

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Герасимов Макар Алексеевич

**Поиск новых перспективных источников антоцианинов растительного
происхождения**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

кандидат фармацевтических наук, доцент

Родионова Галина Михайловна

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Основные сведения об антоцианинах	13
1.2. Синтез антоцианов в растительных клетках.....	15
1.3. Биологические функции антоцианинов в клетках растений.....	21
1.4. Фармакологическая активность антоцианинов	22
1.5. Природные источники антоцианинов	24
1.5.1. Жимолость съедобная <i>Lonicera edulis</i> Turcz. Ex Freyn.....	24
1.5.2. Черноплодная рябина <i>Aronia melanocarpa</i> (Michx.) Elliot.....	27
1.5.3. Голубика высокорослая <i>Vaccinium corymbosum</i> L.....	28
1.5.4. Черная смородина <i>Ribes nigrum</i>	31
1.6. Физико-химические свойства антоцианинов.....	34
1.7. Современные подходы к анализу антоцианинов.....	38
1.7.1. Спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой области.....	39
1.7.2. Хроматографические методы определения антоцианинов.....	41
1.7.2.1. Тонкослойная хроматография	41
1.7.2.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография	42
1.7.2.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс- спектрометрическим детектированием.....	45
1.7.3. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса	47
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	50
2.1. Объекты исследования.....	50
2.2. Оборудование	53
2.3. Реактивы	53
2.4. Пробоподготовка.....	54
2.5. Методика определения суммарного содержания антоцианинов методом рН-дифференциальной спектрофотометрии	55

2.6. Методики определения сопутствующих полифенольных соединений в объектах исследования	57
ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ АНТОЦИАНИНОВ.....	
3.1. Экстракция антоцианинов из растительного сырья	59
3.2. Методика определения специфического профиля антоцианинов	62
3.3. Валидация методики определения специфического профиля антоцианинов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием диодного и масс-спектрометрического детектора.....	64
3.4. Линейность методики	66
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	72
ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ОБЪЕКТАХ ИССЛЕДОВАНИЯ	
4.1. Результаты исследования полифенольного комплекса плодов жимолости съедобной	73
4.1.1. Идентификация профиля индивидуальных антоцианинов плодов жимолости съедобной	73
4.1.2. Определение сопутствующих соединений полифенольной природы в плодах жимолости съедобной	76
4.1.3. Количественное определение суммы антоцианинов плодов жимолости съедобной	81
4.2. Результаты исследования полифенольного комплекса плодов черноплодной рябины.....	84
4.2.1. Профиль индивидуальных антоцианинов в плодах черноплодной рябины	84
4.2.2. Определение сопутствующих соединений полифенольной природы в плодах черноплодной рябины	86
4.2.3. Количественное определение суммы антоцианинов плодов черноплодной рябины	92

4.3. Результаты исследования полифенольного комплекса плодов голубики высокорослой	94
4.3.1. Профиль индивидуальных антоцианинов плодов голубики высокорослой	94
4.3.2. Определение сопутствующих соединений полифенольной природы в плодах голубики высокорослой	96
4.3.3. Количественное определение суммы антоцианинов плодов голубики высокорослой	97
4.4. Результаты исследования полифенольного комплекса плодов черной смородины	98
4.4.1. Профиль индивидуальных антоцианинов плодов черной смородины.....	98
4.4.2. Определение сопутствующих соединений полифенольной природы в плодах черной смородины.....	101
4.4.3. Количественное определение суммы антоцианинов плодов черной смородины	101
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	102
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	105
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	108
ПРИЛОЖЕНИЕ А	124
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	125

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Поиск перспективных источников биологически активных веществ (БАВ) природного происхождения является одной из основных задач современной науки для дальнейшего применения в медицинской и фармацевтической промышленности. Это связано с тем, что растительные биологически активные вещества, среди которых наибольшей распространенностью обладают антоцианины, играют важную роль в профилактике различных хронических заболеваний. Данный класс соединений благоприятно влияет на иммунный статус организма, процессы апоптоза, а также на различные ферментные системы, обеспечивающие защиту клетки от повреждающего действия экзогенных и эндогенных факторов. Кроме того, антоцианы обладают рядом положительных свойств, доказанных в доклинических и клинических исследованиях. Природные антоцианы участвуют в снижении проницаемости гемато–паренхиматозных барьеров, улучшают трофику и микроциркуляцию зрительного аппарата, придавая дополнительную защиту ткани сетчатки от светового облучения, а также снижают риск возникновения сосудистых осложнений и сердечно-сосудистых заболеваний при сахарном диабете II типа, что обусловлено гипополипидемической и гипогликемической активностью антоцианинов. Следует отметить защитную функцию против окислительного стресса, а также противовоспалительными и антиоксидантными свойствами.

В Государственной фармакопее (ГФ) XV издания [1] нет действующих статей, описывающих источники антоцианинов. Фармакопейным сырьем, содержащим антоцианины в Российской Федерации по ГФ XIV издания [2], являются плоды аронии черноплодной свежие и сухие (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott), василька синего цветки (*Centaureae cyani flores*), плоды черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.). Плоды калины обыкновенной (*Viburnum opulus* L.) свежие и плоды лимонника китайского (*Schizandra chinensis* (Turcz.)

Baill.), которые также в своем составе содержат антоцианины, регламентируется по показателям содержание органических кислот в пересчете на яблочную кислоту и содержание суммы лигнанов в пересчете на схизандрин, соответственно. Плоды жимолости, голубики, черной смородины на данный момент не включены в действующую ГФ РФ.

Помимо фармацевтической отрасли, в расширении сырьевой базы заинтересованы и другие отрасли, такие как пищевая и косметическая. Это связано с тем, что натуральные БАВ, выделенные из растительных источников, обладают рядом преимуществ по сравнению с субстанциями химического происхождения, а именно имеют широкое терапевтическое действие, при этом безопасны и имеют меньшее количество побочных реакций. Возрастающий спрос подталкивает нас на поиск и дальнейшее использование новых источников, что в свою очередь невозможно без их тщательного изучения.

Степень разработанности темы исследования

Ежегодно количество селекционно-выведенных сортов растений, культивируемых на территории Российской Федерации, возрастает. На конец 2023 года сорта жимолости, зарегистрированные в «Реестре селекционных достижений» [3] составляли порядка 130 разновидностей, при этом в 2019 году их количество не превышало 110. Сложившаяся тенденция демонстрирует, что сравнительное изучение в накоплении БАВ различных сортов является актуальной темой для отечественной селекции и требует дополнительных исследований со стороны фармацевтической науки. На данный момент в Российской Федерации нет сформировавшегося направления работы по изучению содержания и специфического профиля мономерных антоцианинов в исследуемых сортах плодов жимолости, голубики, аронии черноплодной и черной смородины и, как итог, дальнейшего рассмотрения в качестве нового фармакопейного сырья.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – провести комплексную оценку полифенольного профиля перспективных видов и сортов плодов растений, содержащих антоцианины, с последующей оценкой их использования в качестве официальных источников лекарственного растительного сырья.

Для реализации цели ставятся следующие задачи:

1. Оценить современное состояние и перспективы использования сырьевых источников, содержащих антоцианы, в медицинской и фармацевтической промышленности на территории Российской Федерации;
2. Установить оптимальный способ пробоподготовки объектов исследования с целью увеличения экстракционного извлечения антоцианинов из анализируемых плодов растений.
3. Оптимизировать методику определения специфичного профиля антоцианинов в плодах и изучить состав индивидуальных антоцианинов в отобранных видах и сортах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-детектором (ВЭЖХ-МС);
4. Определить суммарное содержание мономерных антоцианинов в объектах исследования с помощью специфичного метода рН-дифференциальной спектрофотометрии;
5. Оценить содержание сопутствующего полифенольного комплекса объектов исследования (флавоны, флавонолы, гидроксикоричные кислоты (ГКК), проантоцианидины (ПАЦ), общее содержание полифенольных соединений (ПФ)) для выявления наибольшей биологической активности;
6. На основе полученных данных, отобрать наиболее перспективные сорта для дальнейшего фармакогностического исследования и стандартизации лекарственного растительного сырья.

Научная новизна

Впервые проведен сравнительный анализ плодов жимолости съедобной, голубики высокорослой, черноплодной рябины и черной смородины различных сортов по содержанию биологически активных веществ полифенольной природы. С помощью оптимизированных методик установлен профиль и суммарное содержание антоцианинов в объектах исследования. Впервые установлены естественные границы содержания мономерных антоцианинов в изученном сырье. Установлено, что сортовая принадлежность является первопричиной в различном накоплении БАВ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты проведенного исследования, полученные с помощью современных физико-химических методов на чувствительном и селективном оборудовании, могут служить теоретическими основами для дальнейшего исследования антоцианин-содержащих лекарственных растений и лекарственного растительного сырья с последующим включением в Государственную Фармакопею Российской Федерации. Полученные аналитические данные могут стать основой для выбора показателей качества и установления норм в процессе стандартизации и разработки актуальной нормативной документации.

Представленные в работе методики внедрены в работу лаборатории протеомного и метаболомного анализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии» при санитарно-гигиенической экспертизе лекарственного и пищевого сырья растительного происхождения, а также продуктов на его основе. На основании выявленных в результате работы различий в количественном содержании БАВ, выбраны оптимальные сорта для последующих исследований в части разработки новых лекарственных препаратов растительного происхождения.

Методология и методы исследования

Методология исследования базировалась на анализе литературных данных и сравнительном анализе присутствующих в объектах исследования групп БАВ. В ходе эксперимента были использованы методы ВЭЖХ со спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием. Суммарное содержание антоцианинов определялось с помощью метода рН-дифференциальной спектрофотометрии. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения OpenLAB CDS ChemStation (Rev. В. 04.03) (Agilent); ВЭЖХ-МС – Thermo Xcalibur (Ver. 4.2.47) (Thermo Scientific); а также Microsoft Office Excel.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты определения суммарного содержания антоцианиновых пигментов в плодах жимолости съедобной, голубики высокорослой, черноплодной рябины и черной смородины методом рН-дифференциальной спектрофотометрии.
2. Оптимизация методики идентификации и определение профиля индивидуальных антоцианинов в сырье.
3. Данные определения специфического профиля антоцианинов в объектах исследования.
4. Материалы сравнительного анализа в накоплении сопутствующих биологически активных веществ полифенольной природы (флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, проантоцианидины, суммы полифенольных соединений).
5. Результаты определения наиболее перспективных сортов для дальнейшего использования.

Степень достоверности и апробация результатов

Данные экспериментов, проведенных в работе, были получены на современном аттестованном оборудовании, на которое выданы действующие свидетельства о поверках, что позволяет считать их достоверными. Оптимизированная методика определения профиля антоцианинов методом ВЭЖХ валидирована по основным требованиям ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» [4]. Выводы и рекомендации базируются на достаточном объеме экспериментальных данных, подвергнутых статистической обработке.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на II международном симпозиуме «2021 China-Russia Young Scholars Symposium» (г. Москва, декабрь 2021); на V-ой школе молодых ученых «Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний» (г. Москва, ноябрь 2022); на «XVIII Всероссийском конгрессе с международным участием «Нутрициология и диетология для здоровьесбережения населения России», посвященный 300-летию Российской академии наук (г. Москва, ноябрь 2023); на международном конгрессе, посвященном современным достижениям фармации «The 6th International Congress on Pharmacy Updates» (г. Тегеран, февраль 2023). Апробация диссертации проведена на межкафедральной конференции кафедр фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева, фармацевтического естествознания, химии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) 28.08.2024 Протокол №1.

Личный вклад автора

Главная роль в выборе объектов изучения и направления исследования принадлежит автору. Цели и задачи исследования сформулированы именно автором работы. Непосредственно автором подготовлен план исследования, включающий анализ литературы, подготовку и проведение анализа в объектах

исследования по определению основных биологически активных веществ, прогнозируемые результаты. Автором проведена оптимизация методики ВЭЖХ-ДМД-МС по определению специфического профиля антоцианинов, а также ее валидация по параметру «Специфичность». Вклад автора является основополагающим на всех этапах работы: от информационного поиска, теоретического обоснования и эксперимента, проведения исследования до обработки результатов и представления их в публикациях. Публикации и доклады о результатах исследований, а также написание диссертации и автореферата осуществлялись непосредственно автором.

Внедрение результатов в практику

Основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института Фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплин «Медицинская химия», «Фармакогнозия» по направлению подготовки (специальности) 33.05.01 Фармация (Акт №439 от 14.05.2024 г.); в рабочий процесс лаборатории протеомного и метаболомного анализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии» при проведении санитарно-эпидемиологической экспертизы БАД к пище и специализированной пищевой продукции (Акт № 410-01-14/478 от 12.04.2024).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия. Полученные в ходе исследования результаты соответствуют области

исследований специальности, конкретно пунктам 2, 3 и 6 паспорта специальности фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Связь темы исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена согласно тематике и научному плану исследований кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института Фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования» (№ государственной регистрации: 01.2.011.68237).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационного исследования автором опубликовано 7 печатных работ, в том числе: научных статей, отражающих основные результаты диссертации – 3, из них: в изданиях, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечня ВАК при Минобрнауки России – 1 обзорная статья; статей в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus – 2 статьи; 4 работы опубликованы в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов исследования и их обсуждения, выводов и библиографического указателя, включающего 137 источников, из которых 114 на английском языке. Работа сопровождается 25 рисунками, 26 таблицами и 2 приложениями.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Основные сведения об антоцианинах

Антоцианы или антоцианины (от греч. *anthos* = цветок и *kyáneos* = синий) представляют собой обширную группу водорастворимых полифенольных пигментов, которая отвечает за окрашивание плодов, цветков, листьев и других частей растений в различные оттенки: от красно-оранжевого до сине-фиолетового [5].

Антоцианидины являются основными структурами антоцианов, последние из которых, в свою очередь, относятся к классу флавоноидов (производных 2-фенилбензопирана или 2-фенилхромана). В основе строения антоцианидинов (или агликонов) лежит $C_6-C_3-C_6$ углеродный скелет, который состоит из замещенного ароматического кольца [A], связанного с гетероциклическим (пирановым) кольцом [C], содержащим кислород, которое связано углерод-углеродной связью с третьим фенольным кольцом [B] (Рисунок 1.1) [6]. В отличие от других групп флавоноидов, атом кислорода пиранового кольца антоцианинов несет на себе формальный положительный заряд.

Цвет, проявляемый этими молекулами, был впервые объяснен Полингом в 1939 году, который предположил, что интенсивность их цвета обусловлена резонансной структурой иона флавилия [7].

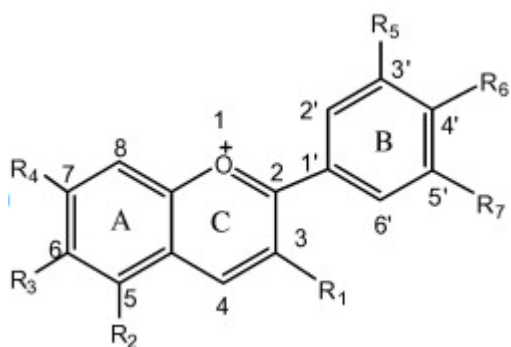


Рисунок 1.1 – Общая структура антоцианинов

Антоцианидин, связанный гликозидной связью с сахаром называется антоцианин. В природе распространено огромное разнообразие антоцианов. На сегодняшний день идентифицировано более 700 структурно различных антоциановых производных [8]. Основные различия между ними заключаются в количестве и расположении гидроксильных групп, а также природе и количестве связанных с агликонами сахаров [9].

На данный момент уже выделено и идентифицировано порядка 30 антоцианидинов, однако к основным относят только шесть, которые лежат в основе ~ 90% антоцианинов [10]. Их структуры представлены в Таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Структуры основных антоцианидинов

R ₁	R ₂	Агликон	Сокращенное название	Цвет	$\lambda_{\text{vis-max}}^*$, нм
H	H	Пеларгонидин	Pgd	Оранжево-красный	512
ОН	H	Цианидин	Cyd	Красный, малиновый	524
ОСН ₃	H	Пеонидин	Pnd	Малиновый, пурпурно-синий	524
ОН	ОН	Дельфинидин	Dpd	Пурпурный, мальвовый, синий	528
ОСН ₃	ОН	Петунидин	Ptd	Пурпурный	532
ОСН ₃	ОСН ₃	Мальвидин	Mvd	Пурпурный	534

*Растворитель: 60% раствор метанола, подкисленный HCl_{конц.}

Антоцианидин обычно присоединен к 1 или более фрагментам сахара, обычно конъюгированному с гидроксильной группой C₃ (реже C₄, C₅) в C-кольце, или к гидроксилам бензопирана в 3 и 5 положениях, что делает их гликозидами. Углеводная часть антоцианов чаще всего представлена гексозами (галактоза, глюкоза, рамноза) и пентозами (арабиноза, ксилоза), из которых в дальнейшем образуются ди- и трисахариды. За исключением 3-дезоксiantoцианидинов, антоцианы существуют почти исключительно в гликозилированной форме; их антоцианидиновые аналоги нестабильны и редко

встречаются в природе [8]. Наиболее распространенными в природе производными гликозидов являются 3-монозиды, 3-биозиды, 3,5- и 3,7-диглюкозиды. Производные 3-глюкозида встречаются в 2,5 раза чаще, чем 3,5-диглюкозиды, а наиболее распространенным антоцианом является Су-3-глюкозид [9].

В дополнение к их естественному разнообразию в природе антоцианы могут быть ацилированы путем этерификации с органическими кислотами (кумаровая, кофейная, синаповая, феруловая, галловая, уксусная, щавелевая, малоновая) [11, 12, 13, 14, 15].

К наиболее богатым источникам антоцианинов относят чернику, черноплодную рябину, бузину черную, голубику, гранат, ежевику, жимолость, черную малину [16]. Кроме того, к этому перечню можно отнести кожуру баклажана, черный рис, фиолетовый ямс, виноград Конкорд, красную капусту, лепестки фиалки [17]. Около 2% всех углеводов, которые образуются в процессе фотосинтеза, идут на создание флавоноидных структур и их производных, в том числе антоцианов. Они располагаются в клеточных вакуолях цветков и плодов. Также, но уже в меньшей степени, их можно найти в эпидермисе и в периферических клетках мезофилла листьев, стеблей и корней. В вакуолях антоцианы содержатся внутри специальных структур – антоцианопластов, в которых и происходит их синтез. Антоцианопласты окружены прозрачной мембраной, которая поддерживает более высокую концентрацию пигментов, чем в вакуоли. По мере созревания растения антоцианы переходят из антоцианопластов в вакуоль, и уже в виде свободных вакуолярных включений придают клеткам специфическую окраску [18, 19].

1.2. Синтез антоцианов в растительных клетках

Антоцианы — это флавоноидные пигменты, синтезируемые фенилпропаноидным путем (Рисунок 1.2).

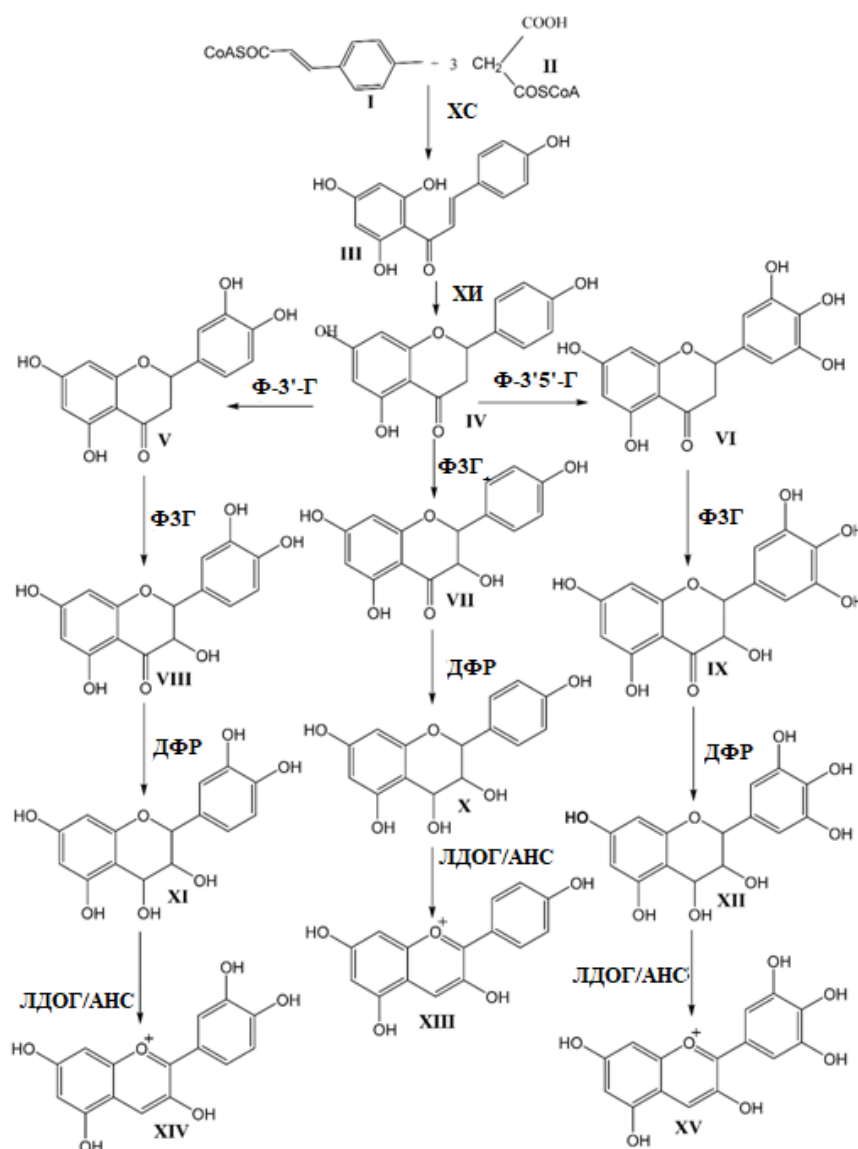


Рисунок 1.2 – Фенилпропаноидный путь биосинтеза антоцианов

Первым решающим шагом на пути синтеза антоциана является конденсация одной молекулы *p*-кумарил-КоА (I) с тремя молекулами малонил-КоА (II) под действием халконсинтазы (XS) с образованием тетрагидрохалкона (III). Изомеризация тетрагидрохалкона под действием халконизомеразы (XII) приводит к образованию флаванона нарингенина (IV). Нарингенин действует как центральная точка разветвления различных флавоноидов посредством гидроксирования С-кольца с помощью флаванон-3-гидроксилазы (Ф3Г) и гидроксирования В-кольца с помощью флаванон-3'-гидроксилазы (Ф3'Г) или флаванона 3'5'. -гидроксилаза (Ф3'5'Г) с образованием дигидрокемпферола (VII), дигидрокверцетина (VIII) и дигидромирицетина (IX). Гидроксирование В-


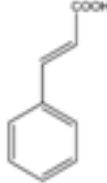
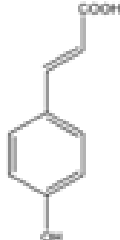
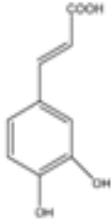
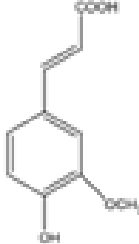
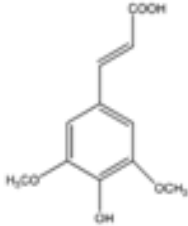
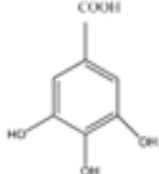
кольца нарингенина флаванон-3-гидроксилазой и флаванон-3'5'-гидроксилазой приводит к образованию эриодиктиола (V) и пентагидроксифлаванона (VI) соответственно. Эти ферменты гидроксилирования необходимы для производства цианидина (XIV) и дельфинидина (XV). Отсутствие фиолетового/синего цвета у некоторых цветочных культур, таких как розы (*Rosa Hybrida*) и хризантемы (*Chrysanthemum morifolium*), объясняется отсутствием Ф3'5'Г, которое проявляется в их неспособности вырабатывать дельфинидин. Однако известны работы по пересадке данного фермента, что в итоге привело к получению трансгенных роз с сине-фиолетовой окраской [20]. Следующим этапом биосинтеза антоцианидина является действие дигидрофлавонол-4-редуктазы (ДФР) на один из трех дигидрофлавонолов: дигидрокемпферол (VII), дигидрокверцетин (VIII) или дигидромирицетин (IX) с образованием соответствующих лейкоантоцианидинов: лейкопеларгонидина (X), лейкоцианидина (XI) и лейкодельфинидина (XII). ДФР обладает строгой субстратной специфичностью. Например, у петунии (*Petunia Hybrida*) и цимбидиума (*Cymbidium Hybrida*) ДФР не может использовать дигидрокемпферол в качестве субстрата. Таким образом, у этих видов растений отсутствуют антоциановые цвета на основе пеларгонидина, такие как оранжевый и кирпично-красный [20]. Лейкоантоцианидины превращаются в соответствующие антоцианидины (пеларгонидин оранжевого цвета (XIII), цианидин оранжево-красного цвета (XIV) и дельфинидин синевато-красного цвета (XV) под действием лейкоантоцианидиндиоксигеназы / антоцианидинсинтазы (ЛДОГ / АНС). Интересно, что профиль состава антоцианов может меняться при различных стрессах, и биологические причины этого факта до конца не исследованы [21].

Как уже упоминалось ранее, наиболее распространенными в природе антоцианидами являются пеларгонидин, цианидин, дельфинидин, пеонидин, петунидин и мальвидин (Таблица 1.1). Гидроксилирование и метилирование В-кольца контролируют цвет и стабильность антоцианов. Голубизна усиливается при увеличении количества гидроксильных групп, тогда как покраснение

усиливается при увеличении числа метильных групп в В-кольце. Более того, О-метилтрансферазы опосредуют метилирование гидроксильных групп В-кольца. Присутствие орто-гидроксильных групп в В-кольце делает молекулу более восприимчивой к окислению, тем самым снижая её стабильность. Орто-положение гидроксильных групп в цианидине, дельфинидине и петунидине делает их менее стабильными, чем пеонидин и мальвидин [11].

Следующим этапом биосинтеза антоцианов является О-гликозилирование. В отличие от основного флавоноидного пути, модификация антоцианидина путем гликозилирования разнообразна. Ферменты, вызывающие эти модификации, специфичны в отношении положения модификации и донорного субстрата. Гликозилированию способствуют гликозилтрансферазы, находящиеся в цитоплазме. Антоцианы изначально гликозилированы в положении 3. Однако в исследованиях, где накапливались 3,5-диглюкозиды, 5-гликозилирование предшествовало 3-гликозилированию [20]. D-глюкоза, D-галактоза, L-рамноза, D-ксилоза, D-арабиноза – одни из самых распространенных сахаров, которые гликозилируют антоцианы [22, 23]. Положения C3, C5, C7, C3' и C5' доступны для гликозилирования, но гликозилирование по положению C3 является наиболее распространенным у антоцианов, встречающихся в природе. Гликозилирование C3 приводит к повышению стабильности молекулы, а также смещению цвета в область красного. В то время как гликозилирование по 3-му положению повышают стабильность, гликозилирование по положению 5 имеет тенденцию ее снижать. Более того, присоединение сахара к антоцианидину в 5-ом положении также может привести к образованию бесцветных псевдооснований, поскольку потеря гидроксильной группы в положении 5 делает антоцианин более восприимчивым к реакции гидратации. Остатки сахаров в антоцианах часто ацилируются ароматическими или алифатическими кислотами. Алифатические и ароматические кислоты, участвующие в реакциях ацилирования, представлены в Таблице 1.2.

Таблица 1.2 – Алифатические и ароматические кислоты, участвующие в ацилировании антоцианов

Алифатические и ароматические кислоты	Химическая формула
Малоновая кислота	
Коричная кислота	
p-Кумаровая кислота	
Кофейная кислота	
Феруловая кислота	
Синапиновая кислота	
Галловая кислота	

Ацилирование приводит к изменению цвета (синий сдвиг) и повышению стабильности за счет реакций внутри- и межмолекулярной совместной пигментации [23]. Помимо генов биосинтеза, участвующих в образовании антоциановых пигментов, существенное влияние на них оказывают рН вакуолей и форма клеток. У цветков петунии закисление вакуоли меняет цвет на красный, а мутации, приводящие к сдвигу $\text{pH} > 7$, проявляются изменением цвета в сторону синего. Даже при высоком накоплении пигментов растения могут выглядеть обесцвеченными из-за формы их клеток. Это происходит из-за различий в отраженном свете между коническими и плоскими клетками [24]. Флавоноидные гликозиды обычно транспортируются в вакуоли. Транспорт антоцианов из мест синтеза в вакуоли индуцируется действием нескольких транспортеров, включая глутатион S-трансферазу [22, 23, 25].

Антоцианидины чаще всего представлены в виде катионов флавилия (Рисунок 1.3). Окрашенные катионы флавилия стабилизируются внутри клетки путем внутри- и межмолекулярного комплексообразования. Межмолекулярному комплексообразованию способствуют бесцветные флавонолы, каротиноиды или ионы металлов, таких как Mg^{2+} или Al^{3+} [24]. Эти модификации обеспечивают повышенную стабильность и разнообразие цветов антоцианов. Однако антоцианы склонны к изменению цвета и конформации в растворах при различных значениях рН.

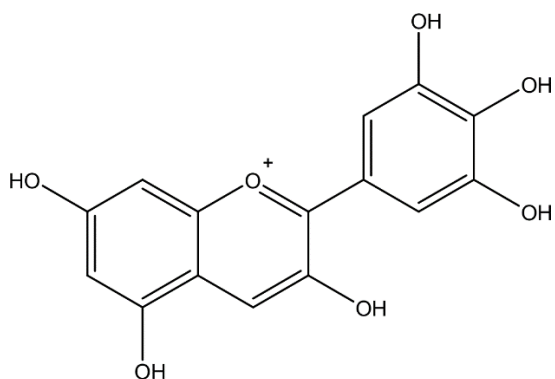


Рисунок 1.3. – Структура катиона флавилия дельфинидина.

1.3. Биологические функции антоцианинов в клетках растений

Биологические функции антоцианинов можно разделить на две основные группы: взаимодействие растение/насекомое (животное) и защита от стрессовых факторов извне [19, 26, 27]. Яркая окраска антоцианинов содержащихся в цветках может служить привлекающим фактором для насекомых и других опылителей, в то время как накопление антоцианов в плодах, говорит о его спелости.

Абиотические стрессы, такие как жара, засуха, засоление, низкие температуры и тяжелые металлы, подавляют рост растений и снижают урожайность [28, 29]. Растения, выращенные на полях, подвергаются воздействию одного или нескольких абиотических стрессов. Последующая реакция растений на стресс индуцирует активные формы кислорода (АФК), которые в избытке вызывают окислительное повреждение растений: дестабилизация клеточных мембран, перекисное окисление, повреждение ДНК и белков, что, в свою очередь, ведет к снижению эффективности фотосинтеза и к возможной гибели растения. АФК используются в качестве сигнальных молекул для активации механизма стрессоустойчивости, который заключается в усилении транскрипции регуляторных ферментов, что в свою очередь ведет к активной экспрессии генов биосинтеза антоцианинов [30, 31]. В условиях абиотического стресса, такие формы активного кислорода, как, например, H_2O_2 , могут быстро диффундировать через мембраны, различные клеточные компартменты и вакуоли, вызывая окислительные повреждения [32, 33]. Антоцианы обычно накапливаются в вакуолях, расположенных вблизи мест продукции АФК [34]. Благодаря своим антиоксидантным свойствам, они защищают растения от ингибирования роста и гибели клеток за счет уменьшения окислительного воздействия путем удаления АФК, образовавшихся из-за абиотического стресса. Это позволяет растениям адаптироваться к неблагоприятным условиям окружающей среды [28, 29, 35, 36]. Роль антоцианов в нейтрализации АФК была доказана в лучшей способности красных листьев справляться с избытком активных форм кислорода по сравнению с зелеными листьями (листьев, с дефицитом антоцианов). Зеленые листья имеют

больше эндогенных АФК и более чувствительны к абиотическим стрессорам, тогда как красные листья лучше поглощают активные формы кислорода, не давая им повреждать мембраны клеток [31, 37].

Этот механизм характерен и для плодов. В частности, этот механизм легко просматривается в плодах черники, голубики, клюквы, которые произрастают в северных районах России (Архангельск, Мурманск и др.) или высокогорных областях. Научно доказано, что плоды, выращенные в более благоприятных климатических условиях, накапливают антоцианинов гораздо меньше, чем плоды, созревающие в неблагоприятных для них условиях [38, 39, 40].

1.4. Фармакологическая активность антоцианинов

Антоцианины представляют собой нетоксичные природные пигменты, обладающие антиоксидантным и противовоспалительным действием [38, 40, 41]. Антоцианы также обладают противомикробным, противовирусным, противоаллергическим, антиканцерогенным, антимуtagenным и антипролиферативным действием и, таким образом, могут играть важную роль в предотвращении различных дегенеративных заболеваний [42, 43, 44].

Некоторые исследования показали, что потребление продуктов, богатых антоцианами, может снизить частоту заболеваний сердечно-сосудистой, нервной, эндокринной, пищеварительной, сенсорной, мочевой и иммунной систем, а также рака. Основным механизмом действия антоцианов является ингибирование воспаления и снижение окислительного стресса [45, 46, 47, 48].

Экстракты из плодов голубой жимолости обладают противоопухолевыми свойствами [49, 50, 51], что связано с индукцией ферментов антиоксидантной защиты, ингибированием пролиферации раковых клеток и факторами, вызывающими метастазы. Плоды жимолости также обладают сильными противодиабетическими свойствами. В исследованиях [52] плоды жимолости показали самую сильную ингибирующую активность α -глюкозидазы среди таких плодов как черная смородина, голубика, брусника, красный крыжовник и

черешня. Ингибирование α -глюкозидазы и β -фруктозидазы позволяет замедлить переваривание дисахаридов, что важно для контроля постпрандиальной гипергликемии у пациентов с сахарным диабетом [53, 54]. Кроме того, было показано, что жимолость оказывает положительное влияние на гипертиреоз за счет снижения уровня тиреотропного гормона в организме [55]. Ягоды жимолости также играют важную роль в борьбе с заболеваниями мочевыводящих путей и нарушением пищеварения [56, 57].

Антоцианины, содержащиеся в черноплодной рябине, черной смородине оказывают защитное действие на β -клетки поджелудочной железы от окислительного стресса, обусловленного глюкозой. Также они могут стимулировать секрецию инсулина β -клетками, снижать уровень глюкозы, липопротеинов низкой плотности и триглицеридов в крови и моче. Помимо этого, они могут снижать уровень гликемии и гликозирванного гемоглобина, что в свою очередь предотвращает развитие диабетической катаракты [19, 28, 58, 59, 60, 61].

Клинические исследования *in vitro* показывают, что антоцианины из плодов черноплодной рябины и черной смородины оказывают вазорелаксирующее действие на артерии и вены через активацию эндотелиальной синтазы оксида азота NO (инозитолфосфатный путь). Как результат, они снижают вязкость крови, улучшают капиллярную фильтрацию и уменьшают избыток проницаемости капилляров [62, 63, 64, 65, 66].

Механизмы абсорбции, распределения и метаболизма антоцианинов зависят от структуры вещества, состава растительного материала, дозы, пола, возраста, состояния здоровья испытуемых и других факторов. После введения антоцианины быстро распределяются по тканям организма и выводятся с мочой и желчью. Всего насчитывается более 35 метаболитов антоцианинов, к которым относят протокатеховую кислоту и флороглюцинальдегид, дегидроксилированные и метилированные производные, конъюгаты с глюкуроновой и серной кислотами [67, 68, 69].

Исследования показывают, что максимальная концентрация антоцианинов в плазме крови после одноразового приема пероральным способом достигается через 0,25-2,8 часа и имеет значение в интервале 1,4-592,0 нмоль/л. Период полувыведения занимает от 2 до 7 часов [67, 68, 69]. По структуре и количеству метаболитов, можно предположить, что клиренс антоцианинов заключается, как в энтерогепатической циркуляции, так и микробном метаболизме в толстом и тонком кишечнике.

Суточная доза, которая оказывает фармакологический эффект на взрослого человека составляет от 80 мг до 150 мг. Антоцианины, содержащиеся в обогащенных экстрактах и лекарственных препаратах, не проявляют высокой токсичности и не вызывают серьезных побочных эффектов при соблюдении рекомендуемых доз. Согласно литературным данным, исследования, в которых участвовало более 2200 человек, не выявили серьезных нежелательных реакций [70].

1.5. Природные источники антоцианинов

1.5.1. Жимолость съедобная *Lonicera edulis* Turcz. Ex Freyn

Жимолость съедобная (Рисунок 1.4) – листопадный кустарник со съедобными плодами тёмно-голубого цвета семейства Жимолостные (*Caprifoliaceae*).



Рисунок 1.4 – Внешний вид растения жимолость съедобная (*Lonicera edulis* L.)

Род *Lonicera* насчитывает более 200 сортов. Растение в природе встречается в лесах Европы, Северной Азии и Северной Америки, преимущественно в горных и низменных влажных регионах [71, 72]. На данный момент широко культивируется в Польше, Словении, Чехии и Словакии. Из всех сортов жимолости, фармакопейным является только жимолость японская - *Lonicera japonica* L., которая зарегистрирована в Фармакопее Китайской Народной Республики с 1995 года [73].

Большим преимуществом плода является его высокая устойчивость к низким температурам. Он может выдержать температуру до -40°C , а цветы - до -7°C . Более того, на них не влияют изменения pH почвы, наличие вредителей или болезней [74].

Жимолость демонстрирует высокий оздоровительный потенциал и является перспективным источником многочисленных биологически активных соединений, главным образом антоцианов, фенольных кислот и флавонолов. Уникальной особенностью плодов жимолости является наличие иридоидов, которые являются прекрасным противовоспалительным и антиоксидантным средством.

Растение широко используется в традиционной медицине, особенно в Японии, поскольку оно является исключительным благодаря своим «антивозрастным» свойствам, а также защите от сердечных и желудочно-кишечных заболеваний [50]. Научные исследования подтвердили кардио- и нейропротекторную, противораковую и противовоспалительную активность плодов жимолости [75]. Кроме того, наблюдаются противомикробные и противодиабетические свойства. Указанные особенности в основном связаны с присутствующими в ягодах биологически активными соединениями, главным образом фенольными соединениями, включая антоцианы, хлорогеновую кислоту и кверцетин [76].

Исследования показали, что плоды жимолости содержат тритерпеновые кислоты, β -каротин, катехин, флавонолы, хлорогеновую кислоту и многие другие кислоты [76]. В группу фенольных соединений входят: гидроксикоричные кислоты, гидроксibenзойные кислоты, флаванолы, флавоны, изофлавоны, флавонолы, флаваноны и антоцианы. Из всех фенольных соединений, обнаруженных в плодах жимолости, наибольшая доля (от 36 до 51%) приходится на антоцианины — пеонидиновые гликозиды, цианидин и петунидин. В декабре 2018 года плоды жимолости были зарегистрированы как традиционный продукт питания в соответствии с правилами Европейского Союза.

В Российской Федерации на данный момент нет ни одного зарегистрированного лекарственного препарата на основе плодов жимолости. Различные части жимолости входят в состав БАД. Цветки жимолости входят в состав гомеопатических капель «Ханнисакл» (Жимолость, №16, 10 мл); из плодов жимолости изготавливают водные настои и жимолости экстракт сухой 5% [77].

1.5.2. Черноплодная рябина *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott

Арония черноплодная, или *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott (Рисунок 1.5), является растением семейства «Розоцветные» (лат. Rosáceae). Этот многолетний кустарник, происходящий из Северной Америки, также известный как черноплодная рябина или черноплодная ягода. Плоды шаровидные или чуть вытянутые до 1,5 см в диаметре, голые, черные, блестящие, иногда с сизым налетом, реже темно-красные, сочные. Мякоть плода образована сильно разросшимся гипантием, на верхушке плода имеются малозаметные чашелистики. Внутри плода под чашелистиками заметно скопление большого числа волосков, похожее на паутину. Оно остается от завязи, имеющей на верхушке железисто-волосистое опушение.

Арония черноплодная была завезена в Европу в конце XIX в. Ее культивированием занимался И.В.Мичурин, который в дальнейшем передал ее ростки на плодово-ягодную станцию в Горно-Алтайске и в другие регионы. В настоящее время черноплодная рябина распространена во многих географических зонах России: в Европейской и Западной частях, в Восточной Сибири, на Урале. Такое широкое распространение она получила за счет своей неприхотливости и морозоустойчивости.



Рисунок 1.5 – Внешний вид растения арония черноплодная *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott

Лекарственным сырьем у черноплодной рябины являются плоды свежие (*Fructus Aroniae melanocarpae recens*) и высушенные (*Fructus Aroniae melanocarpae siccus*) [78, 79].

В плодах аронии содержится Р-витаминный комплекс, состоящий из флавоноидов (рутин, кверцитрин, гесперидин, кверцетин), катехинов и антоцианинов. Также в составе присутствуют дубильные вещества, органические кислоты (яблочная, лимонная, шикимовая), глюкозу, фруктозу, а также значительное количество кислоты аскорбиновой (до 110 мг%). В мякоти плодов обнаружено до 4 % йода (на сухую мякоть без семян) [78, 79]. Плоды аронии обладают различными фармакологическими свойствами. За счет антоцианинов, которые входят в их состав, оказывают антиоксидантное действие [80]. Также обладают антиатеросклеротическим, гипогликемическим, спазмолитическим, диуретическим, желчегонным, гипотензивным, гастро-, капилляро-, гепато- и кардиопротекторным действием, предотвращая сердечно-сосудистые заболевания [59]. Сок из свежих плодов черноплодной рябины используется для лечения ожогов [81, 82]. Высушенные плоды аронии обладают противовоспалительными и антидиарейными свойствами [59, 83, 84].

Свежие плоды аронии и ее сок используются в качестве самостоятельных лекарственных препаратов. На основе высушенных плодов готовят отвар. В промышленном масштабе выпускают эликсир «Кедровит» (производитель ООО «Люми», г. Санкт-Петербург, Россия). Экстракт черноплодной рябины входит в состав таблеток «Шиповит», сиропов «Арбидол-Эхинацея» и «Рябина с калиной», капсул «Рибалипт» [77].

1.5.3. Голубика высокорослая *Vaccinium corymbosum* L.

Голубика высокорослая *Vaccinium corymbosum* L. (Рисунок 1.6) – многолетний листопадный кустарник семейства Вересковые (*лат. Ericaceae*), средней высотой и диаметром кроны около 2 метров. Сорт голубики высокорослой был выведен в середине XX века в США. Селекционный отбор

проводился из нескольких дикорастущих видов: голубика щитковая *V. corymbosum* L., голубика узколистная *V. Angustifolium* Ait., голубика канадская *V. myrtilloides* Michx., голубика южная *V. australe* Sm. На основе перечисленных видов за столетие было выведено большое количество сортов. В настоящее время голубика высокорослая является одной из самых перспективных плодово-ягодных культур.



Рисунок 1.6 – Внешний вид растения голубика высокорослая *Vaccinium corymbosum* L

Культура растет в умеренном и холодном климате. Заросли голубики произрастают в тундре, верхних поясах горной местности, лесных зонах. Ареалом распространения в России является Дальний Восток, Сибирь, Евразийская часть. Может занимать не только крупные территории, но и расти «островками». Примером последнего является Кавказ. Наиболее пригодны торфяно-песчаные и торфяно-суглинистые, кислые почвы.

Растение повсеместно встречается в Евразии, растет на северных японских и Британских островах, Пиренейском полуострове. Кустарники голубики произрастают в Исландии, Северной Америке и Африке.

В течение последнего десятилетия крупнейшими мировыми производителями и экспортерами голубики остаются Китай, США, Чили, Перу, Мексика, Канада, Польша, Испания, ЮАР. Сорты голубики высокорослой северной селекции подходят для культивирования на территории РФ. Хотя голубика обладает высоким адаптивным потенциалом и легко приспосабливается к условиям внешней среды, при подборе сортов следует учитывать климатические особенности региона выращивания и такие характеристики сортов как морозостойкость, засухоустойчивость, длительность вегетативного периода, устойчивость к возвратным морозам, продуктивность и возможность возделывания в промышленных масштабах.

В голубике высокорослой содержатся различные группы полифенольных антиоксидантов (антоцианины, катехины, проантоцианидины, флавонолы, гидроксикоричные кислоты (ГКК), гидроксibenзойные кислоты), иридоиды (преимущественно монотропеин), олеаноловая и урсоловая кислоты, водо- и жирорастворимые витамины, микроэлементы. Кроме того, голубика является дополнительным источником клетчатки, которая имеет очень большое значение в нашем рационе и выполняет множество функций. Состав ягод голубики отличается высоким содержанием витаминов С, К, Е. В умеренных количествах в плодах содержатся железо, цинк, магний, калий, фосфор.

В состав также входят пектиновые вещества, органические кислоты, сахара. Причём, в культивируемой высокорослой голубике сахаров примерно в два раза больше, чем в дикой. И этот показатель можно ещё существенно увеличить, если 4-6 дней «подержать» плоды на кусте после окрашивания.

Антоцианины голубики улучшают работу зрительного аппарата, оказывают защитное воздействие на сердечно-сосудистую систему, предотвращая развитие атеросклероза, вызванное повышенным уровнем холестерина, уменьшают окислительное и воспалительное повреждение эндотелия за счет подавления

высвобождения медиаторов воспаления, снижают систолическое и среднее артериальное давление, обладают противодиабетическими, антибактериальными и противовоспалительными свойствами [85, 86, 87]. Помимо этого, фитоэстрогены голубики защищают от болезней сердца и сосудов (снижают «плохой» холестерин, задерживают развитие атеросклероза), кофейная и хлорогеновая кислоты оказывают капилляроукрепляющее, моче- и желчегонное действие.

В России лекарственных препаратов на основе плодов голубики не производится. Выпускаются БАДы на основе экстрактов голубики: «Голубитокс», голубичный экстракт в капсулах и таблетках, голубичный сироп.

1.5.4. Черная смородина *Ribes nigrum*

Черная смородина *Ribes nigrum* L. (Рисунок 1.7) – листопадный кустарник семейства Крыжовниковые *Grossulariaceae*.



Рисунок 1.7 – Внешний вид растения черная смородина *Ribes nigrum*

Черная смородина произошла от *Ribes vulgare* Lam. – смородины обыкновенной, *R. rubrum* L. – смородины красной и *R. petreum* Wulf. – смородины скалистой. В России выращивается с XI в. В Европе известна в культуре начиная с XVI в. Культивируется в Нечерноземной зоне, Центрально-Черноземных районах, в Поволжье, на Урале, в Сибири, на Дальнем Востоке.

Достаточно зимостойка и засухоустойчива, высокоурожайна, устойчива к почковому клещу и махровости. Оптимальная температура роста и развития 18-20° С. Может расти на разных почвах: черноземах, слабокислых подзолах, и даже на слабосолонцеватых. Предпочитает супесчаные и суглинистые почвы.

В Российской Федерации лекарственным растительным сырьем являются высушенные плоды (*Fructus Ribis nigri siccus*) и листья (*Folia Ribis nigri siccus*) [88]. В Британской фармакопее 2024 и Европейской фармакопее 11th включены плоды черной смородины свежие (*Fructus Ribis nigri recens*) и листья черной смородины (*Folia Ribis nigri*) [89, 90].

Плоды черной смородины содержат пектины, различные органические кислоты (яблочную, лимонную, изолимонную, янтарную, винную), моносахариды (глюкозу и фруктозу), а также до 350 мг/100 г аскорбиновой кислоты. Сорты, выращенные в центрально-черноземных районах и на Алтае, содержат гораздо больше аскорбиновой кислоты и пектина, чем в южных регионах. Они богаты антоцианинами, флавоноидами, дубильными веществами, каротиноидами и витаминами группы В. В семенах черной смородины содержатся липиды, включающие линолевую, гамма-линоленовую, бета-линоленовую и стеарионовую кислоты. Во всех частях растения присутствует эфирное масло, содержащее терпены, алифатические и ароматические спирты, эфиры, а также фенилпропаноиды.

Фитохимические вещества чёрной смородины проявляют антимикробные, нейропротективные, гипотензивные, иммуномодулирующие, потогонные эффекты разной степени выраженности, а также мощные антирадиационные, антиоксидантные и противовоспалительные свойства.

Экспериментальные исследования показали, что сок черной смородины, благодаря антиоксидантным свойствам защищает мембрану эритроцитов от разрушения при воздействии свободного кислорода и ультрафиолетового излучения.

Также плоды черной смородины обладают антигликозидазной активностью. Жмых ягод смородины оказывает терапевтическое воздействие при нарушениях во внутренних органах, вызванных длительным потреблением фруктозы [91].

Антоцианины плодов черной смородины обладают капилляроукрепляющей активностью, антиоксидантным, антибактериальным и антиканцерогенным свойствами и широко применяются в медицине для лечения и предупреждения ряда заболеваний. Антиоксидантные свойства у антоцианов и их сходство к тканям глаза позволяет оказывать положительное воздействие на глаза при различных зрительных и окислительных стрессах, способствуя накоплению глутатиона (определяет антиоксидантную защиту тканей) в глазах и предохраняет от повреждений свободными радикалами. Кроме того, отмечается усиление остроты зрения в сумерках [92, 93].

В настоящее время ведутся исследования по использованию препаратов на основе полисахаридов чёрной смородины для лечения атопического дерматита. В экспериментах на лабораторных мышах препарат на их основе воздействовал на иммунную систему, подавлял миграцию тучных клеток в кожу эпидермиса и гиперпродукцию иммуноглобулина Е, что в дальнейшем смягчало симптомы атопического дерматита [94].

Арабиногалактановый белок, выделенный из семян растения, в умеренной степени препятствует прилипанию бактерии *Helicobacter pylori* к стенкам желудка (в эксперименте на срезах слизистой оболочки), что потенциально можно использовать в лечении гастрита и язвенной болезни [94].

Для приготовления настоя используются высушенные плоды черной смородины. Свежие плоды, а также сок и сироп на их основе являются отдельными лекарственными препаратами (ЛП) [77, 88, 91]. Помимо этого, они

входят в состав многокомпонентных ЛП: витаминного сбора №1, настойки «Герботон» и эликсира «Травохол» (ООО «Гиппократ», Россия).

1.6. Физико-химические свойства антоцианинов

Антоцианины представляют собой окрашенные порошки кристаллической структуры, цвет которых варьируется от красно-оранжевого до пурпурно-синего. Однако из-за своей высокой гигроскопичности они обычно не встречаются в кристаллической форме, так как превращаются в аморфную субстанцию из-за поглощения влаги. Антоцианы хранятся в клеточных вакуолях растительных клеток и придают им характерную окраску [45]. Агликоны, которые свободны от гликозилирования, легко растворимы в воде и других полярных растворителях, нерастворимы в хлороформе, бензоле, эфире и других липофильных растворителях [27, 43]. При нагревании с разбавленными кислотами отщепляется остаток углевода с образованием пирилиевых солей, которыми обусловлено разнообразие окрасок плодов и цветков растений. Сами по себе антоцианидины нестабильны и подвержены быстрому разрушению. Благодаря процессу гликозилирования происходит стабилизация их структуры, а также повышается растворимость антоцианидинов в воде.

Полярная природа функциональной группы –ОН делает антоцианы водорастворимыми [45], и они могут существовать в виде смеси четырех молекулярных форм. рН является важным фактором, определяющим внешний вид антоцианов. Катионы флавилия являются основной формой при рН 1–2 и имеют красный цвет. Псевдооснование карбинола образуется в результате депротонирования и гидратации при рН 3–6 и не имеет окраски. Хиноидное основание образуется при рН 6–8 и имеет фиолетовый и синий цвета. Наконец, при рН 8 образуется халкон, имеющий желтоватый цвет. Кроме того, температура, влажность, ультрафиолетовый свет, соленость окружающей среды и процессы, связанные с обработкой пищевых продуктов, также изменяют цвет

антоцианов [45, 95]. Плавятся антоцианины при температуре от 210 до 260 °С [90].

Антоцианиновые пигменты в природе являются неустойчивыми и реакционноспособными соединениями. Устойчивость антоцианинов зависит от различных факторов, таких как концентрация, рН, структура, растворитель, температура, свет, кислород, ферменты и другие компоненты матрикса [10, 43, 56].

На стабильность антоцианинов значительное воздействие оказывают гликозидная часть и ацильные группы, которые присоединены к антоцианидинам, а также их расположение. Повышение уровня гидроксирования молекулы обычно увеличивает ее устойчивость, в то же время метилирование гидроксильных групп снижает ее. Антоцианины, содержащие остатки ди- и трисахаридов, обычно более устойчивы, чем те, где присутствуют моносахариды. Моногликозилированные антоцианины по степени стабильности можно расположить следующим образом: глюкозиды > арабинозиды > галактозиды и ксилозиды. Также к увеличению стабильности ведет ацилирование гликозидных остатков в сравнении с их неацилированными формами.

В водной среде для антоцианов характерны процессы структурной трансформации – изомеризации и таутомеризации (Рисунок 1.8). Эти процессы связаны с переходом протона в зависимости от рН среды. При низких значениях рН антоцианы будут иметь красную окраску, при нейтральных и слабощелочных – сине-фиолетовую. Более высокие значения рН будут давать бесцветную форму.

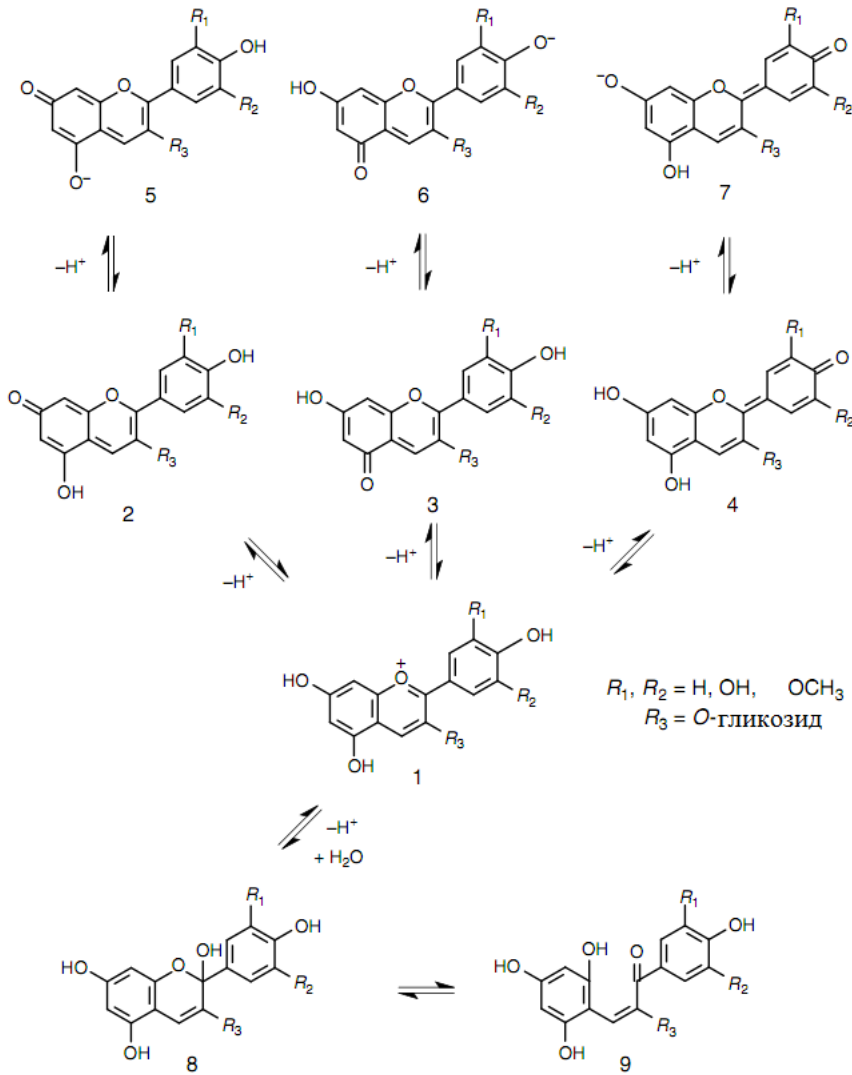


Рисунок 1.8 – Изменения структуры антоцианов в водном растворе при разных значениях рН

При низких значениях рН (рН = 1- 2) антоцианины в большей степени переходят в форму окрашенного катиона флавилия АН⁺ (1), гликозилированного в С₃ положении. Внутри клеток растений флавилиевые катионы обычно находятся в виде солей с различными кислотами, как органическими, так и неорганическими.

В слабокислом и нейтральном водных растворах (рН от 3 до 6) растворимость солей флавилия обуславливается за счет образования промежуточных нейтральных форм (2-4). В нейтральном и слабощелочном растворе (рН от 7 до 8) – за счет ионизированных хиноидных оснований синефиолетового цвета (5-7). Тем не менее, для большинства 3-гликозидов и 3,5-

дигликозидов характерен переход в карбинольную (8) и халконовую(9) формы из-за большей структурной стабильности (Рисунок 1.8).

При значениях рН от 3 до 6 происходит образование бесцветного карбинола, за счет быстрой и практически полной гидратация катиона флавилия в положении С₂. Как итог, достигается химическое равновесие за счет превращения карбинола в открытую форму – халкон (также бесцветный).

При увеличении температуры скорость разрушения антоцианинов также возрастает. При нагревании выше 50° С и рН в пределах от 2 до 4 происходит частичный гидролиз гликозидной связи, что ведет к утрате гликозидного остатка. При термическом разрушении происходит быстрое обесцвечивание свободного агликона, за счет его перехода в форму халкона. Затем, при наличии кислорода, образуются продукты деградации от бурого до коричневого цвета [18, 94, 96, 97, 98]. Более низкие температуры (0 -15 °С), наоборот, благоприятно сказываются на содержании и накоплении антоциановых пигментов [10].

Наличие кислорода так же, как и высокая температура, оказывает негативное воздействие на антоцианины, способствуя их разрушению. После окисления промежуточных форм, которые в дальнейшем реагируют с антоцианинами, происходит усиленный синтез бесцветных форм и продуктов деградации [10]. Антоцианины как антиоксиданты взаимодействуют с пероксидными радикалами. Они обладают способностью поглощать свободные радикалы, такие как активные формы кислорода и азота [45]. Флавилиевый скелет придает антоцианам особые свойства, связанные с делокализацией радикальных электронов на sp²-орбиталях оксониевого фрагмента. Центральная роль антиоксидантной активности заключается в окислении фенольных гидроксильных групп антоцианов; в частности, пара- и ортофенольных групп, которые важны для образования семихинонов и стабилизации продуктов одноэлектронного окисления [45, 99, 100]. Антоцианы могут гасить активные радикалы за счет реакции переноса одного электрона и за счет отрыва атома водорода от фенольных групп. Положения 3' и 4' имеют основополагающее значение для антиоксидантной способности этих соединений. Катехоловые фрагменты (3'- и

4'-дигидроксифенильные группы) в кольце В ответственны за антиоксидантную силу широкого спектра полифенолов и флавоноидов благодаря способности образовывать орто-семихиноны, а затем орто-хиноны посредством двух последовательных реакций переноса одного электрона. В случае цианидина наличие дополнительных гидроксильных групп в кольцах А и С может привести к появлению дополнительных центров удаления окислителя и делокализации радикала. Положения С₃, С₅ и С₇ цианидина могут быть окислены с образованием псевдосемихиноновых частиц, делокализующих электроны через хроменильный цикл (кольца А и С) и стабилизирующих образовавшиеся радикалы. Эти виды могут подвергаться дальнейшему окислению с образованием 3,5 или 3,7 псевдохиноновых структур, которые впоследствии могут изомеризоваться посредством кето-енольной таутомерии [44, 99, 100].

Солнечный свет оказывает не однозначное влияние на антоцианины. Он необходим для их биосинтеза в клетке, но в тоже время ускоряет их деградацию. Хранение антоцианинов лучше осуществлять в темном, прохладном месте.

Гликозидазы являются наиболее распространенными ферментами, которые снижают стабильность антоцианинов. Они высвобождают связанные агликоны, которые в дальнейшем быстро разрушаются, за счет разрыва гликозидной связи. Уменьшению количества антоцианинов способствуют и другие ферменты природного происхождения: фенолазы и пероксидазы. На устойчивость к воздействию данных ферментов, непосредственно, влияет структура антоцианина. Например, гликозиды дельфинидина более подвержены влиянию полифенолоксидазы, чем гликозиды мальвидина, а гликозиды пеларгонидина не вступают в данную реакцию [10].

1.7. Современные подходы к анализу антоцианинов

Поиск новых источников антоцианинов природного происхождения и изучение их биоактивности продолжают уже несколько десятилетий в связи с

растущим спросом на натуральные продукты с полезными для здоровья свойствами.

Разделение антоцианов является сложной задачей во многих аспектах. Упомянутые выше плоды растений богаты соединениями полифенольной природы, в частности антоцианинами, однако большинство этих биологически активных соединений разлагаются под воздействием высоких температур, кислорода и света – условий, которые могут снизить пищевую ценность во время обработки и хранения продукта.

Существуют различные инструментальные аналитические методы для идентификации и количественной характеристики антоцианинов в разных матрицах. К ним относятся спектральные методы анализа (спектроскопия в видимой и ультрафиолетовой (УФ) областях), хроматографические (тонкослойная хроматография/высокоэффективная тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография с различными детекторами), ядерный магнитный резонанс (ЯМР), капиллярный зональный электрофорез. Перечисленные методы имеют различную аналитическую основу, чувствительность и специфичность. Тонкослойная хроматография и спектроскопия в УФ и видимой областях традиционно используются для идентификации антоцианов. Капиллярный зональный электрофорез, гибриды хроматографии и электрофореза набирает популярность в анализе антоцианинов; высокоэффективная жидкостная хроматография стала стандартным методом идентификации и разделения в большинстве лабораторий и используется для количественного анализа антоцианинов как в Российской Федерации, так и за рубежом [100].

1.7.1. Спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой области

Количественное определение содержания антоцианинов в разнообразных матриксах возможно благодаря их спектральным характеристикам. В российской государственной и других европейских фармакопеях используется прямой метод

[88, 89, 90], однако более точным и специфичным является метод рН-дифференциальной спектрофотометрии [97, 101, 102]. В прямом методе измерение оптической плотности антоцианинов осуществляется при длине волны максимума поглощения. рН-дифференциальная спектрофотометрия, в свою очередь, основана на структурной трансформации хромофора в зависимости от рН раствора (Рисунок 1.9).

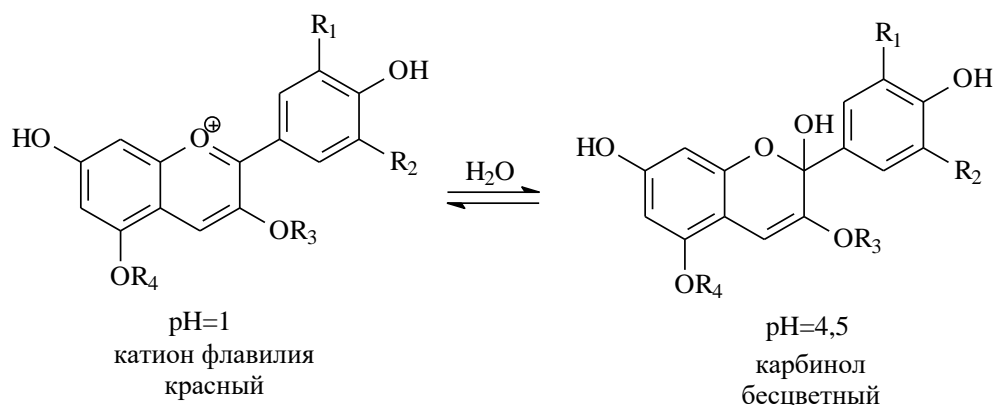


Рисунок 1.9 – Таутомерные переходы антоцианинов в буферных растворах при рН=1 и рН=4,5

Как указано на Рисунке 1.9, при рН=1 раствор имеет ярко-красный цвет за счет перехода всех форм антоцианинов в форму катиона флавилия. При рН=4.5 раствор становится бесцветным из-за перехода катиона в форму карбинола.

Полимерные формы, а также неферментативно окисленные формы антоцианиновых пигментов не подвергаются обратимому изменению структуры при изменении рН, что исключает их вклад при расчете поглощения [97]. Этот метод направлен на определение мономерных форм антоцианинов, которые и являются фармакологически значимыми.

Для расчета суммарного содержания антоцианинов используются коэффициент молярной экстинкции, удельный показатель поглощения или коэффициент пересчета и молекулярная масса цианидин-3-глюкозида, как наиболее распространенного антоцианина в природе.

В данном методе пересчет содержания антоцианинов ведется на цианидин-3-глюкозид при длине волны 510 нм. Коэффициента молярной экстинкции

цианидин-3-глюкозида в буфере с $\text{pH}=1$ равен $26900 \text{ л/моль} \times \text{см}$. [103]. В 2005 году Ассоциация Официальных Аналитических Химиков (АОАС) аттестовала определение антоциановых пигментов с помощью метода pH -дифференциальной СФМ по всем основным показателям согласно российским и международным требованиям к валидации аналитических методов [97, 104, 105, 106] и приняла в качестве официального метода (АОАС 2005.02.). Данный метод быстро и точно помогает оценить общее содержание мономерных форм антоцианинов. Для определения профиля антоцианинов используют хроматографические методы.

1.7.2. Хроматографические методы определения антоцианинов

Исторически для разделения антоцианинов использовалось два хроматографических метода: метод бумажной хроматографии (БХ) и тонкослойной хроматографии (ТСХ). Для разделения использовали хроматографическую камеру и подходящую подвижную фазу. Пробу наносили на фильтровальную бумагу, например, «Whatman» (БХ) или хроматографическую пластинку (ТСХ).

1.7.2.1. Тонкослойная хроматография

Метод тонкослойной хроматографии включен в различные частные фармакопейные статьи для определения примесей и подтверждения подлинности основных групп биологически активных веществ. Это частные фармакопейные статьи государственной фармакопеи XIV издания на плоды черники обыкновенной, плоды аронии черноплодной свежие и сухие, цветы василька синего [77, 78, 107, 108].

В европейские фармакопеи включены ФС на плоды черники свежие и сухой стандартизированный экстракт черники. В качестве экстрагента используется этанол 96%, подкисленный 1% раствором хлористоводородной кислоты. Подвижная фаза: бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2).

Хроматографирование восходящим способом в течение 5 часов. Неподвижная фаза – силикагель.

Другим составом подвижной фазы, зарекомендовавшим себя в отличном разделении антоцианинов сухого экстракта черники, является вода – уксусная кислота – хлористоводородная кислота (82:15:3). Данный состав имеет высокую степень разделения дельфинидин-3-глюкозида и цианидин-3-глюкозида, двух основных антоцианинов черники [89, 90]. Для дальнейшего анализа полученные окрашенные пятна можно вырезать и элюировать в водном или водно-органическом растворителе.

ТСХ обладает некоторыми преимуществами в сравнении с более старым вариантом – бумажной хроматографией (БХ): простое и быстрое проявление разделения, минимальный расход анализа, большая гибкость хроматографических систем, автоматизация всех стадий процессов, возможность сочетания с другими инструментальными методами.

Несмотря на низкую стоимость проведения анализа и постоянное совершенствование методик, к недостаткам метода относятся: ограниченная разделяющая способность, зависимость величины R_f проведения исследований от условий (температура, влажность и др.), низкая чувствительность, а также трудность в работе с антоцианинами, которые чувствительны к свету и кислороду воздуха. Все это заставляет исследователей делать выбор в пользу других более чувствительных и точных методов анализа такой сложной группы БАВ как антоцианы.

1.7.2.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография

На данный момент обращенно-фазовая (ОФ) высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является предпочтительным методом для качественного и количественного анализа антоцианинов. Различные типы детекторов, например, спектрофотометрический и масс-спектрометрический,

позволяют разделить сходные по структуре индивидуальные антоцианины в сложных растительных матрицах.

На данный момент не существует единой стандартной процедуры анализа антоцианов с помощью ВЭЖХ. Чаще всего в анализе используется ОФ колонка с силикагелем, химически связанным с C18. Помимо этого используются колонки на октадецилсилане, полистироле и колонки с фенильной связью [109]. Системы с нормальной фазой или те, в которых используется не модифицированный силикагель, неэффективны для разделения антоцианов из-за полярности этих соединений [10].

В методах ВЭЖХ, как правило, используется градиент системы растворителей ацетонитрил-вода или метанол-вода с небольшим количеством кислоты для снижения рН раствора и повышения стабильности антоцианов (рН меньше 2 не дает переходить катиону флавилия в хиноидные структуры, что в свою очередь может привести к худшему разделению пиков и уменьшить предел обнаружения) [9, 10, 109]. Данные растворители наиболее популярны из-за их совместимости с градиентными методами выделения и различными методами обнаружения в сочетании с ВЭЖХ, используемые для идентификации.

Для получения воспроизводимых результатов, необходимо контролировать рН подвижной фазы и температуру колонки. Это связано с высокой нестабильностью антоциановых соединений, которые реагируют на любое изменение рН и температуры окружающей среды.

На время удерживания антоцианинов будут влиять следующие параметры: природа агликона, число и природа ацильных остатков, гликозидных остатков.

При обращенно-фазовой хроматографии время удерживания уменьшается с увеличением полярности. Порядок элюирования основных антоцианидинов следующий: дельфинидин, цианидин, петунидин, пеларгонидин, пеонидин и мальвидин. Это соответствует увеличению количества гидроксильных фрагментов у иона флавилия, которое отображается на времени и порядке их элюирования. Также на порядок элюирования влияют число и положение, в которое прикреплены гликозидные остатки. Тригликозиды будут иметь самое

низкое время удерживания. За ними следуют дигликозилированные антоцианины: 3,7-дигликозиды, 3,5-дигликозиды, 3-дигликозиды. Затем идут моногликозилированные антоцианы, агликоны и, наконец, ацилированные антоцианы [10, 106].

Моногликозилированные антоцианы будут элюироваться в следующем порядке: галактозиды, вицианозиды, латирозиды, самбубиозиды, глюкозиды, арабинозиды, рутинозиды, ксилозиды [10, 106].

На порядок выхода ацилированных форм антоцианинов будет влиять и стереохимия. Например, цис-форма кумароилгликозида будет выходить раньше, чем трансизомер [110].

Антоцианины имеют два характерных для их класса максимума поглощения, которые обусловлены наличием фенилпропана и бензопирана в их структуре. Первый максимум, характерный для всего класса флавоноидов, у антоцианинов проявляется при длине волны 280 ± 5 нм (ультрафиолетовая область). Вторым максимумом возникает за счет флавилий-катиона, окрашенного в красный цвет в кислой среде, при длине волны около 520 нм (видимая часть спектра). Именно второй максимум позволяет точно отличить антоцианины от других флавоноидов, которые присутствуют в составе сложной биологической матрицы. Для идентификации пиков используются времена удерживания, спектральные характеристики и сравнение полученных хроматограмм с библиотекой данных в литературе.

В зависимости от того, при какой длине волны проявляется максимум поглощения (Таблица 1.1), можно предположить структуру проантоцианидина, которая образует данный антоцианин. Например, производные пеларгонидина и цианидина имеют максимумы при меньших длинах волн, чем производные дельфинидина [106, 111].

Если ацилирование антоцианинов происходит за счет остатков гидроксисоричных кислот, то на спектре это отображается появлением дополнительного максимума при 310-330 нм. При ацилировании за счет гидроксibenзойных кислот или алифатических кислот, которые поглощают при

270-290 и менее 210 нм соответственно, данный максимум отсутствует [43, 111, 112].

Большинство работ проводится с использованием стандарта цианидин-3-глюкозида, так как доступность и стабильность отдельных антоцианидинов весьма мала.

Результаты, полученные методом ВЭЖХ, чаще всего используют для идентификации отдельных антоцианинов. Для подсчета суммарного содержания прибегают к данным, полученным методом рН-дифференциальной спектрофотометрии.

1.7.2.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

Комбинация ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором (МСД) оказала значительное влияние на качественные и количественные аналитические методы определения антоцианинов в последнее десятилетие. Масс-спектрометрия (МС) является очень чувствительным методом молекулярного анализа. Принцип метода основывается на разделении веществ по массе, благодаря чему достигается высокий уровень селективности и идентификации отдельных соединений в смеси [9]. В зависимости от задачи для комбинирования МС и ВЭЖХ используются разные интерфейсы и, соответственно, разные методы ионизации.

Среди методов ионизации масс-спектрометрии, наиболее подходящих для химии антоцианов, выделяют:

- 1) CF-FAB – непрерывный поток, бомбардирующий быстрыми атомами;
- 2) MALDI – матричная лазерная десорбционная ионизация;
- 3) APCI – химическая ионизация при атмосферном давлении;
- 4) ESI – ионизация электрораспылением.

В течение первых нескольких лет после появления, ВЭЖХ-МС-CF-FAB являлась наиболее распространенной техникой ионизации [10, 109].

Однако, по мере развития технологии ВЭЖХ-МС, стали очевидны недостатки бомбардировки быстрыми атомами, в частности тот факт, что анализу должна предшествовать очистка и растворение образца в полярной фазе перед вводом в анализатор.

На данный момент, наиболее подходящим для анализа антоцианинов, считается ионизация электрораспылением (ESI). ESI является методом мягкой ионизации, который создает газообразные ионы из сильно заряженных капель испаряющейся жидкости, что делает его подходящим для небольших растительных метаболитов, таких как антоцианы. Благодаря данному типу ионизации, удастся избежать фрагментирования и получить неповрежденные молекулярные ионы. Особенно это важно для термолабильных и полярных соединений. Также ионизация электрораспылением дает возможность вводить жидкие образцы в МС с минимальными манипуляциями, успешно избегая общих проблем, присутствующих в ВЭЖХ-МС- CF-FAB [113].

Для детектирования масс молекулярных ионов антоцианинов используется положительный режим регистрации. Это объясняется наличием положительно заряженного атома кислорода на бензопирановом кольце. Если же проводить ионизацию в отрицательном режиме, при котором происходит депротонирование молекулярного иона, интенсивность и чувствительность регистрируемых пиков будет ощутимо ниже.

Важно отметить, что добавление фосфорной кислоты, а также использование подвижных фаз на ее основе, которые широко используются в ВЭЖХ на диодной матрице и УФ-детекторе, не рекомендуется. Фосфорная кислота добавляется для лучшего разделения антоцианинов, но в случае с ВЭЖХ-МС-ESI, ее наличие в системе быстро загрязняет источник, подавляет сигнал и увеличивает фон. Все это приводит к сниженной чувствительности и невозможности воспроизводимости результатов. Для подкисления подвижной фазы до необходимого уровня используются водные растворы уксусной, муравьиной и трифторуксусной кислот.

Применение тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) также возможно для установления структуры антоцианинов. Метод тандемной масс-спектрометрии заключается в возможности фрагментирования молекул после их диссоциации, вызванной низкоэнергетическими столкновениями (CID) и достигающаяся за счет ионной ловушки (IT) и тройного квадруполя (QqQ). Квадруполевая ионная ловушка является наиболее распространенным типом анализатора для ВЭЖХ-МС-ESI, который позволяет упростить интерпретацию сложных смесей, не исключая при этом идентификацию второстепенных пиков [106]. Она также служит детектором с исключительно высокой специфичностью благодаря масс-фильтру, способному пропускать только выбранный ион. В устройстве ловушки имеется три квадруполя, в которых первый (Q1) и третий (Q3) квадруполь действуют как фильтры масс, а средний (Q2) квадруполь используется как ячейка столкновений, в которой происходит ионизация. Этот процесс фильтрации работает по отношению массы к заряду (m/z) и позволяет изучать фрагменты, которые имеют решающее значение в установлении структуры. Например, Q1 можно настроить так, чтобы он отфильтровывал ион известной массы, который фрагментирован в Q2, а затем Q3 может быть настроен на сканирование всего диапазона m/z , что дает информацию о размерах полученных фрагментов, а также информация об этом конкретном ионном фрагменте. Таким образом, можно вывести структуру исходного иона [111].

Благодаря этим приборам можно проводить контролируемую фрагментацию, выбирая и разделяя ион с нужным отношением массы к заряду. Данные манипуляции рассматриваются как дополнительное подтверждение при установлении структуры агликона, а также присоединенных к нему сахаров, их количества, природы и порядка присоединения.

1.7.3. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Создание современных магнитов с высокой проводящей способностью, а также импульсных генераторов, открывает новые горизонты в структурном

анализе антоцианов. По сравнению с хроматографическим анализом, отдельно взятый метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия, ЯМР) менее чувствителен, но в то же время он не приводит к фрагментации, более простой в пробоподготовке и его результаты легко воспроизводимы. С его помощью возможно одновременное обнаружение множества органических компонентов и профилирование широкого спектра вторичных метаболитов в сложных смесях. На данный момент методы ЯМР чаще всего используются для идентификации антоцианов и изучения их точных структурных характеристик, а также для установления механизмов их действия, что может привести к лучшему применению этих соединений в качестве функциональных ингредиентов [114].

Сочетание таких методов как высокоэффективная жидкостная хроматография и ЯМР может использоваться для идентификации цис- и транс-форм изомеров, что возможно за счет разности в значениях констант взаимодействия в спектрах ВЭЖХ – ^1H -ЯМР. Более высокая константа связи (16 Гц) и меньшая (10 Гц) характерна для транс- и цис-изомеров, соответственно [115].

Методы ЯМР в сочетании с хемометрикой недавно были применены для составления метаболического профиля и определения географического происхождения источника растительных материалов.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. В результате информационного исследования проанализировано современное состояние и перспективы использования различного лекарственного растительного сырья, содержащего антоцианы в медицинской и фармацевтической промышленности на территории Российской Федерации и за рубежом.

2. Описаны сырьевые источники, культивируемые на территории Российской Федерации в плодах, которых содержатся антоцианы, а также их интеграция в Государственные Фармакопеи Российской Федерации и другие ведущие Фармакопеи мира.

3. Рассмотрены фармакологические, физико-химические и биологические свойства антоцианинов.

4. Проведен анализ современных методов экстракции антоцианинов, таких как сверхкритическая флюидная экстракция, ультразвуковая экстракция, микроволновая экстракция, а также водная экстракция и использованием ферментов.

5. На основе физико-химических свойств антоцианинов, выделены наиболее чувствительные и специфичные хроматографические и спектральные методы анализа антоцианинов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования в данной работе являются:

— замороженные плоды жимолости голубой – 20 селекционных сортов российского, канадского и американского происхождения, собранные в ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина» в 2021 году (Таблица 2.1);

— замороженные плоды аронии черноплодной – 5 селекционных сортов российского (Черноплодная, Мулатка) белорусского (Надзея, Вениса) и датского (Арон) происхождения, собранные в ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина» в 2022 году;

— замороженные плоды голубики высокорослой – 7 северных селекционных сортов (Ковилл, Эллиотт, Блюрей, Блюголд, Голдтраубе 71, Спартан, Ронкокас), собранные на экспериментальной площадке сортоизучения ФГБНУ «ФНЦ им. И.М. Мичурина» (г. Мичуринск Тамбовской области) и ООО «Агрофирма «СадМашСервис» (Мичуринский район) РФ в 2023 году;

— замороженные плоды черной смородины – 3 селекционных сорта (Деметра, Созвездие, Элевеста), собранные в ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина» в 2021 году.

Таблица 2.1 – Исследованные сорта плодов жимолости голубой, аронии черноплодной, голубики высокорослой и черной смородины

Жимолость голубая				
№	Наименование сорта	Происхождение сорта	Место селекции	Страна селекции
1.	Авача	Сеянец от свободного опыления сорта 'Киев № 8' (<i>L. kamtschatika</i>)	ФГБНУ «ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»	Россия
2.	Аврора	'Соловей' (<i>L. kamtschatika</i>) × МТ46.55	University of Saskatchewan	Канада

Продолжение Таблицы 2.1

3.	Бакчарский великан	Гибридный сеянец F ₃ , полученный из семьи 1-39-23 (<i>L. venulosa</i> subsp. <i>edulis</i>) × 'Роксана' (<i>L. kamtschatika</i>)	ОГУП «Бакчарское»	Россия
4.	Барышня	Сеянец от свободного опыления формы 4-83-2 (<i>L. kamtschatika</i>)	ФГБНУ «ФИЦ имени И.В. Мичурина»	Россия
5.	Блю Банана	Гибрид F4 <i>L. caerulea</i> subsp. <i>turczaninowii</i> Pojark (группа сортов Blue Moose селекции Lydia Stewart)	“Berries Unlimited”, Арканзас	США
6.	Бореал Бист	'Киев № 7' × 'Томичка' (<i>L. kamtschatika</i>)	University of Saskatchewan	Канада
7.	Бореал Близзард	Сеянец от свободного опыления сорта 'Соловей' (<i>L. kamtschatika</i>)	University of Saskatchewan	Канада
8.	Бореал Бьюти	Гибрид японских и российских (континентальных и курильских) сортов	University of Saskatchewan	Канада
9.	Волхова	Сеянец от свободного опыления сорта 'Павловская' (<i>L. kamtschatika</i>)	ФГБНУ «ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»	Россия
10.	Индиго Гем	'Киев № 8' × 'Томичка' (<i>L. kamtschatika</i>)	University of Saskatchewan	Канада
11.	Княгиня	Сеянец от свободного опыления сорта 'Богдана' (<i>L. kamtschatika</i>)	ФГБНУ «ФИЦ имени И.В. Мичурина»	Россия
12.	Маша	'Васюганская' (<i>L. venulosa</i>) × элитная форма <i>L. kamtschatika</i> 102	ФГБНУ «ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»	Россия
13.	Морена	Скращивание элитных форм № 110 и № 21-5 (<i>L. venulosa</i>)	ФГБНУ «ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»	Россия
14.	Нимфа	Гамма-сеянец от свободного опыления сорта 'Ленинградский великан' (<i>L. kamtschatika</i>)	ФГБНУ «ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»	Россия
15.	Огненный опал	От свободного опыления отборной формы жимолости второго поколения <i>L. altaica</i> Pall. из Казахстана	ФГБНУ «Научно-исследовательский институт садоводства Сибири имени М.А. Лисавенко»	Россия
16.	Синий утес	Сеянец от свободного опыления 2-64-32	ОГУП «Бакчарское»	Россия

Продолжение Таблицы 2.1

17.	Славянка	Элитная формы № 21-5 (<i>L. kamtschatica</i>) из Приморской края × 'Ленинградский великан' (<i>L. kamtschatica</i>)	ФГБНУ «ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»	Россия
18.	Содружество	'Камчадалка' (<i>L. kamtschatica</i>) × элитная форма 1-39-29	ФГБНУ «ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»	Россия
19.	Сувенир	Сеянец от свободного опыления 'Нимфа' × 'Морена' (<i>L. Kamtschatica</i> , <i>L. venulosa</i>)	ФГБНУ «ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»	Россия
20.	Темная ночь	Отборный сеянец 18-94 (<i>L. kamtschatica</i>)	ФГБНУ «ФНЦ имени И.В. Мичурина»	Россия
Черноплодная рябина				
№	Наименование сорта	Место селекции		Страна селекции
1.	Черноплодная	ФГБНУ «ФНЦ имени И.В. Мичурина»		Россия
2.	Мулатка	ФГБНУ «ФНЦ имени И.В. Мичурина»		Россия
3.	Надзея	РУП «Институт плодоводства»		Белоруссия
4.	Вениса	РУП «Институт плодоводства»		Белоруссия
5.	Арон	Дания		Дания
Голубика высокорослая				
№	Наименование сорта	Происхождение и место сбора		Страна селекции
1.	Ковилл	ФГБНУ «ФНЦ имени И.В. Мичурина»		США
2.	Элиотт	гибридизации сеянцев Burlington × (Dixi × Jersey × Pioneer), ООО «Агрофирма «СадМашСервис» (Мичуринский район)		США
3.	Блюрей	ФГБНУ «ФНЦ имени И.В. Мичурина»		США
4.	Блюголд	скрещивания высокорослых видов дикой голубики ФГБНУ «ФНЦ имени И.В. Мичурина»		США
5.	Голдтраубе 71	ООО «Агрофирма «СадМашСервис» (Мичуринский район)		Германия
6.	Спартан	ФГБНУ «ФНЦ имени И.В. Мичурина»		США
7.	Ронкокас	ООО «Агрофирма «СадМашСервис» (Мичуринский район)		США
Черная смородина				
№	Наименование сорта	Место селекции		Страна селекции
1.	Деметра	ФГБНУ «ФНЦ имени И.В. Мичурина»		Россия
2.	Созвездие	ФГБНУ «ФНЦ имени И.В. Мичурина»		Россия
3.	Элевеста	ФГБНУ «ФНЦ имени И.В. Мичурина»		Россия

Объекты хранились в замороженном виде при температуре -18°C непосредственно до приготовления экстрактов.

2.2. Оборудование

Исследования проводились на спектрофотометре Shimadzu «UV-1800» (Shimadzu Corporation, Япония) с диапазоном длин волн 190–1100 нм, жидкостном хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным спектрофотометрическим детектором (ДМД), жидкостном хроматографе Ultimate 3000 с ДМД и тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором (МСД) TSQ Endura.

2.3. Реактивы

В работе использовались: вода сверхчистая (MilliQ® Advantage A10, Merck, США), ацетонитрил UPLC/HPLC grade (Applihem PanReac (Дармштадт, Германия), метанол UPLC/HPLC grade (J.T. Baker (Avantor Performance Materials, Пало Альто, США), муравьиная кислота 98-100% (Sigma-Aldrich, Дармштадт, Германия). В качестве стандартов были использованы коммерчески доступные чистые вещества: процианидин В2 ($\geq 90\%$, INDOFINE Chemical Company), галловой кислоты моногидрат (98%, J&K Scientific GmbH), рутин тригидрат ($\geq 95\%$, Roth), гиперозид ($\geq 95\%$, HWI ANALYTIK GmbH), изокверцитрин ($\geq 94\%$, HWI ANALYTIK GMBH), лютеолин-7-глюкозид ($\geq 98\%$, Extrasynthese), кемпферол-3-глюкозид ($\geq 95\%$, PhytoLab), мирицетин ($\geq 96\%$, Sigma-Aldrich, США), кверцетин ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, США), неохлорогеновая кислота ($\geq 98\%$, Sigma), хлорогеновая кислота ($\geq 95\%$, Sigma), кафтаровая кислота ($\geq 97\%$, Sigma-Aldrich, США), кофейная кислота ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, США), *n*-кумаровая кислота ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, США), галловая кислота (98%, J&K Scientific, США), (+)-катехин гидрат (95%, ABCR, Германия), (-)-эпикатехин (95%, ABCR,

Германия), логанин ($\geq 97,0\%$, Sigma), лимонная кислота ($\geq 99,5\%$, Sigma), яблочная кислота ($\geq 99,5\%$, Fluka), аскорбиновая кислота ($\geq 99\%$, Fluka), фруктоза ($\geq 99\%$, Sigma), глюкоза ($\geq 99,5\%$, Sigma), сорбит ($\geq 98\%$, Sigma), тролокс ($\geq 97\%$, Aldrich, США).

2.4. Пробоподготовка

Плоды, не достигая полного размораживания измельчали и гомогенизировали в блендере до получения однородной массы.

Суммарное содержание и профиль антоцианинов.

Для определения суммарного содержания и профиля антоцианинов использовали точную навеску массой 5,0 г, которую помещали в пробирку для центрифугирования объемом 50 мл. Для определения суммарного содержания экстрагентом служил 70% этанол, подкисленный 1 мл 0,1М водным раствором хлористоводородной кислоты. Для определения профиля в качестве экстрагента использовалась вода двойной очистки. Начальный объем экстрагента составлял 40 мл. Далее пробирку помещали в ультразвуковую баню на 20 минут при температуре 25 градусов по Цельсию. Полученный экстракт центрифугировали при 4500 об/мин в течение 10 минут, супернатант переливали в отдельную мерную колбу на 100 мл. Процедуру повторяли до полного обесцвечивания сырьевой массы. Объединенный экстракт, при постоянном перемешивании, доводили до метки подкисленным 70% этанолом (водой). Далее из объединенного экстракта отбирали аликвоту объемом 2 мл в микропробирку. Ее центрифугировали в течение 10 минут при 15000 об/мин. Фильтрацию раствора не проводили, так как антоцианы адсорбируются на фильтрах [8, 94, 101, 102].

Надосадочную жидкость использовали непосредственно для анализа по методикам, указанным в разделе 2.5.

Проантоцианидины, флавоноиды, гидроксикоринчьи кислоты.

Точную навеску массой 6-7 г гомогенной ягодной пасты вносили в колбу Кьельдаля на 100 мл, прибавляли 40 мл 60% метанола и кипятили на водяной

бане с обратным холодильником в течение 1 часа. После доведения экстракта до комнатной температуры его перемещали в мерную колбу объемом на 50 мл. До метки экстракт доводили 60% метанолом. Затем с помощью микропипетки отбирали аликвоту в 2 мл, центрифугировали при 15000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант переносили в хроматографическую вialsу для дальнейшего анализа.

2.5. Методика определения суммарного содержания антоцианинов методом рН-дифференциальной спектрофотометрии

Дифференциальный спектрофотометрический метод используется для оценки содержания мономерных форм антоцианов в растительных объектах. Окраска и ее интенсивность зависят от концентрации как мономерных, так и полимерных форм антоцианов. Дифференциальная спектрофотометрия включает в себя измерение оптического поглощения при $\text{pH}=1$, где антоцианы преимущественно находятся во флавилиевой форме, а также измерение при $\text{pH}=4.5$, где флавилиевая форма преобразуется в полуацетальную форму без окраски. Так как полимерные формы сохраняют свою окраску при $\text{pH}=4.5$, разность между двумя величинами оптических плотностей отражает содержание антоцианов только в флавилиевой форме. Полученное значение в дальнейшем используется в расчете содержания мономерных антоцианов.

До проведения измерений готовят буферные растворы с заданными рН (1.0 и 4.5).

Для приготовления буферного раствора с $\text{pH}=1.0$ необходимо растворить 1,49 г калия хлорида в 100 мл дистиллированной воды. Отобрать 25 мл приготовленного раствора и смешать с 67 мл 0,2М раствора HCl , после чего довести значение pH до 1.0 концентрированной хлористоводородной кислотой.

Для приготовления буферного раствора с $\text{pH}=4.5$ необходимо растворить 1,64 г ацетата натрия в 100 мл дистиллированной воды, довести значение pH до 4.5 концентрированной хлористоводородной кислотой.

Проведение измерений.

По 1 мл подготовленной пробы разбавляли буферными растворами с рН=1.0 и рН=4.5 в двух различных мерных колбах. В зависимости от интенсивности окраски пробы, разбавление буферными растворами проводилось в 3, 5, 10, 15, 25 раз. Содержимое колбы перемешивалось и настаивалось в течение 15 мин при комнатной температуре. Поочередно снимали спектр и измеряли оптическую плотность проб при 510 и 700 нм. В качестве раствора сравнения использовалась вода. Перед тем, как проводить измерения образцов, снимали базовую (нулевую) линию спектрофотометра для всех длин волн измерения по раствору сравнения.

Установлено, что для достижения оптимальных результатов определения, рекомендуется проводить измерения не позднее 1 часа после приготовления разбавленных проб. Это обусловлено тем, что с увеличением времени экспозиции наблюдается увеличение значений измеряемых показателей. Кроме того, буферные растворы с рН=1.0 и рН=4.5 демонстрируют нулевое поглощение при использовании аналитических длин волн (510 и 700 нм). Следовательно, нет необходимости использовать буферные растворы в качестве растворов сравнения, что позволяет сократить трудоемкость и время при подготовке к исследованию.

Для наиболее точных результатов следует ориентироваться на значение оптической плотности раствора с рН=1,0 при 510 нм в диапазоне 0,2-1,0. Для этого используется различная степень разведения.

Формула для вычисления суммы антоцианинов (в %) в пересчете на цианидин-3-глюкозид [101]:

$$C(\sum \text{антоцианинов, \%}) = \frac{D \times M_w \times V_{\bar{c}} \times V \times 100\%}{\epsilon \times l \times m},$$

где оптическая плотность $D = (D_{510\text{нм}} - D_{700\text{нм}})_{\text{рН}1,0} - (D_{510\text{нм}} - D_{700\text{нм}})_{\text{рН}4,5}$,

ϵ – коэффициент молярной экстинкции (для цианидин-3-глюкозида равный 26900, Моль⁻¹ х см⁻¹),

M_w – молекулярная масса цианидин-3-глюкозида равная 449, 2 г/моль,

$V_{\bar{c}}$ – разведение буферными растворами, мл,

V – объем растворителя, мл,

l – длина кюветы, см,

m – масса образца, мг.

2.6. Методики определения сопутствующих полифенольных соединений в объектах исследования

Основные параметры методик определения профиля флавоноидов и гидроксикоричных кислот представлены в Таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Основные параметры методик определения профиля флавоноидов и гидроксикоричных кислот

Определяемый показатель	Профиль флавоноидов	Профиль гидроксикоричных кислот
Условия хроматографирования:		
Колонка	Phenomenex Luna C18(2) 250×4,6 мм с размером частиц 5 мкм	
Подвижная фаза А	0,1% раствор муравьиной кислоты в воде	
Подвижная фаза В	0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле	
Градиентное элюирование	0 мин – 15% В 35-40 мин – 60% В 41-50 мин – 15% В	0 мин – 10% В 18 мин – 25% В 30 мин – 40% В 35 мин – 60% В 36-45 мин – 10% В
Скорость подачи подвижной фазы	0,5 мл/мин	
Температура колонки	30 °С	
Объем введенной пробы	5 мкл	
Длины волн ДМД	370 и 350 нм	330 нм
Источник ионизации	Прогреваемый электроспрей (HESI)	
Режим регистрации ионов	Положительный (HESI/MS ⁺)	Отрицательный (HESI/MS ⁻)
Напряжение	3500 В	2500 В
Температура испарителя	325 °С	275 °С
Температура трубки переноса электронов	300 °С	275 °С

Суммарное содержание проантоцианидинов (ПАЦ), выраженное в эквивалентах процианидина В₂, определяли по модифицированному методу Бейтса – Смита [102].

Содержащиеся полифенольные соединения оценивали по модифицированному методу Фолина-Чокальтеу, выражая результаты в эквивалентах галловой кислоты (ГК) [102].

Антирадикальную активность определяли с помощью DPPH-теста. Полученные результаты выражались в миллиграммах тролоксового эквивалента на 100 грамм плодов [116].

ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ АНТОЦИАНИНОВ

3.1. Экстракция антоцианинов из растительного сырья

Из-за высокой чувствительности антоцианинов к температуре и свету экстракцию следует проводить в мягких условиях. На выход антоциановых пигментов непосредственное влияние оказывают выбор метода и времени экстракции, а также используемый растворитель [117]. Наиболее часто применяемыми растворителями для экстракции антоцианинов являются водные растворы хлористоводородной кислоты с концентрацией 1% или 0,1%, метанол, абсолютный этанол, нейтральные или подкисленные водно-этанольные смеси и дистиллированная вода.

В ходе предварительных испытаний были исследованы различные экстрагенты: дистиллированная вода, водно-спиртовые смеси различной концентрации (30%, 50%, 70%, 80% и 96% этанол), метанол и водный раствор 0,1% хлористоводородной кислоты (Таблица 3.2). Предпочтительным является использование именно хлористоводородной кислоты, так как она содержится в буферных растворах с $\text{pH}=1$ и $\text{pH}=4,5$.

Для проверки полноты экстракции использовали метод pH -дифференциальной спектрофотометрии при длинах волн 510 и 700 нм. Измерения максимального поглощения в водных, водно-спиртовых и метанольных экстрактах при разведении буферными растворами с $\text{pH}=1$ и $\text{pH}=4,5$ в 10-25 раз показали незначительные различия. Оптическая плотность при этих длинах волн сильно зависела от концентрации спирта. Было выявлено, что водные экстракты содержат меньше антоцианинов, чем водно-этанольные. Содержание антоцианинов в водно-этанольных экстрактах увеличивалось с увеличением концентрации спирта до 70%. Добавление 0,1% HCl в водно-спиртовые смеси и метанол увеличивало выход пигментов. При использовании 80% и 96% этанола наблюдалось снижение оптической плотности при длине волны 510 нм.

Хотя этанол является менее эффективным и летучим растворителем, по сравнению с метанолом, он предпочтителен для извлечения антоцианов из растительного сырья в фармацевтической промышленности. На фармацевтических предприятиях обычно используют этанол или водно-этанольные смеси с содержанием 70% или 50-55% этанола для производства стандартизированных сухих экстрактов, настоек и гомеопатических препаратов из различного растительного сырья, содержащего антоцианины. Использование метилового спирта в пищевой и фармацевтической промышленности запрещено из-за возможных рисков для здоровья. Наиболее предпочтительным растворителем для извлечения антоцианов оказался 70% этанол, подкисленный 0,1% раствором HCl (Таблица 3.2).

На начальном этапе исследований, проводящихся на примере свежемороженых плодов жимолости голубой, было изучено несколько различных методов экстракции: экстракция на ультразвуковой бане, нагревание на водяной бане с обратным холодильником и экстракция с использованием магнитной мешалки (Таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Извлечение антоцианинов из замороженных плодов жимолости различными способами экстракции и их статистическая обработка $f=10$, $P=0,95$, $T(p,f)=2,23$

№ опыта	Содержание антоцианинов, мг/100 г свежего веса		
	Нагревание на водяной бане с обратным холодильником	Экстракция на ультразвуковой бане при комнатной температуре	Экстракция с использованием магнитной мешалки при комнатной температуре
1.	470,3	433,7	412,2
2.	495,1	397,5	425,4
3.	433,4	460,4	389,3
4.	399,2	453,9	413,7
5.	434,0	458,2	420,0
6.	440,5	435,5	435,5
7.	456,7	440,1	378,9
8.	398,9	448,8	422,4
9.	440,5	450,7	418,8
10.	450,1	450,9	374,2

Продолжение Таблицы 3.1

$X_{\text{сред.}}$	441,9	443,0	409,0
S^2	772,9	218,2	432,9
S	27,8	14,7	20,8
Δx	16,9	9,1	12,9
$\varepsilon\%$	4,0	2,2	3,2

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

Таблица 3.2 – Выход антоцианинов из объектов исследования при использовании различных экстрагентов

Экстрагент		Содержание антоцианинов, %			
		Плоды жимолости	Плоды черноплодной рябины	Плоды голубики	Плоды черной смородины
Вода	нейтральная	0,290	0,423	0,191	0,205
	подкисленная 0,1% HCl	0,327	0,437	0,194	0,219
30% этанол	нейтральный	0,332	0,440	0,183	0,209
	подкисленный 0,1% HCl	0,354	0,489	0,190	0,221
50% этанол	нейтральный	0,376	0,497	0,185	0,223
	подкисленный 0,1% HCl	0,385	0,535	0,192	0,231
70% этанол	нейтральный	0,415	0,548	0,186	0,237
	подкисленный 0,1% HCl	0,450	0,579	0,194	0,249
80% этанол	нейтральный	0,390	0,539	0,186	0,222
	подкисленный 0,1% HCl	0,440	0,567	0,193	0,230
96% этанол	нейтральный	0,385	0,531	0,184	0,215
	подкисленный 0,1% HCl	0,395	0,560	0,193	0,224
Метанол	нейтральный	0,412	0,547	0,187	0,241
	подкисленный 0,1% HCl	0,468	0,598	0,203	0,256

Соотношение между сырьём и экстрагентом изменяется в зависимости от концентрации антоцианинов в образце. Для плодов с высоким содержанием

пигментов ($>0,2\%$) оптимальное соотношение сырья к экстрагенту составляет от 1:100 до 1:20, соответственно. Для образцов, содержание антоцианинов в которых $<0,2\%$, соотношение составляет от 1:10 до 1:20. Для всех образцов проводилась трехкратная экстракция точно отвешенных плодов (около 5,0 г) в течение 15 минут. После этого извлечения объединялись в мерной колбе на 100 мл, охлаждали до комнатной температуры и доводили до метки. Для очистки объединенного извлечения было использовано центрифугирование при 15000 оборотах в минуту в течение 10 минут.

Из Таблицы 3.1 следует, что результаты определения суммы антоцианинов при нагревании на водяной бане с обратным холодильником и обработке на ультразвуковой (УЗ) бане при комнатной температуре схожи. Нагревание более 100°C не рекомендуется, так как может произойти частичный или полный гидролиз антоцианов и проантоцианидинов, а также систематическая переоценка результатов анализа.

Оптимальным способом экстракции антоцианинов была выбрана обработка на УЗ бане при комнатной температуре, поскольку она обеспечивает более воспроизводимые результаты с меньшей погрешностью измерения.

3.2. Методика определения специфического профиля антоцианинов

Для определения профиля антоцианинов использовался метод обращено-фазовой ВЭЖХ в режиме градиента (Таблица 3.3). Была проведена оптимизация методики, представленной в работе [118], по составу подвижных фаз и параметрам градиентного элюирования.

Таблица 3.3 – Основные параметры методики ВЭЖХ-ДМД-МС

Условия хроматографирования:	
Колонка	Phenomenex Luna C18(2) 250×4,6 мм с размером частиц 5 μм
Подвижная фаза А	1% раствор муравьиной кислоты в воде
Подвижная фаза В	1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле

Продолжение Таблицы 3.3

Градиентное элюирование	0 мин – 10% В 10 мин – 12% В 20 мин – 15% В 30-32 мин – 30% В 33-45 мин – 10% В	
Скорость подачи подвижной фазы	0,5 мл/мин	
Температура колонки	40° С	
Объем введенной пробы	10 μ л	
Длины волн ДМД	520 нм	
Источник ионизации	Прогреваемый электроспрей (HESI)	
Режим регистрации ионов	Положительный (HESI/MS ⁺)	
Напряжение	3500 В	
Температура испарителя	350° С	325° С
Температура трубки переноса электронов	325° С	300° С

Для работы использовалась колонка Phenomenex Luna C18 с параметрами 250×4,6 mm и размером частиц 5 μ . В качестве подвижной фазы (А) применялся 1% водный раствор муравьиной кислоты (pH=2,10-2,15), подвижной фазы (В) – 1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Добавление муравьиной кислоты обусловлено наиболее высокой степенью разделения антоцианов, в сравнение с подвижными фазами, не содержащими ее в своем составе. Также она никак не влияет на очередность выхода антоцианинов. Линейный градиент: 0 мин - 10% В, 10 мин – 12% В, 20 мин – 15% В, 30-32 мин – 30% В, 33-45 мин – 10% В. Общее время анализа 45 мин. Скорость подачи подвижной фазы 0,5 мл/мин. Температура автосемплера 20°С. Температура колонки 40°С. Объем вводимой пробы 10 μ л. ДМД при 520 нм. Диапазон для снятия спектров находился от 200 до 700 нм. Были подобраны оптимальные параметры для источника ионизации при проведении масс-детектирования: напряжение на капилляре – 3500 В, температура испарителя – 350 °С, температура трубки переноса электронов – 325 °С, давление на распылителе – 0,27 МПа, поток газа-осушителя (азот) – 9 л/мин.

Регистрация положительных ионов $[M]^+$ проводилась в диапазоне от 100 до 1500 m/z.

3.3. Валидация методики определения специфического профиля антоцианинов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием диодного и масс-спектроскопического детектора

Валидацию методики проводили согласно требованиям ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» [4]. Методика используется для определения качественного состава антоцианинов. Валидация представленной методики проводилась по показателю «Специфичность».

Специфичность методики определялась сравнением хроматограмм растворителей (подвижная фаза А, очищенная вода) с хроматограммами объектов исследования. Хроматограммы растворителей не отличались от базовой линии, посторонних пиков, кроме пика ввода, обнаружено не было (Рисунок 3.1).

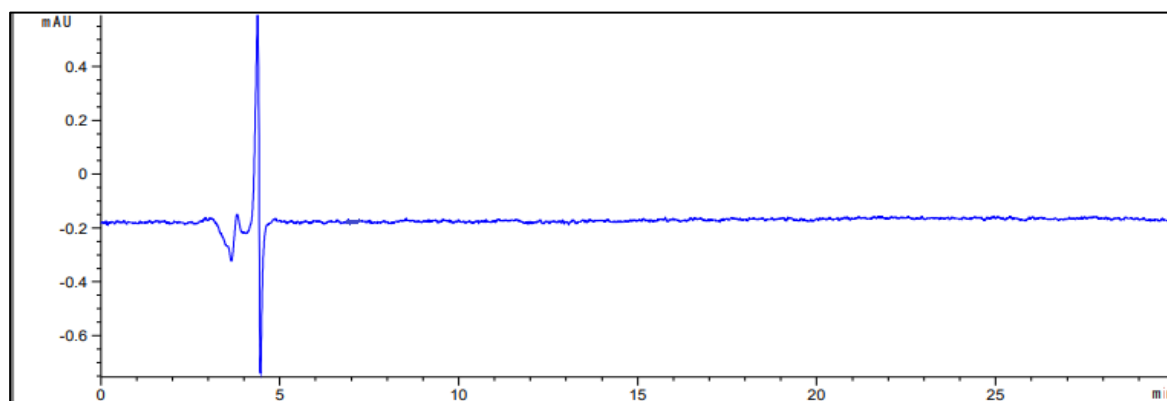


Рисунок 3.1 – Хроматограмма вкола очищенной воды в условиях оптимизированной методики

Были определены параметры пригодности хроматографической системы (Таблица 3.4). Эффективность колонки составила от 11344 до 65909 теоретических тарелок, селективность колонки для всех антоцианинов была $\geq 1,0$, разрешение находилось в диапазоне от 0,07 до 8,23.

Таблица 3.4 – Параметры разделения антоцианинов в объектах исследования в условиях градиентного элюирования, мертвый объем $t_0=5,5$ мин

№	Антоцианин	t_R , мин.	k'	N	Asym	α	R_s
Плоды голубики высокорослой							
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.	Дельфинидин-3-арабинозид	14,7	1,72	23264	0,98	1,01	0,12
4.	Цианидин-3-галактозид	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.	Петунидин-3-глюкозид	19,0	2,52	41782	1,02	1,00	0,07
8.	Цианидин-3-арабинозид	19,1	2,54	39924	0,99	1,06	2,00
9.	Петунидин-3-арабинозид	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.	Мальвидин-3-галактозид	21,9	3,06	40355	1,00	1,09	2,00
12.	Пеонидин-3-глюкозид	23,8	3,41	44895	1,02	1,00	0,10
13.	Мальвидин-3-глюкозид	23,9	3,43	47418	1,01	1,05	1,41
14.	Пеонидин-3-арабинозид	25,1	3,65	50038	0,99	1,02	0,57
15.	Мальвидин-3-арабинозид	25,7	3,76	51590	1,07	1,02	0,29
16.	Дельфинидин-3-ацетилглюкозид	26,1	3,83	51024	1,03	1,06	1,60
17.	Мальвидин-3-ксилозид	28,2	4,22	61052	1,02	1,02	0,45
18.	Цианидин-3-ацетилглюкозид	32,1	4,94	63270	1,03	1,14	4,11
19.	Петунидин-3-ацетилглюкозид	33,6	5,22	64092	0,99	1,05	3,75
20.	Мальвидин-3-ацетилгалактозил	34,1	5,31	64792	1,01	1,02	1,87
21.	Пеонидин-3-ацетилглюкозид	34,4	5,39	65678	1,00	1,05	1,27
22.	Мальвидин-3-ацетилглюкозид	35,0	5,45	65909	0,99	1,10	3,34
Плоды аронии черноплодной							
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
Плоды черной смородины							
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

Продолжение Таблицы 3.4

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	1,08	1,05
Плоды жимолости съедобной							
1.	Цианидин-3,5-диглюкозид	7,3	0,68	11344	1,00	1,10	0,98
2.	Пеонидин-3,5-диглюкозид	8,1	0,89	12575	0,98	1,05	1,12
3.	Цианидин-3-глюкозид	16,9	2,01	31688	1,01	1,11	0,77
4.	Цианидин-3-рутинозид	18,4	2,33	44581	0,97	1,34	1,00
5.	Пеларгонидин-3-глюкозид	21,6	3,10	47112	0,96	1,20	2,01
6.	Пеонидин-3-глюкозид	23,8	3,40	52657	1,03	1,04	0,89
7.	Пеонидин-3-рутинозид	25,5	3,69	53989	1,01	1,01	1,11

В условиях отсутствия стандартов невозможно точно измерить различия в откликах пиков отдельных антоцианинов на хроматограммах, что приводит к общепринятому предположению о сравнительно равных откликах всех антоцианинов. Относительное содержание антоцианинов вычисляют как процент от общей площади всех пиков на хроматограмме, принимая за 100% сумму площадей [20].

3.4. Линейность методики

Для доказательства линейности данной методики и в условиях отсутствия стандартов использовали метод кратных разведений. На примере плодов черной смородины были получены хроматограммы профиля антоцианинов без разведения и с разведениями в 2, 5, 10 и 20 раз (Рисунки 3.2-3.6).

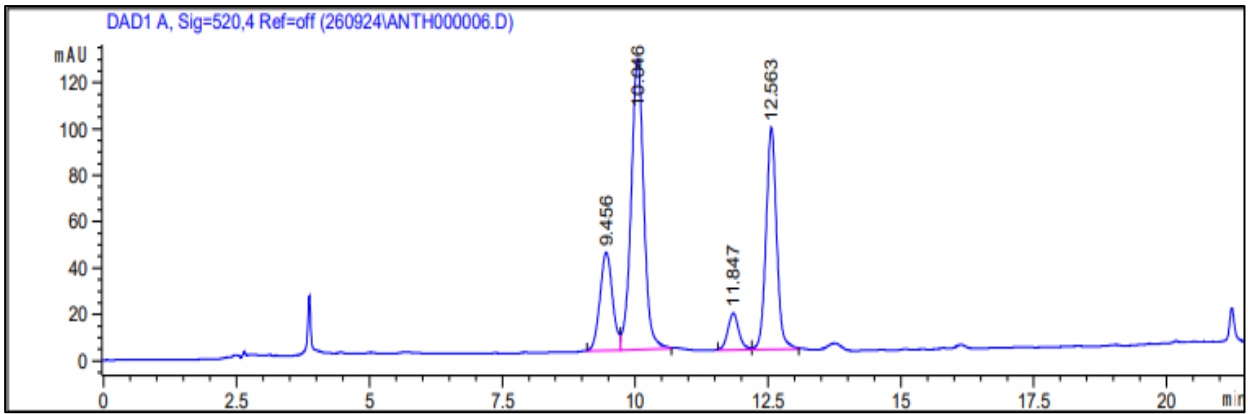


Рисунок 3.2 – Антоцианиновый профиль плодов черной смородины без разведения

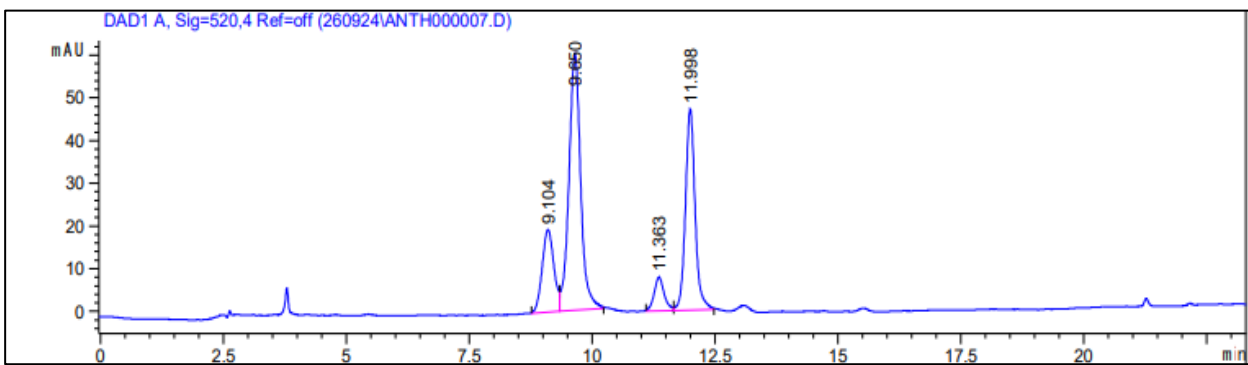


Рисунок 3.3 – Антоцианиновый профиль плодов черной смородины с разведением в 2 раза

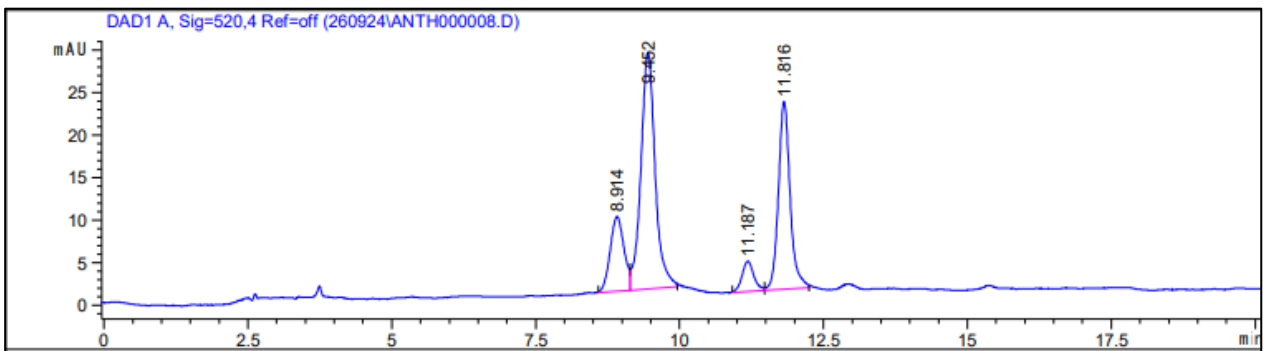


Рисунок 3.4 – Антоцианиновый профиль плодов черной смородины с разведением в 5 раз

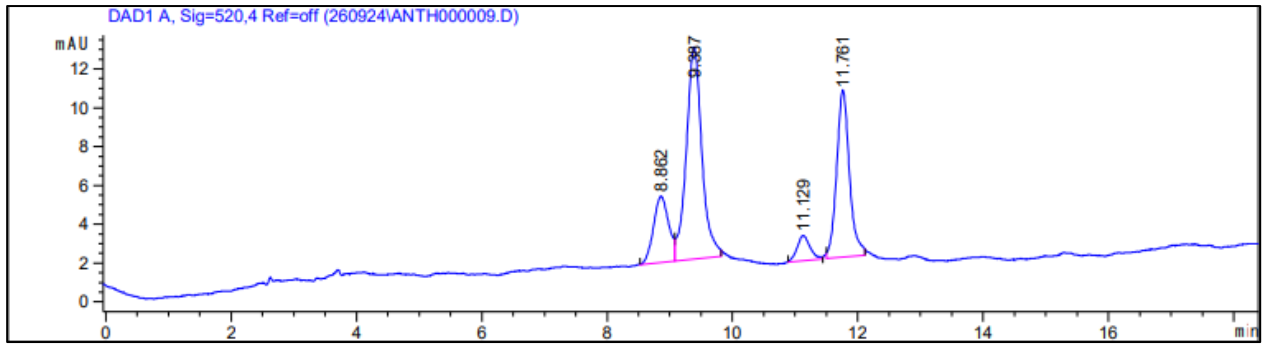


Рисунок 3.5 – Антоцианиновый профиль плодов черной смородины с разведением в 10 раз

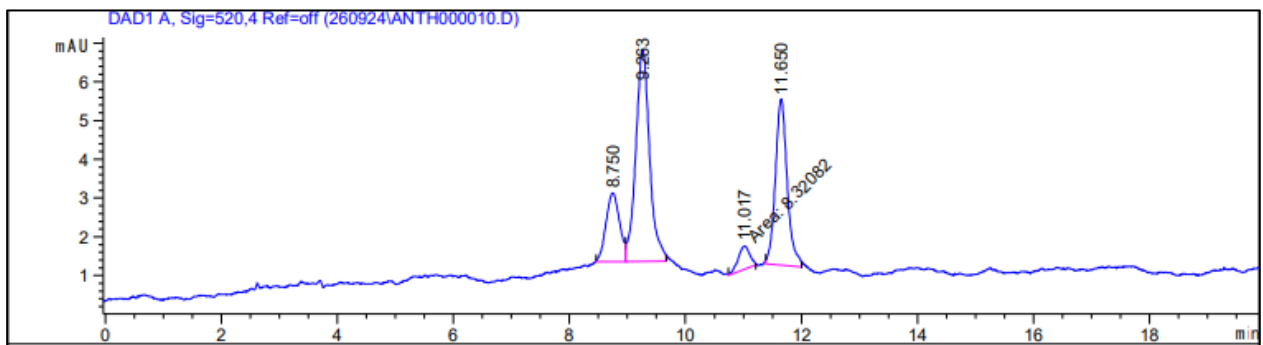


Рисунок 3.6 – Антоцианиновый профиль плодов черной смородины с разведением в 20 раз

Были получены отдельные площади основных антоцианинов плодов черной смородины. По полученным значениям площадей были построены калибровочные графики для дельфинидин-3-глюкозида, дельфинидин-3-рутинозида, цианидин-3-глюкозида и цианидин-3-рутинозида (Рисунки 3.7-3.10). На графиках представлены уравнения калибровочных кривых, значение площади пика при кратном разведении и коэффициенты корреляции.

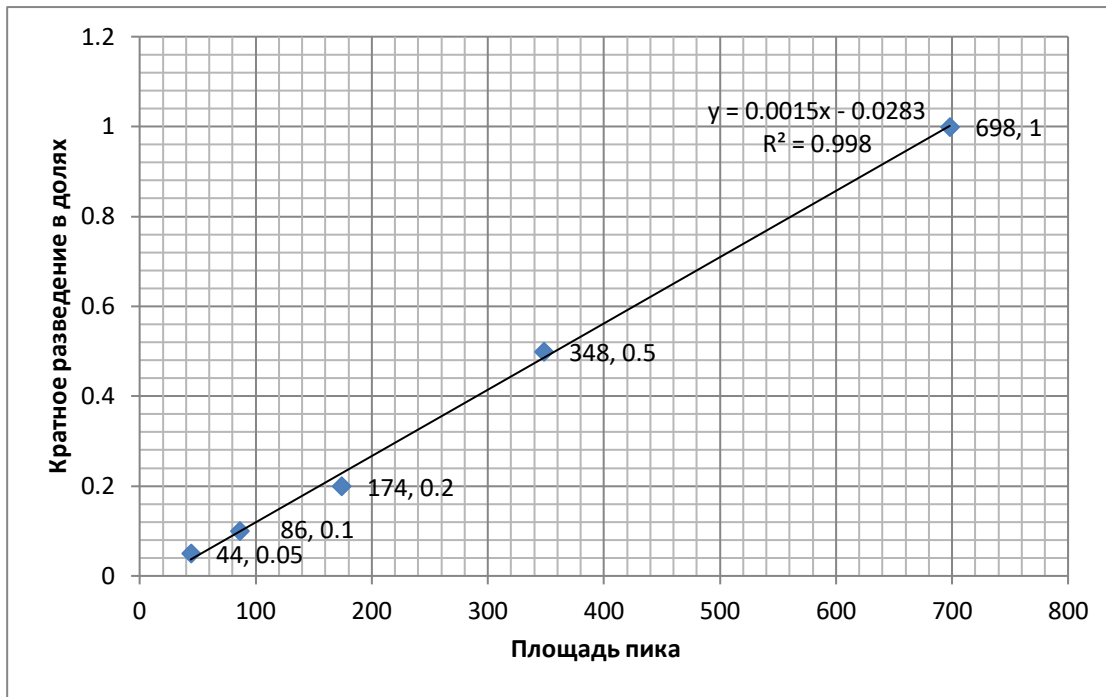


Рисунок 3.7 – Линейная зависимость площади пика дельфинидин-3-глюкозида при кратном разведении

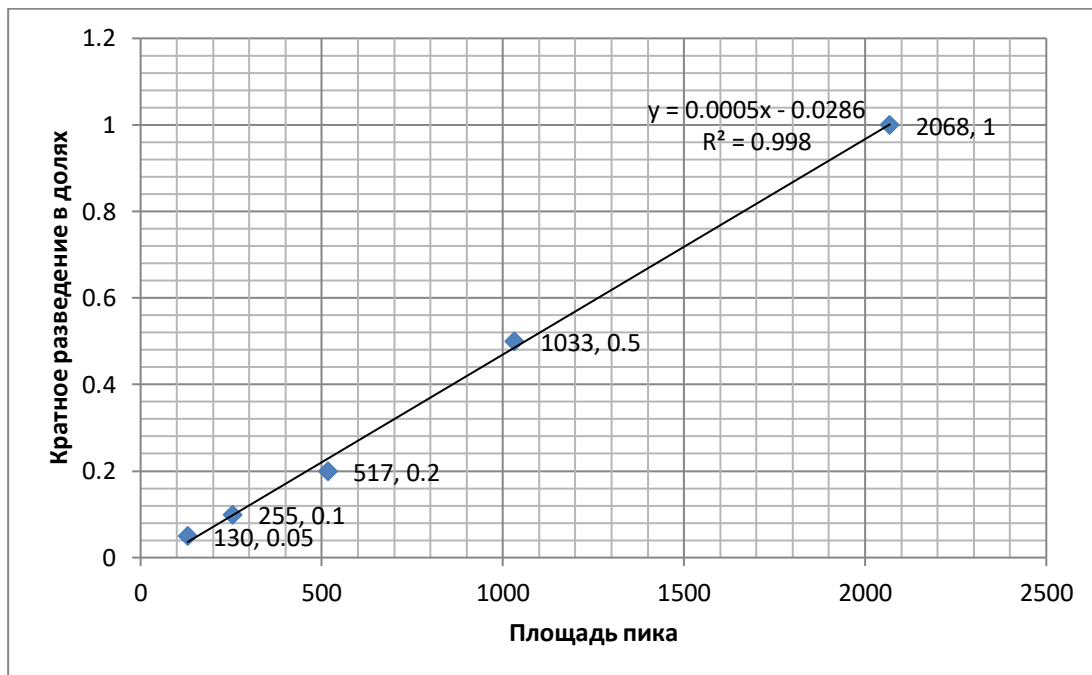


Рисунок 3.8 – Линейная зависимость площади пика дельфинидин-3-рутинозида при кратном разведении

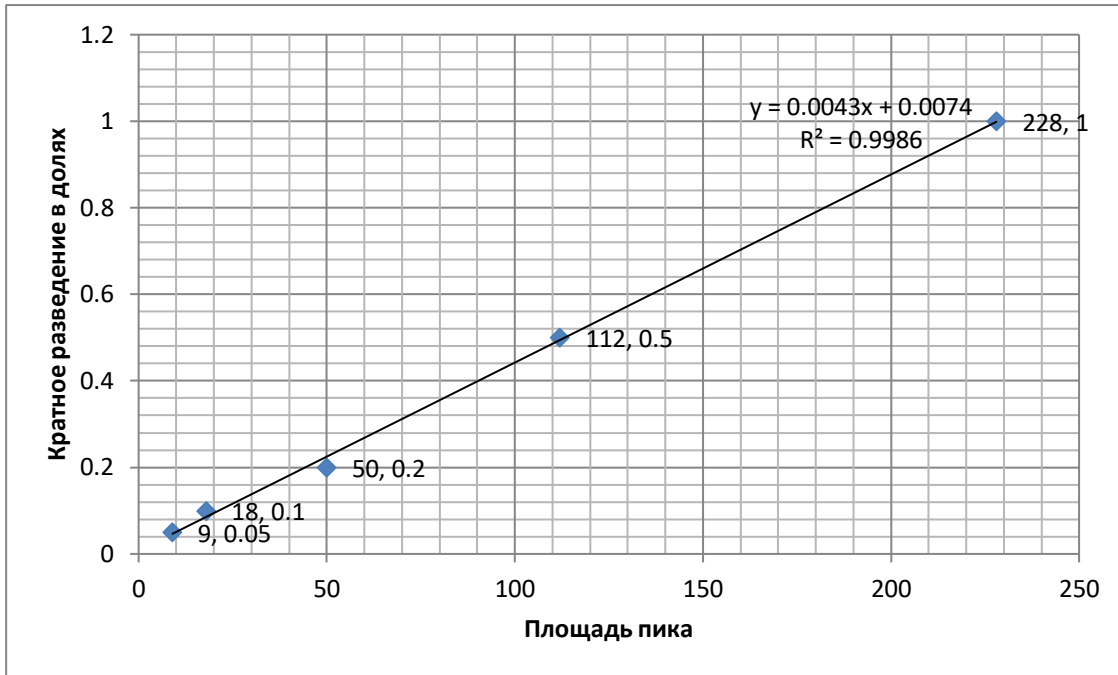


Рисунок 3.9 – Линейная зависимость площади пика цианидин-3-глюкозида при кратном разведении

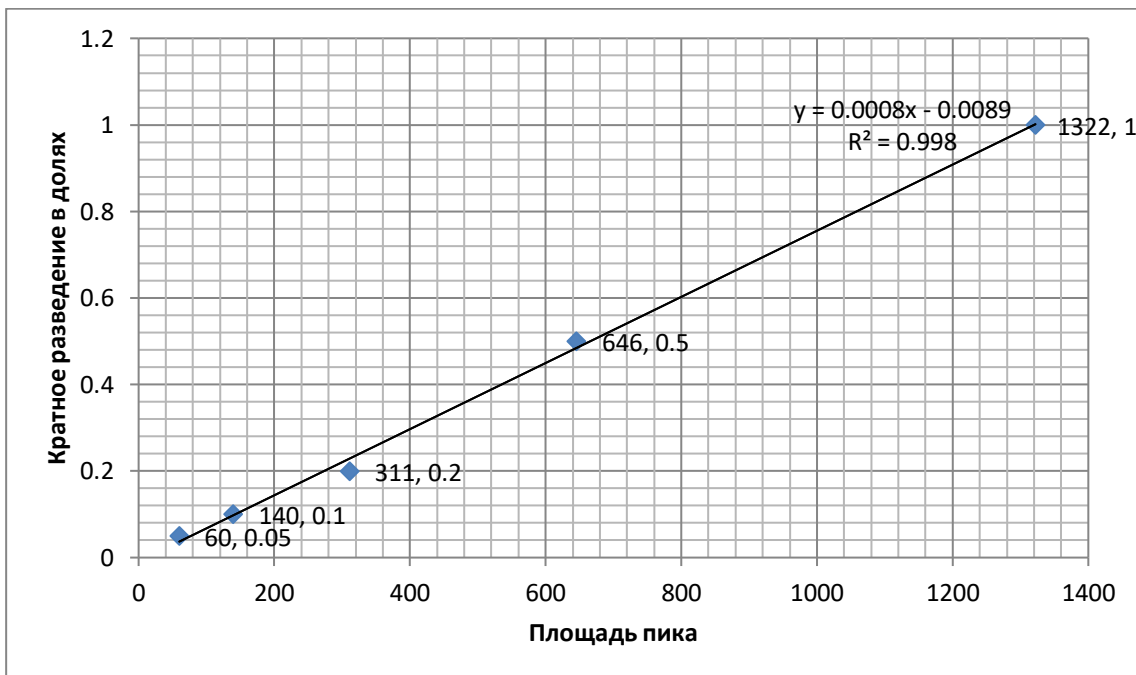


Рисунок 3.10 – Линейная зависимость площади пика цианидин-3-рутинозида при кратном разведении

Получены коэффициенты корреляции (R^2) для калибровочных кривых антоцианинов:

дельфинидин-3-рутинозида – 0,998;

дельфинидин-3-глюкозида – 0,998;

цианидин-3-глюкозида – 0,9986;

цианидин-3- рутинозида – 0,998.

Линейность методики подтверждается, если коэффициент корреляции (R^2) равен не менее 0,99. Полученные результаты подтверждают линейность методики специфического определения антоцианинов.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. В ходе эксперимента были подобраны наиболее оптимальные условия экстрагирования антоцианинов из объектов исследования. 70% водный этанол показал наибольшую эффективность извлечения антоцианинов из объектов растительного происхождения.

2. Оптимизирована методика ВЭЖХ-ДМД-МС по составу подвижных фаз и параметрам градиентного элюирования.

3. Проведена валидация методики ВЭЖХ-ДМД-МС по параметру «Специфичность».

ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ОБЪЕКТАХ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Результаты исследования полифенольного комплекса плодов жимолости съедобной

Биологически активные соединения, обладающие высокой антиоксидантной активностью, вызывают большой интерес у производителей фармацевтической и пищевой промышленности. Тенденция получения продуктов с высоким содержанием антиоксидантов переключила фокус программ по селекции растений на создание сортов с повышенным содержанием биологически активных соединений, что, в свою очередь, невозможно без их тщательного изучения и стандартизации.

4.1.1. Идентификация профиля индивидуальных антоцианинов плодов жимолости съедобной

С помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии на диодной матрице в комбинации с масс-детектором в 20 селекционно-выведенных сортах жимолости съедобной, культивируемой на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр им. И.В. Мичурина», был идентифицирован индивидуальный набор антоцианинов.

Профиль антоцианинов представлен на типичной хроматограмме (Рисунок 4.1) и в Таблице 4.1. Цианидин-3-глюкозид(1) составлял от 82,1% до 89,2% общего количества антоцианинов. Минорные цианидин-3-рутинозид(2), цианидин-3,5-диглюкозид(4) и пеонидин-3-глюкозид(3) присутствовали на уровне 2,4–7,2%, 1,5–7,1% и 2,1–6,7% соответственно. Содержание пеларгонидин-3-глюкозида(6), 3-рутинозида(7) и 3,5-диглюкозида пеонида(5) – от 0,2% до 2,2% от суммы антоцианинов.

Таблица 4.1 – Профиль и относительное содержание антоцианинов плодов жимолости съедобной

№	Сорт жимолости съедобной	Содержание, % от суммы антоцианинов, $M \pm m$ (n = 3)						
		Цианидин-3,5-диглюкозид	Пеонидин-3,5-диглюкозид	Цианидин-3-глюкозид	Цианидин-3-рутинозид	Пеларгонидин-3-глюкозид	Пеонидин-3-глюкозид	Пеонидин-3-рутинозид
1	Авача	7,1 ± 0,3	0,9 ± 0,1	85,0 ± 0,5	2,4 ± 0,1	0,6 ± 0,02	3,7 ± 0,2	0,3 ± 0,02
2	Аврора	3,0 ± 0,2	0,5 ± 0,1	89,2 ± 0,4	2,7 ± 0,2	0,5 ± 0,02	3,6 ± 0,2	0,5 ± 0,02
3	Бакчарский великан	3,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	88,0 ± 0,6	4,7 ± 0,2	0,6 ± 0,03	2,5 ± 0,1	0,3 ± 0,02
4	Барышня	3,2 ± 0,2	0,8 ± 0,1	84,9 ± 0,6	5,3 ± 0,3	0,4 ± 0,02	4,7 ± 0,2	0,7 ± 0,02
5	Блю Банана	1,8 ± 0,1	0,3 ± 0,04	87,6 ± 0,4	4,4 ± 0,2	0,8 ± 0,1	4,5 ± 0,3	0,6 ± 0,03
6	Бореал Бист	4,1 ± 0,2	следы (<0,1)	86,2 ± 0,7	6,0 ± 0,3	0,9 ± 0,1	2,4 ± 0,2	0,4 ± 0,02
7	Бореал Близзард	5,4 ± 0,3	1,0 ± 0,1	84,1 ± 0,5	4,2 ± 0,2	0,7 ± 0,04	4,1 ± 0,2	0,5 ± 0,01
8	Бореал Бьюти	3,3 ± 0,2	0,7 ± 0,1	83,3 ± 0,5	6,8 ± 0,3	0,7 ± 0,03	4,3 ± 0,3	0,8 ± 0,03
9	Волхова	3,2 ± 0,1	0,6 ± 0,05	83,6 ± 0,6	7,2 ± 0,3	0,5 ± 0,02	4,0 ± 0,2	0,9 ± 0,03
10	Индиго Гем	4,4 ± 0,3	0,5 ± 0,03	86,7 ± 0,4	4,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	2,9 ± 0,1	0,4 ± 0,02
11	Княгиня	3,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1	82,1 ± 0,5	5,4 ± 0,2	0,2 ± 0,03	6,7 ± 0,2	1,1 ± 0,1
12	Маша	3,7 ± 0,2	0,6 ± 0,04	88,2 ± 0,4	3,2 ± 0,2	0,2 ± 0,02	3,7 ± 0,2	0,4 ± 0,02
13	Морена	1,7 ± 0,1	0,4 ± 0,02	86,5 ± 0,6	5,7 ± 0,2	0,7 ± 0,04	4,3 ± 0,3	0,7 ± 0,03
14	Нимфа	1,5 ± 0,1	следы (<0,1)	89,4 ± 0,5	4,0 ± 0,2	1,6 ± 0,1	3,0 ± 0,2	0,5 ± 0,02
15	Огненный опал	6,0 ± 0,3	0,5 ± 0,03	85,9 ± 0,4	3,7 ± 0,2	1,4 ± 0,1	2,1 ± 0,1	0,3 ± 0,02
16	Синий утес	2,3 ± 0,2	0,4 ± 0,02	86,9 ± 0,6	3,1 ± 0,1	2,2 ± 0,2	4,5 ± 0,2	0,5 ± 0,02
17	Славянка	3,4 ± 0,1	0,7 ± 0,04	85,3 ± 0,5	5,2 ± 0,2	0,4 ± 0,02	4,3 ± 0,2	0,6 ± 0,03
18	Содружество	4,1 ± 0,2	0,7 ± 0,05	87,8 ± 0,6	2,5 ± 0,2	0,5 ± 0,03	3,9 ± 0,2	0,5 ± 0,02
19	Сувенир	5,4 ± 0,3	0,6 ± 0,03	87,4 ± 0,5	2,4 ± 0,1	1,0 ± 0,1	2,9 ± 0,1	0,3 ± 0,01
20	Темная ночь	2,0 ± 0,1	0,5 ± 0,03	83,9 ± 0,3	6,6 ± 0,3	0,4 ± 0,02	5,5 ± 0,3	1,1 ± 0,1

На основании приведенных данных, для плодов жимолости съедобной характерен следующий набор антоцианинов, в порядке уменьшения: цианидин-3-глюкозид > цианидин-3-рутинозид > цианидин-3,5-диглюкозид > пеонидин-3-глюкозид > пеларгонидин-3-глюкозид.

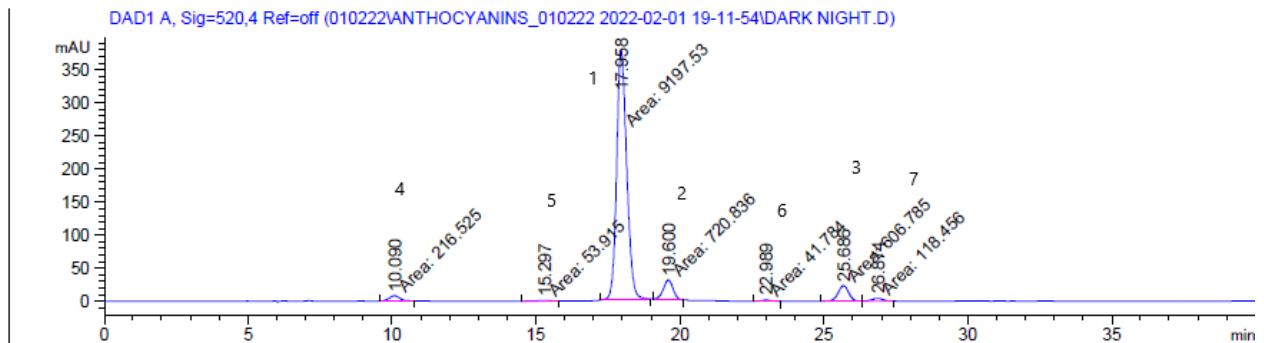


Рисунок 4.1 – Типичная хроматограмма антоцианов плодов жимолости

Полученные результаты профиля антоцианинов совпадают с ранее изученными сортами жимолости, а также с данными, найденными в отечественной и зарубежной литературе [74, 76, 119, 120].

В таких сортах, как «Княгиня», «Авача», «Аврора», «Синий утес» и «Содружество» прослеживается тенденция преобладания пеонидин-3-глюкозида над цианидин-3,5-диглюкозидом. Схожая тенденция наблюдалась и в сортах канадского происхождения, культивируемых в Литве [72].

Вариативность в накоплении биологически активных веществ в различных сортах, может быть связана не только с генетическим фактором, но и с биотическими факторами, такими как низкая температура, солнечная радиация [36]. В данной работе влияние биотических факторов исключено, так как объекты исследования выращивались в одинаковых условиях.

На основании результатов эксперимента и данных, полученных из литературных источников, ключевым признаком, подтверждающим причастность плодов к роду *Lonicera caerulea* subsp. *edulis* (Turcz. ex. Herder) – это цианидин-3-глюкозид, на долю которого приходится более 80% от общего количества антоцианинов [47, 74, 121, 122].

Цианидин-3-глюкозид, как преобладающее соединение фенольной фракции, определяет большинство фармакологических эффектов присущих плодам жимолости съедобной [47, 48, 123].

Также по результатам исследования были установлены естественные границы индивидуальных антоцианов жимолости съедобной, выращиваемой в России. Данные представлены в Таблице 4.2.

Таблица 4.2 – Относительное содержание индивидуальных антоцианинов в изученных сортах плодов жимолости съедобной, выращенной в России (%)

Антоцианин	Диапазон естественных вариаций по данным исследования
Цианидин-3,5-диглюкозид	1,5-7,1
Пеонидин-3,5-диглюкозид	0,1-1,2
Цианидин-3-глюкозид	82,1-89,4
Цианидин-3-рутинозид	2,4-7,2
Пеларгонидин-3-глюкозид	0,2-2,2
Пеонидин-3-глюкозид	2,1-6,7
Пеонидин-3-рутинозид	0,3-1,1

4.1.2. Определение сопутствующих соединений полифенольной природы в плодах жимолости съедобной

Флавонолы и флавоны. В Таблице 4.3 представлены параметры проведения исследования: детектируемые массы флавоноидов и соответствующие им ионы, времена удерживания (R_t), максимумы поглощения (λ_{max}). Были обнаружены некоторые отличия в изучаемых сортах жимолости, по сравнению с ранее исследованными образцами [119]. В результате проведенных исследований были обнаружены два, ранее неописанных, флавоноида – тригликозид рутин-рамнозид и 7-рутинозид лютеолина. Флавоноид авикулярин не был найден ни в одном из 20 сортов жимолости съедобной. Содержание рутина в данных сортах находилось в интервале 2,3-25,8 мг/100 г (Таблица 4.3, 4.4). Он являлся основным и был обнаружен во всех исследуемых сортах жимолости съедобной, за исключением сорта «Нимфа». В других сортах жимолости съедобной, которые имели

русское, польское, словацкое, чешское, швейцарское и американское происхождение, выращенных в Польше и Чехии, также было отмечено преобладание рутина среди флавоно- и флавоногликозидов [74, 76, 124, 125]. Основным флавоноидом в сорте Нимфа является кверцетин-3-вицианозид (3,9 мг/100 г). Содержание рутина оказалось в 1,5 раза меньше, чем кверцетин-3-вицианозид, и составило 2,5 мг/100 г. Среди сортов, выращенных в Польше и имеющих русское (Бакчарская юбилейная, Камчадалка, Крупноплодная, Роксана) и польское (Клон 44) происхождение также наблюдалось преимущественное содержание кверцетин-3-вицианозид по сравнению с рутином [76]. Количественное содержание флавоноидов имело достаточно широкие вариативные границы. Нижняя граница составила 6,6 мг/100 г в сортах Бореалис Бьюти и Морена, верхняя граница имела значение 41,6 мг/100 г в сорте Барышня. По результатам зарубежных исследований содержание флавоноидов зафиксировано на уровне 3,0-35,8 мг/100 г [74, 76, 125]. Полученное автором общее содержание флавоно- и флавоногликозидов, найденных в жимолости съедобной, сопоставимо с данными зарубежных исследований. В результате исследования установлено среднее значение содержания флавоноидов, которое составило 18,5 мг/100 г. Наиболее богатыми сортами жимолости съедобной по содержанию флавоноидов являются «Барышня», «Волхова», «Огненный опал» и «Индиго Гем».

Таблица 4.3 – Результаты ВЭЖХ-ДМД-МС флавоноидов жимолости съедобной

№	Флавоноид	λ_{\max} , нм	Rt, мин	HESI/MS ⁺	Детектируемый ион
1	Рутин рамнозид	256 266 350	12,7	757.30 611.15 465.08 303.24	[M + H] ⁺ [M – рамноза*] ⁺ [M – 2 рамнозы] ⁺ [M – рамноза - рутиноза] ⁺
2	Мирицетин-3- глюкозид	256 268 360	13,6	481,15 319,14	[M + H] ⁺ [M – глюкоза] ⁺
3	Кверцетин-3- вицианозид	256 266 354	14,2	597,24 465,15 303,03	[M + H] ⁺ [M – арабиноза] ⁺ [M – вицианоза] ⁺

Продолжение Таблицы 4.3

4	Лютеолин-7-рутинозид	255 267 347	15,2	595.24 449.13 287.09	[M + H] ⁺ [M – рамноза] ⁺ [M – рутиноза] ⁺
5	Рутин	256 266 354	15,3	611,20 465,15 303,10	[M + H] ⁺ [M – рамноза] ⁺ [M – рутиноза] ⁺
6	Изорамнетин-3-вицианозид	256 268 354	16,1	611,35 479,50 317,09	[M + H] ⁺ [M – арабиноза] ⁺ [M – вицианоза] ⁺
7	Лютеолин-7-глюкозид (цинарозид)	255 267 348	16,6	449,17 287,05	[M + H] ⁺ [M – глюкоза] ⁺
8	Изокверцитрин	256 266 354	16,7	465,14 303,06	[M + H] ⁺ [M – глюкоза] ⁺
9	Кемпферол-3-рутинозид (никотифлорин)	266 348	17,0	595,25 449,23 287,14	[M + H] ⁺ [M – рамноза] ⁺ [M – рутиноза] ⁺
10	Изорамнетин-3-рутинозид (нарциссин)	256 268 354	17,2	625,22 449,23 317,18	[M + H] ⁺ [M – рамноза] ⁺ [M – рутиноза] ⁺

* - остаток дегидратированного сахара (молекула воды высвобождается при образовании гликозидной связи).

Таблица 4.4 – Профиль и суммарное содержание флавоноидов в плодах жимолости съедобной

№	Сорт жимолости съедобной	Содержание, мг/100 г сырого веса, M±m (n=3)										
		Рутин рамнозид	Мирицетин-3-глюкозид	Кверцетин-3-вицианозид	Лютеолин-7-рутинозид	Рутин	Изорамнетин-3-вицианозид	Цинарозид	Изокверцитрин	Никотифлорин	Нарциссин	Сумма флавоноидов
1	Авача	н/о*	0,2± 0,01	2,3± 0,2	следы**	3,6± 0,1	0,1± 0,01	0,1± 0,01	1,7± 0,2	н/о	0,1± 0,01	8,2± 0,2
2	Аврора	0,3± 0,01	0,8± 0,02	1,9± 0,2	0,3± 0,01	5,2± 0,2	н/о	0,5± 0,01	2,9± 0,2	н/о	н/о	11,9 ±0,3
3	Бакчарский великан	н/о	0,4± 0,01	0,7± 0,02	1,1± 0,1	7,3± 0,2	следы	0,5± 0,02	0,8± 0,03	0,2± 0,02	0,5± 0,02	11,5 ±0,2
4	Барышня	3,5± 0,2	1,3± 0,1	2,7± 0,2	2,8± 0,2	25,8 ±0,5	0,3± 0,02	0,3± 0,01	1,9± 0,2	0,2± 0,01	2,8± 0,2	41,6 ±0,7
5	Блю Банана	н/о	0,7± 0,03	4,5± 0,3	н/о	4,4± 0,1	0,3± 0,01	0,1± 0,01	1,6± 0,1	н/о	0,2± 0,01	11,8 ±0,2

Продолжение Таблицы 4.4

6	Бореалис Бист	2,0± 0,1	0,4± 0,01	1,0± 0,1	0,2± 0,01	15,1 ±0,4	след ы	0,6± 0,02	0,8± 0,02	0,4± 0,02	1,1± 0,1	21,6 ±0,4
7	Бореалис Близзард	0,3± 0,02	0,4± 0,02	1,1± 0,1	след ы	6,9± 0,2	след ы	0,2± 0,01	0,9± 0,03	0,2± 0,01	0,5± 0,03	10,5 ±0,2
8	Бореалис Бьюти	0,2± 0,01	0,3± 0,02	2,5± 0,2	0,2± 0,02	2,3± 0,1	0,1± 0,01	0,2± 0,01	0,8± 0,02	след ы	н/о	6,6± 0,2
9	Волхова	0,6± 0,02	1,6± 0,2	8,2± 0,3	0,2± 0,01	22,1 ±0,4	0,4± 0,02	0,3± 0,02	2,9± 0,2	0,2± 0,02	1,5± 0,1	38,0 ±0,6
10	Индиго Гем	н/о	1,0± 0,1	0,8± 0,02	3,0± 0,2	23,3 ±0,5	н/о	0,5± 0,01	2,8± 0,2	0,5± 0,02	0,4± 0,02	32,3 ±0,5
11	Княгиня	1,0± 0,1	0,7± 0,02	1,3± 0,1	0,8± 0,03	10,8 ±0,2	0,1± 0,02	0,3± 0,01	0,8± 0,03	н/о	0,9± 0,02	16,7 ±0,3
12	Маша	1,4± 0,1	0,4± 0,02	2,6± 0,2	след ы	6,7± 0,2	след ы	0,1± 0,02	0,9± 0,02	н/о	0,4± 0,02	12,5 ±0,2
13	Морена	н/о	0,2± 0,01	0,5± 0,02	след ы	4,6± 0,1	след ы	0,1± 0,01	0,5± 0,02	н/о	0,7± 0,02	6,6± 0,2
14	Нимфа	0,3± 0,01	0,3± 0,01	3,9± 0,3	н/о	2,5± 0,1	0,2± 0,01	след ы	1,6± 0,1	0,2± 0,01	0,1± 0,01	9,1± 0,3
15	Огненный опал	н/о	1,2± 0,1	10,3 ±0,2	0,2± 0,02	15,5 ±0,3	н/о	0,7± 0,02	6,3± 0,2	0,8± 0,02	0,2± 0,02	35,2 ±0,5
16	Синий утес	0,5± 0,01	1,6± 0,1	4,1± 0,1	0,2± 0,01	16,0 ±0,3	след ы	0,2± 0,01	2,5± 0,1	0,8± 0,03	0,6± 0,02	26,5 ±0,4
17	Славянка	н/о	0,8± 0,03	1,3± 0,1	3,1± 0,3	15,0 ±0,2	след ы	0,6± 0,02	1,2± 0,1	0,4± 0,01	0,6± 0,02	23,0 ±0,4
18	Содружест во	след ы	0,7± 0,02	3,8± 0,2	0,7± 0,02	8,9± 0,1	0,2± 0,01	1,1± 0,1	1,9± 0,1	0,1± 0,01	0,7± 0,02	18,1 ±0,3
19	Сувенир	след ы	0,3± 0,01	3,6± 0,3	след ы	4,3± 0,1	0,3± 0,02	0,1± 0,01	1,7± 0,1	0,1± 0,02	0,2± 0,01	10,6 ±0,2
20	Темная ночь	н/о	0,8± 0,02	2,6± 0,2	0,2± 0,01	11,5 ±0,2	н/о	0,3± 0,02	1,1± 0,1	0,1± 0,01	0,4± 0,01	17,0 ±0,3

Гидроксикоричные кислоты. При исследовании профиля гидроксикоричных кислот жимолости съедобной было выявлено, что он представлен группой кофеилхинных кислот, основной из которых является хлорогеновая кислота (Таблица 4.5). Кроме того, в изученных сортах жимолости съедобной была обнаружена дикофеилхинная кислота. Среднее содержание гидроксикоричных кислот было на уровне 32,4 мг/100 г. Наименьшее значение было найдено в сорте «Маша» - 18,0 мг/100 г, наибольшее значение гидроксикоричных кислот содержалось в сорте «Темная ночь» - 63,1 мг/100 г. Самыми успешными сортами с точки зрения накопления гидроксикоричных кислот стали «Темная ночь», «Волхова», «Содружество», «Бакчарский великан», «Аврора» и «Нимфа». Процент содержания хлорогеновой кислоты варьировал в диапазоне от 50,2% в

сорта «Огненный опал» до 81,6% в сорте «Темная ночь» от общей суммы гидроксикоричных кислот. Неохлорогеновая и дикофеоилхинная кислоты в плодах жимолости съедобной были обнаружены гораздо в меньших количествах: 0,9-8,6 мг/100 г и 3,8-7,6 мг/100 г, соответственно [124]. Ранее изученным сортам жимолости съедобной и данным, найденным в литературных источниках, присущи следующие значения суммы ГКК: 16,3-79,8 мг/100 г и 27,1-115,5 мг/100 г, что говорит о сопоставимости полученных данных с другими исследованиями [71, 74, 119, 125].

Таблица 4.5 – Профиль гидроксикоричных кислот в плодах жимолости съедобной

№	Наименование Сорта	Содержание, мг/100 г сырого веса, М±m (n=3)			
		Неохлорогеновая Кислота	Хлорогеновая кислота	Дикофеоилхинная кислота	Сумма ГКК
1	Авача	2,9 ± 0,1	16,5 ± 0,2	3,8 ± 0,1	23,2 ± 0,2
2	Аврора	4,5 ± 0,1	31,6 ± 0,3	5,1 ± 0,1	41,2 ± 0,4
3	Бакчарский великан	1,7 ± 0,05	36,5 ± 0,4	7,5 ± 0,2	45,7 ± 0,5
4	Барышня	1,0 ± 0,03	18,4 ± 0,2	4,9 ± 0,1	24,3 ± 0,3
5	Блю Банана	1,7 ± 0,1	16,7 ± 0,2	4,9 ± 0,2	23,3 ± 0,3
6	Бореалис Бист	0,9 ± 0,03	11,9 ± 0,1	7,6 ± 0,2	20,4 ± 0,2
7	Бореалис Близзард	7,2 ± 0,2	19,8 ± 0,2	4,6 ± 0,1	31,6 ± 0,4
8	Бореалис Бьюти	2,5±0,05	14,7 ± 0,2	5,5 ± 0,1	22,7 ± 0,2
9	Волхова	8,6 ± 0,2	33,9 ± 0,3	6,2 ± 0,2	48,7 ± 0,4
10	Индиго Гем	4,6 ± 0,1	10,9 ± 0,1	3,8 ± 0,05	19,3 ± 0,2
11	Княгиня	1,1 ± 0,03	26,1 ± 0,3	5,5 ± 0,1	32,7 ± 0,3
12	Маша	1,0 ± 0,05	12,8 ± 0,1	4,2 ± 0,05	18,0 ± 0,2
13	Морена	6,3 ± 0,1	19,3 ± 0,2	4,4 ± 0,1	30,0 ± 0,3
14	Нимфа	7,2 ± 0,2	30,7 ± 0,2	7,6 ± 0,2	45,5 ± 0,4
15	Огненный опал	6,6 ± 0,2	11,4 ± 0,2	4,7 ± 0,2	22,7 ± 0,3
16	Синий утес	3,6 ± 0,1	18,0 ± 0,3	4,2 ± 0,1	25,8 ± 0,3
17	Славянка	4,0 ± 0,1	15,9 ± 0,2	4,5 ± 0,1	24,4 ± 0,2
18	Содружество	6,7 ± 0,2	44,1 ± 0,4	5,8 ± 0,2	56,6 ± 0,5
19	Сувенир	3,5 ± 0,1	21,8 ± 0,2	4,3 ± 0,1	29,6 ± 0,3
20	Темная ночь	6,0 ± 0,2	51,5 ± 0,3	5,6 ± 0,2	63,1 ± 0,4

Проантоцианидины. Проантоцианидины представляют собой соединения, принадлежащие к группе флаван-3-олов. Флаван-3-олы делятся на мономеры, которыми являются катехин и эпикатехин, и полимеры, которые представляют собой проантоцианидины, преобладающие в ягодах жимолости

съедобной. Проантоцианидины – это компоненты, которые могут влиять на органолептические характеристики сырья, придавая горечь или терпкость. Также важно подчеркнуть их активность в отношении болезней современной цивилизации: сообщается, что они снижают уровень холестерина и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), способствуют лечению заболеваний мочевыводящих путей, а также обладают антиоксидантными и противораковыми свойствами [126]. В результате исследования плодов жимолости съедобной были получены следующие данные по сумме проантоцианидинов в пересчете на проантоцианидин В2 (Таблица 4.6). В сорте «Морена» было найдено 483,8 мг на 100 г сырого сырья. В сорте «Содружество» было обнаружено 1576,9 мг на 100 г сырого сырья. Среднее значение содержания проантоцианидинов составило 970,1 мг/100 г сырого сырья. Выше среднего значения по данному показателю имели следующие сорта жимолости съедобной: «Аврора», «Бакчарский великан», «Волхова», «Индиго Гем», «Нимфа», «Синий утес» и «Содружество».

4.1.3. Количественное определение суммы антоцианинов плодов жимолости съедобной

С помощью методики рН-дифференциальной спектрофотометрии был проведен количественный анализ мономерных антоцианинов в 20 различных плодах жимолости съедобной. Полученные результаты находятся в Таблице 4.6.

Таблица 4.6 – Суммарное содержание антоцианинов и проантоцианидинов в плодах жимолости съедобной

№	Сорт жимолости съедобной	Содержание, мг/100 г сырого веса, $M \pm m, n = 3$		Комментарий
		Сумма антоцианинов	Сумма проантоцианидинов	
1	Авача	271,3 ± 8,0	678,7 ± 28,5	Низкое содержание. Неперспективное сырье.
2	Аврора	508,6 ± 14,4	1416,2 ± 42,1	Высокое содержание. Перспективное сырье для включения в НД.

Продолжение Таблицы 4.6

3	Бакчарский великан	485,4 ± 15,3	1355,9 ± 34,9	Высокое содержание. Перспективное сырье для включения в НД.
4	Барышня	260,7 ± 9,3	595,4 ± 21,7	Низкое содержание. Неперспективное сырье.
5	Блю Банана	323,4 ± 10,4	938,9 ± 35,7	Низкое содержание. Неперспективное сырье.
6	Бореал Бист	201,2 ± 7,8	774,1 ± 27,2	Низкое содержание. Неперспективное сырье.
7	Бореал Близзард	420,7 ± 11,6	766,9 ± 25,0	Среднее содержание. Потенциальное сырье для дальнейших исследований.
8	Бореал Бьюти	240,3 ± 7,2	757,8 ± 22,2	Низкое содержание. Неперспективное сырье.
9	Волхова	529,5 ± 13,8	1295,5 ± 50,7	Высокое содержание. Перспективное сырье для включения в НД.
10	Индиго Гем	493,4 ± 12,5	1121,7 ± 48,5	Высокое содержание. Перспективное сырье для включения в НД.
11	Княгиня	321,6 ± 10,1	547,8 ± 25,3	Низкое содержание. Неперспективное сырье.
12	Маша	301,2 ± 8,5	618,7 ± 30,3	Низкое содержание. Неперспективное сырье.
13	Морена	242,3 ± 9,2	483,8 ± 20,4	Низкое содержание. Неперспективное сырье.
14	Нимфа	503,1 ± 11,3	1142,3 ± 49,9	Высокое содержание. Перспективное сырье для включения в НД.
15	Огненный опал	263,4 ± 9,5	844,3 ± 29,1	Низкое содержание. Неперспективное сырье.
16	Синий утес	505,8 ± 12,0	1319,3 ± 42,4	Высокое содержание. Перспективное сырье для включения в НД.
17	Славянка	478,1 ± 13,1	769,8 ± 33,9	Среднее содержание. Потенциальное сырье для дальнейших исследований.
18	Содружество	389,9 ± 9,2	1576,9 ± 50,4	Среднее содержание. Потенциальное сырье для дальнейших исследований.
19	Сувенир	327,8 ± 9,5	873,5 ± 31,1	Низкое содержание. Неперспективное сырье.
20	Темная ночь	553,9 ± 12,7	1524,6 ± 46,7	Высокое содержание. Перспективное сырье для включения в НД.

Где: низкое содержание – до 380,0 мг на 100 г сырья; среднее содержание – от 380,1 мг на 100 г сырья до 485,0 мг на 100 г сырья; высокое содержание – от 485,1 мг на 100 г сырья.

По данным Таблицы 4.6 видно, что среднее значение содержания мономерных форм антоцианинов, выраженное в эквиваленте цианидин-3-глюкозида (преобладающий антоцианин), составило $381,1 \pm 5,0$ мг/100 г сырья. Наименьшее значение было найдено в жимолости съедобной сорта «Бореалис Бист» и составляло 201, 2 мг/100г сырья, наибольшее было обнаружено в сорте «Темная ночь» – 553,9 мг/100г сырья. В 70% изученных сортов жимолости съедобной количество содержащихся антоцианинов превышало 300мг/100г сырья. По данным исследования можно выделить наиболее перспективные сорта жимолости съедобной, а именно: «Темная ночь», «Аврора», «Волхова», «Синий утес», «Нимфа». Меньшее количество этих пигментов, выраженное через цианидин-3-глюкозид (235,4 мг/100 г), было зарегистрировано в Польше [127]. В сортах жимолости съедобной, выращенных в Польше, Чехии и Литве, и, которые имеют польское, чешское, российское, канадское и словацкое происхождение, по данным исследователей было найдено от 150,3 до 655,2 мг/100 г антоцианинов [71, 74, 76, 124, 127, 128].

По данным, полученным в результате анализа суммы мономерных антоцианов, который проводился методом высокоспецифичной рН-дифференциальной спектрофотометрии, для проекта фармакопейной статьи «Плоды жимолости» в разделе «Числовые показатели» целесообразно установить нижний предел суммарного содержания мономерных антоцианинов в пересчете на цианидин-3-глюкозид – не менее 0,15%.

На основании проведенных исследований плоды сорта жимолости съедобной «Темная ночь» рекомендуется к дальнейшему изучению с целью получения статуса лекарственного растительного сырья.

4.2. Результаты исследования полифенольного комплекса плодов черноплодной рябины

4.2.1. Профиль индивидуальных антоцианинов в плодах черноплодной рябины

Антоцианы, идентифицированные в плодах аронии черноплодной с помощью ВЭЖХ-ДМД-МС, представлены на Рисунке 4.2 и описаны в Таблице 4.7. Идентификацию пиков проводили по времени удерживания, порядку элюирования, УФ-ВИД-спектрам и масс-спектрам путем сравнения с данными из литературы.

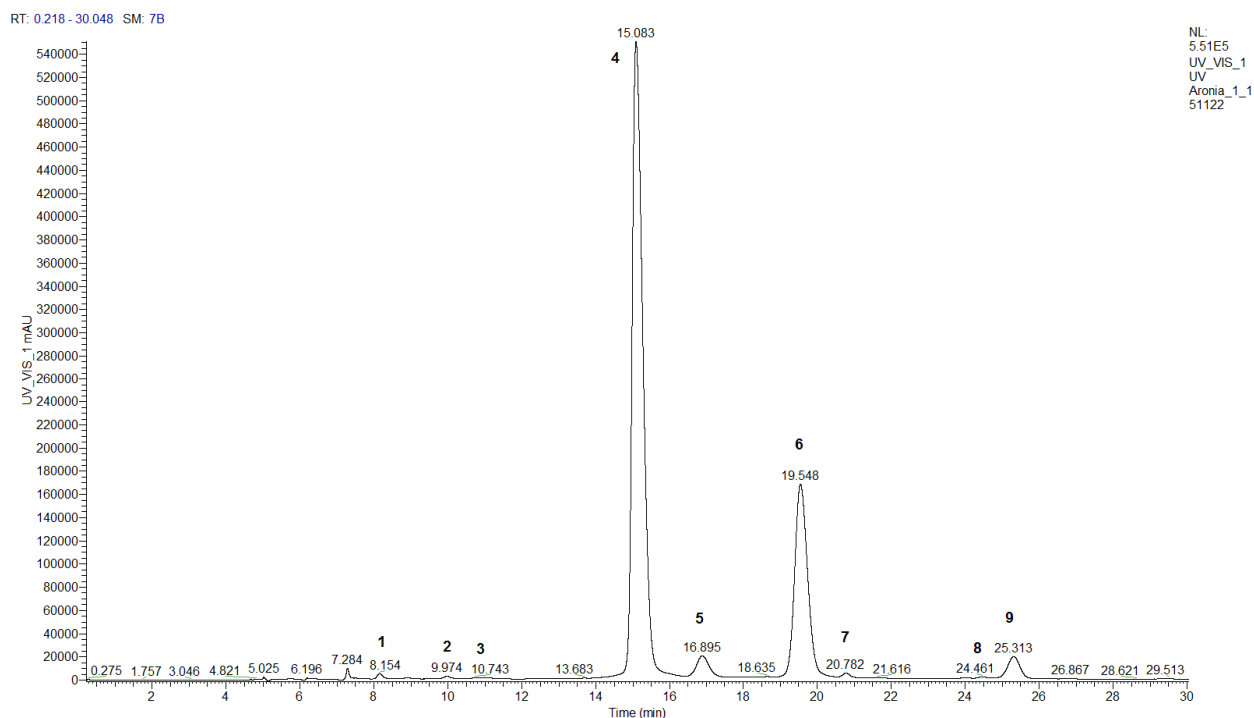


Рисунок 4.2 – Хроматограмма извлечения из плодов аронии черноплодной сорта «Надзея» при $\lambda=520$ нм. Номера пиков антоцианинов на рисунке соответствуют таковым в Таблице 4.7.

Таблица 4.7 – Идентификация антоцианинов плодов аронии черноплодной с помощью ВЭЖХ-ДМД-МС

№	Антоцианин	Rt, мин	λ_{\max} , нм	HESI/MS ⁺ , детектируемый ион
1	Цианидин-3-гексозид-эпикатехин	8,1	524, 280	737.30 [M] ⁺ , 287.21 [M – гексоза – эпикатехин] ⁺
2	Цианидин-3-пентозид-эпикатехин	9,9	520, 280	707.31 [M] ⁺ , 287.20 [M – пентоза – эпикатехин] ⁺
3	Цианидин-3-гексозид-эпикатехин-эпикатехин	10,7	520, 280	1025.49 [M] ⁺ , 287.21 [M – гексоза – эпикатехин – эпикатехин] ⁺
4	Цианидин-3-галактозид	15,0	516, 280	449.20 [M] ⁺ , 287.14 [M – галактоза] ⁺
5	Цианидин-3-глюкозид	16,9	516, 280	449.20 [M] ⁺ , 287.14 [M – глюкоза] ⁺
6	Цианидин-3-арабинозид	19,5	516, 280	419.18 [M] ⁺ , 287.14 [M – арабиноза] ⁺
7	5-карбоксопираноцианидин-3-гексозид	20,7	504, 280	517.25 [M] ⁺
8	5-карбоксопираноцианидин-3-пентозид	24,4	508, 280	487.21 [M] ⁺
9	Цианидин-3-ксилозид	25,2	516, 280	419.18 [M] ⁺ , 287.16 [M – ксилоза] ⁺

Наряду с четырьмя основными антоцианинами в плодах черноплодной рябины (цианидин-3-галактозид, цианидин-3-глюкозид, цианидин-3-арабинозид и цианидин-3-ксилозид) были обнаружены некоторые минорные ингредиенты: три продукта конденсации флаванолов антоцианинов и два пираноантоцианина [129]. Аналогичным методом ранее были обнаружены цианидин-3-гексозид-эпикатехин, цианидин-3-пентозид-эпикатехин и цианидин-3-гексозид-эпикатехин-эпикатехин в плодах аронии черноплодной «Галичанка», возделываемой в Польше [82, 130]. В рамках работы впервые идентифицированы пираноантоцианы 5-карбоксопираноцианидин-3-гексозид и 5-карбоксопираноцианидин-3-пентозид. Пируваты антоцианов обычно образуются в плодах при хранении и/или переработке. Ранее они были обнаружены в виноградных соках и вишневых нектарах, а не в свежем и замороженном сырье. Тем не менее, производные цианидин-3-гликозида-эпикатехина и 5-карбоксопираноцианидин-3-гликозиды в

совокупности составляют от 0,7 до 1,0% от суммарного содержания антоцианов в плодах черноплодной рябины (Таблица 4.7) и, следовательно, вносят незначительный вклад в биологическую активность. Двумя основными антоцианинами являются цианидин-3-галактозид (65,6–69,3%) и цианидин-3-арабинозид (24,2–26,9%). Среднее соотношение концентраций двух основных антоцианов составляло 2,44–2,86.

4.2.2. Определение сопутствующих соединений полифенольной природы в плодах черноплодной рябины

Проантоцианидины. Проантоцианидины представляют собой самую большую группу полифенолов в черноплодной рябине и в основном отвечают за вяжущий вкус плодов. ПАЦ наряду с мономерными антоцианами во многом определяют биологическую активность черноплодной рябины. Общее содержание ПАЦ в пересчете на процианидин В₂ показано в Таблице 4.8.

Таблица 4.8 – Содержание катехинов и проантоцианидинов в плодах аронии черноплодной

Показатель	Надзья	Арон	Черноплодная	Вениса	Мулатка
Катехин, мг/100 г сырого веса, $M \pm m$ (n = 3)	н/о*	н/о	Следы**	н/о	Следы
Эпикатехин, мг/100 г сырого веса, $M \pm m$ (n = 3)	8,3 ± 0,2	6,3 ± 0,2	1,7 ± 0,1	2,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1
Суммарное содержание проантоцианидинов, мг/100 г сырого веса, $M \pm m$ (n = 3)	2524,1 ± 37,7	2198,9 ± 35,6	1395,8 ± 24,0	2212,4 ± 31,3	2476,0 ± 35,5

*Н/о: – менее 0,01 мг/100 г.

**Следы: – менее 0,1 мг/100 г.

Было обнаружено, что эпикатехин является основной мономерной единицей ПАЦ черноплодной рябины. Свободный эпикатехин обнаружен во всех сортах в низких концентрациях от 1,7 до 8,3 мг/100 г (Таблица 4.8). Следовые количества катехина обнаружены только в сортах «Черноплодная» и «Мулатка». Ранее более высокие концентрации эпикатехина (15,8–109,4 мг/100 г) и катехина (21,5 мг/100 г) были обнаружены в черноплодной рябине из Польши, Чехии и Болгарии [80, 82, 83, 130]. Плоды сорта «Черноплодная» содержали наименьшее количество ПАЦ (1395,8 мг/100 г) среди изученных образцов, а плоды четырех других сортов содержали ПАЦ в узком диапазоне от 2198,9 в сорте «Арон» до 2524,1 мг/100 г в сорте «Надзея». Для суммарного содержания ПАЦ наблюдалась та же тенденция, что и для суммарного содержания антоцианинов. Полученные в данной работе количества ПАЦ аналогичны данным Wangenstein (2,46–3,74 г/100 г) [84] и примерно в два раза превышают количества полимерных ПАЦ (1426,6–1751,2 мг/100 г), которые оценивались с использованием флороглюцинолиза-ВЭЖХ-ФЛД и тиолиза-ВЭЖХ-ДМД-ФЛД [119]. По профилю ПАЦ только два димера типа В, В2 и В5 с $[M + N]^+ / [M - N]^-$ 579/577, и один тример С1 с $[M + N]^+ / [M - N]^-$ 867/865, были обнаружены и лишь в незначительных количествах. Процианидин В2 идентифицировали методом сравнения с аутентичным аналитическим стандартом, а процианидины В5 и С1 идентифицировали методом масс-спектрометрии в соответствии с литературными данными [131]. Олигомерные ПАЦ от тетрамеров до гексамеров не обнаружены ни в одном из пяти сортов. Это свидетельствует о том, что фракция ПАЦ аронии состоит преимущественно из высших олигомеров со степенью полимеризации большей, чем С6, и полимеров, что подтверждено в [82, 131] и рядом других исследователей [132, 133].

Флавонолы. Из флавонолов обнаружены только производные кверцетина: пять гликозидов и свободный кверцетин (Рисунок 4.3, Таблица 4.9). Рутин, гиперозид, изокверцитрин и кверцетин идентифицировали по соответствующим аутентичным аналитическим стандартам. Предварительная идентификация дигексозида и 3-вицианозида кверцетина была достигнута путем сравнения

порядка элюирования, УФ-ВИД и масс-спектров с литературными данными [15]. По данным литературы, флавонолы в плодах черноплодной рябины включают преимущественно гликозиды кверцетина, хотя сообщалось также о наличии гликозидов изорамнетина и кемпферола [80, 82, 83, 84].

Тремя основными флавонолгликозидами во всех плодах черноплодной рябины были гиперозид, рутин и изокверцитрин. Рутин был преобладающим флавонолгликозидом только в плодах сорта «Черноплодная», тогда как в плодах остальных четырех сортов преобладал гиперозид. Содержание кверцетиндигексозида и кверцетин-3-вицианозида находилось примерно в 1,5–3,4 раза меньше содержания гиперозида, рутина и изокверцитрина, за исключением плодов «Черноплодная», в которых кверцетин-3- обнаружены виканозид и изокверцитрин. Кверцетин был второстепенным компонентом во всех образцах.

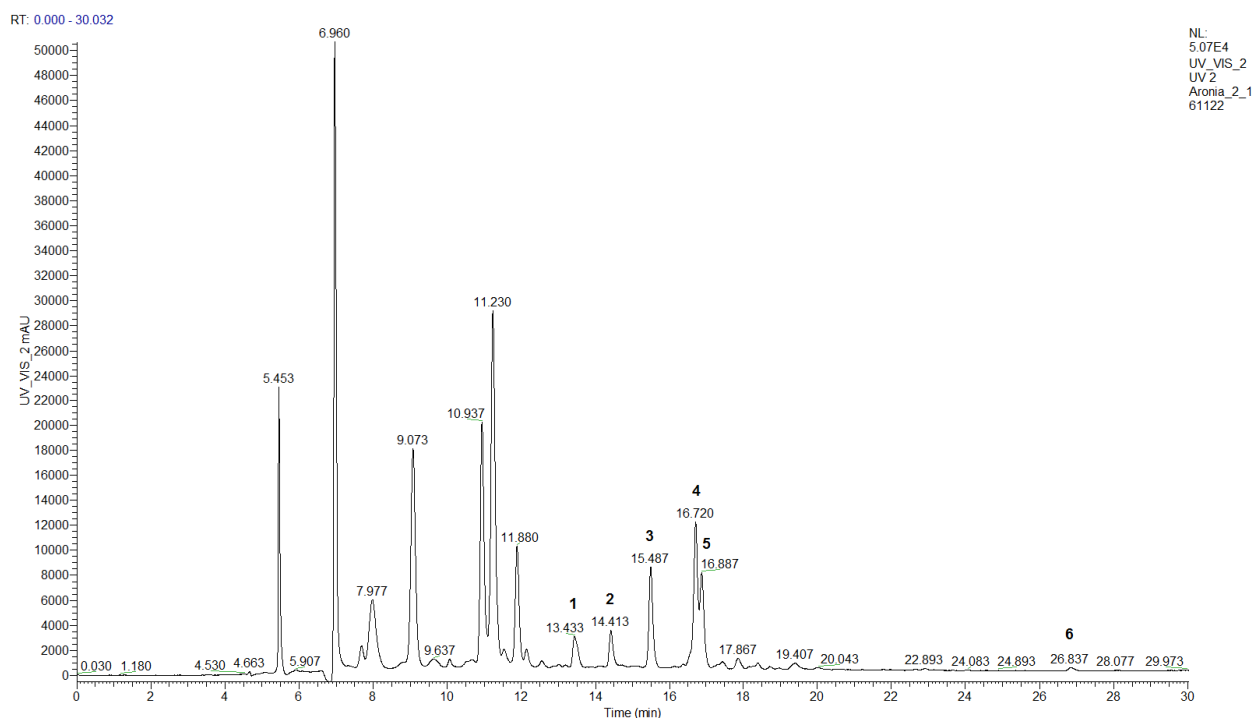


Рисунок 4.3 – Хроматограмма извлечения из плодов аронии «Арон» при $\lambda=350$ нм. Номера пиков флавонолов на рисунке соответствуют таковым в Таблице 4.9.

Таблица 4.9 – Идентификация флавонолов в плодах аронии черноплодной с помощью ВЭЖХ-ДМД-МС

№	Флавонол	Rt, мин	λ_{\max} , нм	HESI/MS ⁺ , детектируемый ион
1	Кверцетин-дигексозид	13,4	255, 265, 354	627.25 [M + H] ⁺ , 465.39 [M – гексоза + H] ⁺ , 303.10 [M – 2 гексозы + H] ⁺

Продолжение Таблицы 4.9

2	Кверцетин-3-вицианозид	14,4	256, 266, 355	597.25 [M + H] ⁺ , 303.09 [M – вицианоза + H] ⁺
3	Рутин	15,5	256, 266, 355	611.25 [M + H] ⁺ , 465.17 [M – рамноза + H] ⁺ , 303.12 [M – рутиноза + H] ⁺
4	Гиперозид	16,7	256, 266, 356	465.22 [M + H] ⁺ , 303.13 [M – галактоза + H] ⁺
5	Изокверцитрин	16,9	256, 266, 356	465.20 [M + H] ⁺ , 303.08 [M – глюкоза + H] ⁺
6	Кверцетин	26,8	255, 267, 372	303.10 [M + H] ⁺

Суммарное содержание флавонолов колебалось от 21,3 мг на 100 г сырья в плодах аронии черноплодной сорта «Черноплодная» до 58,1 мг на 100 г сырья в плодах сорта «Арон» (Таблица 4.10). В различных опубликованных исследованиях сообщалось, что три основных флавонолгликозида в разных сортах плодов аронии черноплодной такие же, как и в изученных образцах [59, 84]. Аналогичные результаты по общему содержанию флавонолов (19,2–55 мг на 100 г сырья) были получены и многими другими исследователями [110, 130]. В то же время ряд авторов наблюдали более высокое содержание общих флавонолов (64,8–124,9 мг на 100 г сырья) в сортах черноплодной рябины из Болгарии и Польши [80, 82, 84, 134].

Таблица 4.10 – Содержание флавонолов в плодах аронии черноплодной

№	Флавонол	Надзья	Арон	Черноплодная	Вениса	Мулатка
1	Кверцетин-дигексозид	5,8 ± 0,1	6,3 ± 0,2	2,2 ± 0,1	3,8 ± 0,1	3,8 ± 0,1
2	Кверцетин-3-вицианозид	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,1	3,0 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,4 ± 0,1
3	Рутин	12,3 ± 0,3	15,8 ± 0,3	7,0 ± 0,2	10,2 ± 0,2	9,8 ± 0,2
4	Гиперозид	16,7 ± 0,3	19,5 ± 0,3	5,7 ± 0,1	11,2 ± 0,2	10,9 ± 0,2
5	Изокверцитрин	10,0 ± 0,2	10,5 ± 0,2	3,1 ± 0,1	6,4 ± 0,1	6,1 ± 0,1
6	Кверцетин	0,4 ± 0,02	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01
Сумма флавонолов, мг/100 г сырого веса, M ± m (n = 3)		50,9 ± 0,5	58,1 ± 0,6	21,3 ± 0,2	35,2 ± 0,3	34,1 ± 0,3

Гидроксикоричные кислоты. ГКК были представлены изомерами кофеилхиновой кислоты: неохлорогеновой, хлорогеновой и криптохлорогеновой кислот (Таблица 4.11). Идентификацию неохлорогеновой и хлорогеновой кислот проводили с использованием аутентичных аналитических стандартов, тогда как криптохлорогеновую кислоту идентифицировали с использованием порядка элюирования, УФ-спектров и масс-спектрометрии. В то же время в ходе исследования не были обнаружены дикафеоилхиновая кислота, *n*-кумароилхиновая, изомеры кофеилшикимовой кислоты, синаповая кислота и глюкозиды ГКК, идентифицированные в качестве минорных компонентов плодов черноплодной рябины в других научных работах [82, 84]. Хлорогеновая кислота была основной ГКК во всех сортах и составляла 51,8–60,8% от общего содержания ГКК. Количество неохлорогеновой кислоты было в 1,3–1,8 раза меньше, чем хлорогеновой кислоты. Криптохлорогеновая кислота была минорной ГКК во всех образцах.

Таблица 4.11 – Содержание гидроксикоричных кислот в изученных сортах плодов аронии черноплодной

ГКК	Надзья	Арон	Черноплодная	Вениса	Мулатка
Неохлорогеновая кислота	45,8 ± 0,2	31,6 ± 0,2	17,5 ± 0,1	15,0 ± 0,1	33,2 ± 0,2
Хлорогеновая кислота	81,2 ± 0,4	47,4 ± 0,3	29,2 ± 0,2	21,3 ± 0,2	43,1 ± 0,3
Криптохлорогеновая кислота	9,9 ± 0,2	3,0 ± 0,1	1,3 ± 0,02	4,8 ± 0,1	6,7 ± 0,1
Суммарное содержание ГКК, мг / 100 г сырого веса, М ± m (n = 3)	136,9 ± 0,6	82,0 ± 0,5	48,0 ± 0,4	41,1 ± 0,3	83,0 ± 0,4

Суммарное содержание ГКК варьировало от 41,1 мг на 100 г сырья аронии черноплодной в плодах сорта «Вениса» до 136,9 мг на 100 г сырья в плодах сорта «Надзья». Эти результаты согласуются с результатами, полученными многими авторами [84, 114]. Напротив, Rop, Tarko, Denev, Oszmiański, and Skupien сообщали о значительно более высоком суммарном содержании ГКК в плодах черноплодной рябины разных сортов из Чехии, Польши и Болгарии (от 189,9 до 407,0 мг на 100 г сырья) [80, 82, 130, 134].

Общее количество полифенолов и антирадикальная активность.

Результаты эксперимента показали большую вариабельность общего содержания полифенолов (ПФ) среди анализируемых образцов (Таблица 4.12). Наименьшее количество ПФ обнаружено в плодах сорта «Черноплодная» (747,2 мг на 100 г сырья), и гораздо более высокие количества ПФ обнаружены в плодах четырех других сортов: от 1369,9 у сорта «Надзея» до 1667,8 мг на 100 г сырья в «Мулатке». Концентрации ПФ соответствовали, в первую очередь, концентрациям антоцианинов и, в меньшей степени, флавонолов и ГКК. Вклад антоцианинов в содержание ПФ был наименьшим у плодов аронии черноплодной сорта «Мулатка» (36,9%) и наибольшим у плодов сорта «Черноплодная» (51,9%). Опубликованные ранее данные о количестве ПФ в различных сортах черноплодной рябины также весьма вариабельны и составляют от 603 до 2377,1 мг на 100 г сырья [84]. Определенные факторы, включая сорт, зону выращивания, климатические условия, процедуру экстракции и модификацию метода Фолина-Чокальтеу, могут объяснить такую значительную разницу в результатах ПФ.

Таблица 4.12 – Содержание ПФ и антирадикальная активность изученных сортов аронии черноплодной

Сорт аронии	Суммарное содержание ПФ, мг/100 г сырого веса, $M \pm m$ (n = 3)	Антирадикальная активность, мг ТЭ* / 100 г сырого веса, $M \pm m$ (n = 3)
«Надзея»	1369,9 ± 27,4	29,1 ± 4,4
«Арон»	1594,5 ± 31,9	35,1 ± 5,3
«Черноплодная»	747,2 ± 14,8	23,5 ± 3,5
«Вениса»	1651,5 ± 33,0	31,9 ± 4,8
«Мулатка»	1667,8 ± 33,4	32,5 ± 4,9

*ТЭ: – Тролоксый эквивалент

По данным Таблицы 4.12 прослеживается взаимосвязь между общим содержанием полифенолов и антирадикальной активностью, полученной в тесте DPPH.

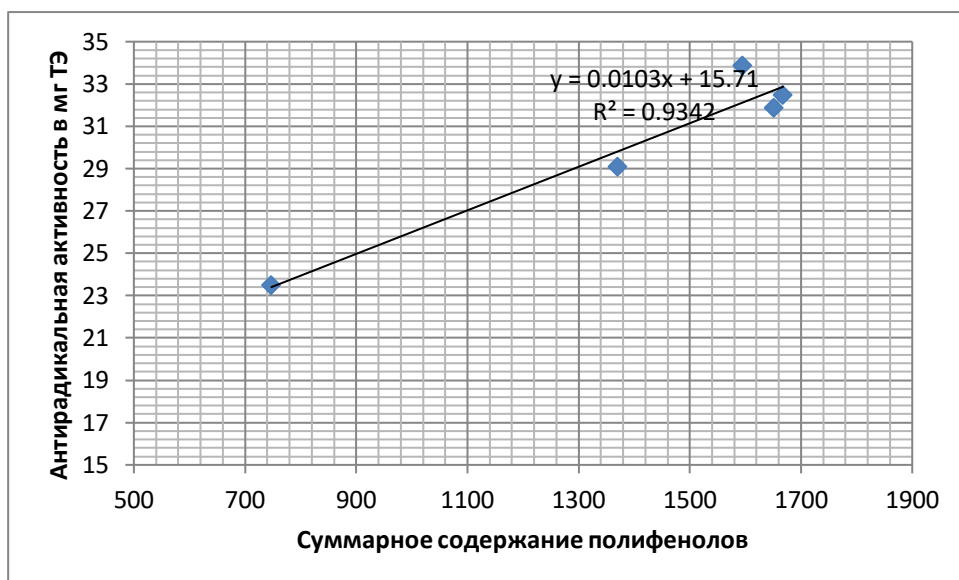


Рисунок 4.4 – Зависимость антирадикальной активности от общего содержания полифенолов

Как видно на Рисунке 4.4, коэффициент корреляции равен 0,9342, что говорит о корреляционной зависимости между содержанием полифенолов и значением антирадикальной активности. Антоцианины вносят наибольший вклад в показатель суммарного значения полифенолов, поэтому антирадикальная активность будет зависеть от суммарного значения антоцианинов в объекте исследования. Вышеупомянутая гипотеза подтверждается данными, приведенными в Таблице 4.13.

4.2.3. Количественное определение суммы антоцианинов плодов черноплодной рябины

Наименьшее содержание антоцианинов обнаружено в плодах аронии черноплодной сорта «Черноплодная» (388,1 мг на 100 г сырья), в плодах остальных четырех сортов аронии черноплодной количество антоцианинов составило от 590,0 мг на 100 г сырья в сорте «Вениса» до 620,5 мг на 100 г сырья в сорте «Арон» (Таблица 4.13).

Таблица 4.13 – Профиль и суммарное содержание антоцианинов в изученных сортах плодов аронии черноплодной

№	Антоцианин	Надзья	Арон	Черноплодная	Вениса	Мулатка
Профиль антоцианинов, % от суммы						
1	Цианидин-3-гексозид-эпикатехин	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,02
2	Цианидин-3-пентозид-эпикатехин	0,2 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01
3	Цианидин-3-гексозид-эпикатехин-эпикатехин	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	н/о	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,02
4	Цианидин-3-галактозид	68,7 ± 0,5	69,3 ± 0,6	65,6 ± 0,5	68,9 ± 0,4	69,3 ± 0,6
5	Цианидин-3-глюкозид	2,6 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,6 ± 0,2
6	Цианидин-3-арабинозид	25,0 ± 0,2	24,2 ± 0,2	26,9 ± 0,3	24,6 ± 0,2	24,2 ± 0,3
7	5-карбоксихирано-цианидин-3-гексозид	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,02	0,2 ± 0,01
8	5-карбоксихирано-цианидин-3-пентозид	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,02	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01
9	Цианидин-3-ксилозид	2,7 ± 0,1	3,1 ± 0,1	4,0 ± 0,2	3,2 ± 0,1	3,2 ± 0,1
Сумма антоцианинов, мг/100 г сырого веса, М ± m (n = 3)		590,0 ± 12,4	620,5 ± 16,5	388,1 ± 8,9	614, ± 13,3	615,8 ± 13,7

По литературным данным концентрации антоцианинов в плодах черноплодной рябины варьировали в широком диапазоне от 192,2 до 2134,9 мг на 100 г сырья [80, 83, 83, 84, 128, 129, 130, 135, 136, 137]. Такой широкий диапазон концентраций антоцианов может быть обусловлен различными факторами, включая сорт, генотип, зону выращивания, зрелость, дату сбора урожая, процедуру экстракции и даже метод анализа (прямая УФ-спектрофотометрия, рН-дифференциальный метод, ВЭЖХ-ДМД или ВЭЖХ-МС). Таким образом плоды черноплодной рябины следует считать одним из наиболее богатых источников антоцианов.

4.3. Результаты исследования полифенольного комплекса плодов голубики высокорослой

4.3.1. Профиль индивидуальных антоцианинов плодов голубики высокорослой

В плодах голубики высокорослой идентифицировано 22 индивидуальных антоцианина: 3-галактозиды, 3-глюкозиды и 3-арабинозиды дельфинидина, цианидина, петунидина, пеонидина и мальвидина, 3-ксилозид мальвидина и их ацилированные уксусной кислотой производные (Таблица 4.14, Рисунок 4.5).

Таблица 4.14 – Профиль и относительное содержание антоцианинов изученных сортов плодов голубики высокорослой

Антоцианин	Содержание, % от суммы антоцианинов						
	Голдтраубе 71	Блюрей	Блю Голд	Ковилл	Спартан	Эллиот	Ронкокас
Дельфинидин-3-галактозид	7,2±0,2	9,3±0,2	21,1±0,2	12,1±0,1	4,5±0,1	21,4±0,2	12,2±0,2
Дельфинидин-3-глюкозид	следы*	2,2±0,06	0,6±0,03	3,8±0,15	1,6±0,05	0,4±0,01	3,6±0,09
Дельфинидин-3-арабинозид	2,2±0,02	3,7±0,1	6,8±0,09	5,5±0,2	3,3±0,1	11,6±0,1	5,4±0,1
Цианидин-3-галактозид	14,3±0,1	6,0±0,2	11,5±0,2	5,5±0,1	5,3±0,2	6,6±0,2	5,8±0,2
Цианидин-3-глюкозид	0,3±0,02	1,2±0,07	0,1±0,02	1,6±0,06	2,0±0,03	следы	1,6±0,05
Петунидин-3-галактозид	9,0±0,1	7,9±0,2	14,2±0,2	7,8±0,2	4,4±0,2	13,3±0,3	8,4±0,2
Петунидин-3-глюкозид	0,3±0,01	3,1±0,1	0,3±0,02	3,9±0,1	2,1±0,08	н/о**	4,2±0,07
Цианидин-3-арабинозид	6,3±0,2	2,8±0,2	4,4±0,1	2,6±0,09	4,8±0,15	3,2±0,1	2,7±0,1
Петунидин-3-арабинозид	4,0±0,1	3,2±0,15	4,8±0,2	3,4±0,1	4,8±0,1	6,2±0,15	3,6±0,1
Пеонидин-3-галактозид	2,7±0,07	2,0±0,05	1,9±0,07	1,7±0,1	1,3±0,03	1,2±0,02	1,5±0,03
Мальвидин-3-галактозид	32,7±0,3	28,4±0,4	23,3±0,3	23,5±0,2	17,9±0,3	23,7±0,2	23,4±0,3
Пеонидин-3-глюкозид	0,2±0,02	0,9±0,06	0,2±0,02	0,9±0,02	0,6±0,02	н/о	0,9±0,03
Мальвидин-3-глюкозид	2,2±0,08	11,1±0,2	0,9±0,04	10,8±0,2	11,3±0,1	0,7±0,03	11,4±0,2

Продолжение Таблицы 4.14

Пеонидин-3-арабинозид	0,8±0,01	0,6±0,02	0,5±0,02	0,5±0,03	1,0±0,04	0,4±0,02	0,4±0,02
Мальвидин-3-арабинозид	15,0±0,2	14,8±0,3	8,6±0,2	13,4±0,3	26,8±0,3	11,2±0,1	11,7±0,15
Дельфинидин-3-ацетил-глюкозид	следы	0,4±0,01	н/о	0,5±0,01	следы	н/о	0,5±0,01
Мальвидин-3-ксилозид	0,2±0,02	н/о	н/о	н/о	1,3±0,02	н/о	н/о
Цианидин-3-ацетил-глюкозид	0,1±0,02	0,5±0,02	следы	0,5±0,02	0,2±0,01	следы	0,5±0,02
Петунидин-3-ацетил-глюкозид	следы	0,4±0,01	следы	0,5±0,01	0,6±0,02	н/о	0,6±0,03
Мальвидин-3-ацетил-галактозид	1,4±0,05	0,3±0,02	0,4±0,02	0,2±0,02	2,1±0,1	следы	0,2±0,01
Пеонидин-3-ацетил-глюкозид	следы	0,2±0,02	н/о	0,3±0,02	0,3±0,02	н/о	0,2±0,02
Мальвидин-3-ацетил-глюкозид	0,9±0,09	1,0±0,05	0,3±0,01	1,0±0,1	3,7±0,15	следы	1,1±0,04

*Следы – менее 0,1 %

**Н/о – менее 0,01%

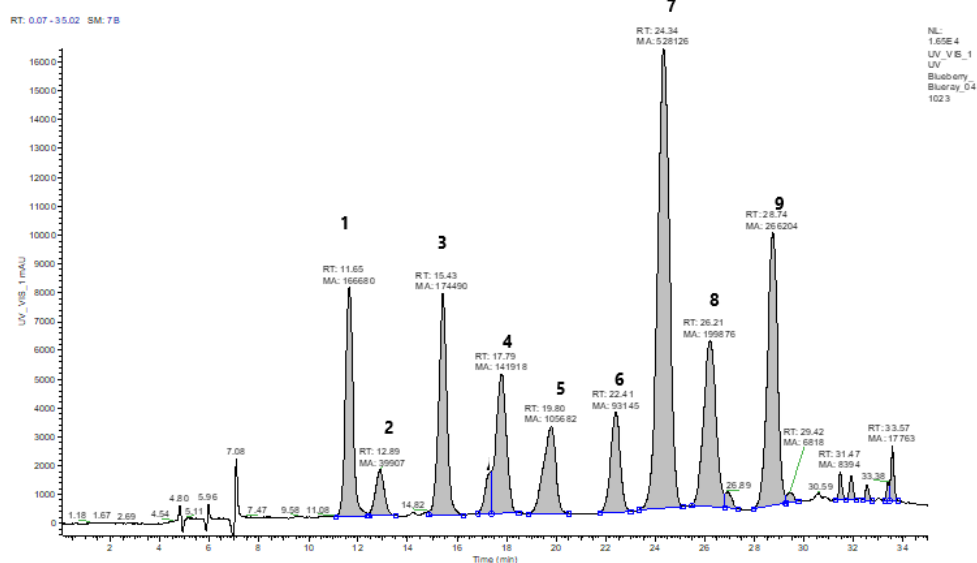
Blueberry Blueray

Рисунок 4.5 – Хроматограмма извлечения из плодов голубики высокорослой сорта «Блюрей»

В шести из семи изученных сортов преобладал мальвидин-3-галактозид (23,3-32,7%), тогда как в голубике высокорослой сорта «Спартан» – мальвидин-3-арабинозид (26,8%). Помимо 3-галактозида и 3-арабинозида мальвидина(7,9) к основным антоцианинам голубики высокорослой относятся 3-галактозиды дельфинидина(3), цианидина(4) и петунидина(8), 3-арабинозиды дельфинидина(6), петунидина(5) и цианидина(2), а также 3-глюкозид мальвидина(1).

На основании проведенных испытаний выявлены характерные особенности профиля антоцианинов плодов голубики высокорослой, по которым можно достоверно отличить ее от плодов черники обыкновенной:

основную часть профиля составляют 3-галактозиды и 3-арабинозиды всех пяти агликонов при относительно низких концентрациях или следовых количествах, соответствующих 3-глюкозидов; отмечено преобладание 3-галактозида мальвидина; плоды голубики высокорослой отличаются высоким содержанием (а в отдельных случаях и преобладанием) 3-арабинозида мальвидина, а также относительно высоким содержанием ацилированных форм антоцианинов.

4.3.2. Определение сопутствующих соединений полифенольной природы в плодах голубики высокорослой

Сумма полифенолов в пересчете на галловую кислоту. В плодах голубики высокорослой было проведено определение соединений полифенольной природы.

Как показано в Таблице 4.15, в плодах голубики высокорослой среднее содержание полифенолов было отмечено на уровне 517, 8 мг на 100 г сырья. Пять из семи изученных сортов имели значение выше среднего: «Голдтраубе 71», «Блю Голд», «Ковилл», «Эллиот» и «Ронкокас».

Таблица 4.15 – Суммарное содержание полифенолов в изучаемых сортах плодов голубики высокорослой в пересчете на галловую кислоту

№	Сорт голубики	Сумма полифенолов, мг/100 г сырого веса $M \pm m$ (n = 3)
1	Голдтраубе 71	556,5 ± 16,7
2	Блюрей	350,6 ± 10,5
3	Блю Голд	612,3 ± 18,4
4	Ковилл	577,1 ± 17,3
5	Спартан	301,4 ± 9,1
6	Эллиот	620,2 ± 18,6
7	Ронкокас	606,9 ± 18,2

Проантоцианидины. Было проведено исследование по определению суммы проантоцианидинов в пересчете на проантоцианидин В2 в плодах голубики высокорослой.

Наибольшее содержание было зафиксировано в плодах голубики высокорослой сорта «Эллиот» (899,1 мг на 100 г сырья). Также на высоком уровне проантоцианидины содержались в таких сортах голубики высокорослой, как «Ронкокас» и «Блю Голд». Самое низкое значение по данному показателю найдено в сорте «Спартан» - 359 мг на 100 г сырья. Среднее значение находилось на уровне 708,9 мг на 100 г сырья (Таблица 4.15).

4.3.3. Количественное определение суммы антоцианинов плодов голубики высокорослой

Количественное содержание антоцианинов в плодах голубики высокорослой варьировалось в диапазоне от 134,3 мг до 252,4 мг на 100 г сырья (Таблица 4.16). Наименьшее накопление приходилось на голубику высокорослую сорта «Спартан», наибольшим накоплением обладала голубика высокорослая сорта «Блюрей». В трех из семи изученных сортов голубики высокорослой общее количество антоцианинов превышало 200 мг на 100 г сырья.

Таблица 4.16 – Содержание антоцианинов и проантоцианидинов в плодах голубики высокорослой

№	Сорт голубики	Содержание, мг/100 г сырого веса M ± m		Комментарий
		Сумма антоцианинов	Сумма проантоцианидинов	
1	Голдтраубе 71	159,9 ± 5,2	773,4 ± 17,6	Низкое содержание. Неперспективное сырье.
2	Блюрей	252,4 ± 6,0	429,6 ± 12,2	Высокое содержание. Перспективное сырье для включения в НД.
3	Блю Голд	175,5 ± 8,3	862,3 ± 21,3	Низкое содержание. Неперспективное сырье.
4	Ковилл	243,8 ± 9,2	784,1 ± 18,1	Высокое содержание. Перспективное сырье для включения в НД.
5	Спартан	134,3 ± 7,7	359,0 ± 13,5	Низкое содержание. Неперспективное сырье.
6	Эллиот	167,2 ± 8,4	899,1 ± 20,7	Низкое содержание. Неперспективное сырье.
7	Ронкокас	225,6 ± 8,6	854,7 ± 19,3	Среднее содержание. Потенциальное сырье для дальнейших исследований.

Наиболее перспективными по показателю накопления антоцианинов являются плоды голубики высокорослой сортов «Блюрей» и «Ковилл».

4.4. Результаты исследования полифенольного комплекса плодов черной смородины

4.4.1. Профиль индивидуальных антоцианинов плодов черной смородины

Изучено 3 селекционно-выведенных сорта плодов черной смородины: «Деметра», «Созвездие» и «Элевеста».

Таблица 4.17 – Профиль антоцианинов плодов черной смородины, % от суммы

№	Антоцианин	Плоды черной смородины		
		Деметра	Созвездие	Элевеста
1	Дельфинидин-3-глюкозид	12,1	15,8	16,0
2	Дельфинидин-3-рутинозид	31,6	51,2	49,7
3	Цианидин-3-галактозид	-	-	-
4	Цианидин-3-глюкозид	7,0	4,4	5,0
5	Цианидин-3-рутинозид	47,4	27,3	28,4
6	Цианидин-3-арабинозид	-	-	-
7	Петунидин-3-рутинозид	0,4	0,4	0,3
8	Пеларгонидин-3-глюкозид	-	-	-
9	Пеларгонидин-3-рутинозид	0,2	0,1	0,1
10	Цианидин-3-ксилозид	-	-	-
11	Пеонидин-3-рутинозид	0,5	0,2	0,1
12	Дельфинидин-3-(6"- <i>n</i> -кумароил)-глюкозид	0,5	0,5	0,3
13	Цианидин-3-(6"- <i>n</i> -кумароил)-глюкозид	0,1	<0,1	<0,1
14	Петунидин-3-(6"- <i>n</i> -кумароил)-глюкозид	0,2	0,1	0,1

Как видно из Таблицы 4.17 и Рисунка 4.6, основными антоцианинами плодов черной смородины являются дельфинидин-3-рутинозид, цианидин-3-рутинозид, дельфинидин-3-глюкозид и цианидин-3-глюкозид, табличные номера которых соответствуют подписям на рисунке.

Black currant Elevesta

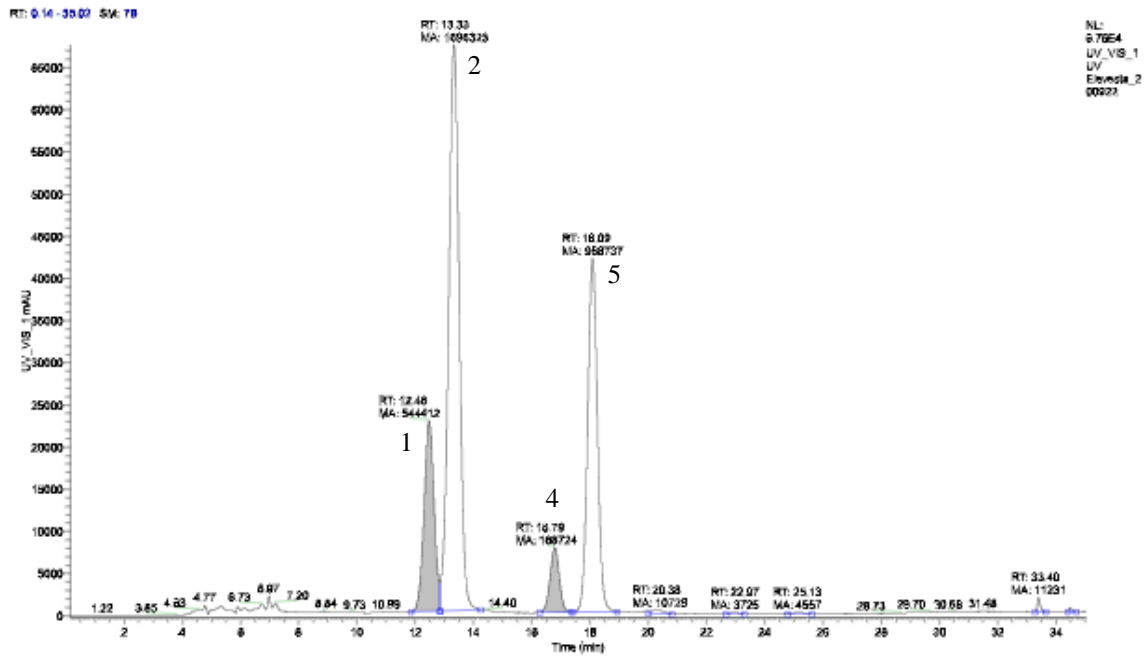


Рисунок 4.6 – Хроматограмма извлечения из плодов черной смородины сорта «Элевеста». Номера пиков антоцианинов на рисунке соответствуют таковым в Таблице 4.17.

В сортах «Созвездие» и «Элевеста» преобладающим являлся дельфинидин-3-рутинозид с содержанием порядка 50%. В сорте «Деметра» основным антоцианином являлся цианидин-3-рутинозид с концентрацией 47,4% от общей суммы антоцианинов.

Помимо основных антоцианинов, были идентифицированы минорные компоненты: петунидин-3-рутинозид, пеларгонидин-3-рутинозид, пеонидин-3-рутинозид и дельфинидин-3-(6"-п-кумароил)-глюкозид. В следовых количествах были найдены цианидин-3-(6"-п-кумароил)-глюкозид и петунидин-3-(6"-п-кумароил)-глюкозид.

4.4.2. Определение сопутствующих соединений полифенольной природы в плодах черной смородины

В плодах черной смородины были определены проантоцианидины, суммарное содержание полифенолов и сумма флавоноидов в пересчете на рутин (Таблица 4.18).

Таблица 4.18 – Сопутствующие соединения изученных сортов черной смородины, %

Название сорта	Содержание проантоцианидинов	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин	Общее содержание полифенолов
Деметра	0,744	0,037	0,918
Созвездие	0,812	0,045	1,159
Элевеста	0,844	0,044	1,238

Суммарное содержание проантоцианидинов варьировалось в диапазоне от 0,74% до 0,84%.

Сумма флавоноидов составляла от 0,037% до 0,045%. Профиль флавоноидов был представлен 3-галактозидами, 3-глюкозидами и 3-рутинозидами кверцетина, мирицетина и кемферола. Также были идентифицированы рутин, гиперозид и изокверцетин.

Суммарное содержание полифенолов в сорте «Деметра» составило 0,918%, в сорте «Созвездие» 1,159% и в сорте «Элевеста» 1,238%.

4.4.3. Количественное определение суммы антоцианинов плодов черной смородины

Суммарное содержание антоцианинов в плодах черной смородины составило 237,4 мг на 100 г сырого сырья в сорте «Деметра», 246,6 мг на 100 г сырого сырья в сорте «Созвездие» и 249,1 мг на 100 г сырого сырья в сорте «Элевеста». Суммарное накопление антоцианинов в данных сортах плодов черной смородины отличалось менее, чем на 5%.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. С помощью оптимизированной методики ВЭЖХ-МС проанализирован и установлен профиль антоцианинов в объектах исследования: плоды жимолости съедобной, плоды черноплодной рябины, плоды голубики высокорослой и плоды черной смородины.

2. Определена сумма антоцианиновых пигментов в объектах исследования с помощью метода рН-дифференциальной спектроскопии.

3. Исследован комплекс биологических веществ полифенольной природы в объектах исследования по показателям проантоцианидины, общее содержание полифенольных соединений, флавоны, флавонолы, гидроксикоричные кислоты.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. В ходе анализа информационного поля, выявлена потребность в расширении сырьевой базы источников антоцианинов, их стандартизации и разработки нормативной документации для дальнейшего практического использования.

2. Проведен сравнительный анализ современных подходов экстракции антоцианинов из их источников; установлено, что экстракция на ультразвуковой бане при комнатной температуре наиболее оптимальный способ экстракции применимый к объектам исследования.

3. Оптимизирована методика определения специфичного профиля антоцианинов методом высокожидкостной хроматографии с масс-спектроскопическим детектором; с помощью оптимизированной методики изучен состав индивидуальных антоцианинов в объектах исследования.

4. Определено суммарное содержание мономерных антоцианинов в плодах жимолости съедобной, плодах черноплодной рябины, плодах голубики высокорослой и плодах черной смородины с помощью специфичного метода рН-дифференциальной спектрофотометрии.

5. В объектах исследования оценено содержание сопутствующего полифенольного комплекса (флавоны, флавонолы, гидроксикоричные кислоты, проантоцианидины, общее содержание полифенольных соединений) для выявления наибольшей биологической активности.

6. На основе полученных данных, установлены наиболее перспективные сорта плодов жимолости съедобной и голубики высокорослой в качестве официальных источников ЛРС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Расширение сырьевой базы растительных источников антоцианинов является актуальной проблемой для решения задач медицинской и фармацевтической промышленности. В рамках диссертационной работы были изучены состав и количественное содержание функциональных соединений плодов жимолости, плодов аронии черноплодной, плодов голубики высокорослой и плодов черной смородины. Подобраны оптимальные условия экстракции из растительного сырья. С помощью усовершенствованных методик изучен профиль и количественное содержание антоцианинов. Определено содержание сопутствующих полифенолов: проантоцианидинов, флавоноидов, гидроксикоричных кислот. Полученные результаты могут использоваться для стандартизации объектов исследования, с целью получения официального статуса лекарственного растительного сырья.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Установленный с помощью оптимизированной методики профиль индивидуальных антоцианинов может быть использован в производственных и контрольно-аналитических лабораториях при проведении анализа на подлинность плодов жимолости съедобной, аронии черноплодной, голубики высокорослой и черной смородины. Результаты, полученные при определении общего содержания антоцианинов, являются доказательной базой при рассмотрении вопроса о присвоении официального статуса лекарственного растительного сырья для объектов исследования.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Выполненные исследования могут лечь в основу стандартизации плодов жимолости съедобной, аронии черноплодной, голубики высокорослой и черной смородины с целью дальнейшей разработки лекарственных препаратов – источников антоцианинов. Приведенные в работе методы анализа могут использоваться при разработке общей фармакопейной статьи по анализу антоцианинов в лекарственном растительном сырье.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АОАС – ассоциация официальных аналитических химиков
АФК – активные формы кислорода
БАВ – биологически активное вещество
БАД – биологически активная добавка
БХ – бумажная хроматография
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-детектором
ГК – галловая кислота
ГКК – гидроксикоричные кислоты
ГСТ – глутатион S-трансферазы
ГФ – Государственная фармакопея
ДФР – дигидрофлавонол-4-редуктаза;
КД – критическое давление
КТ – критическая температура
ЛДОГ/АНС – лейкоантоцианидиндиоксигеназа/антоцианидинсинтаза
ЛПНП – липопротеины низкой плотности
ЛРС – лекарственное растительное сырье
МСД – масс-спектрометрический детектор
ОФ – обращенно-фазовая
ПАЦ – проантоцианидины
ПФ – полифенольные соединения
РФ – Российская Федерация
СФМ – спектрофотометрия
СФЭ – сверхкритическая флюидная экстракция
ТСХ – тонкослойная хроматография
ТФЭ – твердофазная экстракция
УЗ – ультразвук
УФ – ультрафиолет
ФЗГ – флаванон-3-гидроксилаза;
ФЗ'5Г – флаванон-3',5'-гидроксилаза;

ФЗ'Г – флаванон-3'-гидроксилаза;

ФВЭ – ферментативная водная экстракция

ФС – фармакопейная статья

ХИ – халконизомераза;

ХС – халконсинтаза;

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Rt – время удерживания

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XV изд.: утверждена приказом Министерства здравоохранения 20 июля 2023 г. № 377. – Москва, 2023.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд. – В 4 – х тт.: утверждена приказом Министерства здравоохранения 31 октября 2018 г. № 749. – Москва, 2018. – ФС.2.5.0064.18 Василька синего цветки – Текст: непосредственный.
3. Государственный Реестр лекарственных средств РФ: официальное издание: по состоянию на 5 марта 2023 года / М-во здравоохранения Рос. Федерации. – Текст: электронный. – URL: www.grls.rosminzdrav.ru (дата обращения: 11.03.2022).
4. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XV изд.: утверждена приказом Министерства здравоохранения 20 июля 2023 г. № 377. – Москва, 2023. – ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик – Текст: непосредственный.
5. Anthocyanins from *Oxalis triangularis* as potential food colorants / E. A. Pazmiño-Durán, M. M. Giusti, R.E. Wrolstad, [et al.] // *Food Chemistry*. – 2001. – Т. 75. – №. 2. – С. 211-216.
6. Konczak, I. Anthocyanins – more than nature's colours / I. Konczak, W. Zhang // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. – 2004. – № 5. – P. 239.
7. Wrolstad, R. E. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products / R. E. Wrolstad, R. W. Durst, J. Lee // *Trends in Food Science & Technology*. – 2005. – Vol. 16. – №. 9. – P. 423-428.
8. Wallace, T. C. Anthocyanins in health and disease / T. C. Wallace, M. M. Giusti // CRC Press. – 2013.
9. Analysis and biological activities of anthocyanins / J. M. Kong, L. S. Chia, N. K. Goh, [et al.] // *Phytochemistry*. – 2003. – Vol. 64. – № 5. – P.923-933.

10. Andersen, Ø. M. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications / Ø.M. Andersen, K.R. Markham // CRC Taylor & Francis Group. – 2006. – P. 1245.
11. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes / F. He, L. Mu, G. Yan, [et al.] // *Molecules*. – 2010. – Vol. 15. – № 12. – P. 9057-9091.
12. Bruneton, J. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants / J. Bruneton ; – Paris : Intercept, 1999. – 1119 p.: il.; ISBN 1898298637. – Текст : непосредственный.
13. Fossen, T. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region / T. Fossen, L. Cabrita, O. M. Andersen // *Food Chemistry*. – 1998. – Vol.63. – №4. – P.435-440.
14. Francis, F. J. Food colorants: anthocyanins / F. J. Francis // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 1989. – Vol. 28. – P.273-314.
15. Flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa* / R. Slimestad, K. Torskangerpoll, H. Nateland, [et al.] // *Journal of Food Composition and Analysis* – 2005. – Vol. 18. – P.61–68.
16. Anthocyanins: food sources and benefits to consumer's health / P.R. Ramos, R. Herrera, M.-A. Moya-Leyn, [et al.] // *Handbook of Anthocyanins: Food Sources, Chemical Applications and Health Benefits (Biochemistry Research Trends)*. – Hauppauge; New York: Nova Science Publishers, Inc., 2014.
17. Payyavula, R.S. Transcription factors, sucrose, and sucrose metabolic genes interact to regulate potato phenylpropanoid metabolism / R.S. Payyavula, R.K. Singh, D.A. Navarre // *Journal of Experimental Botany*. – 2013. – Vol. 64(16). – P. 5115-5131.
18. Goulas, V. Structural diversity of anthocyanins in fruits / V. Goulas, A.R. Vicente, G.A. Manganaris // *Anthocyanins: structure, biosynthesis and health benefits*. Nova Science Publishers Inc. – 2012. – P. 225-250.
19. Photochemistry of anthocyanins and their biological role in plant tissues / F.H. Quina, J.P.F. Moreira, C. Vautier-Giongo, [et al.] // *Pure and Applied Chemistry*. – 2009. – Vol. 81. – № 9. – P. 1687-1694.

20. Tanaka, Y. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids / Y. Tanaka, N. Sasaki, A. Ohmiya // *The Plant Journal*. – 2008. – Vol. 54. – №. 4. – P. 733-749.
21. Not all anthocyanins are born equal: distinct patterns induced by stress in *Arabidopsis* / N. Kovicich, G. Kayanja, A. Chanoca, [et al.] // *Planta*. – 2014. – Vol. 240. – P. 931–940.
22. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins / K. Springob, J. Nakajima, M. Yamazaki, [et al.] // *Natural product reports*. – 2003. – Vol. 20. – № 3. – P. 288-303.
23. Zhang, Y. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants / Y. Zhang, E. Butelli, C. Martin // *Current opinion in plant biology*. – 2014. – Vol. 19. – P. 81-90.
24. Grotewold, E. The genetics and biochemistry of floral pigments / E. Grotewold // *Annual Review of Plant Biology*. – 2006. – Vol. 57. – P. 761-780.
25. The *Arabidopsis* MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H⁺-antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat / K. Marinova, L. Pourcel, B. Weder, [et al.] // *The Plant Cell*. – 2007. – Vol. 19. – № 6. – P. 2023-2038.
26. Misyura, M. High density stress response in plants and the role of anthocyanin biosynthesis under adverse environmental conditions / M. Misyura // *A Thesis*. – Guelph, Ontario, Canada. – 2014.
27. Onslow, M.W. The anthocyanin pigments of plants. Second edition / M.W. Onslow // *Cambridge University Press*. – 2014. – P. 294.
28. Ai, T.N. Overexpression of RsMYB1 enhances anthocyanin accumulation and heavy metal stress tolerance in transgenic petunia / T.N. Ai, A.H. Naing, B.W. Yun [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2018. – № 9. – P. 1388.
29. Overexpression of snapdragon Delila (Del) gene in tobacco enhances anthocyanin accumulation and abiotic stress tolerance / A.H. Naing, K.I. Park, T.N. Ai [et al.] // *BMC Plant Biology*. – 2017. – Vol. 17. – P. 65.
30. Altangerel, N. In vivo diagnostics of early abiotic plant stress response via Raman spectroscopy / N. Altangerel, G. Ariunbold, C. Gorman // *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America. – 2017. – Vol. 114. – P. 3393–3396.

31. Xu, Z. ROS induces anthocyanin production via late biosynthetic genes and anthocyanin deficiency confers the hypersensitivity to ROS-generating stresses in *Arabidopsis* / Z. Xu, K. Mahmood, S.J. Rothstein // *Plant and Cell Physiology*. – 2017. – T.58. – P.1364–1377.

32. Mittler, R. Reactive oxygen gene network of plants / R. Mittler, S. Vanderauwera, M. Gollery // *Trends in Plant Science*. – 2004. – Vol. 9. – P. 490–498.

33. Yamasaki, H. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂ / H. Yamasaki, Y. Sakihama, N. Ikehara // *Plant Physiology*. – 1997. – Vol. 115. – P. 1405-1412.

34. Anthocyanin function in vegetative organs. / J.H.B. Hatier, K.S. Gould, K.M. Davies, [et al.] // *Anthocyanins: biosynthesis, functions, and applications*. – New York: Springer, 2009. – P. 1–20.

35. Chalker-Scott, L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses / L. Chalker-Scott // *Photochemistry and Photobiology*. – 1999. – Vol. 70. – P. 1–9.

36. A chalcone synthase gene *AeCHS* from *Abelmoschus esculentus* regulates flavonoid accumulation and abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* / F. Wang, G. Ren, F. Li, [et al.] // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2018. – T.40. – P.97.

37. Photoprotection by foliar anthocyanins mitigates effects of boron toxicity in sweet basil (*Ocimum basilicum*) / M. Landi, L. Guidi, A. Pardossi, [et al.] // *Planta*. – 2014. – Vol. 240. – P. 941–953.

38. Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits / D. Burdulis, L. Ivanauskas, V. Dirsė [et al.] // *Medicina (Kaunas)*. – 2007. – Vol. 43. – № 12. – P.971-977.

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

40. UV-B induced changes of phenol composition and antioxidant activity in black currant fruit (*Ribes nigrum* L.) / S. Huyskens-Keil, I. Eichholz, L.W. Kroh, [et al.] // *Journal of Applied Botany and Food Quality*. – 2007. – Vol. 81. – P. 140-144.
41. Neuroprotective effects of anthocyanin-and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinson' s disease / K. E. Strathearn, G. G. Yousef, M. H. Grace, [et al.] // *Brain research*. – 2014. – T. 1555. – P. 60-77.
42. Bratman, S. *The Natural Pharmacist: Clinical evaluation of medicinal herbs and other therapeutic natural products* / S. Bratman, D. Kroll. – Roseville, CA: Prima Publishing, 1999. – P. 1-5.
43. Delgado-Vargas, F. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability / F. Delgado-Vargas, A.R. Jiménez, O. Paredes-López // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2000. – Vol. 40. – № 3. – P. 173–289.
44. Horie, K. Phytoestrogenic effects of blackcurrant anthocyanins increased endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in human endothelial cells and ovariectomized rats / K. Horie, N. Nanashima, H. Maeda // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – № 7. – P. 1259.
45. Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases / R. Mattioli, A. Francioso, L. Mosca, [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 17. – P. 3809.
46. Garcia, C. Antioxidant properties of anthocyanins and their mechanism of action in atherosclerosis / C. Garcia, C. N. Blesso // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2021. – Vol. 172. – P. 152-166.
47. The potential health benefits of haskap (*Lonicera caerulea* L.): Role of cyanidin-3-Oglucoside / H. Rupasinghe, N. Arumuggam, M. Amararathna, [et al.] // *Journal of Functional Foods*. – 2018. – Vol. 44. – P. 24.
48. Anti-tumor properties of anthocyanins from *Lonicera caerulea* 'Beilei' fruit on human hepatocellular carcinoma: In vitro and in vivo study / L. Zhou, H. Wang, J. Yi, [et al.] // *Biomedical and Pharmacology Journal*. – 2018. – Vol. 104. – P. 520-529.

49. Biological effect of *Vaccinium uliginosum* L. on STZ-induced diabetes and lipid metabolism in rats / E. K. Han, H. Kwon, S. Shin, [et al.] // *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. – 2012. – Vol. 41. – P. 1727–1733.
50. Celli, G.B. Haskap berries (*Lonicera caerulea* L.) – A critical review of antioxidant capacity and health-related studies for potential value-added products / G.B. Celli, A. Ghanem, M.S.L. Brooks // *Food and Bioprocess Technology*. – 2014. – Vol. 7. – P. 1541–1554.
51. Evaluation of polyphenolic profile and nutritional value of non-traditional species in the Czech Republic-A comparative study / T. Jurikova, J. Sochor, O. Rop, [et al.] // *Molecules*. – 2012. – Vol. 17(8). – P. 8968–8981.
52. In vitro inhibitory effect on digestive enzymes and antioxidant potential of commonly consumed fruits / A. Podszędek, I. Majewska, M. Redzyna, [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2014. – Vol. 62(20). – P. 4610-4617.
53. Anthocyanin and flavonol variation in bog bilberries (*Vaccinium uliginosum* L.) in Finland / A. K. Latti, L. Jaakola, K. R. Riihinen, [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2010. – Vol. 58. – № 1. – P. 427-433.
54. Cultivar evaluation and effect of fermentation on antioxidant capacity and in vitro inhibition of α -amylase and α -glucosidase by highbush blueberry (*Vaccinium corombosum*) / M. H. Johnson, A. Lucius, T. Meyer, [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 59(16). – P. 8923–8930.
55. Therapeutic effects of blue honeysuckle on lesions of hyperthyroidism in rats / S.-I. Park, Y. J. Lee, S. H. Choi, [et al.] // *The American Journal of Chinese Medicine*. – 2016. – Vol. 44(7). – P. 1441-1456.
56. Del Rio, D. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects / D. Del Rio, G. Borges, A. Crozier // *British Journal of Nutrition*. – 2010. – Vol. 104(3). – P. 67–90.
57. Dietary factors protecting women from urinary tract infection / T. Kontiokari, J. Laitinen, L. Järvi, [et al.] // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2003. – Vol. 77. – P. 600–604.

58. Ghosh, D. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function / D. Ghosh, T. Konishi // *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. – 2007. – Vol. 16. – № 2. – P. 200-208.
59. Kulling, S.E. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A review on the characteristic components and potential health effects / S.E. Kulling, H.M. Rawel // *Planta Medica*. – 2008. – Vol. 74. – P. 1625-1634.
60. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects / Y. Qin, M. Xia, J. Ma, [et al.] // *American Journal of Clinical Nutrition*. – 2009. – Vol. 90. – № 3. – P. 485-492.
61. Zapolska-Downar, D. Flavonoids-rich extract from chokeberry fruits inhibits oxLDL-induced apoptosis of endothelial cells / D. Zapolska-Downar, A. Kosmider, M. Naruszewicz // *Atherosclerosis Supplements*. – 2006. – Vol. 7. – P. 223.
62. Bell, D.R. Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts / D.R. Bell, K. Gochenaur // *Journal of Applied Physiology*. – 2006. – Vol. 100. – P. 1164–1170.
63. Bell, D.R. Phenolic acids contained in anthocyanin enriched extracts from elderberry, bilberry and chokeberry possess endothelium dependent and independent vasorelaxation properties in porcine coronary arteries / D.R. Bell, T.D. Burt // *Faseb Journal*. – 2007. – Vol. 21. – P366.
64. Effect of black currant anthocyanins on the activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in vitro in human endothelial cells / I. Edirisinghe, K. Banaszewski, J. Cappozzo, [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 59(16). – P. 8616-8624.
65. Nakamura, Y. Endothelium-dependent vasorelaxation induced by black currant concentrate in rat thoracic aorta / Y. Nakamura, H. Matsumoto, K. Todoki // *The Japanese Journal of Pharmacology*. – 2002. – Vol. 89. – № 1. – P. 29-35.
66. Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after

myocardial infarction (MI) / M. Naruszewicz, I. Laniewska, B. Mollo, [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2007. – Vol. 194. – P. 179-184.

67. The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans / R.M. Ferrars, C. Czank, Q. Zhang, [et al.] // *British Journal of Pharmacology*. – 2014. – Vol. 171. – P. 3268–3282.

68. Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers / S.U. Mertens-Talcott, J. Rios, P. Jilma-Stohlawetz, [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2008. – Vol. 56. – № 10. – P. 7796-7802.

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

70. Eandi, M. Post-marketing investigation on Tegens' preparation with respect to side effects / M. Eandi // *Fitoterapia*. – 1996. – Vol. 67. – P. 3-29.

71. Promising Antioxidant and Antimicrobial Food Colourants from *Lonicera caerulea* L. var. *Kamtschatica* / A.K. Molina, E.N. Vega, C. Pereira, [et al.] // *Antioxidants*. – 2019. – Vol. 8. – № 9. – P. 394.

72. Phenolic Profiles, Antioxidant Activity and Phenotypic Characterization of *Lonicera caerulea* L. Berries, Cultivated in Lithuania / L. Raudone, M. Liaudanskas, G. Vilkickytė, [et al.] // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 10. – P. 115.

73. The Japanese Pharmacopoeia, 16th edition: website. – URL: <http://www.pmda.go.jp/english/pharmacopoeia/online.html> (дата обращения: 23.05.2023).

74. Gołba, M. Health properties and composition of honeysuckle berry *Lonicera caerulea* L. An update on recent studies / M. Gołba, A. Sokół-Łetowska, A. Z. Kucharska // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – P. 759.

75. Effects of *Lonicera caerulea* berry extract on lipopolysaccharide-induced toxicity in rat liver cells: Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic activities / Y. Wang, B. Li, Y. Lin, [et al.] // *Journal of Functional Foods*. – 2017. – T.3. – P.217–226.

76. Iridoids, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Edible Honeysuckle Berries (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Sevest.) / A.Z. Kucharska, A. Sokół-Łętowska, J. Oszmiański, [et al.] // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22(3). – P. 405.

77. Государственный Реестр лекарственных средств РФ: официальное издание: по состоянию на 5 марта 2023 года / М-во здравоохранения Рос. Федерации. – Текст: электронный. – URL: www.grls.rosminzdrav.ru (дата обращения: 11.03.2022).

78. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд. – В 4 – х тт.: утверждена приказом Министерства здравоохранения 31 октября 2018 г. № 749. – Москва, 2018. – ФС.2.5.0002.15 Аронии черноплодной свежие плоды – Текст: непосредственный.

79. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд. – В 4 – х тт.: утверждена приказом Министерства здравоохранения 31 октября 2018 г. № 749. – Москва, 2018. – ФС.2.5.0003.15 Аронии черноплодной сухие плоды – Текст: непосредственный.

80. Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) Fruits and Functional Drinks Differ Significantly in Their Chemical Composition and Antioxidant Activity / P. Denev, M. Kratchanova, I. Petrova, [et al.] // *Journal of Chemistry* – 2018. – № 1. – P. 1-11.

81. Fabrication of Functional Bioelastomer for Food Packaging from Aronia (*Aronia melanocarpa*) Juice Processing By-Products / K.H. Lee, Y. Chun, Y.W. Jang, [et al.] // *Foods*. – 2020. – Vol. 9. – № 11. – P. 1565.

82. Oszmiański, J. Effect of the Production of Dried Fruits and Juice from Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) on the Content and Antioxidative Activity of Bioactive Compounds / J. Oszmiański, S. Lachowicz // *Molecules*. – 2016. – Vol. 22. – № 8. – P. 1098.

83. Phenolic content, antioxidant capacity, radical oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibiting activities of extracts of five black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) cultivars / O. Rop, J. Mlcek, T. Jurikova, [et al.] // *Journal of Medicinal Plants Research*. – 2020. – Vol. 4. – P. 2431-2437.

84. Sidor, A. Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* L.—A Qualitative Composition, Phenolic Profile and Antioxidant Potential / A. Sidor, A. Gramza-Michałowska // *Molecules* – 2019. – Vol.24. – P.3710.

85. Blueberry anthocyanin intake attenuates the postprandial cardiometabolic effect of an energy-dense food challenge: Results from a double blind, randomized controlled trial in metabolic syndrome participants / P. Curtis, L. Berends, V. van der Velpen, [et al.] // *Clinical Nutrition* –2022.–Vol.41, No.1. – P.165-176.

86. Acute effect of blueberry intake on vascular function in older subjects: Study protocol for a randomized, controlled, crossover trial / Bo' C. Del, M. Tucci, D. Martini, [et al.] // *PLoS One*–2022.–Vol.17. No.12. – P.1-16.

87. Golovinskaia, O. Review of Functional and Pharmacological Activities of Berries / O. Golovinskaia, C.K. Wang // *Molecules*–2021.–Vol.26, No.13. – P.3904.

88. Государственная фармакопея СССР. – XI изд., вып. 1: утверждена приказом Министерства здравоохранения СССР 25 декабря 1984 г. № 1455. – Москва: Медицина, 1987.

89. British Pharmacopoeia 2024 / British Pharmacopoeia Commission Secretariat, part of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. URL: <https://www.pharmacopoeia.com/content/html/472> (дата обращения: 23.05.2024). Режим доступа: платный.

90. European Pharmacopoeia 11th edition. URL: <https://www.edqm.eu/en/web/edqm/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition> (дата обращения: 23.05.2024). Режим доступа: платный.

91. Елисеева, Т. Черная смородина (лат. *Ribes nigrum*) / Т. Елисеева, А. Ямпольский // *Журнал здорового питания и диетологии*. – 2020. №12. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/chernaya-smorodina-lat-r-bes-n-grum> (дата обращения: 09.09.2023).

92. ВЭЖХ в контроле антоцианового состава плодов черной смородины / Л.А. Дейнека, Е.И. Шапошник, Д.А. Гостищев, [и др.] // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2009. – Т. 9. – Вып. 4. – С. 529–536.

93. The use of cardiovascular diseases / E. Kowaleryk, P. Krzensinski, P. Fijalkowski, [et al.] // *Polski Merkurusz Lekarski*. – 2009. – Vol. 19. – №109. – P. 108–110.
94. Giusti, M. M. Anthocyanins characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. Unit F1.2.1-13 / M. M. Giusti, R. E. Wrolstad (Ed.) // *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. – New York: Wiley, 2001.
95. Process optimization for enzymatic assisted extraction of anthocyanins from the mulberry wine residue / Y. Li, F. Tao, Y. Wang, [et al.] // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – 2020. – Vol. 559. – P.11-12.
96. Handbook of food analytical chemistry / R.E. Wrolstad, T.E. Acree, E.A. Decker, [et al.]. – 2005. – P. 5-71.
97. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study / J. Lee, R.W. Durst, R.E. Wrolstad, [et al.] // *Journal of AOAC International*. – 2005. – Vol. 88. – № 5. – P. 1269-1278.
98. Wrolstad, R. E. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products / R. E. Wrolstad, R. W. Durst, J. Lee // *Trends in Food Science & Technology*. – 2005. – Vol. 16. – №. 9. – P. 423-428.
99. Anthocyanin pigments: Importance, sample preparation and extraction / J. Martín, M. J. Navas, A. M. Jiménez-Moreno, [et al.] // *Phenolic compounds-natural sources, importance and applications*. – 2017. – P. 117-152.
100. Advances in the Chemistry, Analysis and Adulteration of Anthocyanin Rich-Berries and Fruits: 2000–2022 / B. Avula, K. Katragunta, A.G. Osman, [et al.] // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – P. 560.
101. ГОСТ ИСО 32709-2014. Продукция соковая. Методы определения антоцианинов. Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ: межгосударственный стандарт: нац. стандарт Российской Федерации: утвержден и введен в действие приказом Федер. агентства по техн. регулированию и метрологии от 9 июля 2014 г. № 777-ст: введен впервые: дата введения 2016-01-

01. // Кодекс: электрон. фонд правовой и норматив. - техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200111757> (дата обращения: 23.03.2022).

102. Тутельян, В. А. Методы анализа минорных биологически активных веществ пищи / под редакцией акад. В.А. Тутельяна, проф. К.И. Эллера. – Москва: Династия, 2010. – 160 с.

103. Lee, J. AOAC. Official Method 2005.02 Total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines / J. Lee, R. Durst, R. E Wrolstad // Journal of AOAC International. – 2005. – Vol. 88. – №5. – P. 1269.

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

105. Валидация в производстве лекарственных средств / В.В. Береговых, Н.В. Пятигорская, В.В. Беляев, [и др.] – Москва: Издательский дом «Русский врач», 2010. – 286 с.

106. Mazza, G. Methods of Analysis for Anthocyanins in Plants and Biological Fluids / G. Mazza, J. E. Sacace, C. D. Kay // Journal of AOAC International. – 2004. – Vol. 87. – № 1. P. 129–145.

107. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд. – В 4 – х тт.: утверждена приказом Министерства здравоохранения 31 октября 2018 г. № 749. – Москва, 2018. – ФС.2.5.0050.15 Черники обыкновенной плоды – Текст: непосредственный.

108. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд. – В 4 – х тт.: утверждена приказом Министерства здравоохранения 31 октября 2018 г. № 749. – Москва, 2018. – ФС.2.5.0064.18 Василька синего цветки – Текст: непосредственный.

109. Da Costa, C. T. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis / C. T. Da Costa, D. Horton, S. A. Margolis // Journal of Chromatography A. – 2000. – Vol. 881. №1-2. – P. 403–410.

110. Kaloudi, T. Aronia melanocarpa: Identification and Exploitation of Its Phenolic Components / T. Kaloudi, D. Tsimogiannis, V. Oreopoulou // *Molecules* – 2022. – Vol. 27. – № 14. – P. 4375.

111. Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments / E. De Rijke, H. Zappey, F. Ariese, [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2003. – Vol. 984. – № 1. – P. 45–58.

112. Sáenz-López, R. Analysis of aged red wine pigments by capillary zone electrophoresis / R. Sáenz-López, P. Fernández-Zurbano, M. T. Tena // *Journal of Chromatography A*. – 2004. – Vol. 1052. – № 1-2. – P. 191-197.

113. HPLC/MS application to anthocyanins of *Vitis vinifera* L. / A. Baldi, A. Romani, N. Mulinacci, [et al.] // *Food Chemistry*. – 1995. – Vol. 43. – № 8. P. 2104–2109.

114. Isolation and structural characterization of unusual pyranoanthocyanins and related anthocyanins from Staghorn sumac (*Rhus typhina* L.) via UPLC–ESI-MS, ¹H, ¹³C, and 2D NMR spectroscopy / C. W. Kirby, T. Wu, R. Tsao, [et al.] // *Phytochemistry*. – 2013. – Vol. 94. – P. 284-293.

115. Anthocyanin identification and composition of wild *Vitis* spp. accessions by using LC–MS and LC–NMR / A. A. De la Cruz, G. Hilbert, C. Rivière, [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2012. – Vol. 732. – P. 145-152.

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

117. Современные методы получения очищенных экстрактов антоцианов / М. А. Герасимов, А. С. Кошечкина, И. Б. Перова, [и др.] // *Фармация*. – 2024. – №4. – С. 5-13.

118. Перова, И.Б. Исследование содержания и специфического профиля антоцианинов лекарственного растительного сырья: специальность 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия»: диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / И. Б. Перова // ФГАОУ ВО Первый

МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). – Москва, 2015. – 171 с.

119. Исследование полифенольного комплекса и иридоидных гликозидов в различных сортах плодов жимолости съедобной *Lonicera edulis* Turcz. ex Freyn / И.Б. Перова, Е.В. Рылина, К.И. Эллер, [и др.] // Вопросы питания. – 2019. – Т. 88(6). – С. 88-92.

120. Khattab, R. Phenolic analyses of haskap berries (*Lonicera caerulea* L.): Spectrophotometry versus high performance liquid chromatography / R. Khattab, M.S.L. Brooks, A. Ghanem // International Journal of Food Properties. – 2015. – Vol. 19. – P. 1708–1725.

121. Bioactive compounds and antioxidant capacity of *Lonicera caerulea* berries: Comparison of seven cultivars over three harvesting years / N. Auzanneau, P. Weber, A. Kosińska-Cagnazzo, [et al.] // Journal of Food Composition and Analysis. – 2018. – Vol. 66. – P. 81–89.

122. Blue honeysuckle fruit (*Lonicera caerulea* L.) from eastern Russia: Phenolic composition, nutritional value and biological activities of its polar extracts / G. Caprioli, R. Iannarelli, M. Innocenti, [et al.] // Food & Function journal. – 2016.

123. Optimization of ultrasound-assisted extraction by response surface methodology, antioxidant capacity, and tyrosinase inhibitory activity of anthocyanins from red rice bran / Y. Wang, L. Zhao, R. Zhang, [et al.] // Food Science & Nutrition. – 2020. – Т. 8(2). – P. 921-932.

124. Исследование комплекса биологически активных веществ в плодах перспективных сортов жимолости голубой (*Lonicera caerulea* L.) / И.Б. Перова, К.И. Эллер, М.А. Герасимов, [и др.] // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2023. – Т.184. – №1. – С. 53-69.

125. Phenolic Compounds, Vitamins C and E and Antioxidant Activity of Edible Honeysuckle Berries (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Pojark) in Relation to Their Origin / J. Orsavová, I. Sytařová, J. Mlček, [et al.] // Antioxidants (Basel). – 2022. – Vol. 11. – № 2. – P. 433.

126. Proanthocyanidins: A comprehensive review / A. Rauf, M. Imran, T. Abu-Izneid, [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2019. – Vol. 116. – P. 108999.
127. Małodobry, M. Evaluation of the yield and some components in the fruit of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* var. *edulis* Turcz. Freyn.) / M. Małodobry, M. Bieniasz, E. Dziedzic // *Folia Horticulturae*. – 2010. – Vol. 22. – № 1. – P. 45-50.
128. Bioactive Compounds, Antioxidant, and Antibacterial Properties of *Lonicera caerulea* Berries: Evaluation of 11 Cultivars / L. Česonienė, J. Labokas, I. Jasutienė, [et al.] // *Plants (Basel)*. – 2021. – Vol. 10(4). – P. 624.
129. Investigation of Polyphenolic Compounds in Different Varieties of Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* / M.A. Gerasimov, I.B. Perova, K.I. Eller, [et al.] // *Molecules*. – 2023. – 28, 4101.
130. In vitro antileukaemic activity of extracts from chokeberry (*Aronia melanocarpa* [Michx] Elliott) and mulberry (*Morus alba* L.) leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells / K. Skupień, D. Kostrzewa-Nowak, J. Oszmiański, [et al.] // *Phytotherapy Research* – 2008. – Vol. 22. – P.689-694.
131. Extracts, anthocyanins and procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors / M. Bräunlich, R. Sliemstad, H. Brede Wangensteen, [et al.] // *Nutrients*. – 2013. – Vol.5. – № 3. – P. 663-678.
132. Mayer-Miebach, E. Stability of Chokeberry Bioactive Polyphenols during Juice Processing and Stabilization of a Polyphenol-Rich Material from the By-Product / E. Mayer-Miebach, M. Adamiuk, D. Behnlian // *Agriculture*. – 2012. – Vol. 2. – № 4. – P. 244-258.
133. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity / X. Wu, L. Gu, R. L. Prior, [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2004. – T. 52(26). – P.7846-56.
134. Transformations of Phenolic Compounds in an in vitro Model Simulating the Human Alimentary Tract / T. Tarko, A. Duda-Chodak, P. Sroka, [et al.] // *Food Technology and Biotechnology*. – 2009. – Vol. 47 – №.4. – P.456-463.

135. Isolation of Neuroprotective Anthocyanins from Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) against Amyloid- β -Induced Cognitive Impairment / H. Wen, H. Cui, H. Tian, [et al.] // *Foods*. – 2021. – Vol.10. – №.1. – P.63.

136. Kaloudi, T. *Aronia melanocarpa*: Identification and Exploitation of Its Phenolic Components / T. Kaloudi, D. Tsimogiannis, V. Oreopoulou // *Molecules* – 2022. – Vol. 27. – № 14. – P. 4375.

137. Study of Interactions Between Individual Phenolics of *Aronia* with Barley Beta-Glucan / L. Jakobek, P. Matic, J. Istuk, [et al.] // *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. – 2020. – Vol. 71. – № 2. – P. 187-196.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ПИТАНИЯ, БИОТЕХНОЛОГИИ
И БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩИ**

(ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»)

109240, г. Москва, Устьинский проезд, 2/14
Тел.: +7 (495) 698-53-60; факс: +7 (495) 698-53-79
ОКПО 01897222 ОГРН 1027739311907
ИНН 7705004254 КПП 770501001
E-mail: mailbox@ion.ru Сайт: www.ion.ru

12.04.2024 № 410-21-14/948

На № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБУН
«ФИЦ питания и биотехнологии»
академик РАН
Д. Сид Никитюк Д.Б.
«12» апреля» 2024 года

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящим актом подтверждаем, что результаты, полученные в рамках выполнения диссертационной работы Герасимова Макара Алексеевича «Поиск новых перспективных источников растительного происхождения, содержащих антоцианины» используются при проведении санитарно-эпидемиологической экспертизы БАД к пище и специализированной пищевой продукции на основе антоцианин-содержащего сырья в лаборатории метаболомного и протеомного анализа ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии».

Заместитель директора
по научной работе, к.б.н.



Ефимочкина Н.Р.

Ефимочкина Н.Р.

Заведующий лабораторией метаболомного
и протеомного анализа, д.х.н., профессор

Эллер К.И.

Эллер К.И.

03528

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебно-воспитательной работе
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет)

_____ Лигвинова Т.М.

« _____ » _____ 2024 г.

14 МАЙ 2024

АКТ 439

о внедрении результатов диссертации Герасимова Макара Алексеевича в учебный процесс Института Фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)


Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации

Герасимова Макара Алексеевича

на тему «Поиск новых перспективных источников растительного происхождения, содержащих антоцианины» внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии А.П. Арзамасцева и кафедры фармацевтического естествознания Института Фармации им. А.П. Нелюбина

при изучении дисциплин «Медицинская химия», «Фармакогнозия» читаемых студентам по направлению подготовки 33.05.01 Фармация

Директор Института
Фармации им. А.П. Нелюбина



Раменская Г.В.

(подпись)

Заведующий учебной частью
кафедры фармацевтической
и токсикологической химии
А.П. Арзамасцева



Кузина В.Н.

(подпись)

Заведующий учебной частью
кафедры фармацевтического
естествознания



Бобкова Н.В.

(подпись)

Начальник Учебного управления



Юдина Л.Ю.

(подпись)