



УДК 615.322:543.544.123

АНТОЦИАНЫ ЛЕПЕСТКОВ ЦВЕТКОВ *CHAENOMELES JAPONICA* И *C. MAULEI*

А.Н. Чулков
В.И. Дейнека
И.А. Навальнева
Л.А. Дейнека
В.Н. Сорокопудов

Белгородский государственный
 национальный исследовательский
 университет, 308015 г. Белгород,
 ул. Победы 85

e-mail: Ach87@mail.ru
 deineka@bsu.edu.ru
 irina.navalneva@mail.ru
 Deyneka@bsu.edu.ru
 sorokopudov@bsu.edu.ru

Спектрофотометрическим и хроматографическим (с масс-селективным детектированием) методами определены основные компоненты антоциановых комплексов цветков *Chaenomeles japonica* и *C. maulei*. Установлено, что во всех исследованных образцах присутствуют 3-галактозиды и 3-гексозилгалактозиды цианидина и пеларгонидина, причем комплексы различаются относительной активностью флавоноид-3'-гидроксилазы (F-3'-H), что может служить основанием для разделения исследованных растений по различным видам рода Хеномелес.

Ключевые слова: *Chaenomeles japonica*, *C. maulei*, лепестки цветков, антоцианы, ВЭЖХ-МС.

Введение

Хеномелес – новая перспективная плодовая культура [1], принадлежит к роду *Chaenomeles* Lindl. По разным данным в природе выделяют три (или четыре) вида и несколько гибридных групп, возникших в культуре. В Европе в качестве отдельных видов признаются: хеномелес японский (I, *C. japonica* (Thunb.) Lindl. ex Spach.), хеномелес прекрасный (II, *C. speciosa* (Sweet) Nakai) и хеномелес катаянский (III, *C. cathayensis* (Hemsl.) Schneid.) [1, 2], в отдельный вид по данным китайских ученых выделяется *C. thibetica*. Различают также четыре гибридных вида: *C. x superba* (Frahm) Rehder; *C. japonica* x *C. speciosa*, группа Superba, *C. x clarkiana* Weber (*C. cathayensis* x *C. japonica*, группа Clarkiana), *C. x vilmoriniana* Weber (*C. cathayensis* x *C. speciosa*, группа Vilmoriniana) и *C. x californica* Clarke ex Weber [*C. cathayensis* x (*C. x superba*), группа Californica]. В советской литературе выделяли четыре вида хеномелеса: I, III, хеномелес Маулея (айва низкая, *C. maulei* (Mast.) С.К. Schneid), хеномелес китайский (*C. sinensis* (Thouin) Koehne) [3], хотя в мировой литературе *C. maulei* отождествляют с *C. japonica* [4], а *C. sinensis* рассматривается в настоящее время в иностранной литературе как важный источник лекарственных соединений.

Плоды растений рода *Chaenomeles* – не только пищевая, но и лечебно-профилактическая культура. Плоды *C. speciosa* в традиционной китайской медицине использовали для лечения диспепсии и различных воспалительных процессов, ревматоидного артрита, невралгии тройчатого нерва, заболеваний печени и др, поскольку они содержат компоненты с высоким антиоксидантным действием [5], включая витамин С. Наличие ингибиторов глюкозидазы делает плоды этих растений полезными при лечении диабета II типа [6], а плоды *C. sinensis* рассматриваются как эффективные источники веществ, обладающих противовирусной активностью [7].

В ботаническом саду Белгородского государственного университета с 2002 года произрастает два вида хеномелеса: *C. japonica* и *C. maulei*. Большинство из имеющихся образцов были привезены из Липецка («Липецкая опытно-селекционная станция») и из Латвии («Латвийский ботанический сад»). Все растения ежегодно обильно цветут и плодоносят.

Поскольку ранее было отмечено, что относительно *C. japonica* и *C. maulei* существуют разночтения в их видовой идентификации, то представляет интерес использо-

¹ Работа выполнена в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 гг., государственные контракты № П425 и № П267 «Скрининг морфолого-биологических особенностей растений рода *Chaenomeles* как основа создания адаптивного сортамента».



вание хемосистематики для решения данной проблемы. Эти растения хорошо известны как высоко декоративные благодаря обильному цветению – ветви куста усеяны цветками с шарлахово-красной, оранжевой, малиновой, розовой и белой окраской. По литературным данным антоциановый комплекс цветков *C. speciosa* представлен необычными дигликозидами (образованными глюкозой и галактозой) [8] пеларгонидина и цианидина и обычными для плодов растений подсемейства яблоневые 3-галактозидами [9] тех же агликонов со следами 3-глюкозидов пеларгонидина. В работе китайских исследователей [10] в цветках того же вида хеномелеса найдены в основном аналогичные производные цианидина, а доля производных пеларгонидина оказалась минимальной, причем для дигликозидов предполагается присоединение дигликозидного радикала в положение 3, и найден еще один минорный компонент – цианидин-3-сукциниларабинозид. При этом исследованные растения по окраске цветков, несмотря на большое преобладание цианидиновых компонент в цветках всех 24 исследованных растений (в системе СIE Lab), были разделены на две группы.

В настоящей работе предполагалось исследовать антоциановый состав окрашенных цветков для выяснения различий между *C. japonica* и *C. maulei*.

Объект и методы исследования

Антоцианы экстрагировали из свежих лепестков цветков хеномелеса настаиванием в 0.1 М водном растворе HCl при разминании растительного материала для разрушения клеточных мембран. Полученный экстракт отфильтровывали на бумажном фильтре и очищали твердофазной экстракцией на патронах ДИАПАК C18. Спектры полученных экстрактов записывали в кварцевых кюветах на спектрофотометре СФ-56 и в ячейке детектора хроматографа. Разделение антоцианов экстракта и масс-спектры индивидуальных компонентов снимали с использованием хроматографической системы Agilent Infinity 1200 с диодно-матричным и масс-селективным детектором (MMES, positive, fragm. 200V). Хроматографическая колонка 4.6x250 мм Symmetry® C₁₈; подвижная фаза 10 об.% муравьиной кислоты и 8 об.% ацетонитрила в воде, 1 мл/мин. Хроматограммы записывали при 510 нм.

Результаты и обсуждение

Спектрофотометрические исследования антоцианового комплекса цветков *C. japonica* и *C. maulei* показали, что различие в окраске цветков связано не только с различием в уровне накопления антоцианов, см. табл.1, но и в различии в основах (антоцианидинах) антоцианов. Для некоторых экстрактов максимум находился в относительно коротковолновом диапазоне – порядка 490 ÷ 500 нм, что характерно для антоцианов, построенных на пеларгонидине. Для других экстрактов наблюдается bathochromное смещение максимума абсорбции, рис.1, что характерно для комплексов антоцианов цианидинового ряда (производных цианидина и пеонидина).

Типичная хроматограмма экстракта цветков исследованных растений представлена на рис.2 на фоне хроматограммы экстракта плодов черной смородины, которую мы использовали в качестве стандартного образца [11], содержащего (в порядке элюирования) дельфинидина-3-глюкозид, Dp-3-Glu, дельфинидина-3-рутинозид, Dp-3-Rut, цианидина-3-глюкозид, Cy-3-Glu, и цианидина-3-рутинозид, Cy-3-Rut.

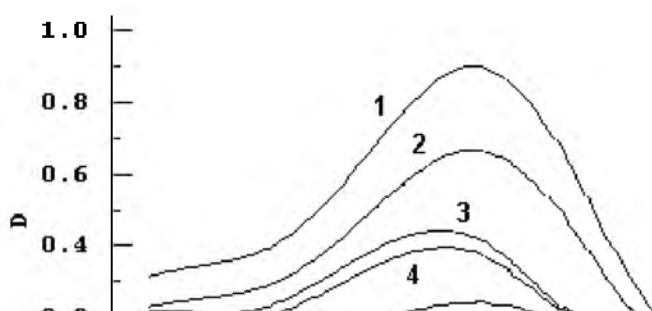


Рис. 1. Спектры экстрактов цветков *Chaenomeles* sp.
Экстракты цветков растений: *C. japonica* – 1, 2, 5; *C. maulei* – 3, 4

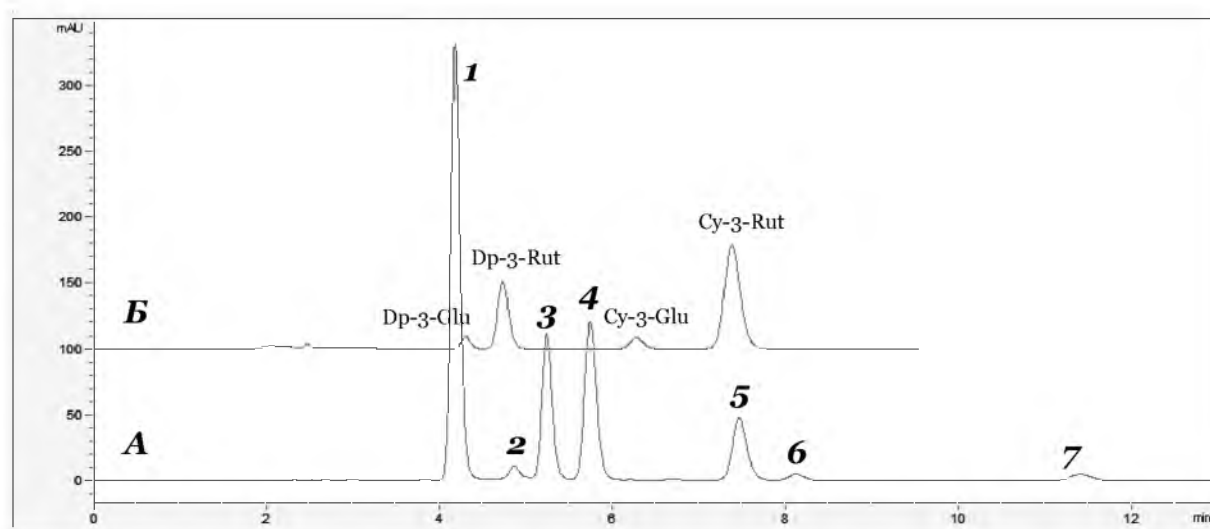


Рис. 2. Разделение антоцианов цветков хеномелеса:
А – экстракт цветков хеномелеса; Б – экстракт плодов черной смородины;
1 – Су-3-Гала; 3 – Су-3-Гала; 4 – Рg-3-Гекс-Гала; 5 – Рg-3-Гала; 2, 6, 7 – не идентифицированные компоненты.

По спектрам компонентов экстракта цветков хеномелеса, записанным в ячейке детектора, можно утверждать, что пики 1, 2, 3 и 7 соответствуют антоцианам цианидинового ряда, а два пика 4, 5 и 6 – производные пеларгонидина, рис.3.

Сопоставляя удерживание компонентов экстракта цветков хеномелеса с удерживанием компонентов экстракта аронии, в котором основным компонентом является цианидина-3-галактозид, Су-3-Гала, а также присутствуют Су-3-Глу, цианидина-3-арабинозид, Су-3-Ага, и цианидина-3-ксилозид, Су-3-Хул, [9], пик №3 идентифицируется как Су-3-Гала, при этом ни в одном из экстрактов нет остальных компонентов экстракта плодов аронии.

Пик №3 с наименьшим удерживанием может соответствовать соединению, у которого в положении 3 находится дигликозидный заместитель, Су-3-diGly. По аналогии можно предположить, что пики 4 и 5 относятся к пеларгонидин-3-дигликозиду Рg-3-diGly и Рg-3-Гала. Такое отнесение полностью подтверждается анализом масс-спектров этих соединений, рис.4.

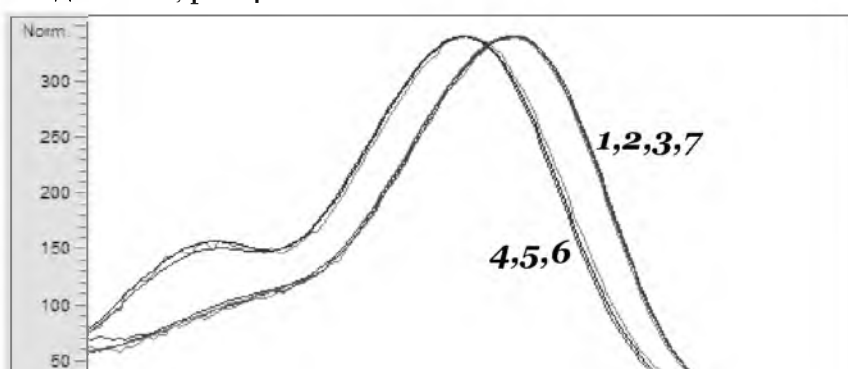




Рис. 3. Спектры основных пиков на хроматограмме на рис. 2

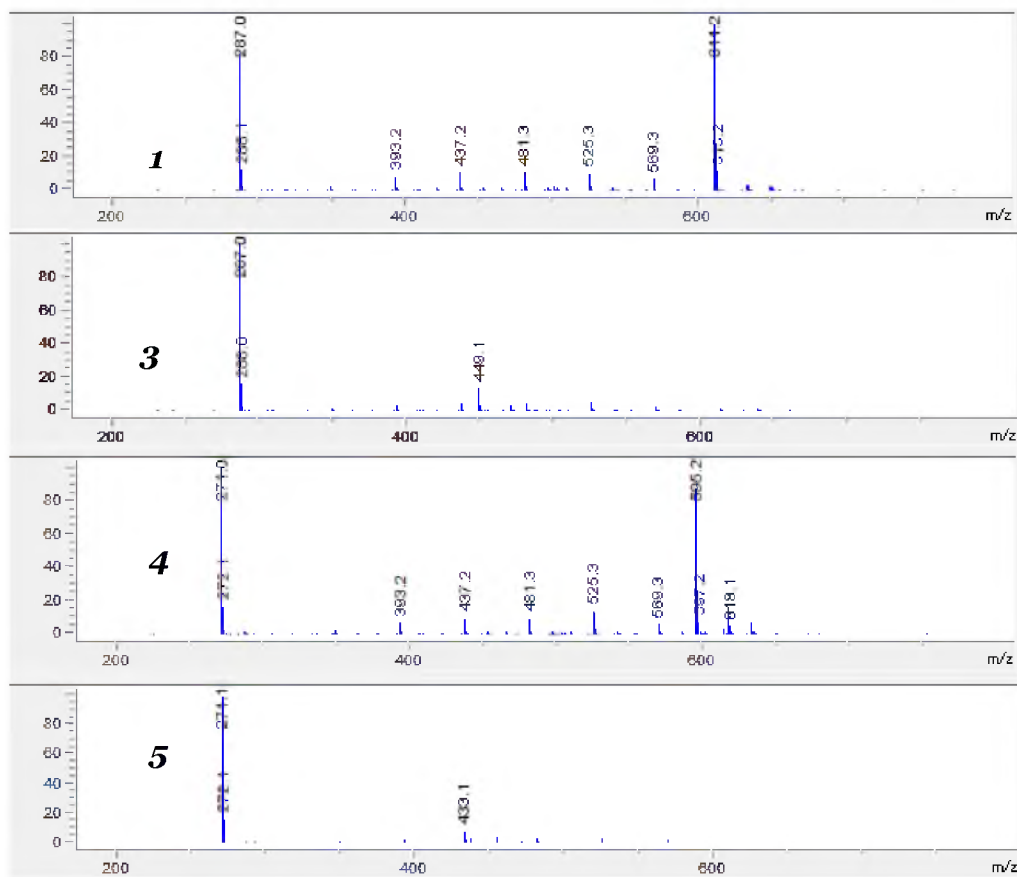


Рис. 4. Масс-спектры пиков 1,2,4 и 5 на хроматограмме на рис. 2

Действительно, m/Z 611.2 и 595.2 соответствуют гексозилгексозидам цианидина и пеларгонидина, соответственно, а значения 449.1 и 433.1 – Су-3-Gala и Pг-3-Gala [12]. Наконец, пик №2 имеет $m/Z=581.2$, что соответствует цианидин-3-дигликозиду, образованному пентозой и гексозой.

С использованием представленной выше идентификации пиков были проанализированы антоциановые комплексы образцов цветков, для которых было замечено большое расхождение в спектрах суммы антоцианов, рис.5 и табл.1. Все образцы разделились на 2 группы. В первой группе (для цветков *всех* исследованных растений *C. japonica*) в антоциановом комплексе преобладают производные цианидина, тогда как для растений второй группы (для *всех* растений *C. taulei*) очевидно преобладание антоцианов на основе пеларгонидина. Такое различие действительно может служить основанием отнесения *C. japonica* и *C. taulei* к различным видам хеномелеса.

Различие между соотношением количеств антоцианов, построенных на различных антоцианидинах определяется активностью флавоноид 3'- или 3',5'-гидроксилаз (F3'H или F3',5'H). При высокой активности F3'H основным антоцианом могут быть



или производные цианидина, или производные пеонидина (при высокой активности еще одного фермента – метилазы). Отсутствие в сумме антоцианов всех исследованных образцов производных дельфинидинового ряда свидетельствует о неактивности (или об отсутствии) F3',5'H. Относительная активность F3'H может быть оценена по простому соотношению, в котором число моль производных цианидина относят к числу моль суммы производных цианидина и пеларгонидина; в данной работе эту характеристику рассчитывали по площадям пиков, указанных на хроматограмме 5:

$$A(F3'H) = \frac{\sum S_i(Cy)}{\sum C_i(Cy + Pg)} 100 \tag{1}$$

где $\sum S_i(Cy)$ – сумма площадей пиков производных цианидина;
 $\sum S_i(Cy+Pg)$ – сумма площадей всех пиков.

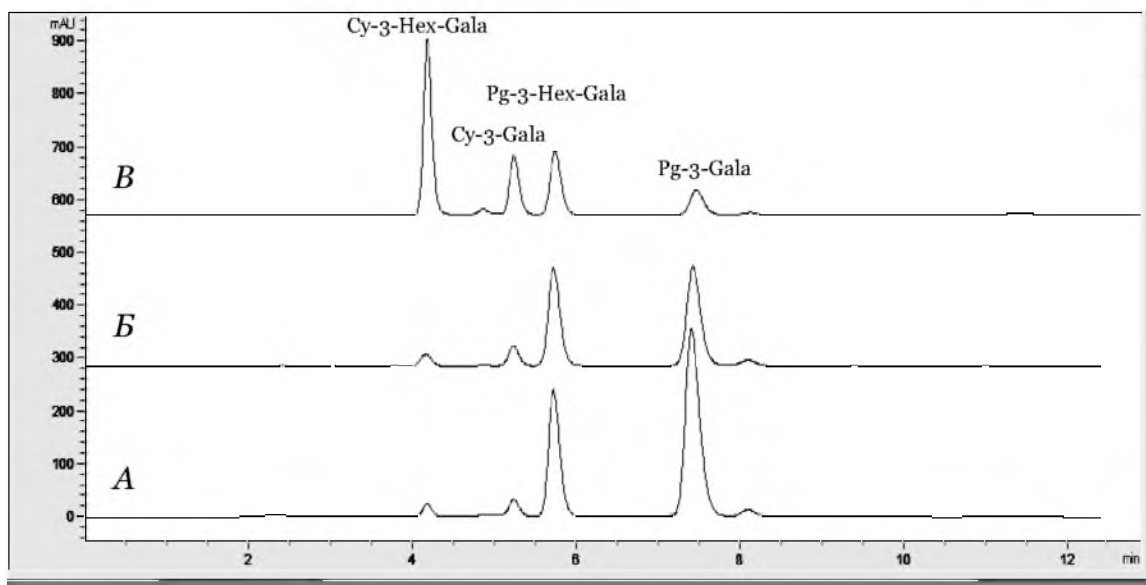


Рис. 5. Хроматограммы антоциановых экстрактов лепестков цветков *C. maulei* (А и В) и *C. japonica* (В)

Таблица 1

Сопоставление антоциановых комплексов лепестков цветков хеномелеса

Вид <i>Chaenomeles</i>	№	Гликозиды				Активность ферментов	
		Цианидина		пеларгонидина		$A(F3'H),\%$	%Hex
		3-Hex-Gala	3-Gala	3-Hex-Gala	3-Gala		
<i>C. japonica</i>	2-14	44.5	16.9	26.0	10.3	62.8	72.2
	2-01	25.6	52.9	4.5	13.9	81.0	31.1
	5-29	29.4	49.8	6.6	11.4	81.5	37.0
<i>C. maulei</i>	6-8	4.4	7.2	39.3	46.4	11.9	44.9
	6-5	2.7	5.2	31.5	58.4	8.1	34.9
	6-1	6.7	8.4	31.1	51.8	15.4	38.5

Второй показатель, включенный в таблицу, предполагает оценку активности фермента, определяющего гликозилирование галактозидного радикала в положении 3 обоих антоцианов. Этот показатель можно рассчитать по формуле:

$$A(hex) = \frac{S(Cy - 3 - HexGala) + S(Pg - 3 - HexGala)}{\sum C_i(Cy + Pg)} 100 \tag{2}$$



Эта активность не обязательно должна зависеть от строения кольца В антоциана, поэтому не удивительно, что она не выявляет различий между *C. japonica* и *C. maulei*.

Наконец суммарное содержание антоцианов по спектрофотометрическим данным в пересчете на цианидин-3-гликозид [14] составило для большинства исследованных образцов 120 ÷ 180 мг на 100 г исходного материала, а для одного из образцов *C. japonica* (5-29) даже превысило 400 мг. Таким образом, лепестки этого растения можно рассматривать в качестве ценного источника колорантов с сильными антиоксидантными свойствами.

Заключение

Таким образом, окраска цветков *Chaenomeles japonica* и *C. maulei* обусловлена накоплением 3- гликозидов цианидина и пеларгонидина, причем в качестве гликозидных фрагментов выступают радикалы галактозы и дигексозида. Различие в активности флавоноид 3'-гидроксилазы обуславливает накопление в основном цианидиновых производных в случае *C. japonica* и пеларгонидиновых – в случае *C. maulei*, что может служить обоснованием отнесения этих растений к различным видам хеномелеса.

Список литературы

1. Rumpunen K. *Chaenomeles*: Potential New Fruit Crop for Northern Europe / "Trends in new crops and new uses" J. Janick and A. Whipkey (eds.). ASHS Press, Alexandria, VA., 2002. - P. 385-392.
2. Garkava L.P., Rumpunen R., Bartish I.V. Genetic relationships in *Chaenomeles* (*Rosaceae*) revealed by isozyme analysis // *Scientia Horticulturae*. – 2000. – V.85. – P. 21±35
3. Соколова О.В. Род 12. Хеномелес — *Chaenomeles* Lindl. // Деревья и кустарники СССР. Дикорастущие, культивируемые и перспективные для интродукции / Ред. тома С. Я. Соколов. — М.—Л.: Изд. АН СССР, 1954. — Т. III. Покрытосеменные. Семейства Трохондроновые — Розоцветные. — С. 370—374.
4. Ho-Dzun H., Knüpfner H., K. Hammer K. Additional notes to the checklist of Korean cultivated plants // *Genet. Resources Crop Evol.* – 1997. – V.44. – P. 349–391.
5. Zhang L., Cheng Y.-X., Liu A.-L., Wang H.-D., Ya-Ling Wang Y.-L., Du G.-H. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-Influenza properties of components from *Chaenomeles speciosa* // *Molecules*. – 2010. – V.15. – P. 8507-8517.
6. Sancheti S., Sancheti S., Seo S.-Y. *Chaenomeles Sinensis*: A Potent α -and β -Glucosidase Inhibitor // *Amer. J. Pharmacol. Toxicol.* – 2009. – V.4. – P. 8-11.
7. Sawai R., Kuroda K., Shibata T, Gomyou R., Osawa K., Shimizu K. Anti-influenza virus activity of *Chaenomeles sinensis* // *J. Ethnopharmacol.* – 2008. - V.118. – P. 108-112.
8. Timberlake C.F., Bridle P. Anthocyanins in petals of *Chaenomeles speciosa* // *Phytochem.* – 1971. – V.10. – P. 2265-2267.
9. Дейнека В.И., Григорьев А.М., Дейнека Л.А., Ермаков А.М., Сиротин А.А., Староверов В.М. Анализ компонентного состава антоцианов плодов и жирных кислот масел семян некоторых видов семейства Rosaceae методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Растительные ресурсы*. - 2005. - Вып.1. - С. 91 -98.
10. Zhang J., Wang L.-s., Gao J.-m., Li S.-b., Xu Y.-j., Li C.-h. Yang R.-z. Identification of Anthocyanins Involving in Petal Coloration in *Chaenomeles speciosa* cultivars // *Acta Horticult. Sinica*. – 2011. – V.38. – P. 527-535.
11. Дейнека Л.А., Шапошник Е.И., Гостищев Д.А., Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н., Селеменов В.Ф. ВЭЖХ в контроле антоцианового состава плодов черной смородины // *Сорбц. хром. процесс*. – 2009. – Т.9, Вып.4. – С. 529-536
12. Giusti M.M., Rodriguez-Saona L.E., Griffin D., Wrolstad R.E. Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanins characterization // *J. Agric. Food Chem.* – 1999. – V.47. – P.4657-4664.
13. Kobayashi H., Suzuki S., Tanzawa F., Takayanagi T. Low Expression of Flavonoid 3',5'-Hydroxylase (F3',5'H) Associated with Cyanidin-based Anthocyanins in Grape Leaf // *Am. J. Enol. Vitic.* – 2009. – V.60. – P. 362-367.
14. Giusti M.M., Wrolstad R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy / *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001. Ed. John Wiley & Sons, Inc. - F1.2.1-F1.2.13.

**ANTHOCYANINS OF PETALS OF *CHAENOMELES JAPONICA* AND *C. MAULEI* FLOWERS****A.N. Chulkov****V.I. Deineka****I.A. Navalneva****LA. Deineka****V.N. Sorokopudov**

*Belgorod National
Research University,
308015 RF Belgorod Pobeda str. 85*

*e-mail: Ach87@mail.ru
deineka@bsu.edu.ru
irina.navalneva@mail.ru
Deyneka@bsu.edu.ru
sorokopudov@bsu.edu.ru*

Spectrophotometry and HPLC-MS were explored for the determination of main anthocyanins of *Chaenomeles japonica* and *C. maulei* petals. It has been established that all samples under investigations were composed of 3-galactosides as well as 3-hexosilgalactosides of cyanidine and pelargonidine. The main anthocyanin composition differences were due to relative activity of flavonoid-3'-hydroxylase being the base for differentiation of the *Chaenomeles* species.

Key words: *Chaenomeles japonica*, *C. maulei*, flowers petals, anthocyanins, HPLC-MS.