

УДК 615.322: 615.071: 615.074

DOI: 10.18413/2313-8955-2015-1-4-119-124

**Писарев Д. И.¹
Алексева К.А.²
Новиков О.О.³
Корниенко И.В.⁴
Севрук И.А.⁵**

**ХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА АНТОЦИАНОВ ТРАВЫ
OCIMUM BASILICUM L.**

1) доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии, доктор фармацевтических наук, доцент Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»); ул. Победы, 85, Белгород, 308015, Россия; E-mail: pisarev@bsu.edu.ru

2) студентка 5 курса фармацевтического факультета Медицинского института Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»); ул. Победы, 85, Белгород, 308015, Россия; E-mail: 740890@bsu.edu.ru

3) заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии, доктор фармацевтических наук, профессор. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»); ул. Победы, 85, Белгород, 308015, Россия; E-mail: novikov@bsu.edu.ru

4) ассистент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»); ул. Победы, 85, Белгород, 308015, Россия; E-mail: indina@bsu.edu.ru

5) ассистент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»); ул. Победы, 85, Белгород, 308015, Россия; E-mail: sevruk@bsu.edu.ru

Аннотация. Базилик обыкновенный – *Ocimum basilicum* L. содержит широкий спектр биологически активных соединений, в их числе эфирные масла, фенольные соединения, включая флавоноиды и антоцианы. Фиолетовая разновидность является богатым источником ацилированных и гликозилированных антоцианов и может представить интерес в качестве уникального источника стабильных красных пигментов для пищевой промышленности. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определён химический состав антоцианов – *O. basilicum* L. Установлено, что в его составе присутствует 12 антоциановых гликозидов, причём данные соединения находятся в виде депсидов с оксикоричными кислотами, о чём свидетельствуют их характерные УФ-профили. Агликоном антоциановых гликозидов является цианидин, что было подтверждено кислотным гидролизом. Причём 11 антоциановых гликозидов представлены в виде депсидов с п-кумаровой кислотой. Один из антоциановых гликозидов находится в виде депсида с кофейной кислотой. Количественное определение антоцианов проводили методом *pH – дифференциальной спектрофотометрии*. Установлено, что в свежем сырье *O. basilicum* L. суммарное содержание антоцианов составило – 0,48±0,054%.

Ключевые слова: базилик обыкновенный, депсиды антоциановых гликозидов, высокоэффективная жидкостная хроматография.

**Pisarev D.I.¹
Alekseeva K.A.²
Novikov O.O.³
Kornienko I.V.⁴
Sevrur I.A.⁵**

**THE CHEMICAL STUDY OF THE ANTHOCYANINS IN
OCIMUM BASILICUM L. HERB**

1) Doctor of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor. Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy. Belgorod State National Research University. 85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia. E-mail: pisarev@bsu.edu.ru

2) 5th Year Student. Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy Belgorod State National Research University. 85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia. E-mail: 740890@bsu.edu.ru

- 3) Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor. Head of Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy Belgorod State National Research University. 85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia. E-mail: novikov@bsu.edu.ru
4) Assistant Lecturer. Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy. Belgorod State National Research University. 85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia. E-mail: indina@bsu.edu.ru
5) Assistant Lecturer. Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy Belgorod State National Research University. 85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia. E-mail: sevruk@bsu.edu.ru

Abstract. Sweet basil – *Ocimum basilicum L.* contains a wide spectrum of biologically active compounds: essential oils, phenolic compounds, including flavonoids and anthocyanins. The violet variety is a rich source of acylated and glycosylated anthocyanins and can be of interest as a unique source of stable red pigments for the food industry. The HPLC method has determined the chemical composition of *O. basilicum L.* anthocyanins: it contains 12 anthocyanin glycosides, and these compounds are in the form of depsides with hydroxy-cinnamic acids, as evidenced by their characteristic UV profiles. The aglycone of anthocyanin glycosides is cyanidin, which was confirmed by the acid hydrolysis. And 11 anthocyanin glycosides are represented as depsides with p-coumaric acid. One anthocyanin glycoside is in the form of a depside with caffeic acid. The quantification of anthocyanins was determined by the pH-differential spectrophotometry. It was found that the fresh *O. basilicum L.* raw material total content of anthocyanins was – $0,48 \pm 0,054\%$.

Keywords: basil ordinary; depsides anthocyanin glycosides; high performance liquid chromatography.

Введение. Антоцианидины – это производные катиона флавилия. Особенностью строения антоцианидинов является наличие в гетероциклическом кольце четырехвалентного кислорода (оксония) и свободной положительной валентности. Антоцианы отвечают за окраску плодов, цветков и других частей растений от оранжевого до синего [1].

На окраску антоцианидинов влияет число и природа заместителей: гидроксильные группы, несущие свободные электронные пары, обуславливают батохромный сдвиг при увеличении их числа. Гликозидирование, метилирование или ацилирование гидроксильных групп антоцианидинов приводит к уменьшению или исчезновению батохромного эффекта [2,3].

Большие различия между природными антоцианами связаны с разнообразием углеводных фрагментов, присоединенных к агликону по гидроксильным группам, как правило, в положении 3, реже одновременно в двух положениях – 3 и 5. Кроме того, большей частью разнообразие антоцианов обусловлено различием производных, в которых некоторые из гидроксильных групп углеводного фрагмента ацилированы уксусной, малоновой, кумаровыми, кофейной и другими кислотами [4, 7, 10].

Для антоцианов в настоящее время доказаны следующие виды фармакологической активности:
– *антиоксидантная* – высокая антирадикальная активность антоцианов во много раз превышает таковую других классов флавоноидов [12].

– *вазопротекторная* – уменьшают ломкость и проницаемость капилляров, улучшая функцию эндотелия [6].

– илизации выработки коллагена, ингибируют агрегацию тромбоцитов и стимулируют выработку эндотелием простагландинов. Кроме того, установлена способность антоцианов гасить воспалительные процессы в легких, снижая активность ферментов [8].

– *противоопухолевая* – антоцианы уменьшают скорость деления раковых клеток [11].

– *фунгицидная и антимикробная активность* – антоцианы способны ингибировать биосинтез афлатоксинов [13].

Базилек душистый обыкновенный – *Ocimum basilicum L.* – однолетнее травянистое растение семейства *Lamiaceae*, образующее ветвящийся куст около 50 см в высоту.

Трава *O. basilicum L.* содержит широкий спектр биологически активных соединений, в их числе эфирные масла, фенольные соединения, включая флавоноиды и антоцианы.

В ряде зарубежных сообщений указывается, фиолетовый базилик является богатым источником ацилированных и гликозилированных антоцианов и может представить интерес в качестве уникального источника стабильных красных пигментов для пищевой промышленности [9].

Учитывая вышесказанное, **целью** настоящего исследования явилось изучение химического состава антоцианов *O. basilicum L.*

Материалы и методы. Для определения антоцианов 2,5 г свежей травы *O. basilicum L.*, измельчили и помещали в плоскодонную колбу вместимостью 100 мл, заливали 25 мл экстрагента – 1%-ного раствора кислоты хлористоводородной в

спирте этиловом 95%-ном, колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на магнитной мешалке при температуре 80°C в течение 30 минут. Полученное извлечение декантировали и оставшееся сырьё заливали свежей порцией того же экстрагента в количестве 25 мл. Всего было сделано четыре экстракции. Извлечение каждый раз фильтровали в мерную колбу вместимостью 100 мл. Содержимое мерной колбы доводили экстрагентом до метки. Полученный фильтрат далее исследовали на содержание антоцианов.

Для разделения исследуемого объекта использовали метод ОФ ВЭЖХ.

Хроматографические исследования проводили на хроматографическом приборе фирмы «Agilent Technologies 1200 Infinity» производства США с автоматическим пробоотборником Agilent 1200, вакуумным микродегазатором, градиентным насосом и термостатом той же серии. Электронные спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометрического детектора с диодной матрицей серии Agilent 1200 (диапазон длин волн от 190 до 950 нм), шаг сканирования – 2 нм.

Для регистрации и обработки спектральных данных и хроматограмм использовали программное обеспечение «Agilent Chem Station».

Для приготовления подвижных фаз использовали следующие растворители: воду сверхчистую (для жидкостной хроматографии), спирт метиловый, кислоту муравьиную.

Идентификацию компонентов осуществляли по совпадению времён удерживания анализируемых веществ со СО зафиксированных в аналогичных условиях эксперимента и по результатам диодно-матричного детектирования.

Сумму антоцианов подвергали хроматографическому разделению в следующих условиях: подвижная фаза – (А) – 1%-ный водный раствор кислоты муравьиной, (Б) – спирт этиловый в градиентном режиме элюирования; колонка – Ascentis express C₁₈ 2,7µm × 100 мм × 4,6 мм; скорость подвижной фазы – 0,5 мл/мин; температура колонки +35 °С; объём вводимой пробы 1 µl; детекция диодно-матричная – 520 нм.

Состав подвижной фазы программировали в условиях, указанных в таблице 1.

Таблица 1

Условия градиентного элюирования антоцианов

Table 1

Terms of gradient elution of anthocyanins

| Время, мин | А,% | Б,% |
|------------|-----|-----|
| 0 | 90 | 10 |
| 10 | 80 | 20 |
| 20 | 70 | 30 |
| 30 | 50 | 50 |
| 40 | 10 | 90 |

Идентификацию компонентов осуществляли по совпадению времён удерживания анализируемых веществ со СО зафиксированных в аналогичных условиях эксперимента и по результатам диодно-матричного детектирования.

Результаты и выводы. Хроматограмма разделения суммы антоцианов травы *O. basilicum L.* представлена на рисунке 1.

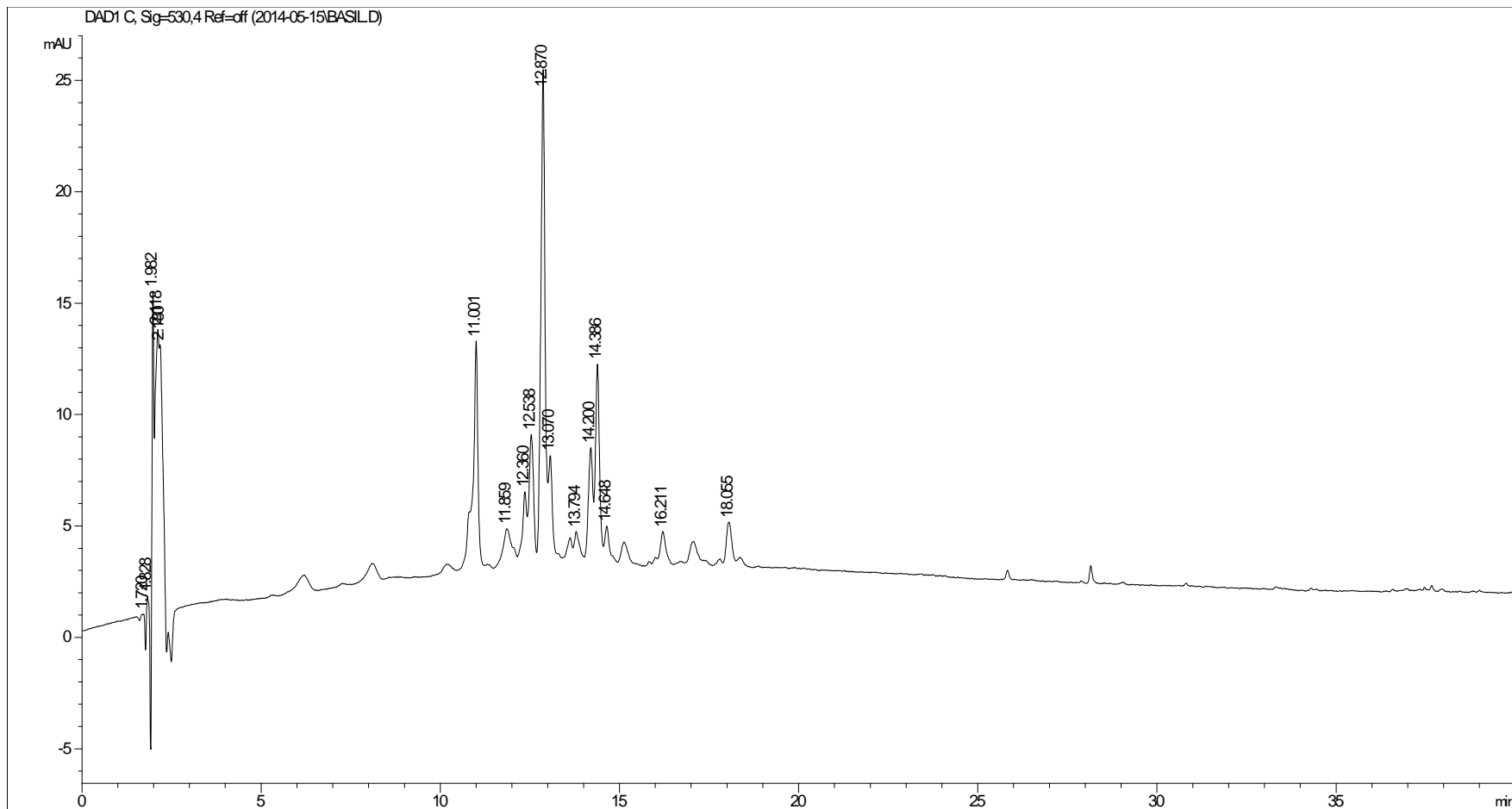


Рис. 1. Хроматограмма антоцианов базилика (детекция диодно-матричная $\lambda_{\max} = 530$ нм)

Figure 1. Chromatography of basil anthocyanins (diode array detector $\lambda_{\max} = 530$ nm)

В результате хроматографирования установлено присутствие в траве базилика 12 антоциановых гликозидов, причём данные соединения находятся в виде депсидов с оксикоричными кислотами, о чём свидетельствуют их характерные УФ-профили.

Агликоном антоциановых гликозидов является цианидин, что было подтверждено кислотным гидролизом. Причём 11 антоциановых гликозидов представлены в виде депсидов с п-кумаровой кислотой, УФ-профиль, одного из компонентов представлен на рисунке 2.

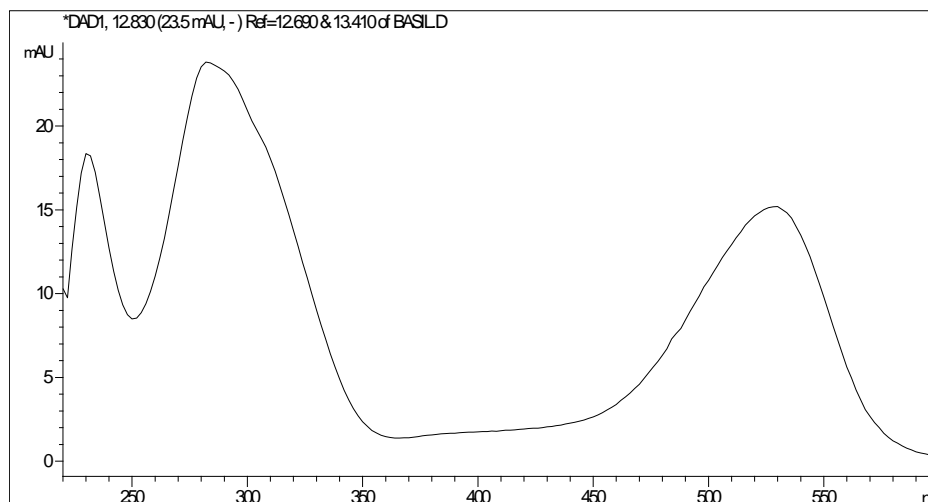


Рис. 2. УФ-профиль депсида антоцианового гликозида с п-кумаровой кислотой

Figure 2. UV-profile of anthocyanins glucoside deposite with p-coumaric acid

Один из антоциановых гликозидов находится в виде депсида с кофейной кислотой (рис. 3).

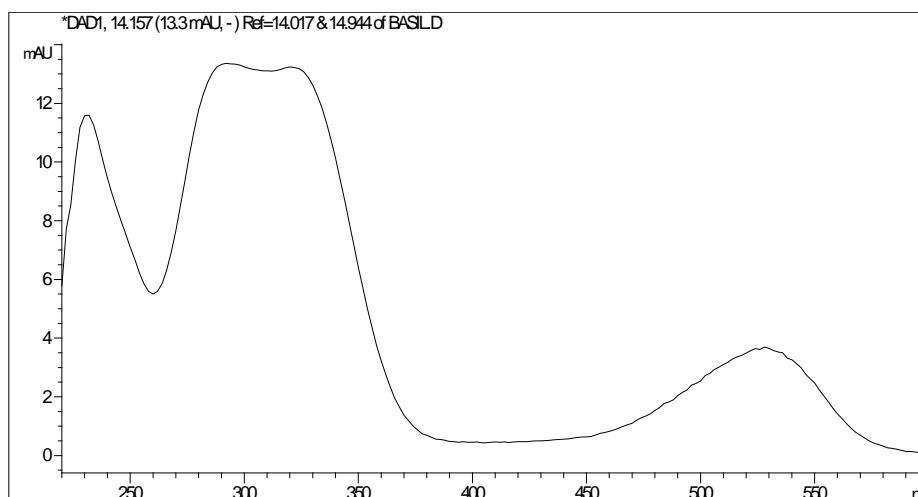


Рис. 3. УФ-профиль депсида антоцианового гликозида с кофейной кислотой

Figure 3. UV-profile of anthocyanins glycoside deposite with caffeic acid

Количественное определение антоцианов проводили методом *pH – дифференциальной спектрофотометрии* [4].

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-гликозид в процентах (X) вычисляли по формулам 1 и 2:

$$D = (D_{510} - D_{700})_{pH1,0} - (D_{510} - D_{700})_{pH4,5}$$

$$X = \frac{D \times M_M \times W_1 \times W_2 \times 100}{\varepsilon \times l \times m \times V \times 10 \times (100 - B)}$$

где W_1 – общий объем извлечения из сырья, мл;
 W_2 – объем разведения, мл;
 m – масса сырья, г;
 V – аликвота, взятая для разбавления, мл;
 M_M – молярная масса цианидина-3-гликозида, равная 449,17;

l – толщина кюветы, см;
ε – молярный коэффициент поглощения,
равный 26900;

В – влажность сырья.

В результате установлено, что в свежем сырье
O. basilicum L. суммарное содержание
антоцианов составило – 0,48±0,054%.

Проведённые исследования позволяют
рекомендовать траву *O. basilicum L.* в качестве
источника биологически активных антоцианов.

Список литературы

1. Биохимия растений / Л. А. Красильникова, О. А. Авксентьева, Ю. А. Жмурко [и др.]. Ростов н/Д : Феникс; Харьков : Торсинг, 2004. 224 с.

2. Гейссман Т. Антоцианы, халконы, ауроны, флавоны и родственные им водорастворимые пигменты // Биохимические методы анализа растений: сб. ст. М., 1960. С. 453.

3. Кишковский З. Н, Скурихин И. М. Химия вина. М.: Пищевая промышленность, 1976. 312 с.

4. Методы анализа минорных биологически активных веществ пищи / под ред. В. А. Тутельяна, К. И. Эллера; НИИ питания РАМН. М. : Династия, 2010. 180 с.

5. Танчев С. С. Антоцианы в плодах и овощах. М.: Пищевая промышленность, 1980. 302 с.

6. Analysis and biological activities of anthocyanin / J. M. Kong, L. S. Chia, N. K. Goh [et al.] // Phytochemistry. 2003. Vol.64, №5. P. 923-933.

7. Antal D.-S, Gârban G., Gârban Z. The anthocyanins: biologically-active substances of food and pharmaceutical interest // The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI : Food Technology. Galati, 2003. P. 106-115.

8. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries / H. Wang, M. G. Nair, G. M. Strasburg [et al.] // J. Nat. Prod. 1999. Vol.62, №2. P. 294-296.

9. Phippen B.W., Simon J.E. Anthocyanins in Basil (*Ocimum basilicum L.*) // J. Agric. Food Chem. 1998. Vol.46, №5. P. 1734–1738.

10. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development / L. Jaakola, K. Määttä, A. M. Pirttilä [et al.] // Plant. Physiol. 2002. Vol.130, №2. P. 729-739.

11. Hou D. X. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins // Curr. Mol. Med. 2003. Vol.3, №2. P. 149-159.

12. Lila M. A. Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach // J. Biomed. Biotechnol. 2004. Vol.2004, №5. P. 306-313.

13. Norton R. A. Inhibition of Aflatoxin B1 Biosynthesis in *Aspergillus flavus* by Anthocyanidins and Related Flavonoids // J. Agric. Food. Chem. 1999. Vol.47, №3. P. 1230-1235.

References

1. Plant Biochemistry / L.A Krasil'nikova, O.A Avksentiev Yu.A. Zhmurko [et al.]. Rostov n/D: Phoenix; Kharkov: Torsing, 2004. 224 p.

2. Geysman, T. Anthocyanins, Chalcones, Auron, Flavones and Related Water-soluble Pigments // Biochemical Methods of Analysis plan. M., 1960. P. 453.

3. Kishkovsky, Z. H., Skurikhin, I.M. Chemistry of Wine. M.: The Food Industry, 1976. 312 p.

4. Methods of Analysis of Biologically Active Substances in Food / ed. VA Tutelian, K.I. Eller; Institute of Nutrition. M.: Dynasty, 2010. 180 p.

5. Tanchev, S.S. Anthocyanins in Fruits and Vegetables. M.: The Food Industry, 1980. 302 p.

6. Analysis and Biological Activities of Anthocyanin / J. M. Kong, L. S. Chia, N. K. Goh [et al.] // Phytochemistry. Vol.64, №5. 2003: Pp. 923-933.

7. Antal, D.-S, Gârban, G., Gârban, Z. The anthocyanins: biologically-active substances of food and pharmaceutical interest // The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI : Food Technology. 2003: P. 106-115.

8. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries / H. Wang, M. G. Nair, G. M. Strasburg [et al.] // J. Nat. Prod. Vol.62, №2. 1999: P. 294-296.

9. Phippen, B.W., Simon, J.E. Anthocyanins in Basil (*Ocimum basilicum L.*) // J. Agric. Food Chem. Vol.46, №5. 1998: P. 1734–1738.

10. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development / L. Jaakola, K. Määttä, A. M. Pirttilä [et al.] // Plant. Physiol. Vol.130, №2. 2002: P. 729-739.

11. Hou, D. X. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins // Curr. Mol. Med. Vol.3, №2. 2003: P. 149-159.

12. Lila, M. A. Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach // J. Biomed. Biotechnol. Vol.2004, №5. 2004: P. 306-313.

13. Norton, R. A. Inhibition of Aflatoxin B1 Biosynthesis in *Aspergillus flavus* by Anthocyanidins and Related Flavonoids // J. Agric. Food. Chem. Vol.47, №3. 1999: P. 1230-1235.