

На правах рукописи

ПЕРОВА ИРИНА БОРИСОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ И СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ
АНТОЦИАНИНОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2015 г.

Диссертационная работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Раменская Галина Владиславовна – доктор фармацевтических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Саканян Елена Ивановна – доктор фармацевтических наук, профессор, директор Центра фармакопей и международного сотрудничества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»

Шиков Александр Николаевич – доктор фармацевтических наук, заместитель генерального директора по инновационной деятельности ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации»

Ведущая организация:

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2015 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д.208.040.09 при ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства Здравоохранения Российской Федерации по адресу: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д.13

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации www.mma.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д.208.040.09,
Доктор фармацевтических наук, профессор

Демина Наталья Борисовна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Антоцианины (водорастворимые гликозиды антоцианидинов) относятся к классу широко распространенных полифенольных вторичных метаболитов растений – флавоноидов. Антоцианины обладают целым рядом конкретных фармакологических свойств, проверенных в строго контролируемых опытах *in vitro*, *in vivo*, в доклинических и клинических исследованиях. Показана роль антоцианинов в улучшении трофики зрительного аппарата и ночного зрения, в снижении риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний и сосудистых осложнений при сахарном диабете 2 типа. Эти свойства антоцианинов непосредственно связаны с их защитной функцией против окислительного стресса, гипогликемической и гипوليпидемической активностью. Описаны способности антоцианин-содержащих экстрактов участвовать в противовоспалительной активности и снижении перекисного окисления липидов, снижении проницаемости и хрупкости капилляров и укреплении мембран.

Фармакопейными источниками антоцианинов являются плоды черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.), плоды аронии черноплодной (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott), плоды черной смородины (*Ribes nigrum* L.), плоды калины обыкновенной (*Viburnum opulus* L.), плоды лимонника китайского (*Schizandra chinensis* (Turcz.) Baill.). В ГФ XI изд., а также в проекты Фармакопейных статей (ФС) для ГФ XIII изд. включены только плоды черники высушенные, в которых регламентируется содержание дубильных веществ (ГФ XI изд.) и антоцианинов (проект ФС «Плоды черники высушенные» для ГФ XIII изд.), тогда как в Фармакопеи ряда стран Европы включены ФС на ЛРС плоды черники свежие, стандартизуемые по содержанию антоцианинов. Необходимость применения в качестве источника мономерных антоцианинов свежего сырья обусловлена тем, что в процессе высушивания плодов происходят процессы гидролиза и полимеризации антоцианинов, в результате чего содержание мономерных антоцианинов резко снижается, а полимерные пигменты, обладающие низкой биодоступностью, не оказывают характерных для антоцианинов фармакологических эффектов. Стандартизация высушенных плодов черники по содержанию мономерных антоцианинов более достоверно характеризует биологическую ценность сырья, а также обосновывает требования к режиму сушки плодов, позволяющие максимально сохранить мономерные антоцианины.

Плоды аронии черноплодной, смородины черной, лимонника китайского разрешены в РФ для лекарственного применения. На плоды аронии черноплодной свежие и высушенные разработаны проекты ФС для включения в ГФ XIII изд., содержащие малоинформативные и неселективные методы качественного и количественного анализа мономерных антоцианинов в сырье. В РФ традиционно заготавливают плоды смородины черной высушенные. Плоды смородины черной свежие, одними из основных действующих веществ которых являются антоцианины, включены в Британскую Фармакопею 2014 (BP 2014), во Французскую Фармакопею 11 изд. (Ph. Fr. 11^{ème}), Европейскую Фармакопею 8 изд. (EP 8th), и стандартизуются только по содержанию аскорбиновой кислоты.

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

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

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

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

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

Важной предпосылкой оценки качества и биологической ценности отечественного антоцианин-содержащего ЛРС является проведение комплексного исследования, включающего определение общего содержания антоцианинов, профиля индивидуальных антоцианинов, сопутствующих полифенольных соединений (ПФ), а также оценка антирадикальных свойств.

Степень разработанности темы исследования. Из исследованных в диссертационной работе видов антоцианин-содержащего ЛРС в отечественной литературе представлены только, как правило, завышенные данные о суммарном содержании антоцианинов (АЦ) в плодах черники, полученные с помощью неселективного метода прямой спектрофотометрии (СФМ) [Рязанова, 2014]. Состав индивидуальных мономерных АЦ изучался в этих работах с помощью

малопригодного для выполнения поставленной задачи метода ТСХ, ввиду недостаточной эффективности разделения последнего и неспецифичных методов детектирования. Встречаются единичные работы по изучению содержания мономерных АЦ сырье на основе черники обыкновенной и продуктах переработки смородины черной методом рН-дифференциальной СФМ [Редико, 2009; Сергунова, 2013]. Однако до настоящего времени в РФ не было проведено систематических работ по исследованию общего содержания и специфического состава мономерных АЦ в отечественном фармакопейном ЛРС на примере группы плодов черники обыкновенной, аронии черноплодной, смородины черной, калины обыкновенной, лимонника китайского, а также перспективных для медицинских целей плодов кизила обыкновенного с помощью современных высокоспецифичных и селективных методов анализа (рН-дифференциальная СФМ и ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором на диодной матрице (ВЭЖХ-ДМД) и масс-спектрометрическим (ВЭЖХ-МС) детектором).

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является систематическое исследование с помощью современных методов анализа общего содержания и профиля индивидуальных АЦ отечественного ЛРС, экстрактов и других продуктов его переработки с целью их стандартизации и разработки критериев качества. Для реализации цели ставятся следующие задачи:

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

2. Разработать методики определения специфического профиля антоцианинов в ЛРС и продуктах его переработки для научных и рутинных целей;

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

4. Изучить влияние гомологичных примесных плодов на содержание и состав антоцианинов в объектах исследования;

5. Изучить сопутствующий полифенольный комплекс ЛРС (флавоноиды, гидроксикоричные кислоты (ГКК), проантоцианидины (ПАЦ), общее содержание полифенольных соединений);

6. Оценить корреляцию данных по содержанию антоцианинов и сопутствующих ПФ в растительном сырье с результатами DPPH-теста *in vitro* на антирадикальные свойства.

Научная новизна результатов исследования. Разработаны оригинальные методики идентификации индивидуальных антоцианинов методом ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС и ВЭЖХ-ДМД. С помощью разработанных оригинальных методик ВЭЖХ-ДМД и ВЭЖХ-МС идентификации и высокоспецифичного метода рН-дифференциальной СФМ впервые систематически изучены общее содержание и специфический профиль мономерных АЦ в отечественных плодах черники обыкновенной, аронии черноплодной, черной смородины, калины обыкновенной,

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

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

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

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

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 2 статьи в изданиях, рекомендуемых ВАК России.

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

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

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в организации и проведении работ на этапах постановки цели и задач исследования, разработки методологических подходов к выполнению поставленных задач, анализа отечественной и зарубежной научной литературы, нормативной документации. Лично автором были проведены экспериментальные

исследования, анализ полученных результатов и их статистическая обработка. Автору принадлежит ведущая роль в написании публикаций и проекта общей фармакопейной статьи (ОФС). Диссертация написана лично автором.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертационной работы соответствуют формуле специальности «14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты проведенного экспериментального исследования соответствуют области исследований специальности, конкретно пунктам 2, 3 и 6 паспорта специальности фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематикой и планом «Разработка современных технологий подготовки специалистов с высшим медицинским и фармацевтическим образованием на основе достижений медико-биологических исследований», номер государственной регистрации 01.2.006.06352.

Положения, выносимые на защиту:

Адаптирование методики определения общего содержания мономерных антоцианинов для ЛРС и продуктов его переработки методом рН-дифференциальной спектрофотометрии.

Разработка методик идентификации и определения профиля индивидуальных антоцианинов в ЛРС и продуктах его переработки методом ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-MS и ВЭЖХ-ДМД.

Результаты определения суммарного содержания и специфического профиля антоциановых пигментов в плодах черники обыкновенной, аронии черноплодной, смородины черной, калины обыкновенной, лимонника китайского, кизила обыкновенного и продуктах их переработки.

Разработка проекта ОФС «Определение содержания и состава мономерных антоцианинов в лекарственном растительном сырье, растительных экстрактах и лекарственных растительных препаратах».

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 159 стр. машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов исследования и их обсуждения, выводов и библиографического указателя, включающего 107 источников, из которых 92 на английском языке. Работа сопровождается 41 рисунком, 47 таблицами и 3 приложениями.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы.

Объекты исследования. Объектами исследования являлись: промышленные дикорастущие и культивируемые образцы высушенных и замороженных плодов черники, аронии черноплодной, смородины черной, калины обыкновенной, лимонника китайского, замороженные плоды кизила обыкновенного, свежие плоды аронии, смородины черной, калины обыкновенной, заготовленные в различных регионах России; промышленные образцы экстрактов черники обыкновенной и смородины черной; соки прямого отжима и лиофильно высушенные жомы плодов аронии черноплодной и смородины черной собственного производства.

Оборудование. Исследования проводились на базе ФГБНУ «НИИ питания» с использованием спектрофотометра “Shimadzu” UV-1800 (Япония), системы ВЭЖХ «Agilent 1100» (США) со спектрофотометрическим диодно-матричным детектором, времяпролетным «Agilent 6200» (ВЭЖХ-TOF-MS) и тройным квадрупольным «Agilent 6410» (ВЭЖХ-MS/MS) масс-спектрометрическими детекторами. В качестве неподвижной фазы использовались колонки Phenomenex Luna C18 250×4,6 мм 5 мк, Nucleosil 100A C18 250×4,6 мм 5 мк, ProteCol C18 HPH125 250×4,6 мм 5 мк. Полученные хроматограммы обрабатывали при помощи программ «Mass Hunter Workstation Software Qualitative analysis Version B.02.00» и «ChemStation for LC 3Dsystems Rev. B.04.03[16]». Для экстракции применяли УЗ-баню Codyson CD-4820, для очистки полученных извлечений – центрифуги Eppendorf Centrifuge 5424 и Rotina 420.

Стандартные образцы. При разработке методик и проведении исследований по содержанию АЦ и сопутствующих полифенольных соединений в качестве стандартных образцов были использованы коммерчески доступные индивидуальные вещества: цианидин-3-глюкозид («Polyphenols»), процианидин В₂ («INDOFINE Chemical Company»), а также рутин, гиперозид, кемпферол-3-глюкозид, кверцетин, кемпферол, хлорогеновая кислота, галловая кислота, тролокс и схизандрин производства «Sigma-Aldrich Co».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Адаптирование методики определения суммарного содержания антоцианинов методом рН-дифференциальной СФМ для ЛРС. В ГФ XI изд. вып. 2, Европейской Фармакопее 8 изд. (ЕР 8th), Британской Фармакопее 2014 г. вып. (ВР 2014), Французской Фармакопее 11 изд. (Ph. Fr. 11eme), Американской Травяной Фармакопее (АНР) и др. фармакопеех используется метод прямой СФМ, основанный на измерении оптической плотности антоцианинов при длине волны максимума поглощения. Однако более достоверным и специфичным является метод рН-дифференциальной СФМ (официальный метод Ассоциации Официальных Аналитических Химиков АОАС 2005.02), в область применения которого входят соки, сокосодержащие напитки, натуральные красители и вина [J of AOAC Int, 2005]. Метод основан на специфической для АЦ обратимой структурной трансформации хромофора, и, следовательно, поглощения, в зависимости от рН раствора. При рН=1 антоцианины и антоцианидины находятся в виде катиона флавилия, обуславливающего ярко-красную окраску раствора, с увеличением рН до 4,5 катион переходит в форму карбинола и становится бесцветным. Данный метод позволяет быстро и точно определить содержание мономерных АЦ в присутствии полимерных антоциановых пигментов и неферментативно окисленных пигментов, а также других мешающих соединений (в том числе синтетических красителей, которые могут быть добавлены в экстракты, ЛП и БАД к пище с целью фальсификации) которые не подвергаются обратимой трансформации при изменении рН, и таким образом, исключаются из расчета поглощения [Guisti, 2001; Lee, 2005; Wrolstad, 2005]. Содержание мономерных АЦ обычно ведут в пересчете на цианидин-3-глюкозид.

На примере замороженных плодов черники (Карелия) методами прямой (согласно ЕР 8th) и рН-дифференциальной СФМ было определено суммарное

содержание антоциановых пигментов, которое по результатам 10 параллельных измерений составило в среднем 0,522% и 0,426% соответственно. Завышенное значение суммы антоцианинов, полученное по методике ЕР 8th, связано с присутствием в метанольном экстракте замороженных плодов черники и антоцианинов, и посторонних веществ, поглощающих при 500-550 нм (полимерные окрашенные формы, неферментативно окисленные пигменты). При использовании метода рН-дифференциальной СФМ поглощение полимерных и неферментативно окисленных форм пигментов исключается из расчета содержания АЦ [Wrolstad, 2005]. В среднем, коэффициент деградации КД (degradation index, DI) в замороженном сырье черники, представляющий собой отношение содержания АЦ, полученное при использовании в расчете оптической плотности в буферном растворе с рН=1 (прямой метод) к содержанию АЦ, полученному рН-дифференциальным методом, составил $0,522/0,426=1,23$. КД фактически является показателем завышения содержания мономерных АЦ при прямом спектрофотометрическом определении и характеризует также степень деградации мономерных АЦ (в %), которая может быть оценена по формуле:

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

Графически выраженная зависимость КД от степени разрушения мономерных антоцианинов (в %) в процессе хранения и технологической обработки показана на рисунке 1.



Рисунок 1. График зависимости коэффициента деградации от степени разрушения мономерных антоцианинов (в %)

Использование метода прямой СФМ приводило к существенному (приблизительно на 19%) завышению результатов определения суммы АЦ даже в замороженных плодах черники с низким содержанием неферментативно окисленных и полимерных форм пигментов. В высушенном сырье и продуктах технологической обработки сырья с потенциально более высоким содержанием полимерных форм антоцианинов и окисленных пигментов завышение было более значительным (от 36 до 77%). Далее в настоящей работе оценку интегрального содержания мономерных АЦ в объектах исследования проводили методом рН-дифференциальной СФМ.

Для определения суммарного содержания мономерных АЦ методом рН-дифференциальной СФМ были подобраны оптимальные условия пробоподготовки ЛРС. Было найдено, что трехкратная экстракция предварительно измельченного сырья 0,04% раствором HCl в 70%-ном водном этаноле в УЗ бане в течение 30 мин обеспечивала максимальное извлечение и сохранность мономерных антоцианинов.

После адаптации для ЛРС и продуктов его переработки была проведена валидация метода рН-дифференциальной СФМ. Получена калибровочная кривая стандарта цианидин-3-глюкозида (рис. 2) по 6 точкам, коэффициент корреляции линейной зависимости составил 0,9999.

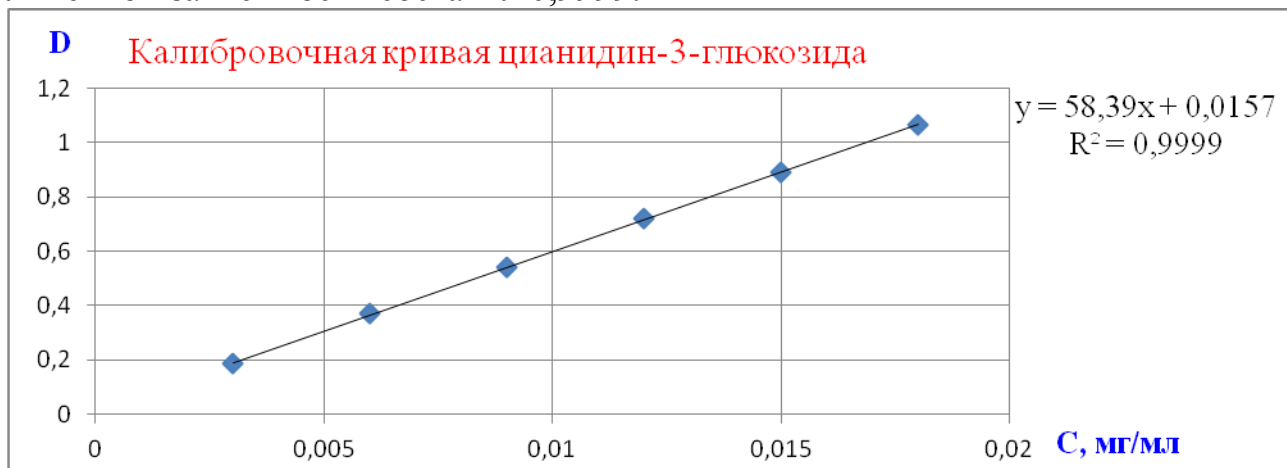


Рисунок 2. Калибровочная кривая по стандарту цианидин-3-глюкозида

Были определены предел обнаружения, предел количественного обнаружения и диапазон линейных концентраций, которые составили соответственно 1,0 мг/кг, 5,0 мг/кг, 5-5000 мг/кг при коэффициенте корреляции, близком к 1 (0,998). Для оценки правильности и прецизионности методики были рассчитаны метрологические характеристики по результатам 7 параллельных измерений стандартных растворов цианидин-3-глюкозида. Относительная ошибка определения для цианидин-3-глюкозида составила от 0,25% (4500 мг) до 3,04% (50 мг). Для оценки правильности использовали метод добавок стандарта цианидин-3-глюкозида. Среднее значение находилось в диапазоне 98-102%, а относительная ошибка определения не превышала 2%. При определении промежуточной прецизионности методики отклонение от среднего значения суммы АЦ в обеих сериях измерений также не превышало 2%. Таким образом, адаптированная для изучения отечественного ЛРС рН-дифференциальная СФМ, валидированная по основным валидационным характеристикам, является приемлемым и целесообразным методом определения суммарного содержания мономерных АЦ в растительном сырье и продуктах его переработки.

Усовершенствованный нами рН-дифференциальный метод определения суммы мономерных антоцианинов в ЛРС включен в межгосударственный стандарт ГОСТ 32709-2014 «Продукция соковая. Методы определения антоцианинов».

Разработка методики определения специфического профиля антоцианинов методом ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-MS. Профиль индивидуальных

АЦ является видовым «отпечатком пальцев», играет важную роль в хемотаксономии растений, а также влияет на фармакологические свойства растения. Определение состава индивидуальных антоцианинов позволяет выявить фальсификацию дорогостоящих растений с высокой биологической активностью и продуктов их переработки более дешевыми и часто менее биологически активными.

Нами была разработана специфическая методика определения профиля индивидуальных АЦ методом ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС. Оптимизированы условия хроматографического разделения АЦ: колонка Phenomenex Luna C18 250×4,6 mm 5 μ. Подвижная фаза (ПФ): А – 1% водный раствор муравьиной кислоты (рН 2,13-2,17), В – ацетонитрил. Градиент: 0 мин - 10% В, 10 мин – 12% В, 20 мин – 15% В, 30 мин – 20% В, 40 мин – 30% В, 50 мин – 40% В, 51-60 мин – 10% В. Общее время анализа 60 мин. Скорость потока растворителя 0,5 мл/мин. Температура колонки 40°C, температура автосемплера 20°C. Объем вводимой пробы 20 μл. ДМД при 520 нм и 280 нм. Спектры снимали в диапазоне от 200 до 700 нм. Для плодов калины, которые содержат только неацилированные гликозиды цианидина с близкой хроматографической подвижностью, в дальнейшем оптимизировали градиент: 0 мин – 12% В, 20 мин – 15% В, 30 мин – 20% В, 31-40 мин – 12% В. В результате дальнейшего эксперимента были выбраны оптимальные параметры масс-спектрометрии АЦ: напряжение на капилляре - 3,5 кВ, поток газа-осушителя (азот) – 9 л/мин, температура - 325°C, давление на распылителе – 0,27 МПа, сканирование масс – в режиме регистрации положительных ионов $[M]^+$ в диапазоне от 100 до 1500 m/z. Примеры типичных ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС плодов представлены в разделах на соответствующие виды ЛРС и продуктов его переработки. Идентификацию пиков на хроматограмме проводили по молекулярным массам, временам удерживания, спектральным данным, а также путем сравнения с литературными данными о составе антоцианинов в аналогичном сырье.

Масс-спектры антоцианинов содержали родительские ионы $[M]^+$, фрагменты агликонов $[M - \text{гликозидная часть}]^+$. У антоцианинов, сахарная часть которых представлена три- и дисахаридами (ксилозилрутинозиды, рутинозиды, сambuбиозиды, вицианозиды и латирозиды), в масс-спектрах также обнаружены характерные фрагменты, образованные в результате отщепления рамнозы, ксилозы и арабинозы минус 18 Да (потеря молекулы воды) вследствие более слабых 1→6 и 1→2 гликозидных связей.

После установления профиля индивидуальных антоцианинов методом ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС для производственного и лабораторного контроля рутинный анализ выполняли методом ВЭЖХ-ДМД.

Методики определения сопутствующих классов полифенольных соединений. Суммарное содержание ПАЦ в пересчете на процианидин В₂ оценивали модифицированным методом Бейта-Смита, суммарное содержание ПФ в пересчете на галловую кислоту (ГК) проводилось модифицированным методом Фолина-Чокальтеу [Методы анализа минорных биологически активных веществ пищи, М., 2010]. Содержание флавоноидов, ГКК и схизандренов определяли с

помощью оригинальных разработанных методик методом ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС.

Результаты исследования общего содержания и профиля индивидуальных антоцианинов в плодах и экстрактах черники обыкновенной. Проанализировано 17 образцов дикорастущих плодов черники, заготовленных в Карелии, Мурманске, Вологодской и Московской областях, Алтайском крае, Харьковской и Львовской областях Украины, Финляндии. Суммарное содержание АЦ в отечественном замороженном сырье составило 0,376-0,807%, что сопоставимо с их содержанием в украинском сырье, - 0,381-0,577%, и выше, чем в финском – 0,332% (табл. 1). КД в замороженном сырье не превышал 1,15. В высушенных плодах содержание АЦ составило от 0,124% до 1,507%. В образцах с низким содержанием АЦ КД составил 1,57-1,62, а в образцах с высоким содержанием – 1,22-1,26, что обусловлено различными режимами сушки сырья.

Таблица 1

Содержание антоцианинов в плодах черники обыкновенной

Вид сырья, регион заготовки	ΣАЦ, %	Вид сырья, регион заготовки/производитель	ΣАЦ, %
Замор. плоды, Карелия, 2011 г	0,420	Замор. плоды, Львов. обл., Украина	0,577
Замор. плоды, Карелия, 2012 г	0,376	Замор. плоды, Вологодская область	0,577
Замор. плоды, Карелия, 2013 г	0,486	Высуш. плоды, «ФитоФарм»	0,150
Замор. плоды, Мурманск	0,807	Высуш. плоды, «Гемма Вит»	0,930
Замор. плоды, Финляндия	0,332	Высуш. плоды, «Азбука трав»	0,124
Замор. плоды, Харьков. обл., Украина	0,381	Высуш. плоды, Московская область	1,507

На основе полученных результатов при разработке ФС «Плоды черники свежие» и «Плоды черники высушенные» в разделах «Числовые показатели» целесообразно установить нормативы содержания мономерных АЦ в пересчете на цианидин-3-глюкозид – не менее 0,2% и не менее 0,1% соответственно.

Изучено 6 образцов экстрактов черники с содержанием АЦ от 1 до 25%. При использовании современных технологий получения концентрированных (10-25% мономерных АЦ) сухих экстрактов КД составлял не более 1,16. Хотя экстракты черники с низким содержанием АЦ (1-10%) применяются при производстве БАД к пище, при рекомендуемых дозировках они не обеспечивают поступления количеств мономерных АЦ, сопоставимых с количествами, проявлявшими доказанную клиническую эффективность [Mush, 2000; Ghoch, 2007].

Методом ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС в чернике было обнаружено порядка 35 индивидуальных АЦ, из которых 20 - неацилированные, а минорные 15 - ацилированные. 14 основных АЦ черники представляют собой 3-галактозиды, 3-глюкозиды и 3-арабинозиды дельфинидина, цианидина, петунидина, пеонидина и мальвидина (рис. 3), диапазон естественных вариаций которых представлен в таблице 2. Образцы черники, заготовленные в Украине и Финляндии, по составу и содержанию основных АЦ вписываются в диапазон естественных вариаций для отечественного сырья. В замороженном сырье преобладает цианидин-3-глюкозид (12,3-16,2%), в высушенном – дельфинидин-3-глюкозид (15,8-16,3%) и мальвидин-3-глюкозид (8,6-29,4%).

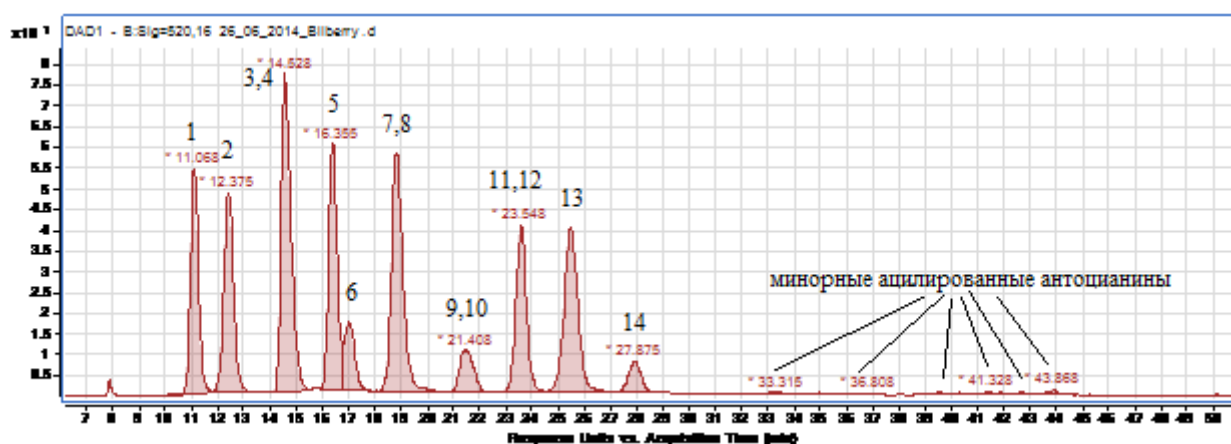


Рисунок 3. ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС черники, Карелия при $\lambda=520$ нм.

Таблица 2

Диапазон естественных вариаций индивидуальных антоцианинов
отечественной черники (%)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Dpd-3-gal	Dpd-3-glu	Cyd-3-gal	Dpd-3-ara	Cyd-3-glu	Ptd-3-gal	Cyd-3-ara	Ptd-3-glu	Pnd-3-gal	Ptd-3-ara	Mvd-3-gal	Pnd-3-glu	Mvd-3-glu	Mvd-3-ara
3,1- 14,6	3,9- 16,3	2,4- 10,6	3,7- 12,2	7,8- 16,2	2,5- 6,3	5,6- 7,7	7,5- 10,0	0,5- 2,1	1,0- 2,3	0,7- 9,2	2,6- 10,4	8,6- 29,4	0,2- 3,1

Профиль АЦ сухих экстрактов черники соответствуют профилю АЦ плодов черники с преобладанием 3-глюкозидов дельфинидина (9,2-12,8%), цианидина (11,0-14,3%). В процессе анализа были выявлены случаи фальсификации сырья и экстрактов черники. Так, профиль АЦ высушенных плодов черники («ГеммаВит») соответствовал профилю АЦ плодов аронии черноплодной (рис. 6), а профиль АЦ сухого экстракта черники («Natex») соответствовал профилю АЦ плодов бузины черной (рис. 4): 1 – цианидин-3-самбубиозид-5-глюкозид, 2 – цианидин-3,5-диглюкозид, 3 – цианидин-3-самбубиозид, 4 – цианидин-3-глюкозид.

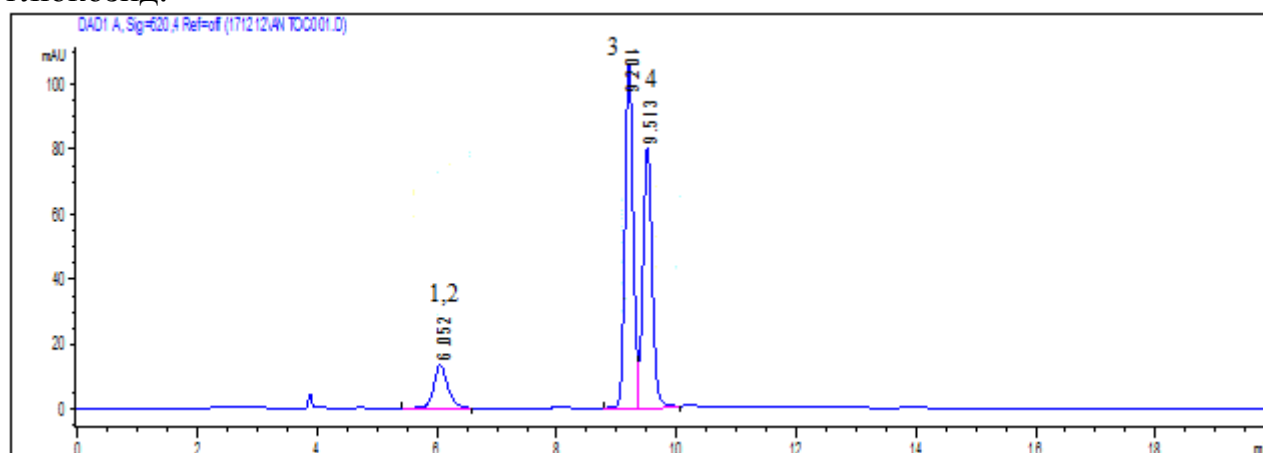


Рисунок 4. ВЭЖХ-ДМД экстракта черники («Natex») при $\lambda=520$ нм

В плодах черники также были исследованы основные классы ПФ - проантоцианидины (ПАЦ) и флавоноиды, определено общее содержание ПФ в пересчете на ГК. Сумма ПАЦ в пересчете на процианидин В2 в замороженном сырье составила от 0,823% (Финляндия) до 1,198% (Вологодская обл.).

В высушенных плодах содержание ПАЦ варьировалось от 1,974% («ФитоФарм») до 4,129% (Московская обл.). Флавоноиды в плодах черники представлены, главным образом, флавонолгликозидами, суммарное содержание которых в замороженном сырье составило от 0,019% (Харьковская обл.) до 0,036% (Карелия, 2013 г.), в высушенном сырье – от 0,040% («ФитоФарм») до 0,116% (Московская обл.). В замороженных плодах черники преобладают гликозиды кверцетина и мирицетина, в высушенных - гликозиды синингетина и ларицитрина. Количество свободных агликонов мирицетина и кверцетина в свежем сырье было 0,001-0,003%, в высушенном - 0,002-0,007%. В замороженных плодах черники общее количество ПФ в пересчете на ГК составило от 0,752% (Финляндия) до 1,097% (Мурманск), в высушенных плодах - от 0,992% («Азбука трав») до 3,055% (Московская обл.). АРА замороженных плодов черники в DPPH-тесте *in vitro* варьировала в диапазоне от 720 мг ТЭ/100 г (Финляндия) до 1170 мг ТЭ/100 г (Мурманск), высушенных – от 287 мг ТЭ/100 г («Азбука трав») до 1951 мг/100 г (Московская обл.). Прослеживается прямая зависимость между содержанием АЦ, ПАЦ, общим количеством ПФ и антирадикальными свойствами плодов черники.

Результаты анализа общего содержания и профиля индивидуальных антоцианинов в плодах аронии черноплодной и продуктах их переработки

Изучено 6 образцов плодов аронии черноплодной, заготовленных в Воронежской, Тверской и Московской областях, а также сок прямого отжима и лиофильно высушенный жом плодов аронии (Домодедово). В свежем сырье накопление антоцианинов увеличивалось с юга на север: количество АЦ в аронии, заготовленной в Воронежской области, составило 0,477-0,569%, в Московской области – 0,586%, в Тверской области – 0,888% (табл. 3). КД свежего сырья не превышал 1,19. На основе полученных данных в разделе «Числовые показатели» проектов ФС на свежие плоды аронии целесообразно установить норматив содержания мономерных АЦ не менее 0,3%.

В сок аронии прямого отжима, полученный в мягких условиях без нагревания сырья, из исходного сырья перешло 43,7% антоцианинов, а КД составил 1,14. Оставшийся после получения сока жом аронии был подвергнут шоковой заморозке и последующему лиофильному высушиванию. Данная технология позволяет сконцентрировать АЦ приблизительно в 5 раз по сравнению с исходным сырьем. КД в жоме аронии составил 1,17, как и в исходном сырье. В образцах высушенных плодов количество антоциановых пигментов различалось приблизительно в 30 раз (табл. 3). При этом в образце с низким содержанием антоцианинов КД составил 4,41, а в образце с высоким содержанием – всего 1,22, что обусловлено различными условиями сушки сырья.

Профиль антоцианинов аронии черноплодной представлен моногликозидами цианидина: 3-галактозидом, 3-глюкозидом, 3-арабинозидом и

3-ксилозидом (рис. 5). Определены границы природных вариаций индивидуальных антоцианинов отечественной аронии черноплодной (табл. 4).

Таблица 3

Содержание мономерных антоцианинов в отечественных плодах аронии и продуктах на её основе

Вид сырья/продукта, регион заготовки/производитель	ΣАЦ, %
Свежие плоды, Воронежская область, 2012 г.	0,569
Свежие плоды, Воронежская область, 2013 г.	0,477
Свежие плоды, Тверская область	0,888
Свежие плоды, Домодедово	0,586
Сок аронии (из плодов, заготовленных в Домодедово)	0,256
Жом аронии (из плодов, заготовленных в Домодедово)	2,610
Высушенные плоды, Московская область	0,036
Высушенные плоды, «Гемма Вит» (фальсификат черники)	0,930

Как видно из таблицы 4, значительных различий в относительном содержании гликозидов цианидина в плодах аронии более северных широт (Тверская область), средней (Московская область) и черноземной полосы России (Воронежская область) не было обнаружено.

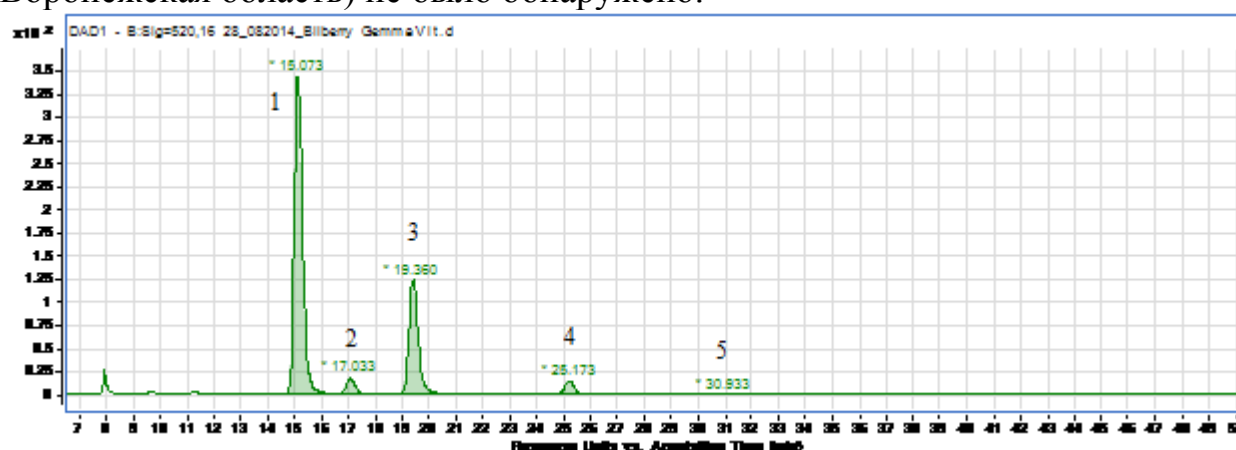
Рисунок 5. ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС аронии, «Гемма Вит» при $\lambda=520$ нм.

Таблица 4

Границы естественных вариаций индивидуальных антоцианинов отечественной аронии черноплодной, %

1	2	3	4	5
Cyd-3-gal	Cyd-3-glu	Cyd-3-ara	Cyd-3-xyl	Cyd
64,6-69,0	2,3-4,0	23,4-29,1	3,1-5,0	0-0,1

Относительное распределение АЦ как и общее их количество, в шкурке и мякоти плода неодинаково. В соке доля цианидин-3-арабинозида была выше, а доли минорных цианидин-3-глюкозида и цианидин-3-галактозида меньше, чем в плодах аронии. В жоме аронии наблюдалось увеличение содержания 3-галактозида и 3-глюкозида цианидина и уменьшение содержания 3-арабинозида и 3-ксилозида цианидина.

В плодах аронии были исследованы основные группы ПФ: ПАЦ и флавоноиды, а также определено общее содержание ПФ. В свежих плодах обнаружено от 2,566% (Домодедово) до 3,987% (Тверская обл.) ПАЦ, в

высушенных - от 2,033% (Московская обл.) до 4,281% («ГеммаВит»). Содержание ПАЦ в соке аронии составило 2,042%, в жоме – 12,491%. Флавоноиды в плодах аронии представлены гликозидами кверцетина, суммарное содержание которых в свежем сырье варьировалось от 0,034% (Ворон. обл., 2012 г.) до 0,065% (Тверская обл.), в высушенном – от 0,064% (Московская обл.) до 0,177% («ГеммаВит»). Основными флавонолгликозидами в исследуемых образцах аронии были гиперозид, изокверцитрин и рутин. В свежем сырье кверцетин отсутствовал, в высушенном сырье его содержание составило от 0,006% (Московская обл.) до 0,032% («ГеммаВит»). Общее содержание ПФ в свежих плодах аронии составило от 0,878% (Домодедово) до 1,548% (Тверская обл.), в высушенных плодах – от 2,427% (Московская обл.) до 3,107% («ГеммаВит»). В соке аронии обнаружено 0,673% ПФ, в жоме аронии – 4,193%. АРА плодов аронии в DPPH-тесте *in vitro* варьировала от 790 мг ТЭ/100 г (Домодедово) до 1203 мг ТЭ/100 г (Тверская обл.). Содержание антоцианинов, ПАЦ, общее содержание ПФ, и флавоноидов коррелирует с выраженностью антирадикальных свойств плодов аронии.

Результаты анализа общего содержания и профиля индивидуальных антоцианинов в плодах смородины черной и продуктах их переработки

Изучено 24 образца культивируемых плодов смородины черной, заготовленных в Тамбовской, Рязанской и Московской областях, а также сок прямого отжима и лиофильно высушенный жом плодов черной смородины (Домодедово). Содержание мономерных АЦ в свежем и замороженном сырье составило 0,105-0,270% (табл. 5), а КД - 1,09-1,19.

Таблица 5

Содержание антоцианинов в плодах черной смородины и продуктах их переработки

Вид, сорт сырья	ΣАЦ, %	Вид, сорт/регион заготовки	ΣАЦ, %
Замор. плоды, «Лентяй»	0,126	Замор. плоды, «Софья»	0,262
Замор. плоды, «Пигмей»	0,138	Замор. плоды, «Нара»	0,200
Замор. плоды, «Велой»	0,137	Замор. плоды, «Былинная»	0,123
Замор. плоды, «Севчанка»	0,202	Замор. плоды, «Зуша»	0,205
Замор. плоды, «Алтайская поздняя»	0,120	Замор. плоды, «Деликатес»	0,164
Замор. плоды, «Гулливер»	0,136	Замор. плоды, «Экзотика»	0,105
Замор. плоды, «Изюмная»	0,136	Замор. плоды, «Лама»	0,184
Замор. плоды, «Ксюша»	0,116	Замор. плоды, Вологодская область	0,250
Замор. плоды, «Шаровидная»	0,270	Свежие плоды, Рязанская область	0,184
Замор. плоды, «Геркулес»	0,130	Свежие плоды, Домодедово	0,196
Замор. плоды, «Плотнокистная»	0,190	Сок черной смородины	0,045
Замор. плоды, «Ажурная»	0,195	Жом черной смородины	2,121
Замор. плоды, «Рита»	0,254	Высуш. плоды, Московская область	0,088

АЦ накапливаются только в шкурке черной смородины, поэтому чем меньше плод, тем больше в нем пигментов. Наиболее крупные плоды массой 3,0-4,3 г (сорта «Экзотика», «Былинная» и «Ксюша») содержали меньше всего АЦ – 0,105-0,123%, тогда как в наиболее мелких плодах массой 0,9-1,2 г (сорта «Плотнокистная», «Зуша» и плоды, заготовленные в Вологодской области) было найдено в среднем в 2 раза большее количество АЦ – 0,190-0,250%. В сок прямого отжима из исходного сырья перешло около 23% АЦ. Лиофильное высушивание

жома черной смородины позволило сконцентрировать АЦ в 10 раз с меньшими по сравнению с аронией потерями. КД в соке и жоме плодов составили 1,19 и 1,15 соответственно. В высушенном сырье найдено наименьшее количество мономерных АЦ – всего 0,088%, при этом КД составил 1,86. Сухие экстракты смородины черной содержали 2,2% («Натэк-продукт») и 20,15% («EUSA colors») мономерных АЦ, а КД в них составили 1,37 и 1,18 соответственно.

Основными АЦ отечественных плодов смородины черной являются 3-глюкозиды и 3-рутинозиды дельфинидина и цианидина (рис. 6). Идентифицированы минорные АЦ: 3-рутинозиды петунидина и пеонидина, ацилированные п-кумаровой кислотой глюкозиды дельфинидина, цианидина и петунидина. Границы естественных вариаций индивидуальных АЦ отечественных плодов смородины черной представлены в таблице 6.

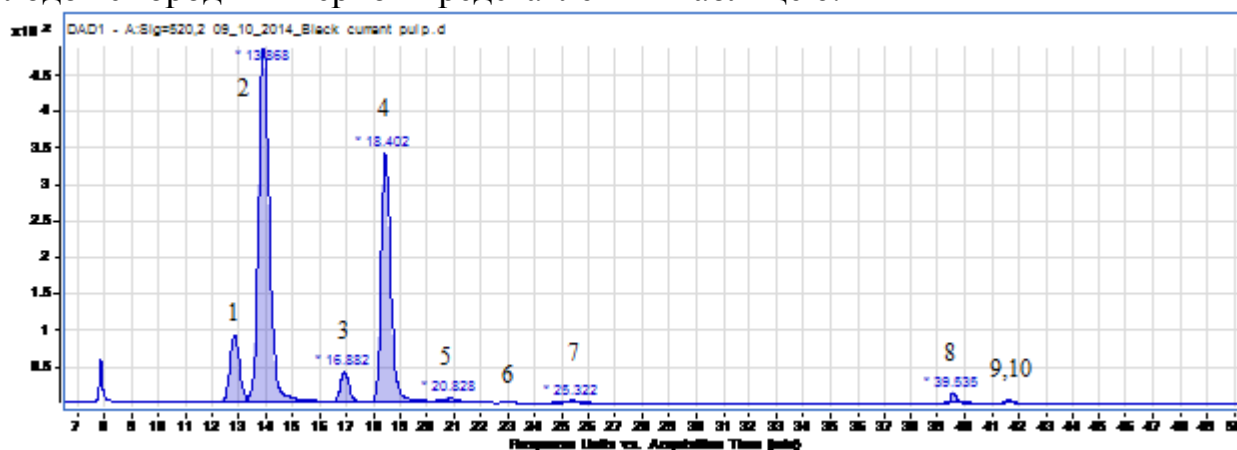


Рисунок 6. ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС жома смородины черной при $\lambda=520$ нм.

Таблица 6

Границы естественных вариаций индивидуальных антоцианинов
отечественной черной смородины, %

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dpd-3-glu	Dpd-3-rut	Cyd-3-glu	Cyd-3-rut	Ptd-3-rut	Pgd-3-rut	Pnd-3-rut	Dpd-3-(coumaroyl)glu	Cyd-3-(coumaroyl)glu	Ptd-3-(coumaroyl)glu
5,1-18,1	19,9-46,6	2,1-12,2	28,7-61,2	0-5,9	0-0,6	0-3,5	0-1,5	0-4,1	0-7,9

По природе доминирующего АЦ плоды смородины черной можно разделить на 3 группы. В первой группе (сорта «Лентяй», «Пигмей», «Велой», «Ажурная», «Софья», «Нара», «Былинная», «Зуша», «Деликатес», «Экзотика», а также образцы плодов, заготовленные в Рязанской и Московской области) основным АЦ является дельфинидин-3-рутинозид (37,0-52,0%). Во второй группе (сорта «Севчанка», «Изюмная», «Ксюша», «Шаровидная», «Плотнокистная», «Рита» и плоды, заготовленные в Вологодской области) преобладает цианидин-3-рутинозид (37,8-54,9%), как и в экстракте черной смородины («EUSA colors»). Приблизительно одинаковое количество 3-рутинозидов дельфинидина и цианидина найдено в третьей группе (сорта «Алтайская поздняя», «Гулливер» и

«Геркулес»). В высушенных плодах присутствовало следовое количество дельфинидина и цианидина. В экстракте смородины черной («Натэк-продукт») идентифицированы 3-самбубиозид-5-глюкозид, 3,5-диглюкозид, 3-самбубиозид и 3-глюкозид цианидина, характерные для плодов бузины черной (рис. 4). Таким образом, выявлен случай фальсификации сухого экстракта плодов смородины черной экстрактом бузины черной.

В плодах черной смородины были исследованы основные классы сопутствующих ПФ: ПАЦ и флавоноиды, а также общее содержание ПФ. Содержание ПАЦ в свежем и замороженном сырье варьировалось от 0,421% (Домодедово) до 1,397% (Рязанская обл.), в высушенных плодах составило 0,792%. В соке обнаружено 0,193% ПАЦ, в жоме – 8,970% – в 20 раз больше, чем в исходном сырье. В плодах смородины черной флавоноиды представлены флавонолгликозидами, суммарное содержание которых в свежем и замороженном сырье составило от 0,020% (Домодедово) до 0,036% (Вологодская обл.), в высушенном – 0,083%. Преобладание 3-галактозидов и 3-глюкозидов мирицетина и кверцетина отмечено в свежих и замороженных плодах, 3-рутинозидов мирицетина и кверцетина – в высушенных плодах и жоме. Общее содержание ПФ в свежем и замороженном сырье составило от 0,538% (Домодедово) до 1,059% (Рязанская обл.), в высушенном – 1,800%. В сок из исходного сырья перешло всего 30,1% ПФ. Общее количество ПФ в жоме плодов черной смородины возросло в 17 раз по сравнению с исходным сырьем.

АРА исследованных образцов смородины черной варьировала от 424 мг ТЭ/100 г (Рязанская обл.) до 920 мг/100 г ТЭ (Вологодская обл.). Неоднозначная корреляция между группами сопутствующих ПФ и АРА обусловлена присутствием в образцах значительного по сравнению с другими объектами исследования количества аскорбиновой кислоты, являющейся мощным антиоксидантом и влияющей на результаты теста.

Результаты определения суммарного содержания и профиля индивидуальных антоцианинов в плодах калины обыкновенной.

Исследовано 14 образцов дикорастущих и культивируемых плодов калины, заготовленных в Тамбовской, Московской и Тверской областях, Алтайском крае. Суммарное содержание АЦ в свежем и замороженном сырье составило 0,010-0,034% (табл. 7).

Таблица 7

Содержание мономерных антоцианинов в плодах калины

Вид, сорт/регион заготовки сырья	ΣАЦ, %	Вид, сорт/регион заготовки, производитель сырья	ΣАЦ, %
Замор. плоды, К-1-13	0,031	Замор. плоды, К-8-13	0,018
Замор. плоды, К-2-13	0,021	Замор. плоды, Домодедово, 2013 г.	0,024
Замор. плоды, К-3-13	0,013	Замор. плоды, Москов. обл., 2013 г.	0,017
Замор. плоды, К-4-13	0,026	Замор. плоды, Тверская обл., 2013 г.	0,020
Замор. плоды, К-5-13	0,011	Свеж. плоды, Москов. обл., 2014 г.	0,015
Замор. плоды, К-6-13	0,010	Замор. плоды, Домодедово, 2014 г.	0,034
Замор. плоды, К-7-13	0,018	Высуш. плоды, «ХОРСТ»	0,003

КД замороженного сырья находились в диапазоне 1,12-1,52, то есть мономерные АЦ составляют 66-90% от общего содержания пигментов. На основе полученных результатов в НД на плоды калины свежие целесообразно установить норматив содержания мономерных АЦ не менее 0,01%. При высушивании плодов мономерные АЦ практически не сохраняются.

Нами впервые определен антоциановый профиль плодов калины обыкновенной, произрастающей в средней полосе России (рис. 7). Установлены границы естественных вариаций индивидуальных АЦ отечественных плодах калины (табл. 8). Плоды содержали от 4 до 8 АЦ, представляющие собой гликозиды цианидина.

Профиль индивидуальных антоцианинов в исследуемых образцах заметно различался. По составу АЦ образцы плоды калины можно разделить на 3 группы. К первой группе относятся сорта К-1-13, К-5-13, К-6-13, К-8-13, К-9-13, образцы, заготовленные в Московской и Тверской областях, ко второй – сорта К-2-13, К-3-13 и высушенные плоды («ХОРСТ»), к третьей – сорта К-4-13, К-7-13, К-10-13 и образец, заготовленный в Домодедово. В первой группе в качестве основных АЦ идентифицированы цианидин-3-вицианозид (17,2-41,5%), цианидин-3-глюкозид (33,9-77,6%) и цианидин-3-рутинозид (1,5-20,6%). Во второй группе преобладает цианидин-3-ксилозилрутинозид, относительное содержание которого составляет 94,6-96,5%. В третьей группе при идентичном составе АЦ в сортах К-4-13, К-10-13 и плоды, заготовленных в Домодедово, основными являются цианидин-3-вицианозид, цианидин-3-ксилозилрутинозид и цианидин-3-глюкозид (21,0-22,0%, 25,4-32,7% и 24,5-30,8% соответственно), тогда как в сорте К-7-13 преобладает цианидин-3-ксилозилрутинозид (80,9%).

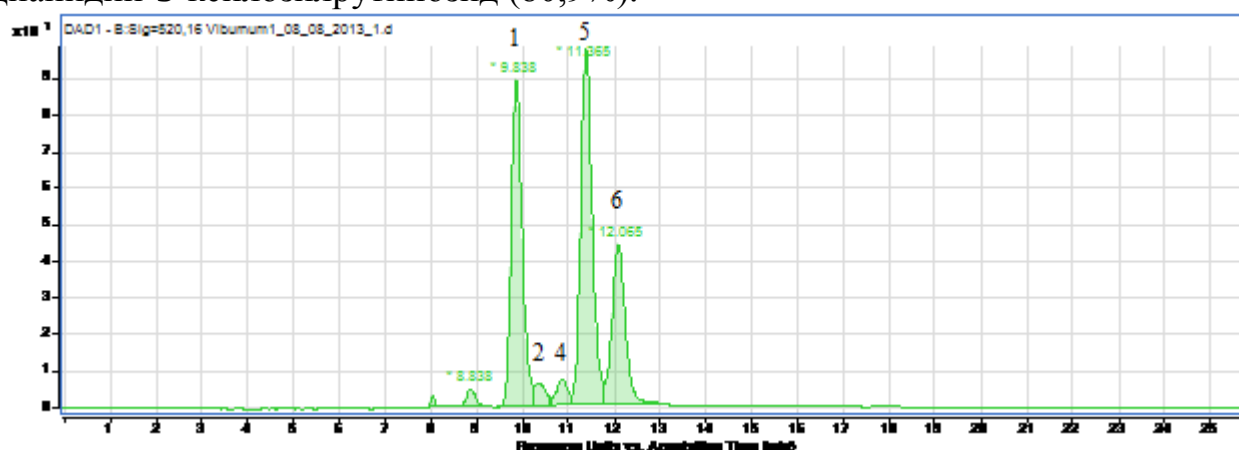


Рисунок 7. ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС калины сорта К-1-13 при $\lambda=520$ нм.

Таблица 8

Границы естественных вариаций индивидуальных антоцианинов
отечественной калины, %

1	2	3	4	5	6
Cyd-3- vician	Cyd-3- lathyr	Cyd-3- xylrut	Cyd-3-samb	Cyd-3-glu	Cyd-3-rut
6,6-41,5	0-2,8	25,5-96,5	1,2-4,3	1,0-77,6	1,5-20,6

Антоциановый профиль исследованных в данной работе образцов калины отличался независимо от сорта и региона произрастания, калину обыкновенную

можно характеризовать как растение с высокой внутривидовой изменчивостью по отдельным группам БАВ, в том числе антоцианинов.

В плодах калины также было определено содержание сопутствующих ПФ (ПАЦ, флавоноидов, ГKK кислот), а также общее содержание ПФ. Количество ПАЦ в свежей и замороженной калине варьировалось от 0,201% (К-5-13) до 0,528% (Тверская обл.). В высушенных плодах обнаружено наибольшее содержание ПАЦ – 1,507%. Флавоноиды в калине представлены флавонолгликозидами, суммарное содержание которых составило от 0,005% (К-5-13) до 0,026% (К-1-13) в свежих и замороженных плодах и 0,036% в высушенных. В качестве основных флавоноидов идентифицированы кверцетин-3-вицианозид (33-74% от общего содержания флавоноидов), рутин (20,0-28,9%). В сортах К-6-13 и К-8-13 отмечено относительно высокое содержание изорамнетин-3-самбубиозида (19,2% и 16,7% соответственно). ГKK кислоты в плодах калины представлены изомерами кофеилхинных кислот, более 96,2% от общего содержания которых приходится на хлорогеновую кислоту, содержание которой в замороженном сырье составило от 0,250% (К-7-13) до 0,580% (К-1-13), в высушенном - 1,747%. Общее содержание ПФ в свежей и замороженной калине варьировалось в диапазоне от 0,403% (К-5-13) до 0,733% (Тверская обл.). В высушенной калине найдено наибольшее количество ПФ – 1,995%.

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

Результаты определения суммарного содержания и профиля индивидуальных антоцианинов в плодах и настойке плодов лимонника китайского. Исследовано 4 образца замороженных и высушенных плодов лимонника, заготовленных в Московской области и Хабаровском крае, а также настойка плодов лимонника урожая 2012 г., заготовленного в Хабаровском крае.

Содержание мономерных антоцианинов в замороженных плодах лимонника составило 0,021%, в высушенных плодах - от 0,042% до 0,065% (табл. 9). Значения КД для замороженного и высушенного сырья были 1,24 и 1,42-1,96 соответственно. Таким образом, в замороженных плодах лимонника на мономерные антоцианины приходилось около 80% пигментов, в высушенных - 51-70% пигментов. В настойке плодов лимонника концентрация АЦ была 0,11 мг/мл или 0,055% в пересчете на сырьё (200 г плодов на 1 л 95% этанола). Выход антоцианинов из исходного сырья составил 94,8%.

Таблица 9

Содержание мономерных антоцианинов в плодах и настойке плодов лимонника

Вид, регион заготовки сырья	ΣАЦ, %
Замороженные плоды, Московская область	0,021
Высушенные плоды, Хабаровский край, 2012 г.	0,058
Высушенные плоды, Хабаровский край, 2013 г.	0,042
Высушенные плоды, Хабаровский край, 2014 г.	0,065
Настойка плодов лимонника (из плодов 2012 г.)	0,011

Нами впервые был определен профиль индивидуальных антоцианинов отечественного лимонника, произрастающего в Хабаровском крае и Московской области (рис. 8). Установлены границы естественных вариаций индивидуальных антоцианинов отечественного лимонника (табл. 10). Исследуемые образцы имели одинаковый профиль антоцианинов с выраженным преобладанием цианидин-3-ксилозилрутинозида (78,5-87,8%). Среди минорных антоцианинов в замороженном сырье преобладал 3-латириозид цианидина. В высушенном сырье, наоборот, наблюдалось увеличение относительного содержания 3-рутинозидов цианидина и пеларгонидина на фоне снижения содержания 3-латириозидов цианидина.

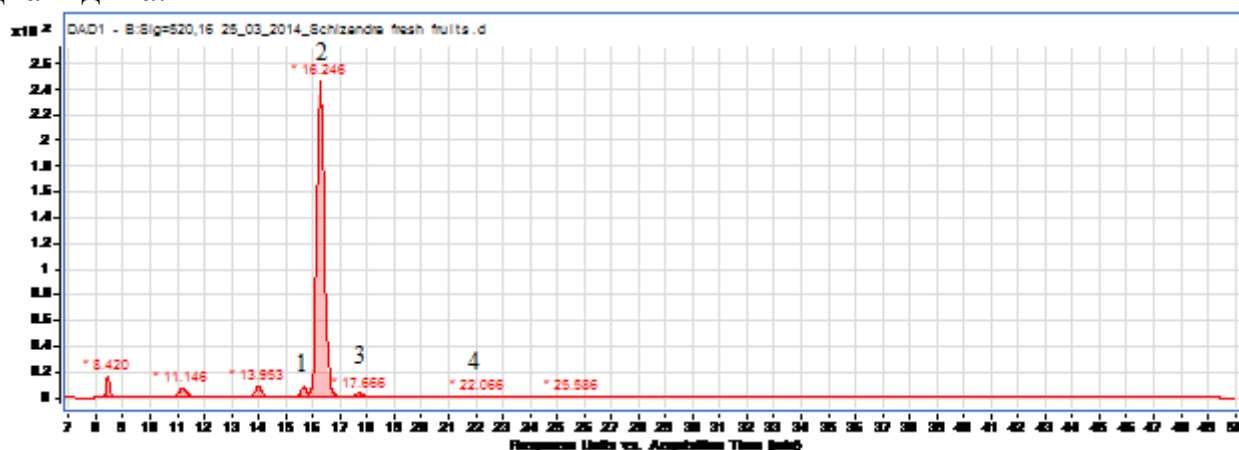


Рисунок 8. ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС лимонника, Московская обл. при $\lambda=520$ нм.

Таблица 10

Границы естественных вариаций индивидуальных антоцианинов отечественных плодов лимонника китайского, %

1	2	3	4
Cyd-3-lathyr	Cyd-3-xylrut	Cyd-3-rut	Pgd-3-rut
1,2-2,6	78,5-87,8	1,3-2,9	0,5-3,3

В плодах и настойке лимонника методом ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС также были изучены дибензоциклооктадиеновые лигнаны. В исследованных образцах было обнаружено более 30 лигнанов, среди которых выделяют 11 характеристических - схизандрин, гомизин J, гомизин A, ангелоилгомизин H, гомизин G, схизантерин A, схизантерин B, схизандрин A, γ -схизандрин, схизандрин B, схизандрин C. Общее содержание лигнанов в замороженном сырье составило 0,552%, в высушенном – 1,250-1,521%. В настойке плодов лимонника обнаружено 1,456% лигнанов в пересчете на сырье. Таким образом, выход дибензоциклооктадиеновых лигнанов составляет 95,7%. Среди 11 характеристических лигнанов в высушенных плодах и настойке лимонника преобладали схизандрин и схизандрин B (29,2-37,2% и 16,6-24,2%), в свежих плодах - ангелоилгомизин O (24,7%), тогда как содержание схизандрина и схизандрина B было более низким (18,0 и 19,1% соответственно).

Результаты определения суммарного содержания и профиля индивидуальных антоцианинов в плодах кизила обыкновенного.

Исследовано 10 образцов культивируемых и дикорастущих замороженных плодов кизила, заготовленных в Тамбовской области и Кавказском регионе соответственно. Суммарное содержание мономерных антоцианинов в

отечественных плодах кизила составило 0,011-0,092% (табл. 11). Наибольшее количество антоциановых пигментов найдено в кизиле сорта «Находка», наименьшее – в недозрелых плодах кизила, собранных в Кавказском регионе. КД замороженных плодов кизила составили 1,16-1,47. Таким образом, мономерные формы антоцианинов составляют 70-86% от общего количества пигментов.

Впервые определен профиль индивидуальных антоцианинов отечественного кизила (рис. 10). Установлены границы естественных вариаций индивидуальных антоцианинов в кизиле (табл. 8).

Таблица 11

Суммарное содержание мономерных антоцианинов в плодах кизила

Сорт /Регион заготовки сырья	ΣАЦ, %
«Азовский-1»	0,024
«Болгарский»	0,031
«Волгоградский грушевидный»	0,028
«Волгоградский»	0,022
«Крымский»	0,016
«Мовир»	0,025
«Мовир грушевидный»	0,014
«Находка»	0,092
Кавказский регион (зрелые плоды кизила)	0,038
Кавказский регион (недозрелые плоды кизила)	0,011

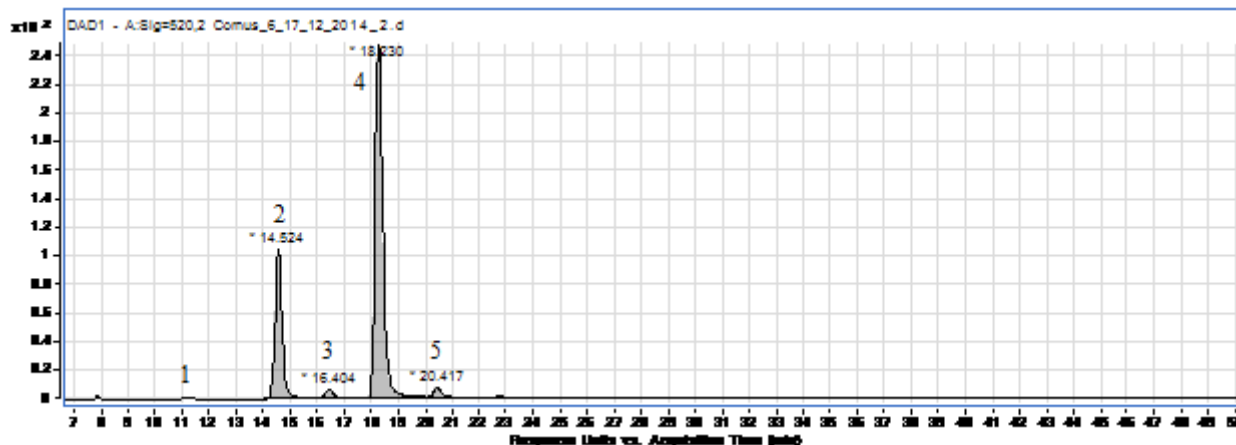


Рисунок 10. ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-МС плодов кизила «Азовский-1» при $\lambda=520$ нм.

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

Таблица 8

Границы естественных вариаций индивидуальных антоцианинов отечественных плодов кизила обыкновенного, %

1	2	3	4	5
Dpd-3-glu	Cyd-3-gal	Cyd-3-glu	Pgd-3-gal	Pgd-3-glu
0,4-4,4	19,0-80,3	1,1-6,5	15,1-75,6	0,2-6,6

В плодах кизила сортов «Азовский-1», «Волгоградский грушевидный», «Волгоградский» и «Крымский» преобладал пеларгонидин-3-галактозид (56,6-75,6%), в сорте «Болгарский», зрелых и незрелых плодах кизила, собранных в Кавказском регионе, – цианидин-3-галактозид (61,0-80,3%). В сортах «Мовир», «Мовир грушевидный» и «Находка» 3-галактозиды цианидина и пеларгонидина накапливались в отношении 1:1. Относительно высокое по сравнению с другими образцами содержание дельфинидин-3-глюкозида обнаружено в незрелых плодах кизила.

Основным классом сопутствующих ПФ плодов кизила обыкновенного являются проантоцианидины, содержание которых составило 0,022% в незрелых плодах и от 0,080% («Волгоградский») до 0,430% («Находка») в зрелых плодах. В образцах кизила обнаружено незначительное количество производных гидроксикоричных кислот – 0,007-0,011% в пересчете на хлорогеновую кислоту. Общее содержание ПФ варьировалось от 0,150% («Мовир грушевидный») до 0,398% («Находка»). АРА плодов кизила в DPPH-тесте *in vitro*, варьировавшая в диапазоне от 470 мг ТЭ/100 г («Мовир грушевидный») до 932 мг ТЭ/100 г («Находка»), примерно эквивалентна АРА смородины черной (424-920 мг ТЭ/ 100 г), черники (720-1170 мг ТЭ/100 г) и др. исследуемых объектов. Прослеживается прямая зависимость АРА от общего содержания и содержания отдельных групп ПФ в плодах кизила.

Общие выводы:

- 1) Адаптирован высокоспецифичный метод рН-дифференциальной спектрофотометрии для оценки интегрального содержания мономерных антоцианинов в плодах черники обыкновенной, аронии черноплодной, смородины черной, калины обыкновенной, лимонника китайского, кизила обыкновенного и продуктах их переработки. Показано, что рН-дифференциальный метод позволяет получить более достоверные данные о содержании мономерных антоцианинов в объектах исследования по сравнению с действующим фармакопейным методом ЕР 8th. Предложено ввести взамен действующего прямого спектрофотометрического метода рН-дифференциальный метод в раздел «Количественное определение» проектов ФС на вышеперечисленные виды ЛРС и стандартизованные экстракты на их основе.
- 2) Разработаны специфические методики определения профиля индивидуальных антоцианинов в ЛРС, растительных экстрактах и лекарственных растительных препаратах методом ВЭЖХ-ДМД-ESI-TOF-MS и ВЭЖХ-ДМД, позволяющие определить их на фоне сложного матрикса без длительной и трудоемкой очистки образцов.
- 3) С помощью разработанных методик изучено общее содержание и профиль индивидуальных антоцианинов в более чем 80 образцах лекарственного и перспективного пищевого растительного сырья и продуктов его переработки, выявлены случаи фальсификации плодов черники обыкновенной, смородины черной и экстрактов на их основе. Изученные границы природных вариаций содержания и состава антоциановых пигментов в отечественном ЛРС могут быть

использованы при разработке разделов «Подлинность» и «Числовые показатели» проектов ФС на объекты исследования. Предложен проект ОФС «Определение содержания и состава мономерных антоцианинов в лекарственном растительном сырье, растительных экстрактах и лекарственных растительных препаратах

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

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

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

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. **Perova, I.B.** Assessment of correlation between the content of polyphenols, proanthocyanidins and antioxidant activity in “*in vitro*” tests in food and medicinal raw plant materials / I.B. Perova, K.I. Eller // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2012. – т. 10, вып. 2. – С. 49-50.

2. Жогова, А.А. Биологически активные вещества плодов кизила обыкновенного / А.А. Жогова, **И.Б. Перова** // *Вопросы диетологии*. – 2012. – т.2, прил. №1. Материалы XIV Всероссийского Конгресса диетологов и нутрициологов с международным участием «Алиментарно-зависимая патология: предиктивный подход». – Москва. – 2012. – С. 30-31.

3. Eller, K.I. Anthocyanin profile of Russian wild berries / K.I. Eller, **I.B. Perova** // *Planta Medica*. Vol. 79. - No 5.- OP11.

4. **Перова, И.Б.** Биологически активные вещества плодов калины обыкновенной / И.Б. Перова, А.А. Жогова, А.В. Черкашин, К.И. Эллер, Г.В. Раменская, И.А. Самылина // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2014. – Т. 48. – № 5. – С. 32 – 39.

5. **Perova, I.B.** Lignans and anthocyanins as the major active ingredients of *Schizandra chinensis* / I.B. Perova, K.I. Eller, G.V. Ramenskaya // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2014. – т.12. – С.16-17.

6. **Perova, I.B.** Biologically active substances from European guelder berry fruits / I.B. Perova, A.A. Zhogova, A.V. Cherkashin, K.I. Eller, G.V. Ramenskaya, I.A. Samylina // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2014. –Vol.48. – No 5. – Issue 5. – P. 332-339.

7. **Перова, И.Б.** Биологически активные вещества плодов кизила (*Cornus mas* L.) / И.Б. Перова, А.А. Жогова, А.В. Полякова, К.И. Эллер, Г.В. Раменская, И.А. Самылина // **Вопросы питания**: М. – 2014. –Т. 83.– № 5.– С. 86-94.

Список сокращений

Ara – арабинозид

Cyd – цианидин

Dpd – дельфинидин

DPPH – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил

Gal – галактозид

Glu – глюкозид

Lathyr – латирозид

Mvd – мальвидин

Pgd – пеларгонидин

Pnd – пеонидин

Ptd – петунидин

Rut – рутинозид

Samb – самбубиозид

Vician – вицианозид

Xylrut - ксилозилрутинозид

АРА – антирадикальная активность

АЦ – антоцианины

БАД – биологически активные добавки

ГК – галловая кислота

ГКК – гидроксикоричные кислоты

КД – коэффициент деградации

ЛП – лекарственный препарат

ЛРС – лекарственное растительное сырье

ОФС – общая фармакопейная статья

ПАЦ – проантоцианидины

ПФ – полифенольные соединения

ФС – фармакопейная статья