

УДК 543.645:543.544

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТОЦИАНОВ ПЛОДОВ НЕКОТОРЫХ РАСТЕНИЙ РОДА RIBES МЕТОДАМИ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ И ГИДРОФИЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© В.И. Дейнека^{1*}, Е.Ю. Олейниц¹, А.А. Павлов¹, А.Ю. Михеев², О.В. Шелепова³, О.Д. Волкова³,
Е.И. Хлебникова¹

¹ Белгородский государственный национальный исследовательский университет, ул. Победы, 85, Белгород, 308015 (Россия),
e-mail: deineka@bsu.edu.ru

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, ул. Институтская, 3, Пущино, 142290 (Россия)

³ Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, ул. Ботаническая, 4, Москва, 127276 (Россия)

Исследован антоциановый состав некоторых видов крыжовника с окрашенными плодами в сопоставлении с антоцианами плодов смородины из коллекции Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина. В плодах смородины *Ribes nigrum* var. *sibiricum* E.Wolf, *Ribes nigrum* L., *Ribes americanum* Mill., как и в темноокрашенных плодах *Ribes aureum* Pursh., обнаружены 3-глюкозиды и 3-рутинозиды цианидина и дельфинидина в качестве основных компонентов в зависимости от видов соотношения. Установлено, что в плодах крыжовника видов *Ribes oxycanthoides* L., *Ribes missouriensis* (Nutt.) Coville & Britton, *Ribes rusticum* Jancz. и *Ribes cynosbati* (L.) Mill. и в плодах одной из смородины (*Ribes alpinum* L.) практически отсутствует биосинтез производных дельфинидина, а также детектируются 3-глюкозид и 3-рутинозид цианидина. При этом биосинтез ацилированных замещенными коричневыми кислотами (главным образом – *para*-кумаровой) антоцианов найден в плодах *Ribes oxycanthoides* и *Ribes cynosbati* (около 10%), *Ribes rusticum* (около 20%). Наследование характерного для плодов некоторых видов крыжовника признака – биосинтеза ацилированных в основном *para*-кумаровой кислотой, – установлено в плодах йошты – *Ribes x nidigrolaria* Rud. Bauer & A. Bauer (около 10%). Видовой состав антоцианов устанавливали с использованием традиционной обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиентном режиме элюирования с применением диодно-матричного и масс-спектрометрического вариантов детектирования. Кроме того, разработан способ разделения антоцианов этих же объектов в изократическом режиме в условиях гидрофильной хроматографии на диольных стационарных фазах, позволяющий использовать более простое оборудование. Предложены варианты пробоподготовки образцов экстрактов для последующего ВЭЖХ определения антоцианов двумя различными методами, позволяющими избежать появления артефактов.

Ключевые слова: антоцианы, плоды растений рода *Ribes*, ацилированные антоцианы, обращенно-фазовая ВЭЖХ, гидрофильная ВЭЖХ.

Введение

Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ) является обычным методом определения веществ с различной степенью липофильности, включая положительно заряженные формы антоцианов, существующие в сильноокислых подвижных фазах [1]. Антоцианы относятся к подклассу флавоноидов; они синтезируются в различных тканях растений. Антоцианы – это гликозиды антоцианидинов (агликонов) с различным числом и положением

Дейнека Виктор Иванович – доктор химических наук, профессор, профессор кафедры общей химии,
e-mail: deineka@bsu.edu.ru

Олейниц Елена Юрьевна – аспирант,
e-mail: 812887@bsu.edu.ru

Павлов Александр Алексеевич – магистрант,
e-mail: 1042597@bsu.edu.ru

с различным числом и положением присоединения углеводов, которые могут быть ацилированными некоторым алифатическими или ароматическими кислотами. Ацилирование замещенными коричневыми кислотами приводит к существенному росту липофильности, поэтому для од-

новременного определения ацилированных и неацилированных антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ необходимо использование градиентного элюирования. Относительно недавно было показано, что альтернативой ОФ ВЭЖХ может служить гидрофильная хроматография, но публикации по этому методу разделения и определения антоцианов ограничены несколькими статьями [2–4], в которых определены некоторые основные различия в хроматографическом поведении антоцианов в сравнении с ОФ ВЭЖХ.

Род *Ribes*, который включает и смородины, и крыжовники, содержит более 150 видов растений [5]. Плоды растений данного рода имеют большое значение в России и Европе. Но при этом используется преимущественно черная смородина, из которой получают сок, изготавливают джемы, желе, ликеры [5]. В Европе за 20 лет (с 1987 до 2017 гг.) объем производства смородины вырос с 550 до 1017 т [5]. Среди плодов различных видов рода *Ribes* плоды черной смородины выделяются высоким уровнем накопления антоцианов (благодаря чему они окрашены в черный цвет) и витамина С, которые обеспечивают плодам высокую биологическую активность [6]. Антоцианы плодов черной смородины были объектами исследований большого числа работ [6–13], и они вне зависимости от условий выращивания и сорта характеризуются довольно постоянным качественным составом при некоторой вариации соотношения между основными компонентами. В кожуре плодов синтезируются главным образом четыре антоциана: 3-глюкозиды (3G) и 3-рутинозиды (3R) двух агликонов – дельфинидина (Dp) и цианидина (Cy). По этой причине экстракт из свежемороженых плодов черной смородины, доступных на рынке РФ в течение круглого года, был предложен в работе [12] в качестве дешевого стандартного образца из набора четырех антоцианов. Отметим, что порядок элюирования (по временам удерживания, t_R) этих антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ почти не зависит от состава подвижных фаз и от марок стационарных (C18) фаз:

$$t_R(\text{Dp}3\text{G}) < t_R(\text{Dp}3\text{R}) < t_R(\text{Cy}3\text{G}) < t_R(\text{Cy}3\text{R}) \quad (1)$$

В дополнение к четырем основным антоцианам в некоторых экстрактах обнаружены аналогичные производные пеларгонидина, петунидина, пеонидина и мальвидина и даже 3-О-(6"-*para*-кумароилглюкозиды) дельфинидина и цианидина (Dp3CG и Cy3CG), хотя и в значительно меньшей концентрации [7, 8, 14].

В то же время по исследованию антоцианового состава плодов крыжовников нами найдено небольшое число публикаций [14, 15]. В одной из этих публикаций найдено заметное накопление Cy3CG вместе с обычными для данного рода Cy3G и Cy3R. Ацилирование *para*-кумаровой кислотой приводит к значительному росту удерживания антоцианов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. Поэтому для детектирования гликозидов антоцианидинов, неацилированных коричневыми кислотами, одновременно с неацилированными производными в мировой литературе используют градиентный режим хроматографирования и, соответственно, более дорогостоящее оборудование. При учете большей стабильности ацилированных антоцианов при хранении [16] информация об их накоплении в растительных источниках приобретает особое значение, в том числе и при селекционном отборе.

Цель настоящей работы – исследование антоцианового состава ряда видов крыжовника с окрашенными антоцианами плодами в сопоставлении с антоцианами некоторых других видов рода *Ribes* из коллекции Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина и разработка способов градиентного элюирования в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ и изократического элюирования в условиях гидрофильной хроматографии.

Экспериментальная часть

Плоды были собраны в Главном ботаническом саду им. Н.В. Цицина РАН (Москва) в сезоне 2018 г. и перед транспортировкой в Белгород были заморожены. Перед исследованием с размороженных плодов снимали кожуру (только в кожуре этих растений синтезируются антоцианы) и 0.2–0.8 г кожуры и наставили материал в 50 мл 0.1 М водного раствора соляной кислоты, оставляя смесь на ночь. Экстракцию повторяли до обес-

цветивания фракций элюата, все порции экстрактов отделяли от растительного материала фильтрованием через бумажный фильтр под вакуумом.

Определение суммарной концентрации антоцианов выполняли упрощенным спектрофотометрическим методом (только при pH = 1), поскольку при наличии антоцианов, ацилированных

Михеев Андрей Юрьевич – научный сотрудник,
e-mail: 2miheev@gmail.com

Шелепова Ольга Владимировна – старший научный сотрудник, e-mail: shelepova-olga@mail.ru

Волкова Ольга Дмитриевна – младший научный сотрудник, e-mail: olgavolkova9@gmail.com

Хлебникова Елена Ивановна – доцент,
e-mail: khlebnikova@bsu.edu.ru

замещенными коричневыми кислотами, дифференциальный спектрофотометрический метод [17], по нашим данным, не применим.

Антоцианы разделяли хроматографическими методами, используя хроматограф Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами. Хроматографические колонки: 150 × 4.6 мм Symmetry C18, 3.5 мкм – при спектрофотометрическом детектировании, 150 × 2.1 мм Kromasil-100 5C18 – при масс-спектрометрическом детектировании. Для градиентного элюирования использовали подвижную фазу А (10 об.% муравьиной кислоты и 6 об.% ацетонитрила в воде) и подвижную фазу Б (10 об.% муравьиной кислоты и 20 об.% ацетонитрила в дистиллированной воде). Режим градиента: 0 мин – 0% Б; 20 мин 100% Б; 30 мин 100% Б; 31 мин – 0% Б и 40 мин – 0% Б; скорость подачи элюента 0.8 мл/мин при спектрофотометрическом детектировании и 0.25 мл/мин при записи масс-спектров; объем пробы образцов 10 и 4 мкл соответственно. Разделение антоцианов в условиях гидрофильной хроматографии осуществляли на колонке 150 × 2.1 мм Kromasil-DIOL, 5 мкм, используя для создания подвижной фазы ацетонитрил (85 об.%) и дистиллированную (ГОСТ 6709-75) воду (15 об.%), содержащую 3.3 об.% ортофосфорной кислоты. Все разделения осуществляли при 40 °С. Масс-спектры антоцианов записывали в режиме электрораспыления при сканировании положительных ионов и напряжении на фрагменторе 175 В. Для записи, хранения и обработки хроматограмм использовали ПО Agilent ChemStation.

Приготовление образцов для хроматографирования в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. Первичный экстракт антоцианов из растительного материала (экстрагент 0.1 М водный раствор HCl) отделяют от нерастворимого остатка фильтрованием через бумажный фильтр. Раствор пропускают через подготовленный картридж (патрон ДИАПАК C18, БиоХимМак СТ, Москва) до проскока окрашенных фракций. Подготовка патрона включает активирование ацетоном (3–5 мл) и кондиционирование 0.1 М водным раствором HCl (10–15 мл). Патрон промывают экстрагентом (0.5 мл) и антоцианы экстрагируют раствором, содержащим 40 об.% ацетонитрила и 10 об.% муравьиной кислоты в воде. Перед хранением и хроматографированием раствор разбавляют в 4 раза раствором 10 об.% муравьиной кислоты в воде.

Приготовление образцов для хроматографирования в условиях гидрофильной хроматографии. Антоцианы из первичного экстракта сорбируют на патроне ДИАПАК C18 (см. Выше). Экстракцию антоцианов с патрона осуществляют раствором, содержащим 75 об.% ацетонитрила, 0.5 об.% ортофосфорной кислоты и 24.5 об.% воды. Перед хранением и хроматографированием экстракт разбавляют 1 : 1 раствором 0.5 об.% ортофосфорной кислоты в ацетонитриле.

Идентификация антоцианов. Для идентификации антоцианов применяли: а) сложную комбинацию хроматографических методов (по сопоставлению удерживания веществ с компонентами известного строения из коллекции лаборатории не менее, чем в двух составах подвижных фаз), б) параметры электронных спектров поглощения, записанных в кювете детектора и в) параметры масс-спектров компонентов.

Обсуждение результатов

Разделение антоцианов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. Для полной записи хроматограммы всех возможных антоцианов плодов рода *Ribes* (табл. 1) в разработанных в настоящей работе условиях градиентной обращенно-фазовой ВЭЖХ требуется немногим более 30 мин (рис. 1–3). При этом 25 мин необходимо для элюирования всех возможных пиков и около 10 мин на уравнивание колонки в стартовом составе подвижной фазы. При таком варианте градиентного режима удается достичь хорошей воспроизводимости времен удерживания – расхождение в удерживании всех антоцианов не выше 1–2 с.

Как следует из представленных на рисунке данных, антоциановый состав плодов двух видов черной смородины соответствует известным литературным данным [12]. В плодах двух других видов *R. americanum* и *R. aureum* антоциановый состав принципиально тот же, но с измененным соотношением вследствие ослабления активности рамнозил-трансферазы и флавоноид-3',5'-гидроксилазы. Полная дезактивация флавоноид-3',5'-гидроксилазы приводит к ограничению набора антоцианов двумя производными цианидина в случае смородины альпийской (табл. 2). Но в плодах йошты, *Ribes × nidigrolaria*, – сложного гибрида нескольких видов рода *Ribes* (гибрида черной смородины, крыжовника растопыренного и крыжовника обыкновенного: *Ribes nigrum × Ribes divaricatum × Ribes uva-crispa*) обнаруживаются новые компоненты, главный из которых – позднее всех элюирующийся цианидин-3-(*nara*-кумароилглюкозид). В качестве небольших примесей на хроматограмме также обнаруживаются: его изомер (по всей вероятности, *цис*-изомер), цианидин-3-(кофеоилглюкозид) и дельфинидин-3-(*nara*-кумароилглюкозид), а также 3-глюкозид и 3-рутинозид пеонидина (рис. 2). Очевидно, что появление ацилированных антоцианов связано с наследованием свойств крыжовников.

Исследование антоцианового состава плодов некоторых видов крыжовников с окраской, обусловленной биосинтезом антоцианов, показало значительный разброс не только в количественном, но и в качественном составе (рис. 3, табл. 2). При этом ацилированные антоцианы обнаружены далеко не во всех видах крыжовника (табл. 2), что следует учитывать при селекции.

К достоинству данной хроматографической системы следует отнести и ее пригодность для регистрации масс-спектров антоцианов. Единственное ограничение метода – необходимость использования более дорогого градиентного насоса.

Таблица 1. Виды антоцианов в плодах растений рода *Ribes*

¹ №	Тип антоциана и его обозначение	² t _{tr} , мин	miLogP	λ _{max} , нм	m/Z, [M ⁺] (³ [A ⁺])
1	Дельфинидин-3-глюкозид (Dp3G)	4.20	-3.08	523	465 (303)
2	Дельфинидин-3-рутинозид (Dp3R)	4.86	-3.78	524	611 (303)
3	Цианидин-3-глюкозид (Cy3G)	6.64	-2.79	516	449 (287)
4	Цианидин-3-рутинозид (Cy3R)	8.00	-3.49	518	595 (287)
5	Пеонидин-3-глюкозид (Pn3G)	11.75	-2.49	517	n.d.
6	Пеонидин-3-рутинозид (Pn3R)	12.76	-3.18	518	609 (301)
7	Цианидин-3-(кофеоилглюкозид) (Cy3CfG)	18.49	-0.92	521, 328	611 (287)
8	Дельфинидин-3-(кумароилглюкозид) (Dp3CG)	19.71	-0.72	529, 316 sh.	611 (303)
9	Цианидин-3-(кумароил*глюкозид) (Cy3C*G)	20.42	-0.43	523, 315 sh.	595
10	Цианидин-3-(кумароилглюкозид) (Cy3CG)	22.18	-0.43	521, 315 sh.	595 (287)

Примечание. ¹ – номера см. на рисунке 2; ² – времена удерживания антоцианов в условиях обращенно-фазовой хроматографии при элюировании в градиентном режиме; ³ – параметр агликона, образующегося при фрагментации исходного антоциана, * – предположительно – *цис*-кумароил производное.

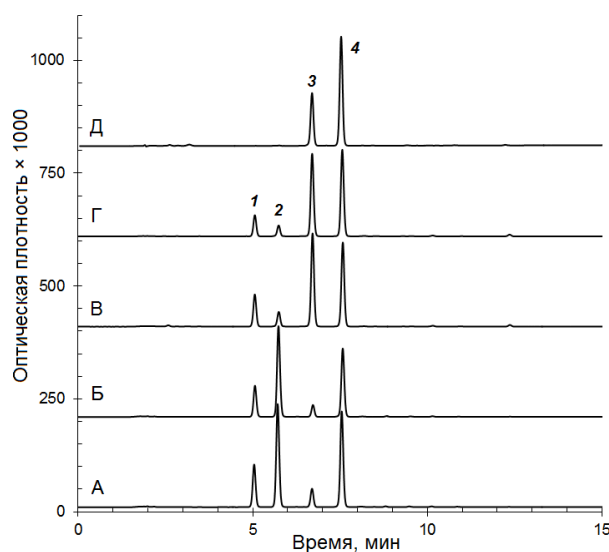


Рис. 1. Разделение основных антоцианов плодов некоторых видов смородины. Виды смородины: А – *R. nigrum* L.; Б – *R. nigrum* var. *sibiricum* E. Wolf; В – *R. americanum* Mill.; Г – *R. aureum* Pursh; Д – *R. alpinum* L. Антоцианы: 1 – Dp3G; 2 – Dp3R; 3 – Cy3G; 4 – Cy3R. Хроматографические условия: колонка 150×4.6 мм Symmetry C18 (3.5 мкм), 40 °С; градиентный режим элюирования, 0.8 мл/мин. Детектирование при 515 нм

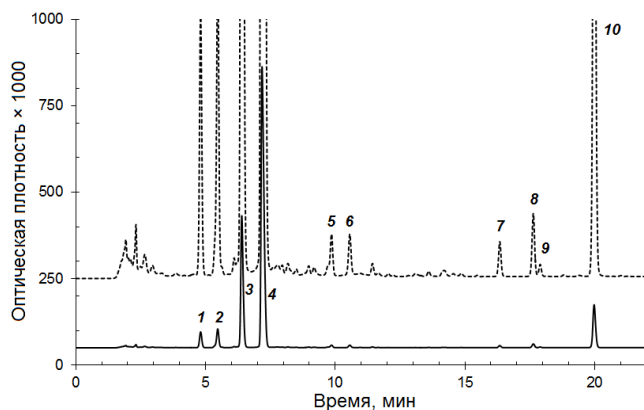


Рис. 2. Разделение основных антоцианов плодов иошты (*Ribes x nidigrolaria* Rud. Bauer & A. Bauer). Пунктирная линия – увеличение в 10 раз. Перечень видов антоцианов в таблице 1. Хроматографические условия: колонка 150×4.6 мм Symmetry C18 (3.5 мкм), 40 °С; градиентный режим элюирования, 0.8 мл/мин. Детектирование при 515 нм

Рис. 3. Разделение основных антоцианов плодов некоторых видов крыжовника в условиях ОФ ВЭЖХ. Виды крыжовника: А – *R. cynosbati* (L.) Mill.; Б – *R. missouriensis* (Nutt.) Coville & Britton; В – *R. nivea* (Lindl.) Spach.; Г – *R. succirubra* (Zbl.) Los. Перечень видов антоцианов в таблице 1. Хроматографические условия: колонка 150×4.6 мм Symmetry C18 (3.5 мкм), 40 °С; градиентный режим элюирования, 0.8 мл/мин. Детектирование при 515 нм

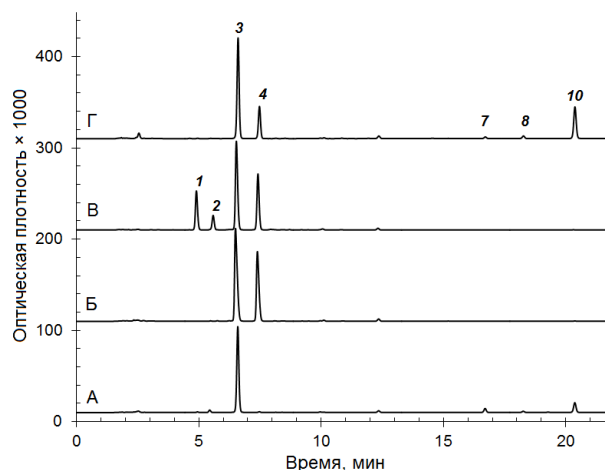


Таблица 2. Видовой состав набора антоциан экстрактов плодов растений рода *Ribes*

№	Вид растения рода <i>Ribes</i>	Доля вида антоцианов, моль % (по площадям пиков), ± 1 ÷ 2 отн. %					
		Dp3G*	Dp3R	Cy3G	Cy3R	Cy3CG	Ост.**
1	<i>R. nigrum</i> var. <i>sibiricum</i> E.Wolf	14.8	44.3	5.6	33.6	<0.1	1.7
2	<i>R. nigrum</i> L.	16.0	39.3	6.8	36.6	<0.1	1.3
3	<i>R. americanum</i> Mill.	14.1	6.8	40.6	37.2	<0.1	4.3
4	<i>R. aureum</i> Pursh.	8.5	4.6	42.4	44.3	<0.1	0.2
5	<i>R. alpinum</i> L.	<0.1	<0.1	32.5	67.3	<0.1	0.2
6	<i>Ribes</i> x <i>nidigrolaria</i> Rud. Bauer & A. Bauer	1.8	2.9	22.0	61.4	10.1	1.8
7	<i>R. oxyacanthoides</i> L.	<0.1	<0.1	44.9	41.4	11.8	1.9
8	<i>R. nivea</i> (Lindl.) Spach.	19.0	7.2	46.2	27.5	<0.1	0.1
9	<i>R. missouriensis</i> (Nutt.) Coville & Britton	<0.1	<0.1	62.5	37.0	<0.1	0.5
10	<i>R. succirubra</i> (Zbl.) Los.	13.4	8.7	36.7	41.0	<0.1	0.2
11	<i>R. rusticum</i> Jancz.	<0.1	<0.1	65.7	12.6	20.7	0.9
12	<i>R. cynosbati</i> (L.) Mill.	<0.1	<0.1	85.7	<0.1	11.1	3.2

Примечание. * – обозначения видов антоцианов как в таблице 1, ** – остальные виды антоцианов.

Разделение антоцианов в гидрофильной хроматографии. В гидрофильной хроматографии антоцианов удерживание зависит от гидрофильности веществ, причем наиболее вероятный механизм удерживания в этом случае – распределительный между подвижной фазой и водным поверхностным слоем, генерированным *in situ* [3]. В работах [3, 4] установлено, что удерживание антоцианов увеличивается при росте числа гидроксильных групп и углеводных заместителей. Поэтому для основных антоцианов плодов растений рода *Ribes* порядок элюирования (1), существенно преобразуется:

$$t_R(\text{Cy3G}) < t_R(\text{Dp3G}) < t_R(\text{Cy3R}) < t_R(\text{Dp3R}) \quad (2)$$

При этом могут быть обнаружены и ацилированные антоцианы. Так, Cy3CG из-за более высокой липофильности должен элюироваться до неацилированных производных. Действительно, в этом варианте хроматографии удается разделить ацилированные и неацилированные производные цианидина и дельфинидина в изократическом режиме (рис. 4). У метода имеется ряд преимуществ по сравнению с ОФ ВЭЖХ для решения той же задачи: а) может быть использовано более простое оборудование, включая микроколоночные хроматографы с низким допустимым входным давлением и с детектором в видимой области электромагнитного спектра благодаря относительно небольшой вязкости используемой подвижной фазы; б) нет необходимости на затраты времени на перекондиционирование колонки.

При использовании микроколоночной хроматографии может быть решена проблема снижения расхода дорогостоящего ацетонитрила.

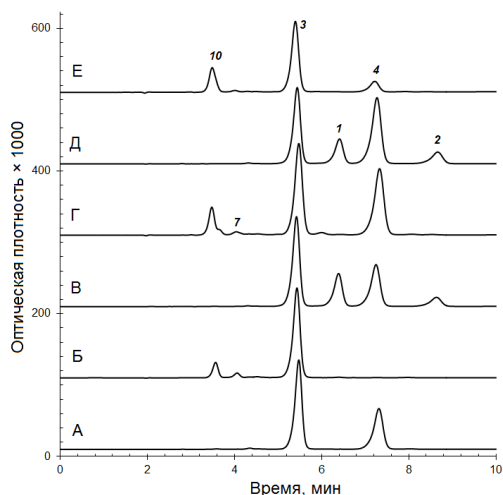


Рис. 4. Разделение основных антоцианов плодов некоторых видов крыжовника в условиях гидрофильной хроматографии. Виды крыжовника: А – *R. missouriensis* (Nutt.) Coville & Britton; Б – *R. cynosbati* (L.) Mill.; В – *R. nivea* (Lindl.) Spach.; Г – *R. oxycanthoides* L.; Д – *R. succirubra* (Zbl.) Los; Е – *R. rusticum* Jancz. Перечень видов антоцианов в таблице 1. Хроматографические условия: колонка 150×2.1 мм Kromasil DIOL (3.5 мкм), 40 °С; 0.8 мл/мин. Детектирование при 515 нм

Выводы

В работе показано, что антоциановый состав плодов растений рода *Ribes* в общем случае необходимо анализировать методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с градиентным элюированием из-за высоколипофильных ацилированных замещенными коричневыми кислотами антоцианов. Но возможно определение всех компонентов экстрактов методом гидрофильной хроматографии на диольной стационарной фазе в изократическом режиме элюирования.

Разработанные методы применены для определения видового состава антоцианов плодов шести видов крыжовника, и определены виды, в которых наблюдается биосинтез ацилированных антоцианов.

Список литературы

1. Basílio N., Pina F. Chemistry and Photochemistry of Anthocyanins and Related Compounds: A Thermodynamic and Kinetic Approach // *Molecules*. 2016. Vol. 21. 1502. DOI: 10.3390/molecules21111502.
2. Willemse C.M., Stander M.A., de Villiers A. Hydrophilic interaction chromatographic analysis of anthocyanins // *J. Chromatogr. A*. 2013. Vol. 1319. Pp. 127–140. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.10.045.
3. Deineka V.I., Saenko I.I., Deineka L.A., Blinova I.P. Hydrophilic interaction chromatography as an alternative to reversed-phase HPLC in determining anthocyanins and betacyanins // *J. Analyt. Chem.* 2016. Vol. 71. Pp. 297–301. DOI: 10.1134/S1061934816030035.
4. Deineka V.I., Makarevich S.L., Deineka L.A. Hydrophilic Interaction Chromatography on Silica: Group Analysis of Grape Anthocyanins // *J. Anal. Chem.* 2018. Vol. 73. Pp. 190–194. DOI: 10.1134/S106193481802003X.
5. Hummer K.E., Dale A. Horticulture of *Ribes* // *For. Path.* 2010. Vol. 40. Pp. 251–263. DOI: 10.1111/j.1439-0329.2010.00657.x.
6. Moyer R.A., Hummer K.E., Finn C.E., Frei B., Wrolstad R.E. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes* // *J. Agric. Food Chem.* 2002. Vol. 50. Pp. 519–525. DOI: 10.1021/jf011062r.
7. Slimestad R., Solheim H. Anthocyanins from Black Currants (*Ribes nigrum* L.) // *J. Agric. Food Chem.* 2002. Vol. 50. Pp. 3228–3231. DOI: 10.1021/jf011581u.
8. Kapasakalidis P.G., Rastall R.A., Gordon M.H. Extraction of Polyphenols from Processed Black Currant (*Ribes nigrum* L.) Residues // *J. Agric. Food Chem.* 2006. Vol. 54. Pp. 4016–4021. DOI: 10.1021/jf0529991.
9. Bordonba J.G., Terry L.A. Biochemical Profiling and Chemometric Analysis of Seventeen UK-Grown Black Currant Cultivars // *J. Agric. Food Chem.* 2008. Vol. 56. Pp. 7422–7430. DOI: 10.1021/jf8009377.
10. Nielsen I.L.F., Haren G.R., Magnussen E.L., Dragsted L.O., Rasmussen S.E. Quantification of Anthocyanins in Commercial Black Currant Juices by Simple High-Performance Liquid Chromatography. Investigation of Their pH Stability and Antioxidative Potency // *J. Agric. Food Chem.* 2003. Vol. 51. Pp. 5861–5866. DOI: 10.1021/jf034004+.
11. Vagiri M., Ekholm A., Andersson S.C., Johansson E., Rumpunen K. An Optimized Method for Analysis of Phenolic Compounds in Buds, Leaves, and Fruits of Black Currant (*Ribes nigrum* L.) // *J. Agric. Food Chem.* 2012. Vol. 60. Pp. 10501–10510. DOI: 10.1021/jf303398z.
12. Дейнека Л.А., Шапошник Е.И., Гостищев Д.А., Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н., Селеменев В.Ф. ВЭЖХ в контроле антоцианового состава плодов черной смородины // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2009. Т. 9, вып. 4. С. 529–536.

13. Петрова С.Н., Кузнецова А.А. Состав плодов и листьев смородины черной *Ribes nigrum* (Обзор) // Химия растительного сырья. 2014. №4. С. 43–50.
14. Wu X., Gu L., Prior R.L., McKay S. Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and Their Antioxidant Capacity // J. Agric. Food Chem. 2004. Vol. 52. Pp. 7846–7856. DOI: 10.1021/jf0486850
15. Jorheim M., Måge F., Andersen Ø.M. Anthocyanins in Berries of *Ribes* Including Gooseberry Cultivars with a High Content of Acylated Pigments // J. Agric. Food Chem. 2007. Vol. 55. Pp. 5529–5535. DOI: 10.1021/jf0709000.
16. Wąkowska-Barczak A. Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants – a review // Pol. J. Food Nutr. Sci. 2005. Vol. 14/55. Pp. 107–116. DOI: 10.1111/j.1745-4514.1987.tb00123.x.

Поступила в редакцию 21 августа 2019 г.

После переработки 8 сентября 2019 г.

Принята к публикации 27 сентября 2019 г.

Для цитирования: Дейнека В.И., Олейниц Е.Ю., Павлов А.А., Михеев А.Ю., Шелепова О.В., Волкова О.Д., Хлебникова Е.И. Определение антоцианов плодов некоторых растений рода *Ribes* методами обращенно-фазовой ВЭЖХ и гидрофильной хроматографии // Химия растительного сырья. 2020. №1. С. 81–88. DOI: 10.14258/jcrpm.2020016331.

Deineka V.I.^{1*}, Oleinits E.Yu.¹, Pavlov A.A.¹, Mikheev A.Yu.², Shelepova O.V.³, Volkova O.D.³, Khlebnikova E.I.¹ DETERMINATION OF ANTHOCYANINS OF FRUITS OF SOME PLANTS OF THE GENUS *RIBES* BY REVERSED-PHASE HPLC AND HYDROPHILIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY (HILIC)

¹ Belgorod State National Research University, ul. Pobedy, 85, Belgorod, 308015 (Russia), e-mail: deineka@bsu.edu.ru

² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, ul. Institutskaya, 3, Pushchino, 142290 (Russia)

³ Tsitsin Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences, ul. Botanicheskaya, 4, Moscow, 127276 (Russia)

The anthocyanin composition of some species of gooseberries with colored fruits was studied in comparison with anthocyanins of currant fruits from the collection of the Tsitsin Main Botanical garden. In fruits of currants *Ribes nigrum* var. *sibiricum* E. Wolf, *R. nigrum* L., *R. americanum* Mill., as well as in dark-colored fruits *R. aureum* Pursh., 3-glucosides and 3-rutinosides of cyanidin and delphinidin were found as major components in species-dependent ratios. It was found that in the fruits of gooseberry species *Ribes oxycanthoides* L., *Ribes missouriensis* (Nutt.) Coville & Britton, *Ribes rusticum* Jancz. and *Ribes cynosbati* (L.) Mill. and in the fruits of one of the currants (*R. alpinum* L.) there is practically no biosynthesis of delphinidin derivatives, and 3-glucoside and 3-rutinoside of cyanidin are detected. Meanwhile, the biosynthesis of acylated by substituted cinnamic acids (mainly – *p*-coumaric acid) anthocyanins were found in the fruits of *Ribes oxycanthoides* and *Ribes cynosbati* (about 10%), *Ribes rusticum* (about 20%). The inheritance of characteristic for the fruit of some species of gooseberry biosynthesis of acylated mainly *p*-coumaric acid, was installed in the fruits of jostaberry - *Ribes x nidigrolaria* Rud. Bauer & A. Bauer (about 10%). The species composition of anthocyanins was established using traditional reversed-phase HPLC in gradient elution mode using diode-array and mass spectrometric detection options. In addition, a method for the separation of anthocyanins of the same objects in the isocratic mode under hydrophilic interaction chromatography on diol stationary phases, allowing the use of simpler equipment. The variants of sample preparation of extract samples for the subsequent HPLC determination of anthocyanins by two different methods to avoid the appearance of artifacts are proposed.

Keywords: anthocyanins, fruits of plants of the genus *Ribes*, acylated anthocyanins, reversed-phase HPLC, HILIC.

* Corresponding author.

References

1. Basílio N., Pina F. *Molecules*, 2016, vol. 21, 1502. DOI: 10.3390/molecules21111502.
2. Willemse C.M., Stander M.A., de Villiers A. *J. Chromatogr. A.*, 2013, vol. 1319, pp. 127–140. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.10.045.
3. Deineka V.I., Saenko I.I., Deineka L.A., Blinova I.P. *J. Analyt. Chem.*, 2016, vol. 71, pp. 297–301. DOI: 10.1134/S1061934816030035.
4. Deineka V.I., Makarevich S.L., Deineka L.A. *J. Anal. Chem.*, 2018, vol. 73, pp. 190–194. DOI: 10.1134/S106193481802003X.
5. Hummer K.E., Dale A. *For. Path.*, 2010, vol. 40, pp. 251–263. DOI: 10.1111/j.1439-0329.2010.00657.x.
6. Moyer R.A., Hummer K.E., Finn C.E., Frei B., Wrolstad R.E. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, vol. 50, pp. 519–525. DOI: 10.1021/jf011062r.
7. Slimestad R., Solheim H. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, vol. 50, pp. 3228–3231. DOI: 10.1021/jf011581u.
8. Kapasakalidis P.G., Rastall R.A., Gordon M.H. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, vol. 54, pp. 4016–4021. DOI: 10.1021/jf052999l.
9. Bordonba J.G., Terry L.A. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, vol. 56, pp. 7422–7430. DOI: 10.1021/jf8009377.
10. Nielsen I.L.F., Haren G.R., Magnussen E.L., Dragsted L.O., Rasmussen S.E. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, vol. 51, pp. 5861–5866. DOI: 10.1021/jf034004+.
11. Vagiri M., Ekholm A., Andersson S.C., Johansson E., Rumpunen K. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, vol. 60, pp. 10501–10510. DOI: 10.1021/jf303398z.
12. Deyneka L.A., Shaposhnik Ye.I., Gostishchev D.A., Deyneka V.I., Sorokopudov V.N., Selemenev V.F. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*, 2009, vol. 9, no. 4, pp. 529–536. (in Russ.).
13. Petrova S.N., Kuznetsova A.A. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2014, no. 4, pp. 43–50. (in Russ.).
14. Wu X., Gu L., Prior R.L., McKay S. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, vol. 52, pp. 7846–7856. DOI: 10.1021/jf0486850.
15. Jorheim M., Måge F., Andersen Ø.M. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, vol. 55, pp. 5529–5535. DOI: 10.1021/jf0709000.
16. Bąkowska-Barczak A. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2005, vol. 14/55, pp. 107–116. DOI: 10.1111/j.1745-4514.1987.tb00123.x.

Received August 21, 2019

Revised September 8, 2019

Accepted September 27, 2019

For citing: Deineka V.I., Oleinits E.Yu., Pavlov A.A., Mikheev A.Yu., Shelepova O.V., Volkova O.D., Khlebnikova E.I. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 1, pp. 81–88. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2020016331.