следовое количество агликонов. В густом ЭЧ (№3) более 21% от общего содержания АЦ составляют свободные агликоны: дельфинидин 6,4%, цианидин 9,8%, петунидин 2,6%, пеонидин 0,8% и мальвидин 1,4%, что свидетельствует о нарушении технологического процесса концентрирования АЦ.

Образец №3 по составу АЦ не соответствует ПЧО (рис. 14).

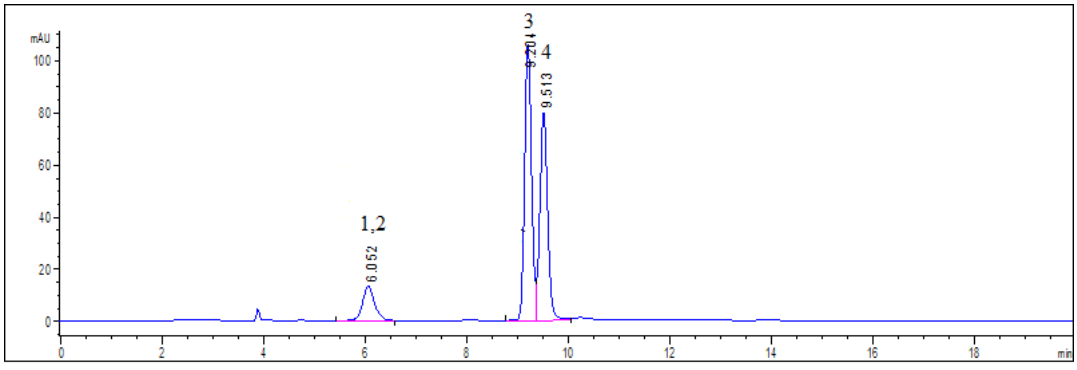



Рисунок 14. ВЭЖХ-ДМД хроматограмма экстракта черники №5 при λ=520 нм

В экстракте №3 обнаружены гликозиды цианидина (в порядке элюирования): 1 - цианидин-3-самбубиозид-5-глюкозид и 2 - цианидин-3,5-диглюкозид (10,5%), 3 - цианидин-3-самбубиозид (48,8%), 4 - цианидин-3-

глюкозид (40,8%), характерные для плодов бузины черной. Структуру соединений идентифицировали с помощью ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС, по временам удерживания и спектральным данным путем сравнения с плодами бузины черной.

Образец ПЧО №10 и ЭЧ №3 представляют собой наиболее распространенные случаи фальсификации сырья и экстрактов на основе ПЧО. Разработанные ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС и ВЭЖХ-ДМД методики, позволяют выявлять подобные случаи фальсификации как ЛРС, так и растительных экстрактов, ЛП и БАД к пище на растительной основе.

### 3.1.3. Результаты анализа сопутствующих полифенольных соединений плодов черники обыкновенной

В ПЧО были исследованы основные классы полифенольных соединений (ПФ), обуславливающие их противовоспалительные свойства и Р-витаминную активность: конденсированные танины – проантоцианидины (ПАЦ) и флавоноиды (флавонольные гликозиды). Определено общее содержание ПФ в пересчете на ГК, а также антирадикальные свойства в DPPH-тесте in vitro.

Сумма ПАЦ в пересчете на процианидин $B_2$ в замороженных ПЧО составила 0,823-1,198%. Наибольшее значение обнаружено в образце №8, наименьшее – в образце №5. В высушенных плодах содержание ПАЦ составило от 1,974% в образце №9 до 4,129% в образце №12.

Впервые определен профиль флавоноидов отечественной черники (табл. 21, рис 15). Флавоноиды в плодах черники представлены, главным образом, флавонолами и их гликозидами, суммарное содержание которых в свежих плодах черники составило от 0,019% (образец №6) до 0,036% (образец №3), в высушенных плодах – от 0,040% (образец №9) до 0,116% (образец №12). В качестве основных флавоноидов идентифицированы галактозид и глюкозид мирицетина, галактозид, глюкозид, арабинозид и глюкуронид кверцетина, глюкозиды метилированных флавонолов

ларицитрина и сирингетина, и также свободные агликоны мирицетин и кверцетин.

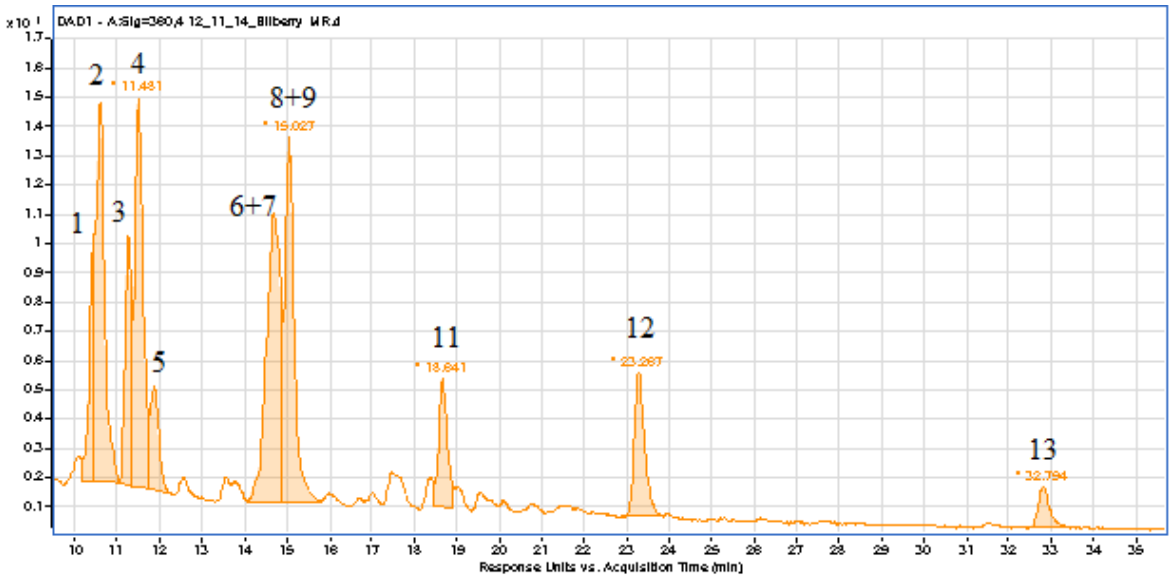



Рисунок 15. ВЭЖХ-ДМД флавонолов сушеных плодов черники, Московская обл.

В замороженных ПЧО преобладают гликозиды кверцетина и мирицетина. В высушенных ПЧО наблюдалась обратная тенденция – преобладание гликозидов сирингетина и ларицитрина при невысоком содержании гликозидов мирицетина и кверцетина. Гликозиды метилированных производных мирицетина – ларицитрина и сирингетина более стабильны и лучше сохраняются при высушивании ЛРС по сравнению с гликозидами гидроксилированных флавонолов – мирицетина и кверцетина. Количество свободных агликонов мирицетина и кверцетина в свежем сырье было 0,001-0,003%, в сушеном в 2 и более раза выше - 0,002-0,007%. В ПЧО основными классами ПФ являются АЦ и ПАЦ, тогда как флавоноидов накапливается существенно меньше.

В замороженных плодах суммарное содержание ПФ в пересчете на ГК составило от 0,752% (образец №5) до 1,097% (образец №4). В высушенных плодах данный показатель варьировал от 0,992% в образце №11 до 3,055% в образце №12.

Таблица 21.

Результаты ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС анализа флавоноидов черники

| № | Флавоноид | K’ | ESI-MS$^+$, m/z | Детектируемый ион |
|---|---|---|---|---|
| 1. | Неидентифицированный флавоноид | 1,49 | 481,22<br>319,11 | $[M+H]^+$<br>$[M - гексоза +H]^+$ |
| 2. | Неидентифицированный флавоноид | 1,52 | 511,12<br>349,06 | $[M+H]^+$<br>$[M - гексоза +H]^+$ |
| 3. | Мирицетин-3-галактозид | 1,67 | 481,12<br>319,06 | $[M+H]^+$<br>$[M - галактоза +H]^+$ |
| 4. | Мирицетин-3-глюкозид | 1,73 | 481,12<br>319,06 | $[M+H]^+$<br>$[M - глюкоза +H]^+$ |
| 5. | Неидентифицированный флавоноид | 1,81 | 481,20<br>349,06 | $[M+H]^+$<br>$[M - пентоза +H]^+$ |
| 6. | Гиперозид | 2,45 | 465,10<br>303,05 | $[M+H]^+$<br>$[M - галактоза +H]^+$ |
| 7. | Ларицитрин-3-глюкозид | 2,49 | 495,13<br>333,07 | $[M+H]^+$<br>$[M - глюкоза +H]^+$ |
| 8. | Изокверцитрин | 2,57 | 465,10<br>303,05 | $[M+H]^+$<br>$[M - глюкоза +H]^+$ |
| 9. | Кверцетин-3-глюкуронид | 2,61 | 479,11<br>303,05 | $[M+H]^+$<br>$[M–глюроновая к-та +H]^+$ |
| 10. | Авикулярин | 3,33 | 435,09<br>303,05 | $[M+H]^+$<br>$[M - арабиноза +H]^+$ |
| 11. | Сирингетин-3-глюкозид | 3,44 | 509,13<br>347,07 | $[M+H]^+$<br>$[M - глюкоза +H]^+$ |
| 12. | Мирицетин | 4,54 | 319,06 | $[M+H]^+$ |
| 13. | Кверцетин | 6,81 | 303,05 | $[M+H]^+$ |

Антирадикальная активность (АРА) замороженных ПЧО в DPPH-тесте invitro варьировала в диапазоне от 720 мг ТЭ/100 г в образце №5 до 1170 мг ТЭ/100 г в образце №4. Высушенные ПЧО №9 и №11 показали наименьшую АРА – 324 и 287 мг ТЭ/100г плодов соответственно, в то время как ПЧО №12 – наибольшую –1951 мг/100 г. Прослеживается прямая зависимость между содержанием АЦ, ПАЦ, общим количеством ПФ и антирадикальными свойствами ПЧ.

### 3.2. Результаты анализа антоцианинов и сопутствующих полифенольных соединений в плодах аронии черноплодной и продуктах на их основе

#### 3.2.1. Суммарное содержание антоцианинов в плодах аронии черноплодной и продуктах на их основев пересчете на цианидин-3-глюкозид

Общее содержание мономерных антоцианинов в свежих плодах аронии черноплодной (ПАЧ) составило 0,477-0,888% (табл. 22), а коэффициент деградации не превышал 1,19. Таким образом, в свежих ПАЧ более 84% пигментов приходится на мономерные антоцианины. По литературным данным в свежих ПАЧ, произрастающих в Европе и США, найдено от 0,150% до 1,480% АЦ [59, 88, 92]. В исследуемых образцах накопление АЦ в плодах аронии заметно увеличивалось с юга (Воронежская область) на север (Тверская область).

Таблица 22

Содержание мономерных антоцианинов в плодах аронии и продуктах на её основе

| № | Образец | Содержание,% |
|---|---|---|
| 1. | ПАЧ свежие, Воронежская область, 2012 г. | 0,569 |
| 2. | ПАЧ свежие, Воронежская область, 2013 г. | 0,477 |
| 3. | ПАЧ свежие, Тверская область | 0,888 |
| 4. | ПАЧ свежие, Московская область, Домодедовский район | 0,586 |
| 5. | Сок аронии черноплодной (из плодов №4) | 0,256 |
| 6. | Жом аронии черноплодной (из плодов №4) | 2,610 |
| 7. | ПАЧ высушенные, Московская область | 0,036 |
| 8. | ПАЧ высушенные, «Гемма Вит» (фальсификат черники) | 0,930 |
| 9. | Плоды ирги ольхолистной свежие, Тамбовская область | 0,162 |

На основе полученных данных в разделе «Числовые показатели» проектов ФС на свежие плоды аронии целесообразно установить норматив содержания мономерных антоцианинов не менее 0,3%.

В ЛП сок АЧ прямого отжима (образец №5), полученного в мягких условиях без нагревания сырья, также обнаружено высокое содержание АЦ – 0,256%, то есть из исходного сырья в сок перешло 43,7% пигментов. Полученные результаты сопоставимы с содержанием АЦ в соке АЧ коммерческого производства [53]. Коэффициент деградации в соке составил 1,14.

Оставшийся после получения сока жом аронии был подвергнут шоковой заморозке и последующему лиофильному высушиванию. Как видно из таблицы 22, данная технология позволяет сконцентрировать АЦ приблизительно в 5 раз по сравнению с исходным сырьем. Коэффициент деградации в жоме аронии составил 1,17, как и в свежем сырье. Таким образом, при лиофильном высушивании мономерные АЦ сохраняются в неизменном виде.

В высушенных ПАЧ количество пигментов отличалось в 26 раз, при этом в образце №7 коэффициент деградации составил 4,41, а в образце №8 – всего 1,22. Жесткий режим сушки ПАЧ №7 привел к деградации значительной части мономерных АЦ (77%), и, соответственно, изменению фармакологических свойств плодов. В то же время щадящий режим высушивания сырья при невысокой температуре (не более 40-50 ºС) позволяет сохранить значительное количество мономерных АЦ.

Примесью к ПАЧ могут быть плоды ирги ольхолистной *Amelanchier alnifolia*. Как и арония, ирга относится к подсемейству яблоневые *Maloideae* семейства розоцветные *Rosaceae*, и широко распространена в средней полосе России - Московской, Тверской, Калужской, Смоленской, Ивановской, Ярославской, Орловской областях. По содержанию антоциановых пигментов ирга значительно уступает аронии (табл. 22), поэтому наличие примесных плодов ирги способствует снижению общего количестсва АЦ в сырье.

### 3.2.2. Профиль индивидуальных антоцианинов аронии черноплодной и продуктов на её основе

Профиль антоцианинов аронии черноплодной представлен моногликозидами цианидина: 3-галактозидом, 3-глюкозидом, 3-арабинозидом и 3-ксилозидом (табл. 23). Определены границы природных вариаций отечественной аронии черноплодной (табл. 24).

Таблица 23

Состав антоцианинов аронии черноплодной и примесных плодах, %

| № | Образец | Цианидин-3-галактозид | Цианидин-3-глюкозид | Цианидин-3-арабинозид | Цианидин-3-ксилозид | Цианидин |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | ПАЧ свежие, Воронежская область, 2012 г. | 65,1 | 2,6 | 28,4 | 3,1 | - |
| 2. | ПАЧ свежие, Воронежская область, 2013 г. | 65,6 | 2,3 | 28,6 | 3,5 | - |
| 3. | ПАЧ свежие, Тверская область | 65,7 | 3,5 | 27,2 | 3,5 | - |
| 4. | ПАЧ свежие, Московская область, Домодедовский район | 64,6 | 3,8 | 26,9 | 4,6 | - |
| 5. | Сок аронии черноплодной (из плодов №4) | 64,6 | 3,2 | 29,1 | 4,0 | - |
| 6. | Жом аронии черноплодной (из плодов №4) | 66,1 | 4,0 | 25,7 | 4,1 | - |
| 7. | ПАЧ высушенные, Московская область | 69,0 | 2,5 | 23,4 | 5,0 | <0,1 |
| 8. | ПАЧ высушенные, «Гемма Вит» (фальсификат черники) | 66,0 | 3,3 | 27,1 | 3,4 | 0,1 |
| 9. | Плоды ирги ольхолистной свежие, Тамбовская область | 55,5 | 26,5 | 10,7 | 7,3 | - |

Как видно из таблицы 23, значительных различий в относительном содержании гликозидов цианидина в плодах аронии более северных широт (№3), средней (№4) и черноземной полосы России (№1 и 2) не обнаружено.

Относительное распределение антоцианинов, как и общее их количество, в шкурке и мякоти плода неодинаково, что отражается на примере плодов аронии №4 и продуктов их переработки. В соке плодов аронии №4 наблюдалось относительное увеличение доли цианидин-3-арабинозида при снижении долей минорных 3-глюкозида и 3-ксилозида цианидина по сравнению с исходным сырьем. В жоме аронии №4 содержание 3-галактозида и 3-глюкозида возросло, тогда как содержание 3-арабинозида и 3-ксилозида снизилось.

Таблица 24

Границы естественных вариаций индивидуальных антоцианинов аронии черноплодной, %

| Антоцианин | Цианидин-3-галактозид | Цианидин-3-глюкозид | Цианидин-3-арабинозид | Цианидин-3-ксилозид | Цианидин |
|---|---|---|---|---|---|
| Границы естественных вариаций по результатам анализов | 64,6-69,0 | 2,3-4,0 | 23,4-29,1 | 3,1-5,0 | 0-0,1 |

Антоцианиновый профиль плодов ирги ольхолистной идентичен антоцианиновому профилю аронии и представлен 3-галактозидом, 3-глюкозидом, 3-арабинозидом и 3-ксилозидом цианидина, относительное содержание которых убывает в порядке перечисления АЦ (табл. 24). В присутствии примесных плодов ирги ольхолистной будет наблюдаться увеличение доли цианидин-3-глюкозида в сырье.

### 3.2.3. Результаты анализа сопутствующих полифенольных соединений плодов аронии черноплодной

Антиоксидантная, гипотензивная, капилляропротекторная и некоторые другие виды фармакологической активности плодов аронии обусловлены присутствием различных групп ПФ. В плодах аронии были исследованы

основные группы ПФ: ПАЦ и флавоноидные гликозиды, а также определено общее содержание ПФ в пересчете на ГК (табл. 25).

Таблица 25

Содержание сопутствующих полифенольных соединений в плодах аронии, %

| № | Образец | Содержание ПАЦ в пересчете на процианидин $B_2$ | Содержание флавонолов и их гликозидов | Общее содержание ПФ в пересчете на ГК |
|---|---|---|---|---|
| 1. | ПАЧ свежие, Воронежская область, 2012 г. | 3,410 | 0,034 | 1,086 |
| 2. | ПАЧ свежие, Воронежская область, 2013 г. | 2,670 | 0,057 | 1,129 |
| 3. | ПАЧ свежие, Тверская область | 3,987 | 0,065 | 1,548 |
| 4. | ПАЧ свежие, Московская область, Домодедовский район | 2,566 | 0,042 | 0,878 |
| 5. | Сок АЧ (из плодов №4) | 2,042 | 0,031 | 0,673 |
| 6. | Жом АЧ (из плодов №4) | 12,491 | 0,467 | 4,193 |
| 7. | ПАЧ сушеные, Московская область | 2,033 | 0,064 | 2,427 |
| 8. | ПАЧ высушенные, «Гемма Вит» (фальсификат черники) | 4,281 | 0,177 | 3,107 |

В исследуемых образцах было найдено значительное количество ПАЦ. В свежих плодах обнаружено 2,566-3,987% ПАЦ. В высушенных плодах содержание ПАЦ практически не отличалось от свежих – 2,033-4,281%. В сок аронии из исходного сырья перешло 79,6% ПАЦ, следовательно, большая часть ПАЦ накапливается в мякоти плодов. В результате лиофильного высушивания жома аронии концентрация ПАЦ возросла в 6 раз.

Впервые определен профиль флавоноидов отечественных ПАЧ (рис. 16, табл. 26).

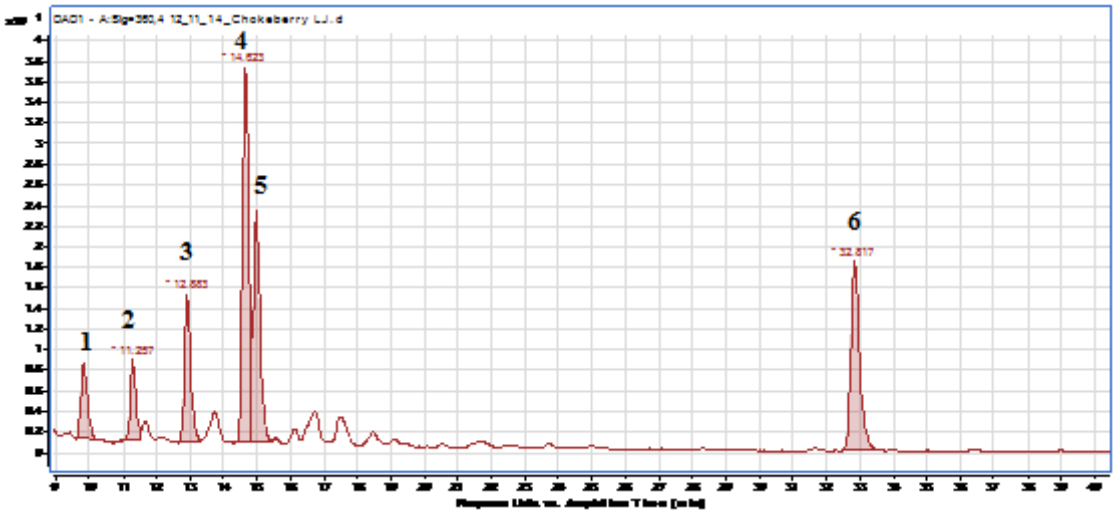



Рисунок 16. ВЭЖХ высушенных плодов аронии, «Гемма Вит» при λ=360 нм.

Флавонолы в плодах аронии представлены кверцетином и его гликозидами, суммарное содержание которых в свежем сырье составило 0,034-0,065%, в высушенном – 0,064-0,177% (табл. 25). В сок аронии из исходного сырья перешло 73,8% гликозидов кверцетина. В лиофильно высушенном жоме аронии обнаружено наибольшее количество флавоноидов – 0,467%. По сравнению с исходным сырьем содержание флавонолов в жоме возросло приблизительно в 5 раз.

Основными флавонолами в исследуемых образцах аронии были гиперозид, изокверцитрин и рутин. В свежих плодах кверцетин отсутствовал. В сушеных плодах №7 его содержание составило 0,006%, в высушенных плодах №8 – 0,032%.

Общее содержание ПФ в свежих ПАЧ составило 0,878-1,548%. В высушенных ПАЧ обнаружено в 2-3 раза более высокое содержание ПФ - 2,427-3,107%. В сок аронии из исходного сырьяперешло 76,7% ПФ. Концентрация ПФ в жоме возросла приблизительно в 5 раз по сравнению и исходным сырьем.

Таблица 26.

Результаты ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-MC анализа флавоноидов аронии

| № | Флавоноид | K’ | ESI-MS$^+$, m/z | Детектируемый ион |
|---|---|---|---|---|
| 1. | Кверцетин-3,5-диглюкозид | 1,34 | 627,20<br>303,05 | $[M+H]^+$<br>$[M–2$ глюкозы $+H]^+$ |
| 2. | Кверцетин-3-самбубиозид | 1,68 | 581,12<br>303,05 | $[M+H]^+$<br>$[M$ - самбубиоза $+H]^+$ |
| 3. | Рутин | 2,07 | 611,16<br>465,10<br>303,05 | $[M+H]^+$<br>$[M$ - рамноза $+H]^+$<br>$[M$ - рутиноза $+H]^+$ |
| 4. | Гиперозид | 2,47 | 465,10<br>303,05 | $[M+H]^+$<br>$[M–$галактоза $+H]^+$ |
| 5. | Изокверцитрин | 2,57 | 465,10<br>303,05 | $[M+H]^+$<br>$[M$ - глюкоза $+H]^+$ |
| 13. | Кверцетин | 6,81 | 303,05 | $[M+H]^+$ |

АРА плодов аронии в DPPH-тесте варьировала от 790 мг ТЭ/100 г (образец №4) до 1203 мг ТЭ/100 г (образец №3). Содержание АЦ, ПАЦ, общих ПФ, и флавоноидов коррелирует с выраженностью антирадикальных свойств плодов аронии.

### 3.3. Результаты анализа антоцианинов и сопутствующих полифенольных соединений в плодах черной смородины и продуктах на их основе

#### 3.3.1. Сумммарное содержание антоцианинов в плодах черной смородины и продуктах на их основе в пересчете на цианидин-3-глюкозид

Общее содержание мономерных антоцианинов в свежих плодах черной смородины (ПЧС) составило 0,105-0,270% (табл. 27).

Различия в количестве пигментов в определенной степени зависят от размера плодов. АЦ накапливаются только в шкурке ПЧС, поэтому общая тенденция - чем меньше плод, тем больше в нем пигментов.

Данная тенденция наблюдалась в исследуемых образцах. Масса ягод №19, №16 и №8 была наибольшей среди исследуемых образцов – 3,0-4,3 г, а содержание АЦ самое низкое - 0,105-0,123%. В наиболее мелких ягодах №21,

№17, №11 (0,9-1,2 г) количество АЦ было в среднем в два раза выше – 0,190-0,250%. Вариации содержания пигментов в остальных образцах в большей степени обусловлены сортовыми особенностями.

Таблица 27

Содержание мономерных антоцианинов в плодах черной смородины

| № | Образец | Содержание,% |
|---|---|---|
| 1. | ПЧС замороженные, сорт «Лентяй» | 0,126 |
| 2. | ПЧС замороженные, сорт «Пигмей» | 0,138 |
| 3. | ПЧС замороженные, сорт «Велой» | 0,137 |
| 4. | ПЧС замороженные, сорт «Севчанка» | 0,202 |
| 5. | ПЧС замороженные, сорт «Алтайская поздняя» | 0,120 |
| 6. | ПЧС замороженные, сорт «Гулливер» | 0,136 |
| 7. | ПЧС замороженные, сорт «Изюмная» | 0,136 |
| 8. | ПЧС замороженные, сорт «Ксюша» | 0,116 |
| 9. | ПЧС замороженные, сорт «Шаровидная» | 0,270 |
| 10. | ПЧС замороженные, сорт «Геркулес» | 0,130 |
| 11. | ПЧС замороженные, сорт «Плотнокистная» | 0,190 |
| 12. | ПЧС замороженные, сорт «Ажурная» | 0,195 |
| 13. | ПЧС замороженные, сорт «Рита» | 0,254 |
| 14. | ПЧС замороженные, сорт «Софья» | 0,262 |
| 15. | ПЧС замороженные, сорт «Нара» | 0,200 |
| 16. | ПЧС замороженные, сорт «Былинная» | 0,123 |
| 17. | ПЧС замороженные, сорт «Зуша» | 0,205 |
| 18. | ПЧС замороженные, сорт «Деликатес» | 0,164 |
| 19. | ПЧС замороженные, сорт «Экзотика» | 0,105 |
| 20. | ПЧС замороженные, сорт «Лама» | 0,184 |
| 21. | ПЧС замороженные, Вологодская область | 0,250 |
| 22. | ПЧС свежие, Рязанская область | 0,184 |
| 23. | ПЧС свежие, Московская область, Домодедовский район | 0,196 |
| 24. | Сок черной смородины (из плодов №23) | 0,045 |
| 25. | Жом черной смородины (из плодов №23) | 2,121 |
| 26. | ПЧС высушенные, Московская область | 0,088 |

Коэффициенты деградации в свежем и замороженном сырье черной смородины варьировались в диапазоне 1,09-1,19, то есть мономерные антоцианины составляют 84-92% от общего количества пигментов.

В сок ЧС прямого отжима из исходного сырья перешло около 23% АЦ. Лиофильное высушивание жома ПЧС позволило сконцентрировать

антоциановые пигменты в 10 раз с меньшими по сравнению с аронией потерями. КД в жоме плодов черной смородины был таким же, как и в исходном сырье - 1,15, КД в соке черной смородины – 1,19. В целом продукты переработки плодов черной смородины содержали не более 16% полимерных и неферментативно окисленных пигментов

В высушенных ПЧС содержание мономерных АЦ было меньше, чем в свежих (табл. 27), а коэффициент деградации составил 1,86. По-видимому, был нарушен режим сушки сырья, в результате чего общее содержание антоцианинов снизилось. Доля полимерных пигментов в высушенном сырье черной смородины составила 46%, тогда как в свежем и замороенном сырье – всего 8-16%. С целью сохранения в плодах черной смородины лабильных веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, - антоцианинов, флавонолов, проантоцианидинов, аскорбиновой кислоты, необходимо применять щадящий режим сушки сырья при невысокой температуре (не более 40-50 ºС).

На основе полученных данных целесообразно в разделе «Числовые показатели» проектов ФС на плоды черники свежие установить норматив содержания антоцианинов не менее 0,07%.

Содержание мономерных антоцианинов в экстракте черной смородины (ЭЧС) №1 (табл. 28) соответствовало спецификации производителя (регламентируется от 19 до 21% АЦ). В экстракте черной смородины №2 обнаружено в 10 раз меньше пигментов. Коэффициенты деградации в сухих экстрактах черной смородины №1 и №2 составили 1,18 и 1,37 соответственно, то есть на мономерные формы антоцианинов приходилось 73-85% общего количества пигментов.

Таблица 28

Содержание мономерных антоцианинов в экстрактах на основе черной смородины

| № | Образец | Содержание, % |
|---|---|---|
| 1. | ЭЧС, 20% антоцианинов, «EUSA Colors» | 20,15 |
| 2. | ЭЧС, ООО «Натэк-продукт» | 2,20 |

### 3.3.2. Профиль индивидуальных антоцианинов черной смородины и продуктов на их основе

Основными антоцианинами отечественных ПЧС, как и ПЧС, заготовленных зарубежом, являются 3-глюкозиды и 3-рутинозиды дельфинидина и цианидина [24, 35, 89, 96]. Идентифицированы минорные АЦ: 3-рутинозиды петунидина и пеонидина, ацилированные п-кумаровой кислотой глюкозиды дельфинидина, цианидина и петунидина (табл. 29). Определены границы естественных вариаций индивидуальных АЦ отечественных ПЧС (табл. 30).

Относительное содержание 3-рутинозидов дельфинидина и цианидина было выше, чем 3-глюкозидов. По природе доминирующего АЦ ПЧС можно разделить на 3 группы. В первой группе (образцы №1-3, 12, 14-19, 22-26) основным АЦ является дельфинидин-3-рутинозид (37,0-52,0%). Во второй группе (образцы №4, 7-9, 11, 13, 21) преобладает цианидин-3-рутинозид (37,8-54,9%). Приблизительно одинаковое количество 3-рутинозидов дельфинидина и цианидина найдено в третьей группе ПЧС (образцы №5, 6 и 10). В высушенных ПЧС присутствовало следовое количество дельфинидина и цианидина. В соке ПЧС №23 содержалось несколько больше дельфинидин-3-рутинозида и минорных АЦ по сравнению и исходным сырьем. В жоме содержание 3-глюкозида и 3-рутинозида дельфинидина (13,0% и 52,0%) увеличилось еще больше по сравнению с исходным сырьем (10,5% и 44,1%).

Профиль индивидуальных АЦ ЭЧС №1 соответствует профилю индивидуальных АЦ ПЧС (табл. 31). Преобладание в образце цианидин-3-рутинозида (43,3%) позволяет отнести данный экстракт к продуктам переработки ПЧС, отнесенных нами ко второй группе.

Состав АЦ ЭЧС №2 не соответсвует ПЧС. Аналогично ЭЧ №5 в образце идентифицированы цианидин-3-самбубиозид-5-глюкозид, цианидин-3,5-диглюкозид, цианидин-3-самбубиозид и цианидин-3-глюкзид, характерные для бузины черной (рис. 14). Таким образом, выявлен случай фальсификации экстракта ПЧС экстрактом из плодов бузины черной.

Таблица 29

Состав антоцианинов черной смородины, %

| № | Образец | Дельфинидин-3-глюкозид | Дельфинидин-3-рутинозид | Цианидин-3-глюкозид | Цианидин-3-рутинозид | Петунидин-3-рутинозид | Пеларгонидин-3-рутинозид | Пеонидин-3-рутинозид | Дельфинидин-3-(кумароил)-глюкозид | Цианидин-3-(кумароил)-глюкозид | Петунидин-3-(кумароил)-глюкозид |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | ПЧС замор., сорт «Лентяй» | 11,7 | 42,8 | 6,3 | 37,6 | <0,1 | - | <0,1 | - | - | 1,6 |
| 2. | ПЧС замор., сорт «Пигмей» | 11,6 | 46,0 | 5,3 | 32,2 | 2,5 | <0,1 | 0,8 | - | - | 1,3 |
| 3. | ПЧС замор., сорт «Велой» | 15,8 | 39,6 | 9,2 | 33,4 | - | - | <0,1 | - | - | 1,9 |
| 4. | ПЧС замор., сорт «Севчанка» | 7,5 | 33,2 | 8,0 | 48,8 | <0,1 | - | <0,1 | - | - | 2,5 |
| 5. | ПЧС замор., сорт «Алтайская поздняя» | 10,4 | 39,0 | 6,7 | 38,1 | 2,5 | - | 1,2 | 0,1 | - | 1,9 |
| 6. | ПЧС замор., сорт «Гулливер» | 9,9 | 38,7 | 6,1 | 38,7 | 3,2 | <0,1 | 1,9 | - | - | 1,3 |
| 7. | ПЧС замор.,сорт «Изюмная» | 13,6 | 34,2 | 8,2 | 37,8 | 3,2 | 0,1 | 1,7 | - | - | 1,0 |
| 8. | ПЧС замор.,сорт «Ксюша» | 6,3 | 22,0 | 9,5 | 54,9 | 3,2 | 0,1 | 3,5 | - | - | 0,5 |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 9. | ПЧС замор., сорт «Шаровидная» | 5,5 | 21,1 | 11,1 | 54,3 | 3,1 | 0,1 | 1,6 | <0,1 | <0,1 | 3,0 |
| 10. | ПЧС замор., сорт «Геркулес» | 10,5 | 38,2 | 6,2 | 39,2 | 2,6 | 0,1 | 1,4 | 0,1 | <0,1 | 1,7 |
| 11. | ПЧС замор., сорт «Плотнокистная» | 11,5 | 34,2 | 10,0 | 38,8 | 2,5 | 0,1 | 0,9 | <0,1 | <0,1 | 2,0 |
| 12. | ПЧС замор., сорт «Ажурная» | 10,8 | 45,1 | 6,5 | 35,4 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | 2,0 |
| 13. | ПЧС замор., сорт «Рита» | 5,1 | 29,5 | 8,1 | 52,1 | 1,8 | <0,1 | 1,7 | 1,5 | <0,1 | <0,1 |
| 14. | ПЧС замор., сорт «Софья» | 7,1 | 47,6 | 4,5 | 38,6 | 1,2 | - | <0,1 | <0,1 | <0,1 | 0,8 |
| 15. | ПЧС замор., сорт «Нара» | 14,8 | 37,0 | 9,2 | 31,5 | 5,9 | - | 1,5 | - | - | 0,1 |
| 16. | ПЧС замор., сорт «Былинная» («Верность») | 13,3 | 42,8 | 7,2 | 33,2 | <0,1 | - | <0,1 | - | - | 3,4 |
| 17. | ПЧС замор., сорт «Зуша» | 6,9 | 44,1 | 3,7 | 33,2 | <0,1 | - | <0,1 | <0,1 | 4,1 | 7,9 |
| 18. | ПЧС замор., сорт «Деликатес» | 14,3 | 43,0 | 7,8 | 32,2 | <0,1 | - | <0,1 | <0,1 | <0,1 | 2,5 |
| 19. | ПЧС замор., сорт «Экзотика» | 7,6 | 45,0 | 4,7 | 34,0 | <0,1 | - | <0,1 | - | 2,7 | 5,7 |
| 20. | ПЧС замор., сорт «Лама» | 6,6 | 19,9 | 12,2 | 61,2 | - | - | <0,1 | - | - | <0,1 |
| 21. | ПЧС замор., Вологодская область | 8,1 | 38,5 | 5,3 | 47,4 | 0,3 | - | 0,2 | - | 0,1 | 0,1 |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 22. | ПЧС свежие, Рязанская область | 18,1 | 42,8 | 7,8 | 28,7 | 1,2 | - | 0,4 | <0,1 | 1,0 | <0,1 |
| 23. | ПЧС свежие, МО, Домодедовский район | 10,5 | 44,1 | 5,8 | 37,7 | 0,7 | 0,1 | 0,4 | - | 0,4 | 0,2 |
| 24. | Сок черной смородины (из плодов №23) | 10,1 | 46,6 | 5,1 | 34,0 | 1,3 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,8 | 0,3 |
| 25. | Жом черной смородины (из плодов №23) | 13,0 | 52,0 | 4,5 | 28,8 | 0,7 | <0,1 | <0,1 | - | 0,7 | <0,1 |
| 26. | ПЧС высушенные, Московская область | 6,9 | 51,0 | 2,1 | 37,5 | 0,6 | <0,1 | 0,3 | 0,6 | 0,8 | <0,1 |

Таблица 30

Границы естественных вариаций индивидуальных антоцианинов отечетственной черной смородины, %

| Антоцианин | Дельфинидин-3-глюкозид | Дельфинидин-3-рутинозид | Цианидин-3-глюкозид | Цианидин-3-рутинозид | Петунидин-3-рутинозид | Пеларгонидин-3-рутинозид | Пеонидин-3-рутинозид | Дельфинидин-3-(кумароил)глюкозид | Цианидин-3-(кумароил)-глюкозид | Петунидин-3-(кумароил)-глюкозид |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Границы естественных вариаций по результатам анализов | 5,1-18,1 | 19,9-46,6 | 2,1-12,2 | 28,7-61,2 | 0-5,9 | 0-0,6 | 0-3,5 | 0-1,5 | 0-4,1 | 0-7,9 |

Таблица 31

Состав антоцианинов экстрактов черной смородины, %

| № | Образец | Дельфинидин-3-глюкозид | Дельфинидин-3-рутинозид | Цианидин-3-глюкозид | Цианидин-3-рутинозид | Петунидин-3-рутинозид | Пеларгонидин-3-рутинозид | Пеонидин-3-рутинозид | Дельфинидин-3-(кумароил)глюкозид | Цианидин-3-(кумароил)глюкозид | Петунидин-3-(кумароил)глюкозид |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | ЭЧС, 20% антоцианинов, «EUSA Colors» | 12,5 | 35,5 | 7,9 | 43,3 | <0,1 | - | <0,1 | <0,1 | 0,3 | 0,5 |
| 2. | ЭЧС, ООО «Натэк-продукт» | - | - | 30,8 | - | - | - | - | - | - | - |

### 3.3.3. Результаты анализа сопутствующих полифенольных соединений плодов черной смородины и продуктов на их основе

Кроме антоциановых пигментов в плодах черной смородины были исследованы ПФ, обуславливающие Р-витаминную и противовоспалительную активность, - флавоноиды и ПАЦ, а также общее содержание полифенолов и антирадикальные свойства в DPPH-тесте invitro.

Суммарное содержание ПАЦ менялось в диапазоне от 0,421% в ПЧС №23 до 1,397% в ПЧС №22 (табл. 32). В сок ЧС из исходного сырья перешло 45,8% ПАЦ. В результате лиофильного высушивания жома ЧС содержание ПАЦ по сравнению с исходным сырьем увеличилось более, чем в 20 раз.

Таблица 32

Содержание сопутствующих полифенольных соединений в плодах аронии, %

| № | Образец | Содержание ПАЦ в пересчете на процианидин $B_2$ | Содержание флавонолов и их гликозидов | Общее содержание ПФ в пересчете на ГК |
|---|---|---|---|---|
| 21. | ПЧС замор., Вологодская область | 0,744 | 0,036 | 0,818 |
| 22. | ПЧС свежие, Рязанская область | 1,397 | 0,024 | 1,059 |
| 23. | ПЧС свежие, МО, Домодедовский р-н | 0,421 | 0,020 | 0,538 |
| 24. | Сок ЧС (из ЧС №23) | 0,193 | 0,013 | 0,162 |
| 25. | Жом ЧС (из ЧС №23) | 8,970 | 0,230 | 9,239 |
| 26. | ПЧС высушенные, Московская область | 0,792 | 0,083 | 1,800 |

Впервые определен профиль флавоноидов черной смородины. В ПЧС флавоноиды представлены флавонолами и их гликозидами. Идентифицированы 3-рутинозиды, 3-галактозиды и 3-глюкозиды мирицетина, кверцетина и кемпферола (рис. 17, табл. 33). В высушенных

плодах также обнаружены свободные агликоны мирицетин, кверцетин и кемпферол.

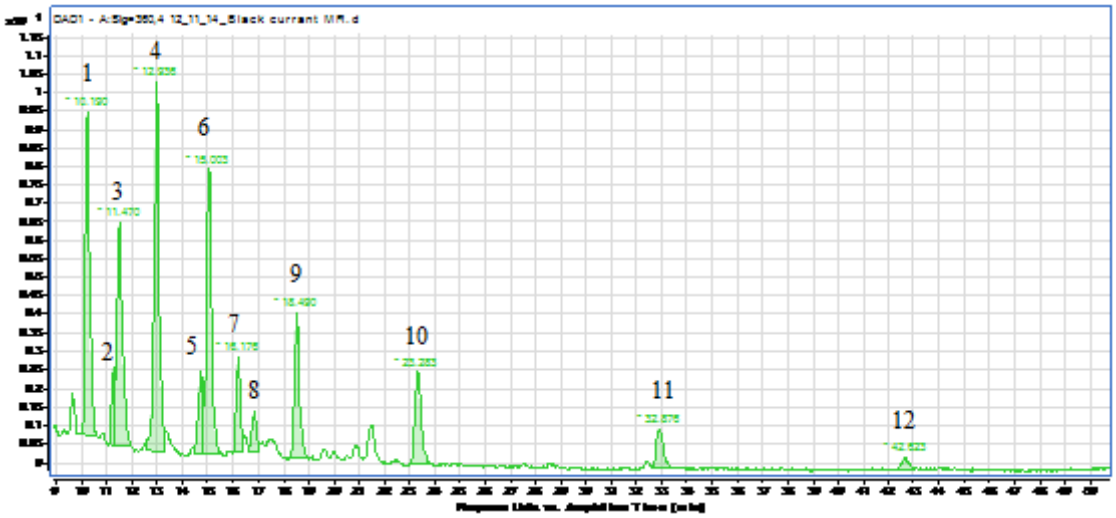



Рисунок 17. ВЭЖХ-ДМД флавоноидов высушеннлых плодов черной смородины при λ=360 нм.

Преобладание 3-галактозидов и 3-глюкозидов мирицетина и кверцетина отмечено в свежей и замороженной ЧС, 3-рутинозидов мирицетина и кверцетина – в высушенных плодах и жоме ЧС, следовательно, 3-рутинозиды флавонолов более стабильны, чем 3-галактозиды и 3-глюкозиды, и лучше сохраняются при технологической обработке и высушивании.

Общее содержание флавонолгликозидов в свежем сырье составило от 0,020% (образец №23) до 0,036% (образец №21). В высушеных плодах было обнаружено максимальное количество флавонолов и их гликозидов – 0,083%.

Суммарное содержание ПФ в пересчете на галловую кислоту в исследуемых образцах составило 0,421-1,059%. Наименьшее количество ПФ обнаружено в образце №23, наибольшее – в образце №22. Так как в сок ЧС из исходного сырья перешло всего 30,1% ПФ, вероятно, что большая часть различных ПФ накапливается в шкурке ПЧС. Концентрирование ПФ в жоме ПЧС в 17 раз по сравнению с исходным сырьем подтверждает наше предположение.

Таблица 33.

Результаты ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС анализа флавоноидов черники

| № | Флавоноид | K’ | ESI-MS$^+$, m/z | Детектируемый ион |
|---|---|---|---|---|
| 1. | Мирицетин-3-рутинозид | 1,55 | 627,20<br>481,12<br>319,06 | $[M+H]^+$<br>$[M - рамноза +H]^+$<br>$[M - рутиноза +H]^+$ |
| 2. | Мирицетин-3-галактозид | 1,67 | 481,12<br>319,06 | $[M+H]^+$<br>$[M - галактоза +H]^+$ |
| 3. | Мирицетин-3-глюкозид | 1,73 | 481,12<br>319,06 | $[M+H]^+$<br>$[M - глюкоза +H]^+$ |
| 4. | Рутин | 2,07 | 611,16<br>465,10<br>303,05 | $[M+H]^+$<br>$[M - рамноза +H]^+$<br>$[M - рутиноза +H]^+$ |
| 5. | Гиперозид | 2,45 | 465,10<br>303,05 | $[M+H]^+$<br>$[M - галактоза +H]^+$ |
| 6. | Изокверцитрин | 2,57 | 465,10<br>303,05 | $[M+H]^+$<br>$[M - глюкоза +H]^+$ |
| 7. | Кемпферол-3-рутинозид | 2,85 | 595,16<br>449,11<br>287,05 | $[M+H]^+$<br>$[M - рамноза +H]^+$<br>$[M - рутиноза +H]^+$ |
| 8. | Кемпферол-3-галактозид | 3,02 | 449,11<br>287,05 | $[M+H]^+$<br>$[M–галактоза +H]^+$ |
| 9. | Кемпферол-3-глюкозид | 3,39 | 449,11<br>287,05 | $[M+H]^+$<br>$[M–глюкоза +H]^+$ |
| 10. | Мирицетин | 4,54 | 319,06 | $[M+H]^+$ |
| 11. | Кверцетин | 6,81 | 303,05 | $[M+H]^+$ |
| 12. | Кемпферол | 9,12 | 287,05 | $[M+H]^+$ |

АРА исследованных образцов ПЧС варьировала от 424 мг ТЭ/100 г (ПЧС №22) до 920 мг/100 г ТЭ (ПЧС №21). Неоднозначная корреляция между группами сопутствующих ПФ и АРА in vitro обусловлена присутствием в ПЧС значительного по сравнению с другими объектами исследования количества аскорбиновой кислоты, являющейся мощным антиоксидантом и влияющей на результаты теста.

### 3.4. Результаты анализа антоцианинов и сопутствующих полифенольных соединений в плодах калины обыкновенной и продуктах их переработки

#### 3.4.1. Сумммарное содержание антоцианинов в плодах калины обыкновенной в пересчете на цианидин-3-глюкозид

Суммарное содержание АЦ в свежих и замороженных плодах калины обыкновенной (ПКО) составило 0,010-0,034% (табл. 34). Наибольшее количество АЦ обнаружено в калине №13, наименьшее в калине №6. Полученные результаты сопоставимы с литературными данными о содержании АЦ в ПКО, произрастающих в странах Европы и на Ближнем Востоке [29, 70, 86].

Таблица 34

Содержание мономерных антоцианинов в калине

| № | Образец | Содержание,% |
|---|---|---|
| 1. | ПКО замороженные К-1-13 | 0,031 |
| 2. | ПКО замороженные К-2-13 | 0,021 |
| 3. | ПКО замороженные К-3-13 | 0,013 |
| 4. | ПКО замороженные К-4-13 | 0,026 |
| 5. | ПКО замороженные К-5-13 | 0,011 |
| 6. | ПКО замороженные К-6-13 | 0,010 |
| 7. | ПКО замороженные К-7-13 | 0,018 |
| 8. | ПКО замороженные К-8-13 | 0,018 |
| 9. | ПКО замороженные, МО, Домодедовский район, 2013 г. | 0,024 |
| 10. | ПКО замороженные, МО, 2013 г. | 0,017 |
| 11. | ПКО замороженные, Тверская область, 2013 г. | 0,020 |
| 12. | ПКО свежие, МО, 2014 г. | 0,015 |
| 13. | ПКО замороженные, МО, Домодедовский район, 2014 г. | 0,034 |
| 14. | ПКО высушенные, «ХОРСТ» | 0,003 |

Коэффициенты деградации замороженных плодов калины находились в диапазоне 1,12-1,52, то есть мономерные антоцианины составляют 66-90% от общего содержания пигментов. На основе полученных результатов в НД на замороженные плоды калины обыкновенной целесообразно установить

норматив содержания мономерных антоцианинов не менее 0,01%. При высушивании плодов калины мономерные антоцианины практически не сохраняются.

### 3.4.2. Профиль индивидуальных антоцианинов калины обыкновенной

Важное идентификационное значение имеют данные по составу индивидуальных антоцианинов калины. Немногочисленные работы о составе АЦ ПКО противоречивы. Y. Sedat Velioglu и др. обнаружили цианидин-3-глюкозид и цианидин-3-рутинозид. M. Jordheim и соавторы методами ВЭЖХ-МС и ЯМР идентифицировали цианидин-3-глюкозид, цианидин-3-ксилозилрутинозид и цианидин-3-вицианозид. В других видах калины найдены цианидин-3-самбубиозид, цианидин-3-глюкозид, цианидин-3-галактозид и цианидин-3-латирозид [56, 99].

Нами впервые определен антоциановый профиль ПКО, произрастающей в средней полосе России (табл. 35). Установлены границы естественных вариаций индивидуальных антоцианинов отечественных ПКО (табл. 36). Всего ПКО содержали от 4 до 8 АЦ, представляющие собой гликозиды цианидина (табл. 13, 35). Пики 5, 6 и 8 с молекулярными ионами m/z 581 и фрагментами m/z 287 были идентифицированы как цианидин-3-вицианозид, цианидин-3-латирозид и цианидин-3-самбубиозид на основе молекулярных ионов, их осколков, по временам удерживания путем сравнения с растениями, содержащими цианидин-3-самбубиозид (бузина черная *Sambucus nigra*) и цианидин-3-латирозид (черная морковь *Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.), и литературных данных [48]. Пик 7 с молекулярным ионом m/z 727 и фрагментами m/z 581, 287 соответствует цианидин-3-ксилозилрутинозиду.

По составу АЦ образцы можно разделить на 3 группы. К первой группе относятся ПКО К-1-13, К-5-13, К-6-13, К-8-13, К-9-13, №11 и 12, ко второй – К-2-13, К-3-13 и высушенные ПКО (№14), к третьей – К-4-13, К-7-13, К-10-13 и №13. В ПКО первой группы в качестве основных АЦ

идентифицированы цианидин-3-вицианозид (17,2-41,5%), цианидин-3-глюкозид (33,9-77,6%) и цианидин-3-рутинозид (1,5-20,6%). Во второй группе преобладает цианидин-3-ксилозилрутинозид, относительное содержание которого составляет 94,6-96,5%. В третьей группе при идентичном составе АЦ в образцах К-4-13, К-10-13 и №13 основными являются цианидин-3-вицианозид, цианидин-3-ксилозилрутинозид и цианидин-3-глюкозид (21,0-22,0%, 25,4-32,7% и 24,5-30,8% соответственно), тогда как в образце №7 преобладает цианидин-3-ксилозилрутинозид (80,9%).

В более поздней работе Дейнека В.И. и соавторы также обнаружили отличия в составе антоцианинов ПКО, заготовленной в Белгороде и Киеве [5]. В половине исследованных авторами образцов калины основными антоцианинами были цианидин-3-вицианозид (26,1-52,4%), цианидин-3-глюкозид (21,2-68,1%) и цианидин-3-рутинозид (1,4-25,9%), как и в ПКО, отнесенных нами к первой группе.

В другой половине образцов калины обыкновенной наряду с 3-вицианозидом, 3-глюкозидом и 3-рутинозидом цианидина основными антоцианинами были 3-ксилозилрутинозид и 3-самбубиозид цианидина (4,4-25,8% и 38,3-80,5% соответственно). Прослеживается сходство состава АЦ с ПКО, отнесенными нами к третьей группе. Относительно высокое содержание цианидин-3-самбубиозида (до 80,5%) в Белгородских образцах ПКО позволяет нам по составу антоцианинов условно выделить их как четвертую группу ПКО.

Различный профиль АЦ в пределах растений одного вида может быть связан с сортовыми особенностями, условиями произрастания, степенью зрелости плодов во время сбора. Поскольку антоциановый профиль исследованных в данной работе ПКО, отличался независимо от региона произрастания и связанных с ним климатических условий, калину обыкновенную можно характеризовать как растение с высокой внутривидовой изменчивостью по отдельным группам БАВ, в том числе АЦ.

Таблица 35

Состав антоцианинов калины, %

| № | Образец | Цианидин + 2 гексозы + пентоза | Цианидин + 2 пентозы + гексоза | Цианидин + 2 гексозы | Цианидин + 2 пентозы + гексоза | Цианидин -3-вицианозид | Цианидин -3-латирозид | Цианидин -3-ксилозил-рутинозид | Цианидин -3-самбубиозид | Цианидин-3-глюкозид | Цианидин -3-рутинозид |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | ПКО заморож. К-1-13 | 0,5 | - | 1,6 | - | 33,6 | 2,3 | - | 2,8 | 38,6 | 20,6 |
| 2. | ПКО заморож. К-2-13 | 1,7 | 1,3 | 0,5 | 0,6 | - | - | 94,6 | - | 1,3 | - |
| 3. | ПКО заморож. К-3-13 | 1,5 | 1,8 | <0,1 | <0,1 | - | - | 95,7 | - | 1,0 | - |
| 4. | ПКО заморож. К-4-13 | 1,1 | 8,1 | 0,9 | 0,5 | 21,9 | - | 27,0 | - | 29,2 | 11,3 |
| 5. | ПКО заморож. К-5-13 | 1,2 | - | 1,2 | - | 36,5 | 2,8 | - | 3,8 | 37,9 | 16,6 |
| 6. | ПКО заморож. К-6-13 | 0,8 | - | 0,9 | - | 17,2 | 0,8 | - | 1,2 | 77,6 | 1,5 |
| 7. | ПКО заморож. К-7-13 | 1,3 | 1,9 | 0,3 | 0,2 | 6,6 | - | 80,9 | - | 6,7 | 2,0 |
| 8. | ПКО заморож. К-8-13 | 0,7 | - | 1,4 | - | 41,5 | 2,5 | - | 4,3 | 33,9 | 15,7 |
| 9. | ПКО заморож., Дом. р-он, 2013г. | 0,2 | - | 1,2 | - | 37,0 | 2,0 | - | 2,3 | 42,3 | 15,0 |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10. | ПКО заморож., МО, 2013 г. | 1,0 | 11,1 | 0,2 | 0,5 | 21,0 | - | 32,7 | - | 24,5 | 8,9 |
| 11. | ПКО заморож., Тверская обл., 2013 г. | <0,1 | - | 1,8 | - | 22,7 | - | - | 1,4 | 55,4 | 18,7 |
| 12. | ПКО свежие, МО, 2014 г. | - | - | 1,0 | - | 21,0 | - | - | 1,7 | 68,4 | 7,9 |
| 13. | ПКО заморож., Дом.р-он, 2014 г. | - | 8,1 | 1,3 | 0,6 | 22,0 | 0,2 | 25,4 | 2,6 | 30,8 | 9,0 |
| 14. | ПКО высушенные, «ХОРСТ» | 1,0 | 0,7 | <0,1 | <0,1 | - | - | 96,5 | - | 1,5 | - |

Таблица 36

Границы естественных вариаций антоцианинов калины, %

| Антоцианин | Цианидин + 2 гексозы + пентоза | Цианидин + 2 пентозы + гексоза | Цианидин + 2 гексозы | Цианидин + 2 пентозы + гексоза | Цианидин -3-вицианозид | Цианидин -3-латирозид | Цианидин -3-ксилозил-рутинозид | Цианидин -3-самбубиозид | Цианидин-3-глюкозид | Цианидин -3-рутинозид |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Границы естественных вариаций по результатам анализов | 0-1,7 | 0-11,1 | 0-1,8 | 0-0,6 | 6,6-41,5 | 0-2,8 | 25,5-96,5 | 1,2-4,3 | 1,0-77,6 | 1,5-20,6 |

### 3.4.3. Результаты анализа сопутствующих полифенольных соединений плодов калины обыкновенной

Содержание сопутствующих ПФ (ПАЦ, флавоноидов, дигидроксикоричных кислот), а также общего количества ПФ в исследуемых образцах ПКО представлено в табл. 37.

Таблица 37

Содержание сопутствующих полифенольных соединений в плодах калины, %

| № | Образец | Сумма ПАЦ в пересчете на процианидин $B_2$ | Сумма флавонол-гликозидов | Хлорогеновая кислота | Сумма ПФ в пересчете на ГК |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | ПКО заморож. К-1-13 | 0,399 | 0,026 | 0,580 | 0,719 |
| 2. | ПКО заморож. К-2-13 | 0,342 | 0,005 | 0,321 | 0,420 |
| 3. | ПКО заморож. К-3-13 | 0,262 | 0,008 | 0,422 | 0,491 |
| 4. | ПКО заморож. К-4-13 | 0,385 | 0,017 | 0,553 | 0,465 |
| 5. | ПКО заморож. К-5-13 | 0,201 | 0,005 | 0,301 | 0,403 |
| 6. | ПКО заморож. К-6-13 | 0,278 | 0,016 | 0,450 | 0,476 |
| 7. | ПКОзаморож. К-7-13 | 0,528 | 0,009 | 0,250 | 0,523 |
| 8. | ПКО заморож. К-8-13 | 0,348 | 0,006 | 0,392 | 0,502 |
| 9. | ПКО заморож., МО, Дом. р-н, 2013 г. | 0,344 | 0,017 | 0,524 | 0,586 |
| 10. | ПКО заморож., МО, 2013 г. | 0,344 | 0,010 | 0,530 | 0,564 |
| 11. | ПКО заморож., Тверская обл., 2013 г. | 0,458 | 0,007 | 0,575 | 0,733 |
| 12. | ПКОвысушен., «ХОРСТ» | 1,504 | 0,036 | 1,747 | 1,995 |

Содержание ПАЦ в калине составило 0,201-0,528%, что примерно эквивалентно содержанию их в клюкве болотной (0,409%) и голубике болотной (0,503%).

Нами впервые определен профиль флавоноидов КО, произрастающей в средней полосе России (табл. 38). Типичная ВЭЖХ-ДМД-хроматограмма флавоноидов калины представлена на рисунке 18.

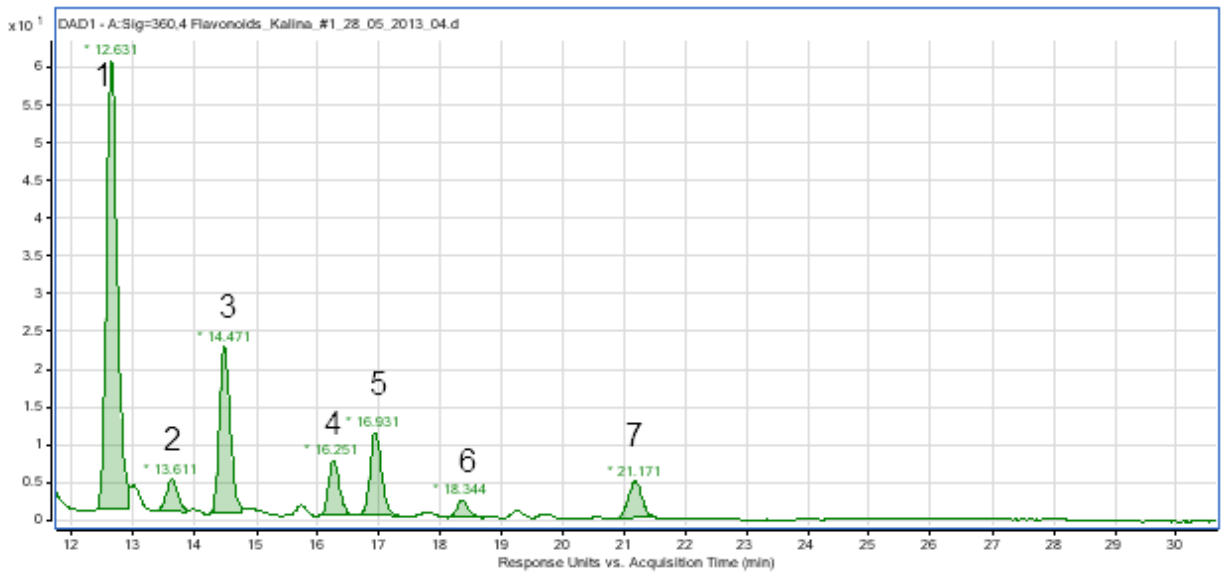



Рисунок 18. ВЭЖХ флавоноидов калины К-1-13 при λ=360 нм.

В отличие от АЦ, состав флавоноидов исследованных ПКО был идентичен, варьировалось только их содержание (табл. 39). В качестве основных флавоноидов идентифицированы кверцетин-3-вицианозид (1,9-14,2 мг/100 г или от 33 до 74% от общего содержания флавонолгликозидов), рутин (1,0-8,0 мг/100 г или от 20,0 до 28,9%). В образцах №6 и №8 показано относительно высокое содержание изорамнетин-3-самбубиозида (19,2% и 16,7% соответственно).

Суммарное содержание флавонолгликозидов в свежих ПКО варьировалось от 4,5 мг/100 г до 25,5 мг/100 г. В высушенных ПКО обнаружено наибольшее количество флавоноидов – 36,3 мг/100 г. В отличие от АЦ, флавоноиды при высушивании плодов калины сохраняются лучше.

Таблица 38.

Результаты ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-MC анализа флавоноидов калины

| № | Флавоноид | K’ | ESI-MS$^+$, m/z | Детектируемый ион |
|---|---|---|---|---|
| 1. | Кверцетин-3-вицианозид | 1,98 | 597,20<br>465,10<br>303,05 | $[M+H]^+$<br>$[M - арабиноза +H]^+$<br>$[M - вицианоза +H]^+$ |
| 2. | Кверцетин-3-самбубиозид | 2,21 | 597,20<br>465,10<br>303,05 | $[M+H]^+$<br>$[M - ксилоза +H]^+$<br>$[M - самбубиоза +H]^+$ |
| 3. | Рутин | 2,45 | 611,22<br>465,10<br>303,05 | $[M+H]^+$<br>$[M - рамноза +H]^+$<br>$[M - рутиноза +H]^+$ |
| 4. | Изорамнетин-3-самбубиозид | 2,90 | 611,20<br>479,15<br>317,05 | $[M+H]^+$<br>$[M - ксилоза +H]^+$<br>$[M - самбубиоза +H]^+$ |
| 5. | Изокверцитрин | 3,00 | 465,10<br>303,05 | $[M+H]^+$<br>$[M - глюкоза +H]^+$ |
| 6. | Изорамнетин-3-рутинозид | 3,36 | 625,24<br>479,15<br>317,05 | $[M+H]^+$<br>$[M - рамноза +H]^+$<br>$[M - рутиноза +H]^+$ |
| 7. | Кверцитрин | 3,88 | 449,11<br>303,05 | $[M+H]^+$<br>$[M - рамноза +H]^+$ |

Дигидроксикоричные кислоты в ПКО представлены изомерами кофеоилхинных кислот, более 96,2% от общего содержания которых приходится на хлорогеновую кислоту. В замороженных ПКО содержание хлорогеновой кислоты составило 0,250-0,580%. В высушенных ПКО было обнаружено наибольшее количество хлорогеновой кислоты 1,747%, что сопоставимо с литературными данными о количестве хлорогеновой кислоты в высушенном сырье калины [7]. Дигидроксикоричные кислоты наряду с ПАЦ являются основными группами ПФ калины.

Содержание ПФ варьировалось в диапазоне от 0,403 до 0,733% (табл. 33). В ПКОК-1-13 (Тамбовская обл.) и ПКО (Тверская обл.) показано наибольшее количество ПФ (0,733% и 0,719% соответственно), в ПКО К-5-13 – наименьшее (0,403%). По литературным данным в метанольных извлечениях различных ПКО обнаружено от 0,680 до 1,280% ПФ [16, 29, 86].

Таблица 39.

Содержание флавоноидов в плодах калины, мг/100 г

| Образец | Флавонолгликозид | | | | | | | Сумма флавонол-гликозидов |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| ПКО замор. К-1-13 | 12,3 | 0,7 | 5,2 | 2,1 | 3,4 | 0,3 | 1,0 | 25,5 |
| ПКО замор. К-2-13 | 2,0 | 0,2 | 1,0 | 0,3 | 0,5 | - | 1,0 | 5,0 |
| ПКО замор. К-3-13 | 3,7 | 0,3 | 2,0 | 0,9 | 0,4 | - | 0,4 | 7,8 |
| ПКО замор. К-4-13 | 7,2 | 1,3 | 4,1 | 1,0 | 2,3 | - | 1,1 | 17,0 |
| ПКО замор. К-5-13 | 2,1 | 0,1 | 1,3 | 0,7 | 0,1 | - | 0,2 | 4,5 |
| ПКО замор. К-6-13 | 10,0 | 0,6 | 1,1 | 3,0 | 0,5 | - | 0,4 | 15,6 |
| ПКОзамор. К-7-13 | 3,0 | 0,6 | 2,0 | 0,4 | 1,0 | - | 2,0 | 9,0 |
| ПКО замор. К-8-13 | 1,9 | 0,1 | 1,5 | 0,9 | 0,2 | - | 0,8 | 5,5 |
| ПКО замор., МО, Домодедовский р-н, 2013 г. | 8,4 | 0,4 | 4,8 | 1,0 | 1,5 | 0,6 | 0,5 | 17,2 |
| ПКО замор., МО, 2013 г. | 5,0 | 0,3 | 2,1 | 0,7 | 0,8 | 0,3 | 0,6 | 9,8 |
| ПКО замор., Тверская обл., 2013 г. | 3,8 | 0,2 | 0,9 | 0,5 | 0,9 | 0,1 | 0,3 | 6,7 |
| ПКО сушеные, «ХОРСТ» | 14,2 | 0,4 | 8,0 | 2,0 | 6,6 | 1,0 | 4,1 | 36,3 |

АРА ПКО в DPPH-тесте invitro варьировалась в диапазоне от 377,0 мг ТЭ/100 г (К-5-13) до 0,968 г ТЭ/100 г (ПКО, Тверская обл.). Прослеживается прямая зависимость АРА плодов калины от общего содержания и содержания отдельных групп ПФ.

### 3.5. Результаты анализа антоцианинов и лигнанов в плодах лимонника китайского и продуктов на его основе

#### 3.5.1. Суммарное содержание антоцианинов в плодах лимонника китайского и продуктах на его основе в пересчете на цианидин-3-глюкозид

Содержание мономерных АЦ в замороженных плодах лимонника китайского (ПЛК) составило 0,021% (табл. 40), что соответствует их содержанию в ПЛК, заготовленном в Китае, – 0,015-0,023% [63, 102]. В высушенных ПЛК содержание антоцианиновых пигментов варьировалось от 0,042% до 0,065%. Коэффициенты деградации в замороженном и высушенном сырье ПЛК составили 1,24 и 1,42-1,96 соответственно.

Таблица 40

Содержание мономерных антоцианинов в лимоннике

| № | Образец | Содержание,% |
|---|---|---|
| 1. | ПЛК замор., Московская обл. | 0,021 |
| 2. | ПЛК высушенные, Хабаровский край, 2012 г. | 0,058 |
| 3. | ПЛК высушенные, Хабаровский край, 2013 г. | 0,042 |
| 4. | ПЛК высушенные, Хабаровский край, 2014 г. | 0,065 |
| 5. | Настойка ПЛК (из плодов №2) | 0,011 |

В настойке ПЛК концентрация АЦ была 0,11 мг/мл или 0,055% в пересчете на сырьё (200 г плодов на 1 л 95% этанола), что соответствует 94,8% выходу АЦ из исходного сырья. Учитывая лабильность антоциановых пигментов, выход можно считать высоким.

### 3.5.2. Профиль индивидуальных антоцианинов лимонника китайского и продуктов на его основе

Нами впервые был определен профиль индивидуальных антоцианов отечественных ПЛК, произрастающих в Хабаровском крае и в Московской области (табл. 41). Установлены границы естественных вариаций индивидуальных антоцианинов лимонника (табл. 42).

Исследуемые образцы имели одинаковый профиль антоцианинов с выраженным преобладанием цианидин-3-ксилозилрутинозида (78,5-87,8% от общего содержания пигментов) и в замороженных, и в высушенных плодах. ПЛК, произрастающие в Китае, также в качестве основного АЦ содержат цианидин-3-ксилозилрутинозид (более 95% от общего содержания пигментов) [55]. Среди минорных АЦ в замороженном сырье преобладали неидентифицированные три-, дигликозиды и 3-латирозид цианидина, а содержание минорных 3-рутинозидов цианидина и пеларгонидина было низким. В высушенных ПЛК наблюдалась обратная картина: увеличение доли 3-рутинозидов цианидина и пеларгонидина на фоне снижения неидентифицированных три-, дигликозидов и 3-латирозида цианидина.

Таблица 41

Состав антоцианинов лимонника и ЛП на его основе, %

| № | Образец | Цианидин + 2 гексозы + пентоза | Цианидин + 2 гексозы | Цианидин + 2 пентозы + гексоза | Цианидин -3-латирозид | Цианидин -3-ксилозил-рутинозид | Цианидин -3-рутинозид | Пеларгонидин-3-рутинозид |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | ПЛК замор., Московская обл. | 2,6 | 2,8 | 3,3 | 2,6 | 86,5 | 1,3 | 0,5 |
| 2. | ПЛК высушенные, Хабаровский край, 2012 г. | 3,2 | 0,8 | 1,2 | 1,2 | 87,5 | 2,1 | 2,7 |
| 3. | ПЛК высушенные, Хабаровский край, 2013 г. | 9,2 | 0,6 | 1,5 | 1,3 | 78,5 | 2,3 | 3,3 |
| 4. | ПЛК высушенные, Хабаровский край, 2014 г. | 1,8 | 1,0 | 2,0 | 1,4 | 83,5 | 2,9 | 1,6 |
| 5. | Настойка ПЛК (из ПЛК №2) | 2,6 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 87,8 | 2,4 | 2,8 |

Таблица 42

Границы естественных вариаций антоцианинов лимонника и ЛП на его основе, %

| Антоцианин | Цианидин + 2 гексозы + пентоза | Цианидин + 2 гексозы | Цианидин + 2 пентозы + гексоза | Цианидин -3-латирозид | Цианидин -3-ксилозил-рутинозид | Цианидин -3-рутинозид | Пеларгонидин-3-рутинозид |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Границы естественных вариаций по результатам анализов | 1,8-9,2 | 0,5-2,8 | 1,0-3,3 | 1,2-2,6 | 78,5-87,8 | 1,3-2,9 | 0,5-3,3 |

### 3.5.3. Результаты анализа лигнанов в плодах лимонника китайского и продуктах на его основе

В плодах и настойке лимонника методом ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС также были изучены дибензоциклооктадиеновые лигнаны, во многом обуславливающие фармакологическую активность плодов и семян лимонника китайского и продуктов их переработки.

Во всех исследованных образцах было обнаружено более 30 лигнанов, многие из которых присутствуют в виде изомеров. Среди большого числа лигнанов выделяют 11 характеристических - схизандрин, гомизин J, гомизин A, ангелоилгомизин H, гомизин G, схизантерин A, схизантерин B, схизандрин A, γ-схизандрин, схизандрин B, схизандрин C, по содержанию которых фармакопейный вид *Schizandra chinensis* можно отличить от нефармакопейного вида *Schizandra shephanthera* (nan-wuweizi). Химические структуры 11 характеристических лигнанов и ангелоилгомизина O приведены на рисунке 19. Типичная ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-MS хроматограмма лигнанов плодов лимонника китайского представлена на рисунке 20.

Общее содержание лигнанов в замороженных ПЛК составило 0,552%, в сушеных ПЛК – 1,250-1,521% (табл. 43). В настойке ПЛК №2 обнаружено 1,456% лигнанов в пересчете на сырье. Таким образом, выход дибензоциклооктадиеновых лигнанов составляет 95,7%.

Среди 11 характеристических лигнанов сушеных ПЛК и настойки ПЛК преобладали схизандрин и схизандрин B (29,2-37,2% и 16,6-24,2% от общего содержания лигнанов). В свежих плодах преобладал ангелоилгомизин O (24,7%), тогда как содержание схизандрина и схизандрина B было более низким, чем в высушенных плодах (18,0 и 19,1% соответственно).

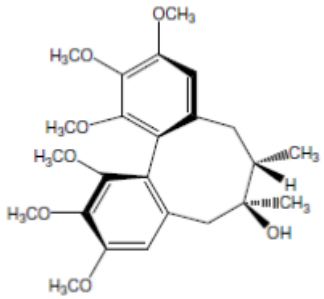
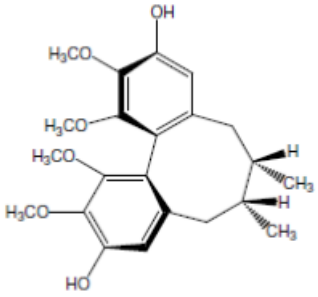
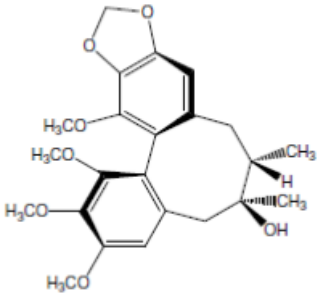
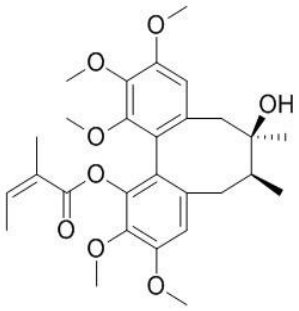
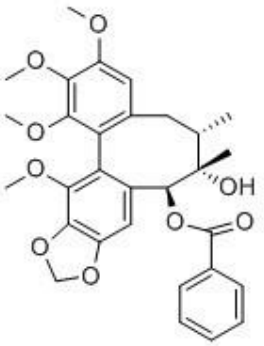
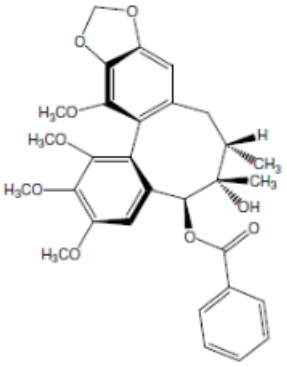
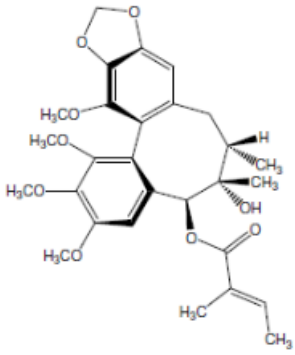
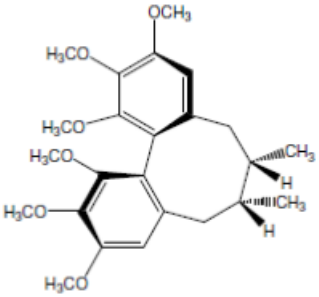
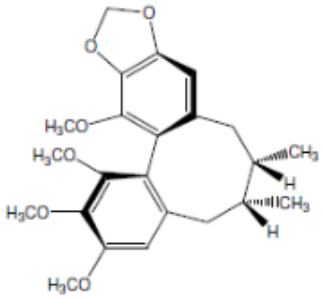
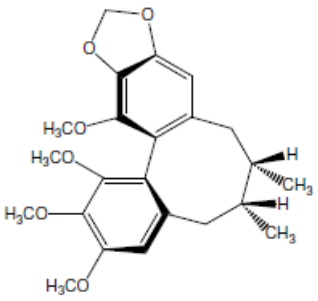
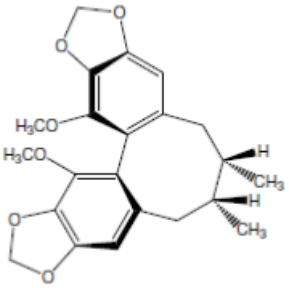
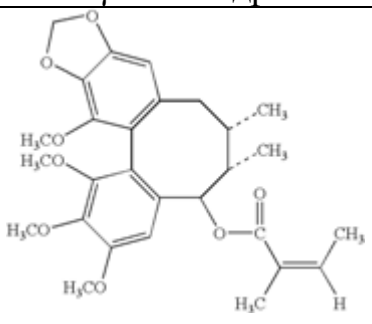
| | | |
|---|---|---|
|  |  |  |
| 1. Схизандрин | 2. Гомизин J | 3. Гомизин A |
|  |  |  |
| 4. Ангелоилгомизин H | 5. Гомизин G | 6. Схизантерин A |
|  |  |  |
| 7. Схизантерин B | 8. Схизандрин A | 9. γ-схизандрин |
|  |  |  |
| 10. Схизандрин B | 11. Схизандрин C | Ангелоилгомизин O |

Рисунок 19. Структуры основных характеристических лигнанов лимонника китайского

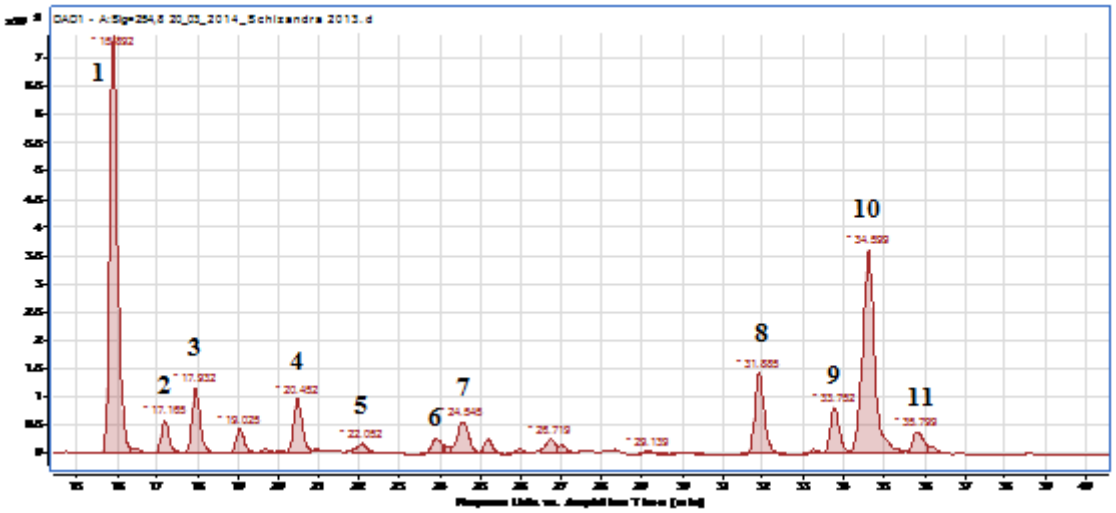



Рисунок 20. ВЭЖХ-ДМД дибензоциклооктадиеновых лигнанов плодов лимонника №3

Таблица 43

Содержание 11 характеристических дибензоциклооктадиеновых лигнанов в плодах лимонника китайского, мг/г, и в мг/мл (на сухое сырье) в настойке

| № | Лигнан | ПЛК замор., Московская область, 2013г. | ПЛК высуш., Хабаровский край, 2012 г. | ПЛК высуш., Хабаровский край, 2013г. | ПЛК высуш., Хабаровский край, 2014г. | Настойка ПЛК (из высуш. ПЛК №2) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | Схизандрин | 0,99 | 5,20 | 5,21 | 4,29 | 0,995 (4,98) |
| 2. | Гомизин J | 0,10 | 0,47 | 0,39 | 0,31 | 0,091 (0,46) |
| 3. | Гомизин A | 0,39 | 0,94 | 0,79 | 1,01 | 0,182 (0,91) |
| 4. | Ангелоилгомизин H | 0,31 | 0,79 | 0,71 | 0,67 | 0,153 (0,77) |
| 5. | Гомизин G | 0,23 | 0,17 | 0,14 | 0,17 | 0,030 (0,15) |
| 6. | Схизантерин A | 0,05 | 0,21 | 0,23 | 0,15 | 0,039 (0,20) |
| 7. | Схизантерин B | 0,18 | 0,55 | 0,54 | 0,41 | 0,106 (0,53) |
| 8. | Схизандрин A | 0,26 | 1,22 | 1,18 | 0,71 | 0,240 (1,20) |
| 9. | γ-схизандрин | 0,24 | 0,74 | 0,59 | 0,52 | 0,141 (0,71) |
| 10. | Схизандрин B | 1,05 | 2,75 | 0,54 | 3,03 | 0,540 (2,70) |
| 11. | Схизандрин C | 0,04 | 0,98 | 1,18 | 0,33 | 0,189 (0,95) |
| Сумма лигнанов* | | **5,52** | **15,21** | **15,03** | **12,50** | **2,91 (14,56)** |

*По сумме площадей всех пиков лигнанов в пересчете на схизандрин

### 3.6. Результаты анализа антоцианинов и сопутствующих полифенольных соединений в плодах кизила обыкновенного

#### 3.6.1. Сумммарное содержание антоцианинов в плодах кизила обыкновенного в пересчете на цианидин-3-глюкозид

Суммарное содержание мономерных антоцианинов в отечественных плодах кизила обыкновенного (ПКИЗО) составило от 0,010% до 0,092% (табл. 44). Наибольшее количество антоцианинов найдено в образце №8, наименьшее – в образце №10. Полученные результаты сопоставимы с данными литературы по содержанию АЦ в ПКИЗО из других регионов. Так, в плодах кизила, заготовленных в Словакии, содержание АЦ составило 0,029-0,111%, в Польше – 0,050%, в Турции – 0,065% [48, 83, 98].

Коэффициенты деградации замороженных плодов кизила составили 1,16-1,47. Таким образом, в замороженом сырье кизила обыкновенного мономерные формы антоцианинов составляют 70-86% от общего количества пигментов.

Таблица 44

Содержание мономерных антоцианинов в плодах кизила обыкновенного

| № | Образец | Содержание,% |
|---|---|---|
| 1. | ПКИЗО заморож., сорт «Азовский-1» | 0,024 |
| 2. | ПКИЗО заморож., сорт «Болгарский» | 0,031 |
| 3. | ПКИЗО заморож., сорт «Волгоградский грушевидный» | 0,028 |
| 4. | ПКИЗО заморож., сорт «Волгоградский» | 0,022 |
| 5. | ПКИЗО заморож., сорт «Крымский» | 0,016 |
| 6. | ПКИЗО заморож., сорт «Мовир» | 0,025 |
| 7. | ПКИЗО заморож., сорт «Мовир грушевидный» | 0,014 |
| 8. | ПКИЗО заморож., сорт «Находка» | 0,092 |
| 9. | ПКИЗО заморож. зрелые, Кавказ | 0,038 |
| 10. | ПКИЗО заморож. недозрелые, Кавказ | 0,011 |

### 3.6.2. Профиль индивидуальных антоцианинов кизила обыкновенного

В отечетсвенной литературе данные о составе антоцианинов кизила обыкновенного отсутствуют. В кизиле обыкновенном, собранном в США и Польше, были идентифицированы 3-галактозиды дельфинидина, цианидина и пеларгонидина [83, 98].

Впервые установлен профиль индивидуальных антоцианов отечественного кизила (табл. 45).

Таблица 45

Профиль индивидуальных антоцианинов кизила, %

| № | Образец | Дельфинидин-3-глюкозид | Цианидин-3-галактозид | Цианидин-3-глюкозид | Пеларгонидин-3-галактозид | Пеларгонидин-3-глюкозид |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | ПКИЗО замор., сорт «Азовский-1» | 0,5 | 19,0 | 1,1 | 75,6 | 3,7 |
| 2. | ПКИЗО замор., сорт «Болгарский» | 1,4 | 70,1 | 4,3 | 23,3 | 0,8 |
| 3. | ПКИЗО замор., сорт «Волгоградский грушевидный» | 0,9 | 29,3 | 5,7 | 57,4 | 6,6 |
| 4. | ПКИЗО замор., сорт «Волгоградский» | 0,4 | 20,6 | 1,2 | 75,2 | 2,6 |
| 5. | ПКИЗО замор., сорт «Крымский» | 1,1 | 39,5 | 1,3 | 56,6 | 1,4 |
| 6. | ПКИЗО замор., сорт «Мовир» | 1,6 | 47,9 | 2,3 | 46,7 | 1,5 |
| 7. | ПКИЗО замор., сорт «Мовир грушевидный» | 1,8 | 50,1 | 2,6 | 44,0 | 1,4 |
| 8. | ПКИЗО замор., сорт «Находка» | 1,0 | 48,5 | 2,0 | 47,5 | 0,9 |
| 9. | ПКИЗО замор. зрелые, Кавказ | 0,5 | 80,3 | 4,0 | 15,1 | 0,2 |
| 10. | ПКИЗО замор. недозрелые, Кавказ | 4,4 | 61,0 | 6,5 | 26,9 | 1,1 |

Установлены границы естественных вариаций индивидуальных антоцианинов кизила (табл. 46).

Таблица 46

Границы естественных вариаций индивидуальных антоцианинов плодов кизила, %

| Антоцианин | Дельфинидин-3-глюкозид | Цианидин-3-галактозид | Цианидин-3-глюкозид | Пеларгонидин-3-галактозид | Пеларгонидин-3-глюкозид |
|---|---|---|---|---|---|
| Границы естественных вариаций по результатам анализов | 0,4-4,4 | 19,0-80,3 | 1,1-6,5 | 15,1-75,6 | 0,2-6,6 |

В качестве основных АЦ в отечественных плодах кизила найдены 3-галактозиды цианидина и пеларгонидина. Минорные антоцианины идентифицированы как 3-глюкозиды дельфинидина, цианидина и пеларгонидина соответственно.

Состав АЦ во всех образцах идентичен, при этом варьируется только относительное содержание индивидуальных АЦ. В ПКИЗО № 1, 3-5 преобладает пеларгонидин-3-галактозид (56,6-75,6% от суммы антоцианинов), в ПКИЗО №2, 9 и 10 – цианидин-3-галактозид (61,0-80,3% от суммы антоцианинов), а в ПКИЗО №6-8 цианидин-3-галактозид и пеларгонидин-3-галактозид содержатся в отношении приблизительно 1:1 (табл. 45). Относительно высокое по сравнению с другими образцами содержание дельфинидин-3-глюкозида обнаружено в недозрелых ПКИЗО.

### 3.6.3. Анализ сопутствующих полифенольных соединений плодов кизила обыкновенного

Содержание сопутствующих ПФ кизила обыкновенного представлено в таблице 47. Содержание ПАЦ составило от 0,022% в недозрелых ПКИЗО до

0,080-0,430% - в зрелых ПКИЗО.Содержание ПФ варьировало в диапазоне от 0,150 до 0,398%. В ПКИЗО обнаружено незначительное количество производных гидроксикоричных кислот - 0,007-0,011% в пересчете на хлорогеновую кислоту.

Таблица 47

Содержание сопутствующих полифенольных соединений в плодах кизила, %

| № | Образец | Сумма ПАЦ в пересчете на процианидин $B_2$ | Сумма ПФ в пере-счете на ГК | АРА, мг ТЭ/100 г |
|---|---|---|---|---|
| 1. | ПКИЗО замор., сорт «Азовский-1» | 0,176 | 0,310 | 887 |
| 2. | ПКИЗО замор., сорт «Болгарский» | 0,089 | 0,310 | 866 |
| 3. | ПКИЗО замор., сорт «Волгоградский грушевидный» | 0,198 | 0,295 | 904 |
| 4. | ПКИЗО замор., сорт «Волгоградский» | 0,080 | 0,262 | 648 |
| 5. | ПКИЗО замор., сорт «Крымский» | 0,098 | 0,194 | 591 |
| 6. | ПКИЗО замор., сорт «Мовир» | 0,245 | 0,330 | 894 |
| 7. | ПКИЗО замор., сорт «Мовир грушевидный» | 0,102 | 0,150 | 470 |
| 8. | ПКИЗО замор., сорт «Находка» | 0,430 | 0,398 | 932 |
| 9. | ПКИЗО замор. зрелые, Кавказ | 0,092 | 0,230 | 910 |
| 10. | ПКИЗО замор. недозрелые, Кавказ | 0,022 | 0,183 | 512 |

В результате проведенных нами исследований показано, что АРА ПКИЗО в DPPH-тесте in vitro, варьировавшая в диапазоне от 470 до 932 мг ТЭ/100 г (табл. 43), примерно эквивалентна АРА клюквы (409 мг ТЭ/100 г), брусники (709 мг/100 г), черной смородины (424-920 мг ТЭ/ 100 г), черники (720-1170 мг ТЭ/100 г) и др. исследуемых объектов. Прослеживается прямая зависимость АРА ПКИЗО от общего содержания и содержания отдельных групп ПФ.

**Общие выводы:**

1) Адаптирован высокоспецифичный метод pH-дифференциальной спектрофотометрии для оценки интегрального содержания мономерных антоцианинов в лекарственном растительном сырье и продуктах его переработки. Показано, что pH-дифференциальный метод позволяет получить более достоверные данные о содержании мономерных антоцианинов в объектах исследования по сравнению с действующим фармакопейным методом EP 8$^{th}$. Предложено ввести взамен действующего прямого спектрофотометрического метода pH-дифференциальный метод в раздел «Количественное определение» проектов ФС и ФСП на ЛРС и стандартизованные экстракты на основе объектов исследования.

2) Разработаны специфические методики определения профиля индивидуальных антоцианиновв ЛРС, растительных экстрактах и лекарственных растительных препаратах методом ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-MS и ВЭЖХ-ДМД, позволяющие определить их на фоне сложного матрикса без длительной и трудоемкой очистки образцов.

3) С помощью разработанных методик изучено общее содержание и профиль индивидуальных антоцианинов в более чем 80 образцах лекарственного и перспективного пищевого растительного сырья и продуктов его переработки. Изученные границы природных вариаций содержания и состава антоциановых пигментов в отечественном ЛРС могут быть использованы при разработке разделов «Подлинность» и «Числовые показатели» проектов частных ФС на объекты исследования.

4) На основе разработанных методик предложен проект ОФС «Определение содержания и состава мономерных антоцианинов в лекарственном растительном сырье, растительных экстрактах и лекарственных растительных препаратах».

5) Изучено влияние гомологичных примесных плодов на содержание и состав антоцианинов в объектах исследования. Показано, что присутствие гомологичных примесных плодов ведет к снижению общего содержания и изменению профиля антоцианинов в сырье.

6) С помощью разработанных оригинальных методик выявлены случаи фальсификации ЛРС на основе плодов черники обыкновенной, смородины черной и экстрактов на их основе.

7) В объектах исследования изучен комплекс сопутствующих полифенольных соединений - проантоцианидины, флавоноиды, дигидроксикоричные кислоты, определено общее содержание полифенольных соединений.

8) Выявлена корреляция между содержанием антоцианинов, сопутствующих классов полифенольных соединений, общим содержанием полифенольных соединений и антирадикальной активностью объектов исследования в DPPH-тесте in vitro.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П., Харитонов Ю.Я. Валидация аналитических методов // Фармация. 2006. № 4. С. 8–12.

2. Береговых В.В., Пятигорская Н.В., Беляев В.В. и др. Валидация в производстве лекарственных средств. – М.: Издательский дом «Русский врач», 2010. – 286 с.

3. Государственная фармакопея XI СССР. Вып. 1, 2. М.: Медицина, 1987 (выпуск 1), 1989 (выпуск 2).

4. Дейнека Л.А., Блинова И.П., Чулков А.Н. и др. Метод экстракции и очистки антоцианинов из плодов аронии черноплодной // Научные Ведомости БелГУ. 2012. - №10 (129), вып. 18/2. С. 60-65.

5. Дейнека В.И., Чулков А.Н., Дейнека Л.А. и др. Определение антоцианов плодов некоторых видовкалины методом ВЭЖХ // Сорбционные и хроматографические процессы. 2014. - Т. 14., вып. 3. С. 434-442.

6. Лекарственные растения Государственной Фармакопеи. Фармакогнозия / Под редакцией проф. И.А. Самылиной, проф. В.А Северцева. – М.: АНМИ, 2003. - 534 с.

7. Медведев Ю.В. Исследование содержания фенолокислот в лекарственном и пищевом растительном сырье методом ВЭЖХ / дисс. канд. фарм. наук. Москва, 2010. – 144 с.

8. Методы анализа минорных биологически активных веществ пищи / Под редакцией акад. В.А.Тутельяна, проф. К.И. Эллера -М.: Династия, 2010. - 160 стр.

9. Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия: Учебник. М.: Медицина, 2002. 645 С.

10. Продукция соковая. Методы определения антоцианинов: МГС ГОСТ ИСО 32709-2014 Введ. 2016-01-01. М.: Стандартинформ, 2002. 2-6 с.

11. Продукция соковая. Методы определения антоцианинов: ГОСТ Р ИСО 53773-2010 Введ. 2011-01-01. М.: Стандартинформ, 2011. 4-8 с.

12. Редико Е.Э. Анализ и стандартизация полифенольного комплекса листьев и плодов черной смородины / дисс. канд. фарм. наук. – 15.00.02. Москва, 2009. – 133 с.

13. Рязанова Т.К. Фармакогностическое исследование плодов и побегов черники обыкновенной // Фундаментальные исследования. 2013.№ 8–5. С. 1136-1140.

14. Сергунова Е.В. Способ консервации и содержание биологически активных веществ в плодах и отварах черники // Фармация. 2013.№6. С. 21-24.

15. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений: ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Введ. 2002-11-01. М.: Изд-во стандартов, 2002. 2-6 с.

16. Altun M.L., Citoğlu G.S., Yilmaz B.S., et al. Antioxidant properties of *Viburnum opulus* and *Viburnum lantana* growing in Turkey // Int J Food Sci Nutr. 2008. Vol. 59. Iss.3. P.175-180.

17. AmericanHerbalPharmacopoeia. Монографии «Плодычерники» («Bilberryfruit») 2001 г., «Плодылимонника» («Schizandra berry») 1999 г. / Подред.. Roy Upton Herbalist.

18. AOAC. Official Method 2005.02 Total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines // Journal of AOAC International. 2005. Vol. 88.N 5. P. 1269.

19. Asgary S., Kelishadi R., Rafieian-Kopaei M., et al. Investigation of the lipid-modifying and antiinflammatory effects of *Cornus mas* L. supplementation on dyslipidemic children and adolescents //Pediatric cardiology. 2013. С. 1-7.

20. Bakowska-Barczak A.M., Marianchuk M., Kolodziejczyk P. Survey of bioactive conponents in Western Canadian berries // Can J. Physiol. Pharmac. 2007. Vol. 85. P. 1139-1152.

21. Bell D.R., Burt T.D. Phenolic acids contained in anthocyanin enriched extractsfrom elderberry, bilberry and chokeberry possess endotheliumdependent

and independent vasorelaxation properties in porcine coronaryarteries. Faseb J. 2007. Vol. 21. A366.

22. Bell D.R., Gochenaur K. Direct vasoactive and vasoprotective propertiesof anthocyanin-rich extracts // J Appl Physiol. 2006. Vol. 100. P. 1164–1170.

23. Bondet V., Brand-Williams W., Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• Free Radical Method // Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 1997. Vol. 30.P. 609–615.

24. Borges G., Degeneve A., Mullen W., etc.Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries // J. Agric. Food Chem. 2010. Vol. 58. P. 3901–3909.

25. Bratman S, Kroll D. The Natural Pharmacist: Clinical evaluation of medicinal herbs and other therapeuticnatural products. Roseville, CA: Prima Publishing, 1999. Bilberry.P. 1-5.

26. Bräunlich M., Slimestad R., Wangensteen H., et al. Extracts, anthocyanins and procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors // Nutrients. 2013. Vol.5. P. 663-678.

27. British Pharmacopoeia 2014 – British Pharmacopoeia Commission Secretariat, part of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. 2014.

28. Burdulis D., Ivanauskas L., Dirsė V., etc. Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*) fruits // Medicina (Kaunas). 2007. Vol. 43, Iss. 12. P.971-977.

29. Cesonienė L., Daubaras R., Viškelis P., et al. Determination of the total phenolic and anthocyanin contents and antimicrobial activity of *Viburnum opulus* fruit juice // Plant Foods Hum Nutr. 2012. Vol.67, Iss. 3. P. 256-261.

30. Dahlo E.S. Variation in chemical composition and genetic differentiation among bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) populations on a latitudinal gradient / Master of Science, Norwegian University of Science and Technology. 2011.

31. Dai J., Mumper R.J. Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties // Molecules. 2010. Vol. 15. P. 7313-7352.

32. Dandena A., Leimane I. Validation of monomeric anthocianin determinationmethod for bilberry juice and marc extracts // Foodbalt. 2011. P. 93-97.

33. Delgado-Vargas F., Jiménez A.R., Paredes-López O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains — characteristics, biosynthesis, processing, and stability // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2000. Vol. 40, Iss. 3. P. 173–289.

34. Desjardins J, Tanabe S, Bergeron C, et al. Anthocyanin-rich black currant extract and cyanidin-3-O-glucoside have cytoprotective and anti-inflammatory properties //J Med Food. 2012. Vol. 15, Iss. 12. P. 1045-1050.

35. Donno D., Cavanna M., Beccaro G.L., etc. Currants and strawberries as bioactive compound sources: determination of antioxidant profiles with HPLC-DAD/MS // Journal of Applied Botany and Food Quality.2013. Vol. 86.P.1 – 10.

36. Downey M.O., Rochfort S. Simultaneous separation by reversed-phase highperformance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin // Journal of Chromatography A 2008. Vol. 1201. P. 43-47.

37. Eandi M. Post-marketing investigation on Tegens' preparation with respect to side effects. 1987. Cited in Morazzoni P, Bombardelli E. *Vaccinium myrtillus L. /* Fitoterapia.1996. Vol. 67. P. 3-29.

38. Edirisinghe I, Banaszewski K, Cappozzo J, et al. Effect of black currant anthocyanins on the activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in vitro in human endothelial cells // J Agric Food Chem. 2011. Vol. 24, Iss. 59(16). P. 8616-8624.

39. EP 1318201 A1 Process for producing purified anthocyanin and crystalline anthocyanin, 2001.

40. European Pharmacopoeia 8$^{th}$ edition.

41. Ferrars R.M., Czank C., Zhang Q., et al. The pharmacokinetics of

anthocyanins and their metabolites in humans // British Journal of Pharmacology. 2014.Vol. 171, Iss. 13. P. 3268–3282.

42. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications / edited by Andersen Ø.M., Markham K.R. CRC Taylor & Francis Group. 2006. 1245 p.

43. Ghosh D., Konishi T. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function // Asia Pac J Clin Nutr. 2007. Vol. 16 N 2. P. 200-208.

44. Ghosh D., McGhie T.K., Zhang J., et al. Effects of anthocyanins and other phenolics of boysenberry and blackcurrant as inhibitors of oxidative stress and damage to cellular DNA in SH-SY5Y and HL-60 cells // Journal of the Science of Food and Agriculture.2006. Vol. 86, Iss. 5. P. 678-686.

45. Giusti M.M., Rodrıguez-Saona L.E., Griffin D., et al. Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization // J. Agric. Food Chem. 1999. Vol. 47. P. 4657-4664.

46. Giusti M.M., Wrolstad R.E. Unit F1.2.1-13. Anthocyanins characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In R. E. Wrolstad (Ed.) / *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: Wiley. 2001.

47. Goulas V., Vicente A.R., Manganaris G.A. Structural diversity of anthocyanins in fruits / Anthocyanins: structure, biosynthesis and health benefits. Nova Science Publishers Inc. 2012. P. 225-250.

48. Gunduz K., Saracoglu O., Ösgen M., et al. Antioxidant, physical and chemical characteristics of cornelian cherry fruits (*Cornus mas* L.) at different stages of ripeness // Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus. 2013. Vol. 12. N 4. P. 59-66.

49. Handbook of food analytical chemistry / edited by Wrolstad R.E., Acree T.E., Decker E.A., etc. 2005. P. 5-71.

50. Huyskens-Keil S., Eichholz I., Kroh L.W., etc. UV-B induced changes of phenol composition and antioxidant activity in black currant fruit (*Ribes nigrum L.*) // Journal of Applied Botany and Food Quality. 2007. Vol. 81. P. 140 - 144.

51. Jaakola L. Flavonoid biosynthesis in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) / Academic dissertation, Oulu, 2003.

52. Jakobek L., M. Šeruga, M. Medvidović-Kosanović et al. Antioxidant activity and polyphenols of *Aronia* in comparison to other berryspecies // Agriculturae Conspectus Scientifi cus. 2007. Vol. 72, N 4. P. 301-306.

53. Jakobek L., Šeruga M., Medvidovic-Kosanovic M., etc. Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices // Deutsche Lebensmittel-Rundschau. 2007. 103 Jahrgang, Heft 2.P. 58-64.

54. Jayaprakasam B. Olson L.K., Schutzki R.E., et al. Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry (*Cornus mas*) //Journal of agricultural and food chemistry. 2006. Vol. 54. N 1. P. 243-248.

55. Jo S.-H., Ha K.-S, Moon K.-S., et al. *In vitro* and *in vivo* anti-hyperglycemic effects of Omija (*Schizandra chinensis*) Fruit // *Int. J. Mol. Sci.* 2011. Vol.12. P. 1359-1370.

56. Jordheim M., Giske N.H., Andersen Ø.M. Anthocyanins in *Caprifoliaceae* // Biochemical Systematics and Ecology.2007. Vol.35. P. 153-159.

57. Knox Y.M., Hayashi K., Suzutani T., et al. Activity of anthocyanins from fruit extract of *Ribes nigrum* L. against influenza A and B viruses // Acta Virologica.2001. Vol. 45. P. 209-215.

58. Kokotkiewich A., Zbigniew J., Luczkiewich M. Aronia plants: A review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicines // Journal of Medicinal Food.2010. Vol. 13, N 2. P. 255-269.

59. Kulling S.E., Rawel H.M. Chokeberry *(Aronia melanocarpa)* – A review on the characteristic components and potential health effects // Planta Med. 2008. Vol. 74. P. 1625–1634.

60. Lala G., Malik M., Zhao C.W., et al. Anthocyanin-richextracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats // NutrCancer. 2006. Vol. 54. P. 84–93.

61. Lee J., Durst R.W., Wrolstad R.E., et al. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study // Journal of AOAC International. 2005. Vol. 88, N. 5. P. 1269-1278.

62. Lyall K.A., Hurst S.M., Cooney J.D., et al. Short-term blackcurrant extract consumption modulates exercise-induced oxidative stress and lipopolysaccharide-stimulatedinflammatory responses // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2009. Vol. 297. P. 70-81.

63. Ma C., Yang L., Yang F., etc. Content and color stability of anthocyanins isolated from *Schisandra chinensis* fruit // Int. J. Mol. Sci. 2012. Vol. 13. P. 14294-14310.

64. Malik M., Zhao C.W., Schoene N. et al. Anthocyanin-rich extract from *Aronia meloncarpa* E. induces a cell cycle block in colon cancer but not normal colonic cells. Nutr Cancer. 2003. Vol.46. P. 186–196.

65. Matsumoto H., Takenami E., Iwasaki-Kurashige K., et al. Effects of blackcurrant anthocyanin intake on peripheral muscle circulation during typing work in humans // European Journal of Applied Physiology. 2005. Vol. 94, N 1-2. P. 36-45.

66. Mertens-Talcott S.U., Rios J., Jilma-Stohlawetz P., et al.Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers // J Agric Food Chem. 2008. Vol. 10, N 56(17). P. 7796-7802.

67. Milbury P.E., Vita J.A., and Blumberg J.B. Anthocyanins are bioavailable in humans following an acute dose of cranberry juice // J Nutr. 2010/ Vol. 140, Iss. 6. P. 1099-1104.

68. Mirbadalzadeh R., Shirdel Z. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of *Cornus mas* extract in diabetic rats compared with glibenclamide// Elixir (Hormo. & Signal). 2012. N 47. P. 8969-8972.

69. Misyura M. High density stress response in plants and the role of anthocyanin biosynthesis under adverse environmental conditions. A Thesis. Guelph, Ontario, Canada, 2014.

70. Moldovan B., David L., Crisbora C., et al. Degradation kinetics of anthocyanins from European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit extracts.

Effects of temperature, pH and storage solvent //Molecules. 2012. Vol.17. P. 11655-11666.

71. Monograph. *Vaccinium myrthillus* (Bilberry) / Alternative Medicine Review. 2001. Vol. 6, N 5. P. 500-504.

72. Muth E.R., Laurent J.M., Jasper P. The effect of bilberry nutritional supplementation on night visual acuity and contrast sensitivity. *Altern Med Rev* 2000. Vol.5. P. 164-173.

73. Nair M.G., Jayaprakassam B., Olsom L.K., et al. Insulin secretion by anthocyanins and anthocyanidins: пат. 7737121 США. 2010.

74. Nakaishi H., Matsumoto H., Tominaga S., et al. Effects of black currant anthocyanoside intake on dark adaptation and VDT work induced transient refractive alteration in healthy humans // Alternative Medicine Reviews.2000. Vol. 5. P. 553-562.

75. Nakajima J.-I., Tanaka I., Seo S., etc. LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavengingactivity of anthocyanins in various berries // Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2004. Vol. 5. P. 241–247.

76. Nakamura Y., Matsumoto H., Todoki K.Endothelium-dependent vasorelaxation induced by black currant concentrate in rat thoracic aorta // The Japanese Journal of Pharmacology. 2002. Vol. 89, N. 1. P.29-35.

77. Naruszewicz M, Daniewski M, Laniewska I, et al. Effect of anthocyanins from chokeberry (*Aronia melanocarpa*) on blood pressure, inflammatory mediatorsand cell adhesion molecules in patients with a history of myocardialinfarction (MI) // Atherosclerosis Suppl. 2003. Vol. 4. P. 143.

78. Naruszewicz M, Laniewska I, Millo B, et al. Combinationtherapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruitsenhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients aftermyocardial infarction (MI) // Atherosclerosis. 2007. Vol. 194. P. 179–184.

79. Novotny J.A., Clevidence B.A., Kurilich A.C. Anthocyanin kinetics are dependent on anthocyanin structure // British Journal of Nutrition. 2012. Vol. 107. P. 504–509.

80. Paulovicsova B., Turianica I., Jurikova T., et al. Antioxidant properties of selected less common fruit species // Lucrări ştiinţifice Zootehnie şi Biotehnologii. Timişoara. 2009. Vol. 42, N 1. P. 608-614.

81. Onslow M.W. The anthocyanin pigments of plants. Second edition. Cambrige University Press, 2014. 294 p.

82. Pharmacopée Français French Pharmacopoeia 11th edition.

83. Pyrkosz-Biardzka K., Kucharska A.Z., Sokół-Łętowska A., et al. A comprehensive study on antioxidant properties of crude extracts from fruits of *Berberis vulgaris* L., *Cornus mas* L. and *Mahonia aquifolium* Nutt. // Pol. J. Food Nutr. Sci. 2014. Vol. 64. N 2. P. 6-17.

84. Qin Y., Xia M., Ma J., et al. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition ofcholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects // American Journal of Clinical Nutrition.2009. Vol. 90, No. 3. P. 485-492.

85. Quina F.H., Moreira J.P.F., Vautier-GiongoC., etc. Photochemistry of anthocyanins and their biological role in plant tissues // Pure Appl. Chem. 2009.Vol. 81, N. 9. P. 1687–1694.

86. Rop O., Reznicek V., Valsikova M., et al. Antioxidant properties of European cranberrybush fruit (*Viburnum opulus* var. *edule*) // Molecules. 2010. Vol. 15. P. 4467-4477.

87. Rugină D., Sconţa Z., Pintea A., et al. Protective effect of chokeberry anthocyanin-rich fraction at nanomolar concentrations against oxidative stress induced by high doses of glucose in pancreatic β-cells // Bulletin UASVM, Veterinary Medicine.2011. Vol. 68, Iss. 1. P. 313-319.

88. Sconţa Z.M. Extraction, purification, characterization and in vitro testing of anthocyanin rich fractions obtained from *Aronia melanocarpa* and *Vaccinium* sp. / Cluj-Napoca, 2012.

89. Stój A., MalikA., Targoński Z. Comparative analysis of anthocyanin composition of juices obtained from selected species of berry fruits // Pol. J. Food Nutr. Sci. 2006. Vol. 15, Iss. 56, N 4.P. 401–407.

90. Su Z. Anthocyanins and flavonoids of *Vaccinium* L. // Pharmaceutical Crops. 2012. Vol. 3. P. 7-37.

91. Sundalius N.M. Examination of blueberry anthocyanins in prevention of age-related macular degeneration through retinal pigment epithelial cell culture study/A Thesis: Michigan State University, 2004.

92. Taheri R. Polyphenol composition of underutilized aronia berries and changes in aronia berry polyphenol content through ripening / Masters Theses. University of Connecticut, 2013.

93. The Japanese Pharmacopoeia16$^{th}$edition.

94. ThePharmacopoeiaofthePeople'sRepublicofChina 2010.

95. The United States Pharmacopeia / The National Formular 37/32. - 2013.

96. Vagiri M., Ekholm A., Andersson S.C., etc. An optimized method for analysis of phenolic compounds in buds, leaves, and fruits of black currant (*Ribes nigrum L.*) // J. Agric. Food Chem. 2012. Vol. 60. P. 10501−10510.

97. Valcheva-Kuzmanova S., Borisova P., Galunska B., et al. Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from *Aronia melanocarpa*on carbon tetrachloride-induced acute liver damage inrats // Exp Toxicol Pathol. 2004. Vol. 56. P. 195–201.

98. Vareed S.K., Reddy M.K., Schutzki R.E., et al. Anthocyanins in *Cornus alternifolia, Cornus controversa, Cornus kousa* and *Cornus florida* fruits with health benefits // Life Sciences. 2006. Vol. 78. P. 777–784.

99. Velioglu Y.S., Ekici L., Poyrazoglu E.S. Phenolic composition of European cranberrybush (*Viburnum opulus L.*) berries and astringency removal of its commercial juice // International Journal of Food Science & Technology. 2006. Vol.41, Iss. 9. P. 1011-1015.

100. Wrolstad R.E., Durst R.W., Lee J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products // Trends in Food Science & Technology. 2005. Vol. 16. P. 423–428.

101. Wu X., Gu L., Prior R.L., etc. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity // J. Agric. Food Chem. 2004.Vol. 52, Iss. 26. P. 7846–7856.

102. Wu X., Yu X. and Jing H. Optimization of phenolic antioxidant extraction from Wuweizi (*Schisandra chinensis*) pulp using random-centroid optimazation methodology // Int. J. Mol. Sci. 2011. Vol. 12. P. 6255-6266.

103. Zapolska-Downar D., Kosmider A., Naruszewicz M. Flavonoids-rich extractfrom chokeberry fruits inhibits oxLDL-induced apoptosis of endothelialcells // Atherosclerosis Suppl. 2006. Vol. 7. P. 223.

104. Zhao C., Giusti M.M., Malik M., et al. Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth // J Agric Food Chem. 2004. Vol. 52. P. 6122–6128.

105. URL http:// rosminzdrav.ru Список общих фармакопейных статей и статей на лекарственное растительное сырье (дата обращения 25.09.2014).

106. URL http://**grls**.rosminzdrav.ru Государственный Реестр Лекарственных Средств (дата обращения 28.12.2014).

107. URL http://rlsnet.ru/ Справочник лекарств РЛС (дата обращения 30.11.2014).

# ПРИЛОЖЕНИЕ 1
# ТИПИЧНЫЕ ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-MC ХРОМАТОГРАММЫ

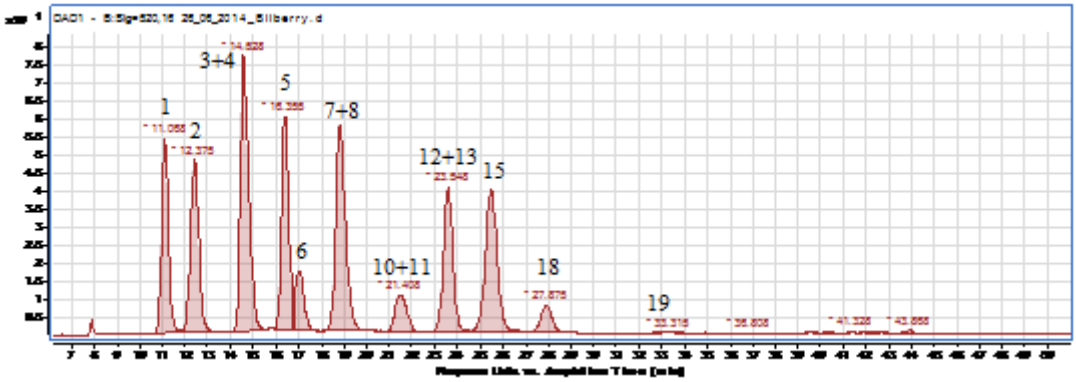



Рисунок 21. ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-MC хроматограмма извлечения плодов черники, Карелия, 2013 г. при λ=520 нм. Здесь и далее в Приложении 1: номера пиков на хроматограмме соответствуют номерам антоцианинов в таблице 13.

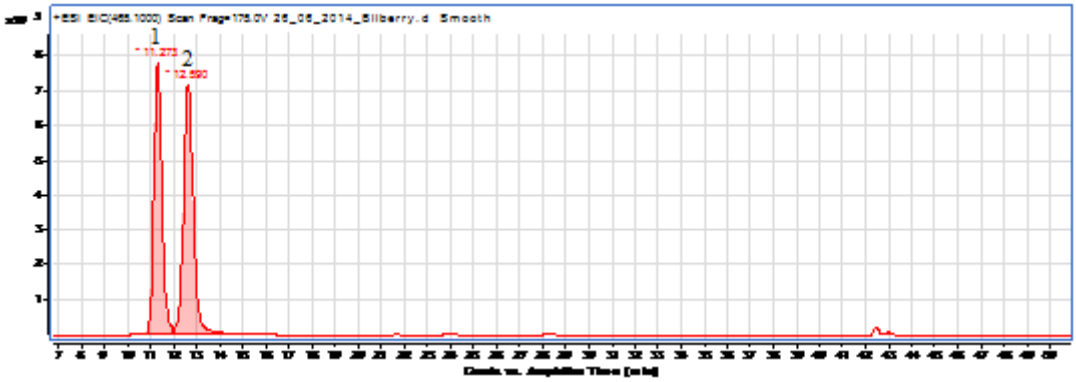



Рисунок 22. Хроматограмма выделенных ионов антоцианинов черники с m/z 465,10.

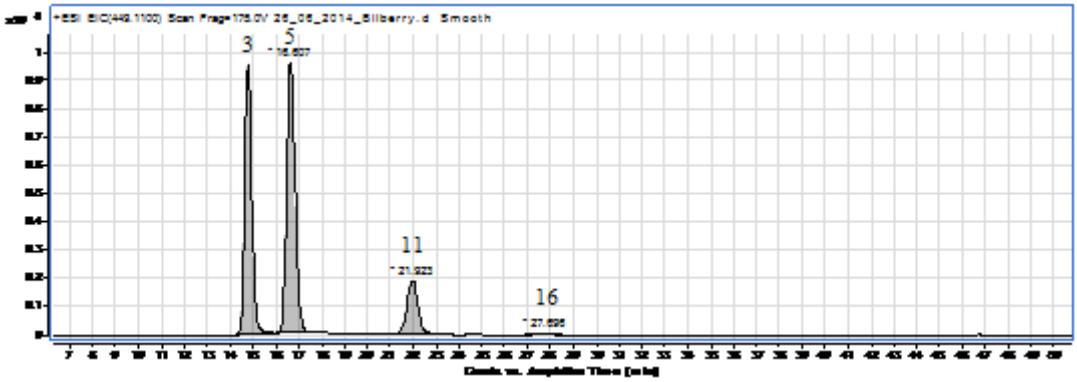



Рисунок 23. Хроматограмма выделенных ионов антоцианинов черники

с m/z 449,11.

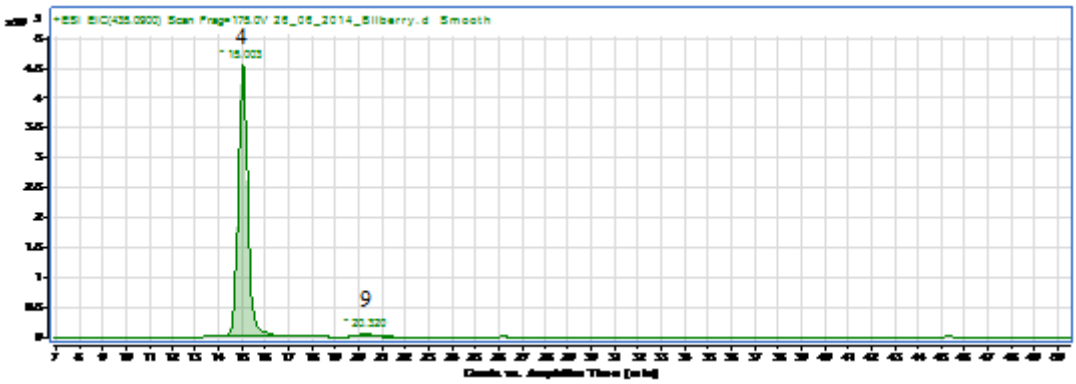



Рисунок 24. Хроматограмма выделенных ионов антоцианинов черники с m/z435,10.

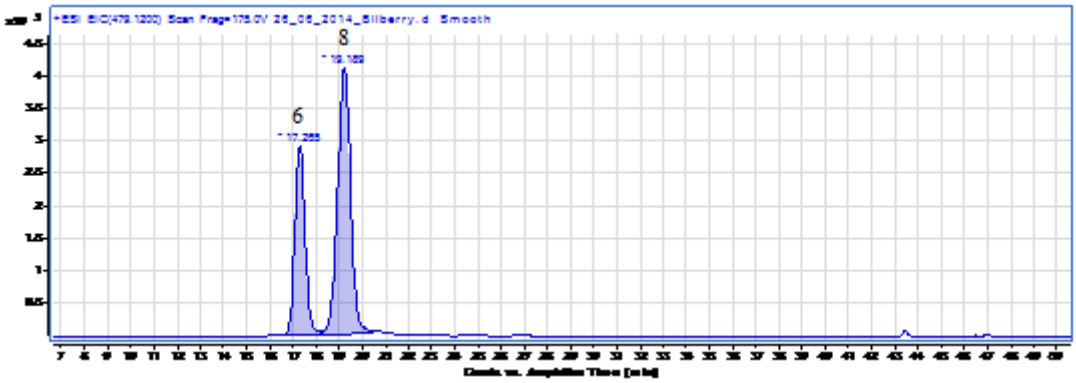



Рисунок 25. Хроматограмма выделенных ионов антоцианинов черники с m/z 479,12.

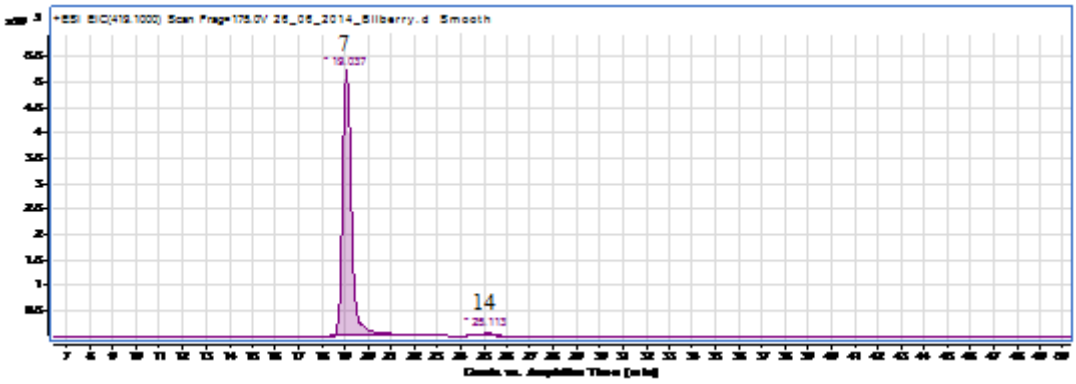



Рисунок 26. Хроматограмма выделенных ионов антоцианинов черники с m/z 419,09.

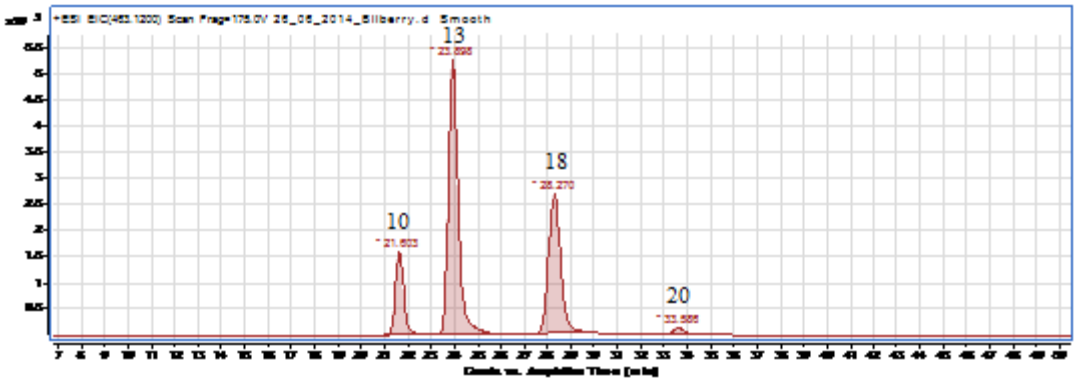



Рисунок 27. Хроматограмма выделенных ионов антоцианинов черники с m/z 463,12.

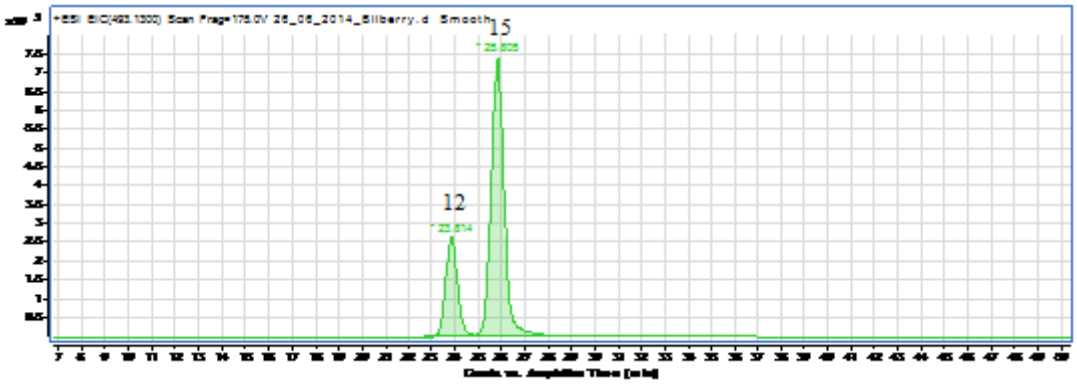



Рисунок 28. Хроматограмма выделенных ионов антоцианинов черники с m/z 493,13.

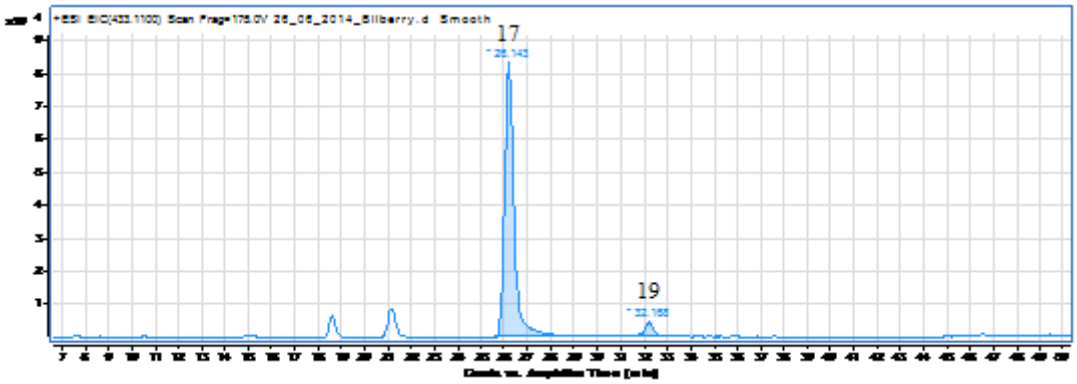



Рисунок 29.Хроматограмма выделенных ионов антоцианинов черники с m/z 433,11.

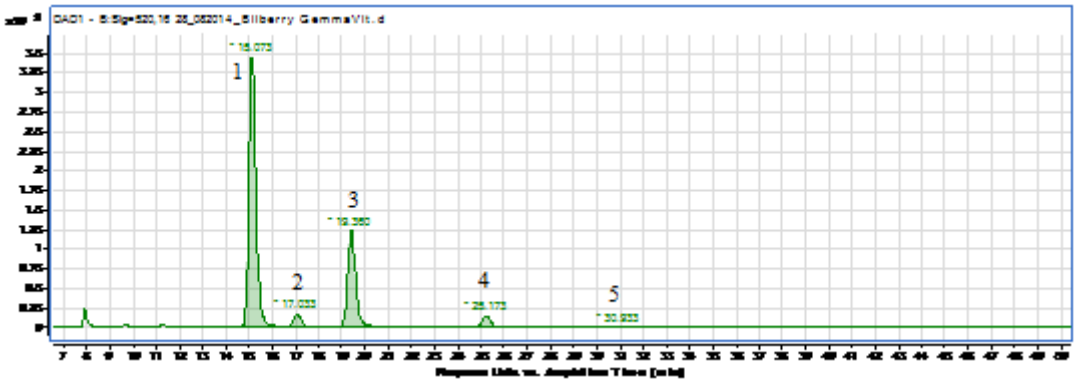



Рисунок 30. ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-MC хроматограмма извлечения плодов аронии, «ГеммаВит» при λ=520 нм

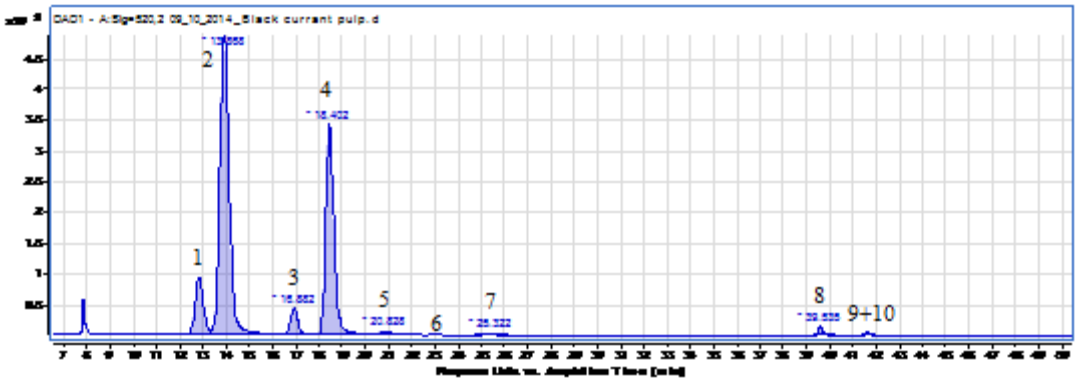



Рисунок 31. ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-MC хроматограмма извлечения жома плодов черной смородины при λ=520 нм.

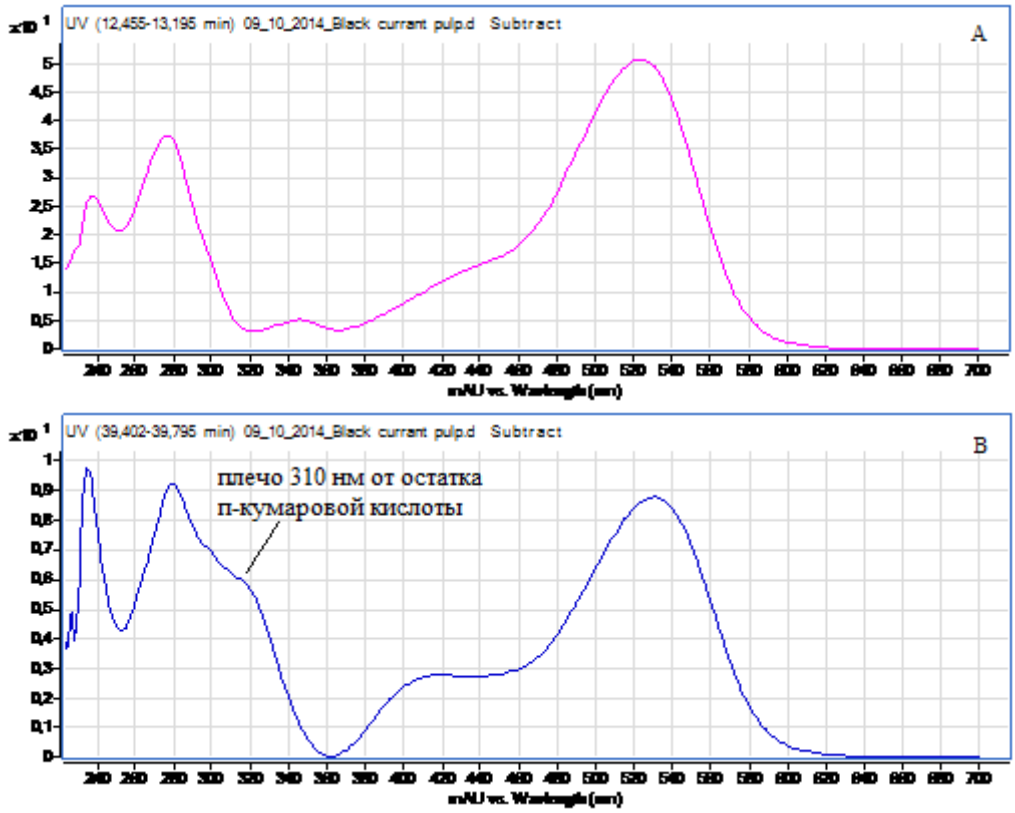



Рисунок 32. Спектры антоцианинов жома черной смородины: дельфинидин-3-глюкозида (А) и дельфинидин-3-(кумароил)глюкозида (В).

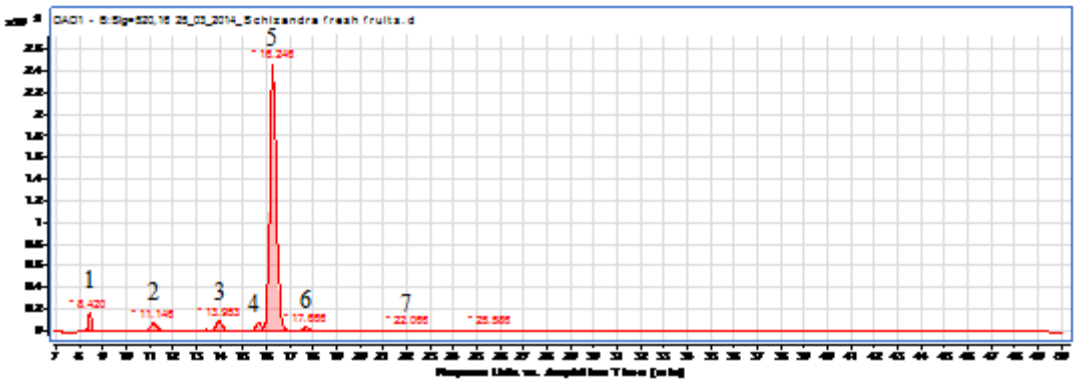



Рисунок 33. ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС хроматограмма извлечения плодов лимонника, Московская область при λ=520 нм

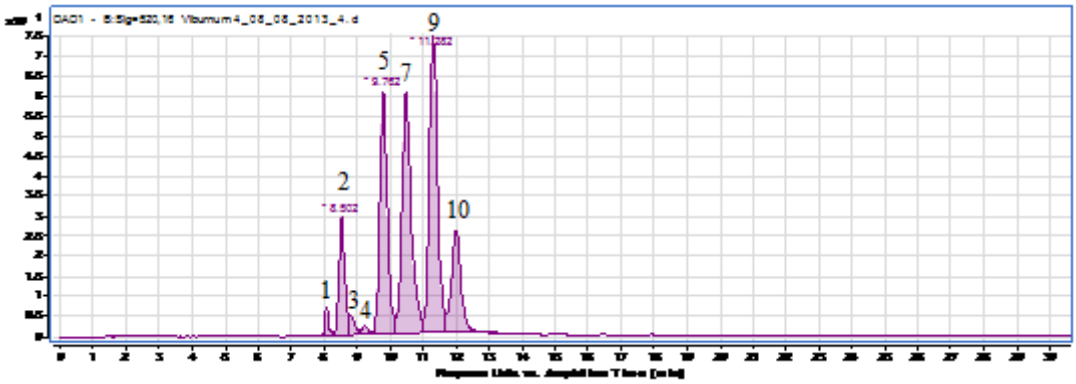



Рисунок 34. ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-MC хроматограмма извлечения плодов калины К-4-13 при λ=520 нм

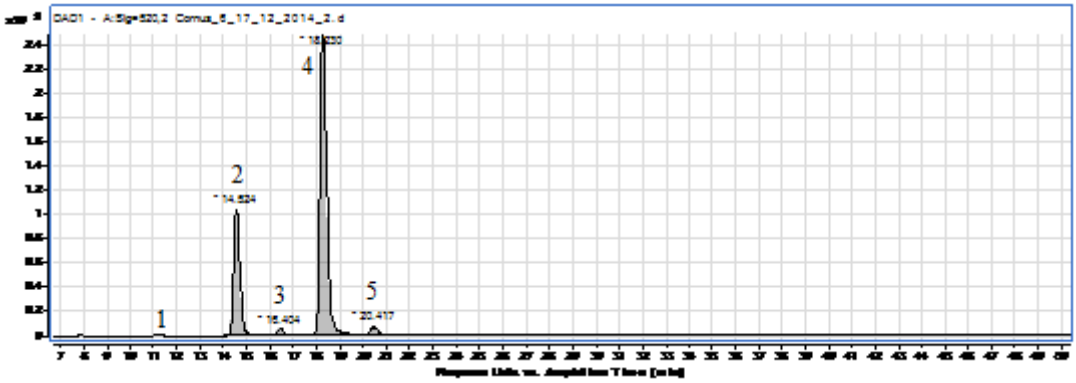



Рисунок 35. ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-MC хроматограмма извлечения плодов кизила, сорт «Азовский-1» при λ=520 нм

# ПРИЛОЖЕНИЕ 2
# ТИПИЧНЫЕ ВЭЖХ-ДМД-ХРОМАТОГРАММЫ

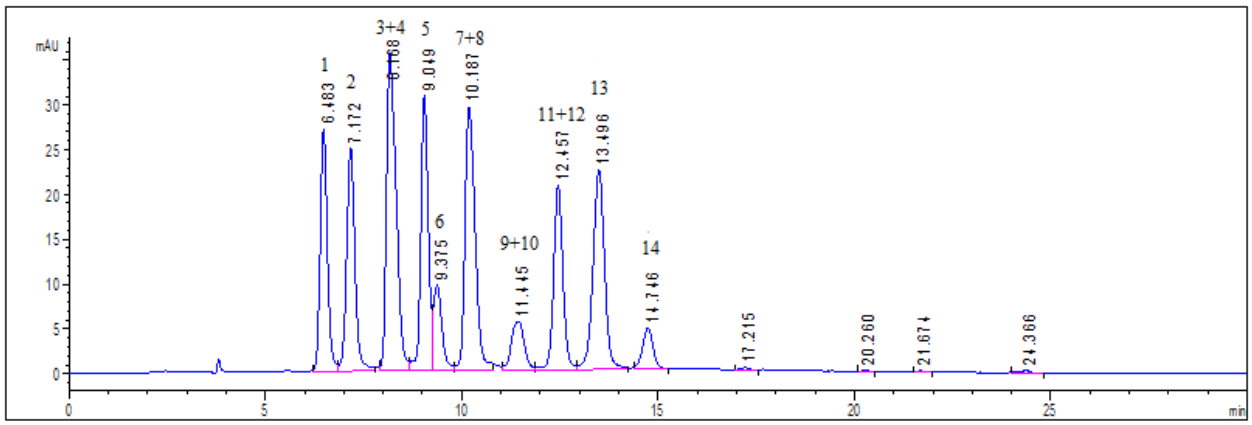



Рисунок 36. ВЭЖХ-ДМД хроматограмма плодов черники, Карелия, 2013 г. при λ=520 нм. Здесь и далее в Приложении 2: номера пиков на хроматограмме соответствуют номерам пиков в таблице 15.

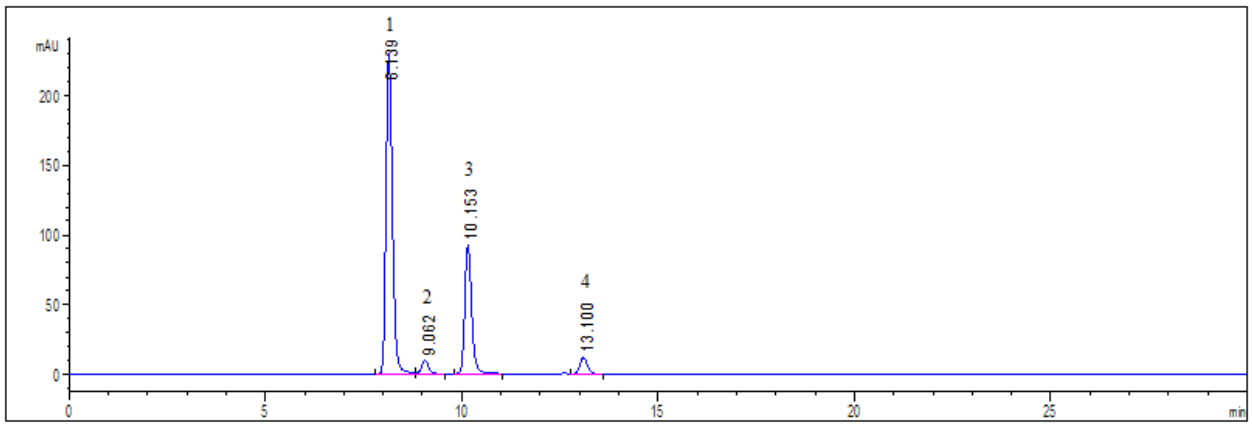



Рисунок 37. ВЭЖХ-ДМД хроматограмма сока аронии при λ=520 нм

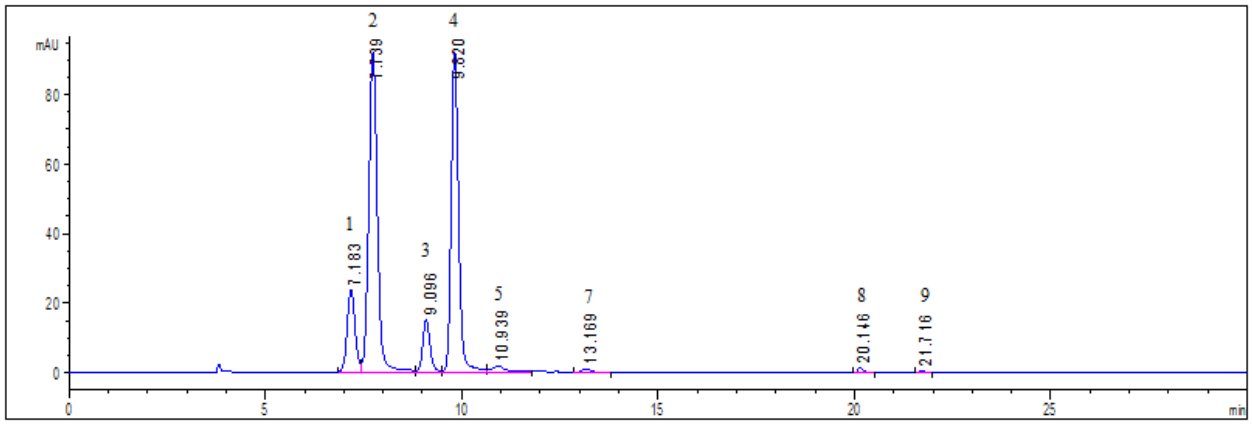



Рисунок 38. ВЭЖХ-ДМД хроматограмма замороженных плодов черной смородины, Домодедовский район при λ=520 нм

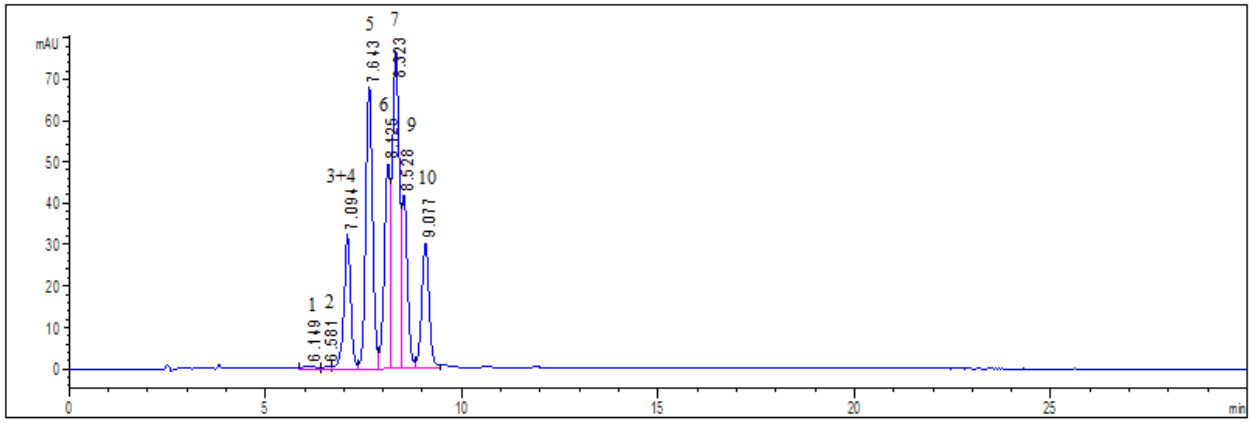



Рисунок 39. ВЭЖХ-ДМД замороженных плодов калины №4 при λ=520 нм

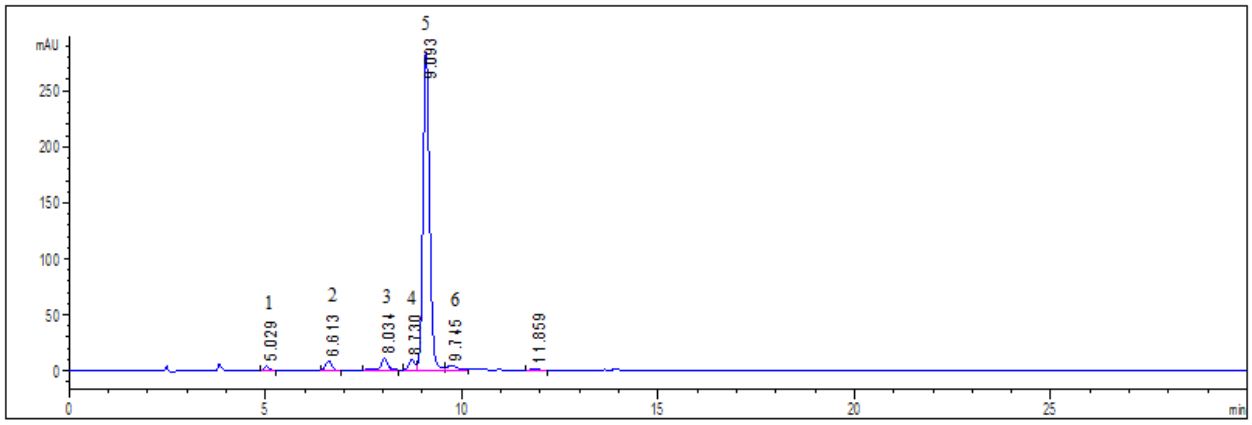



Рисунок 40. ВЭЖХ-ДМД замороженных плодов лимонника китайского при λ=520 нм

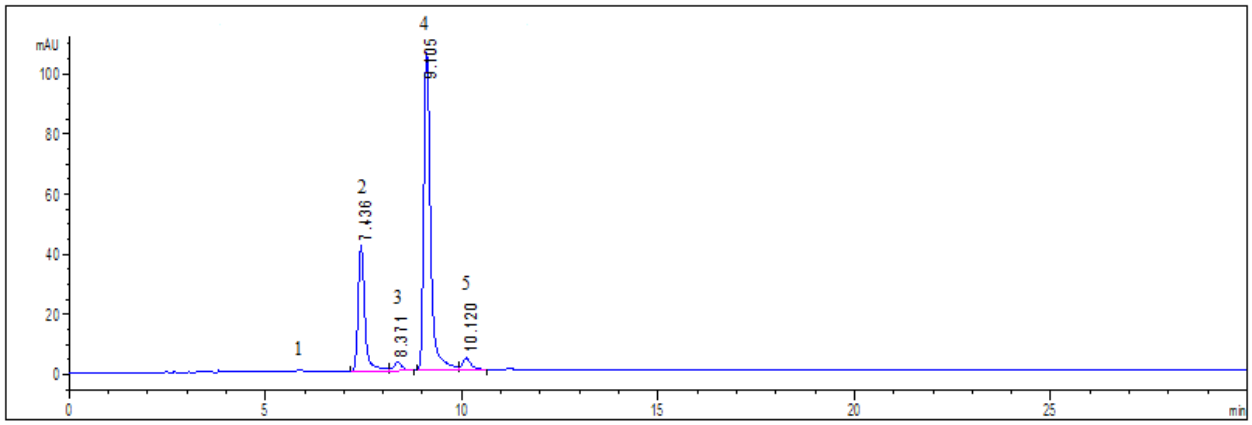



Рисунок 41. ВЭЖХ-ДМД замороженных плодов кизила обыкновенного, сорт «Азовский-1» при λ=520 нм

## ПРИЛОЖЕНИЕ 3

## ПРОЕКТ ОБЩЕЙ ФАРМАКОПЕЙНОЙ СТАТЬИ «ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ И СОСТАВА МОНОМЕРНЫХ АНТОЦИАНИНОВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ, РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТАХ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТАХ»

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

| | |
|---|---|
| **Определение общего содержания и состава мономерных антоцианинов в лекарственном растительном сырье, растительных экстрактах и лекарственных растительных препаратах** | **ОФС**<br>Вводится впервые |

Требования настоящей фармакопейной статьи распространяются на лекарственное растительное сырье, содержащее антоцианины в качестве индикаторных и действующих веществ: свежие и высушенные плоды черники обыкновенной, аронии черноплодной, смородины черной, калины обыкновенной, лимонника китайского, стандартизованные экстракты и лекарственные препараты на их основе.

Состав антоцианинов определяют методом ВЭЖХ.

Свежие и замороженные плоды предварительно измельчают до однородной массы. Высушенные плоды измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 0,2 мм. Навеску

- 2,0 г измельченных плодов черники, аронии, смородины черной,
- 5,0 г измельченных плодов калины, лимонника,

- 0,02 г очищенных и стандартизованных сухих экстрактов свежих плодов черники, смородины черной,

- содержимого капсул или растертых таблеток, содержащих примерно 5 мг антоцианинов помещают в коническую колбу со шлифом, добавляют 20 мл воды очищенной. Экстракцию проводят на УЗ бане при комнатной температуре в течение 15 мин, затем тщательно перемешивают. 1,5-2 мл полученного экстракта помещают в центрифужную пробирку и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 10 мин.

*Раствор сравнения.* Приготовить водное извлечение из соответствующих плодов и экстрактов известного происхождения как описано выше.

*Колонка:*

- наполнитель октадецилсиликагель, химически связанный с $C_{18}$ (5 μ)
- размер 250×4,6 мм
- температура 40 ºС

*Подвижная фаза:*

- компонент А: 4% о-фосфорная кислота (pH=2,10-2,15)
- компонент В: ацетонитрил

*Градиентное элюирование:*

| Время (мин) | Компонент А (% о/о) | Компонент В (% о/о) |
|---|---|---|
| 0 | 90 | 10 |
| 10 | 85 | 15 |
| 15 | 80 | 20 |
| 30 | 70 | 30 |
| 40 | 60 | 40 |
| 41 | 90 | 10 |
| 50 | 90 | 10 |

*Скорость потока растворителя* 1 мл/мин.

*Диодно-матричное спектрофотометрическое детектирование* при 520 нм. Спектры снимают в диапазоне 200-700 нм.

*Объем вводимой пробы* 10 μл.

*Идентификация пиков.* Для идентификации пиков антоцианинов сравнивают хроматограмму определяемого вида плодов известного происхождения с хроматограммой образца.

Времена удерживания и порядок элюирования пиков антоцианинов в образце должен быть подобен временам удерживания и порядку элюирования антоцианинов на хроматограммах, приведенных в частных фармакопейных статьях на лекарственное растительное сырье и растительные экстракты.

Определение общего содержания мономерных антоцианинов в пересчете на цианидин-3-глюкозид проводят методом pH-дифференциальной спектрофотометрии.

Точные навески около 5,0 г измельченных плодов черники, аронии, смородины черной, около 10,0 г измельченных плодов калины, лимонника, помещают в центрифужные пробирки вместимостью 50 мл, добавляют 30 мл 0,04% HCl в 70% этаноле, интенсивно всряхивают, помещают на УЗ баню на 30 мин. Затем центрифугируют при 4500 об/мин в течение 10 мин и переносят экстракт в мерную колбу на 100 мл. Экстракцию повторяют 3 раза. К остаткам сырья добавляют небольшое количество растворителя, интенсивно встряхивают, центрифугируют, переносят в мерную колбу, доводят до метки, тщательно перемешивают. 2 мл объединенного экстракта помещают в центрифужную пробирку и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 10 мин.

Точные навески около 0,14 г очищенных и стандартизованных сухих экстрактов свежих плодов черники, смородины черной, содержимого капсул или растертых таблеток, содержащих примерно 35 мг антоцианинов, помещают в мерные колбу вместимостью 100 мл, добавляют 80 мл 0,05% HCl в 70% этаноле, интенсивоно встряхивают и обрабатывают на УЗ бане при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем доводят растворителем до метки, тщательно перемешивают и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 10 мин.

Отбирают по 1 мл подготовленного экстракта, помещают в мерные колбы вместимостью 25 мл. Одну колбу заполняют до метки буферным раствором с pH 1,0, другую – буферным раствором с pH 4,5, выдерживают 15 мин при комнатной температуре. В кювету сравнения с толщиной слоя 1 см помещают воду очищенную и снимают базовую линию спектрофотометра при всех длинах волн, при которых будут проводить измерения (510-700 нм). В 2 кюветы с толщиной слоя 1 см помещают разбавленные буферными растворами с pH=1 и pH=4,5 пробы и поочередно снимают спектры и измеряют оптические плотности при длинах волн 510 нм и 700 нм против раствора сравнения.

Примечание. Измерения следует проводить в промежутке от 15 мин до 1 ч после приготовления разбавленных проб, так как при более длительном выдерживании наблюдается тенденция к увеличению измеряемых показаний.

Суммарное содержание мономерных антоцианинов в пересчете на цианидин-3-глюкозид вычисляют по формуле:

$$X(\sum\text{антоцианинов},\%) = \frac{D \times Mw \times 25 \times 100 \times 100\%}{\varepsilon \times l \times m},$$

Где оптическая плотность $D = (D_{510нм} - D_{700нм})_{pH1,0} - (D_{510нм} - D_{700нм})_{pH4,5}$, ε и Mw – коэффициент молярной экстинкции и молекулярная масса цианидин-3-глюкозида (26900 л/моль×см и 449,2 г/моль соответственно), *25* – разведение буферными растворами, мл, *100* – объем растворителя, мл, *l* – длина кюветы, см, *m* – масса образца, мг.