

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕТАБОЛИТОВ С АНТИОКСИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ В ЛИСТЬЯХ ОВОЩНОГО АМАРАНТА (*Amaranthus tricolor* L.)*

М.С. ГИНС¹, В.К. ГИНС¹, С.М. МОТЫЛЕВА², И.М. КУЛИКОВ²,
С.М. МЕДВЕДЕВ², В.Ф. ПИВОВАРОВ¹, М.Е. МЕРТВИЩЕВА²

Антиоксиданты растительной природы способны регулировать многие физиологические функции организма и снижать риск развития хронических заболеваний, вызванных свободно-радикальным окислением. Самым доступным источником эссенциальных антиоксидантных метаболитов, дефицит которых приводит к резкому снижению устойчивости организма к стресс-факторам, служат овощные растения. Амарант (*Amaranthus tricolor* L.) — перспективное пищевое и лекарственное растение. Сорт Валентина, созданный во Всероссийском НИИ селекции и семеноводства овощных культур (авторы В.К. Гинс, П.Ф. Кононков, М.С. Гинс), интродуцирован и успешно выращивается в ряде регионов России. Целью нашей работы стало изучение состава и содержания низкомолекулярных биологически активных метаболитов с антиоксидантными свойствами, определяющих питательную и фармакологическую ценность листовой биомассы амаранта, а также оценка накопления основных антиоксидантов в органах растений, выращенных в условиях Московской области. Анализировали водные и спиртовые экстракты свежесобранных и высушенных листьев (ювенильных, с полностью сформированной листовой пластинкой и старых), соцветия, стебли, жилки, черешки и корни. Оценивали количество амарантина, восстановленной аскорбиновой кислоты, суммарное содержание антиоксидантов, количество простых фенолов и оксигензойных кислот, флавоноидов, конденсированных и полимерных полифенолов. Содержание хлорогеновой, галловой, феруловой кислот и арбутина в водном экстракте определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для анализа метаболитов применяли газовую хромато-масс-спектрометрию (ГХ/МС). Водные экстракты разновозрастных листьев амаранта различались по содержанию основных метаболитов-антиоксидантов: амарантина, аскорбиновой кислоты, каротиноидов. В ювенильных листьях накапливалось максимальное количество амарантина, содержание которого снижалось по мере старения листовой пластинки. Аскорбиновая кислота преимущественно накапливалась в активно фотосинтезирующих листьях с полностью оформленной пластинкой, в стареющих листьях ее количество уменьшалось. В ювенильных листьях также отмечалась тенденция к повышению содержания аскорбиновой кислоты. Суммарное содержание антиоксидантов в молодых листьях с неопформленной пластинкой оказалось меньше, чем в листьях с полностью оформленной пластинкой. Жилки, черешки, стебли аккумулировали существенно меньше метаболитов с антиоксидантной активностью по сравнению с листьями. В водном экстракте бетацианины были представлены в основном амарантином и изоамарантином. Хроматографический анализ водных экстрактов листьев показал наличие высокоактивных антиоксидантов: арбутина (гликозид гидрохинона), оксикоричных кислот — феруловой, хлорогеновой, оксигензойной (галловой). Методом компарирования были определены концентрации галловой, хлорогеновой, феруловой кислот и арбутина (соответственно 1,51; 2,05; 0,01 и 472,51 мкг/100 мл). Впервые обнаружено наличие мощного антиоксиданта — сквалена (C₃₀H₅₀) в водном экстракте листьев амаранта, тогда как ранее его выделяли только из семян этого растения. В спиртовом экстракте выявлено большее количество окрашенных компонентов (область спектра λ = 350-700 нм), кроме того, обнаружены галловая, хлорогеновая и феруловая кислоты. Всего с использованием газовой хромато-масс-спектрометрии идентифицированы 37 низкомолекулярных метаболитов. Представленные данные свидетельствуют о том, что овощной амарант как перспективный воспроизводимый источник антиоксидантов может использоваться при создании функциональных продуктов и фитопрепаратов профилактического назначения.

Ключевые слова: амарант, *Amaranthus tricolor* L., сорт Валентина, низкомолекулярные метаболиты — антиоксиданты, амарантин, аскорбиновая кислота, фенольные соединения.

Амарант (род *Amaranthus*) используется населением многих стран мира как зерновая, овощная и лекарственная культура. На африканском континенте листья овощных видов амаранта служат дополнительным источником полноценного белка, сбалансированного по незаменимым аминокислотам (1). Листья и молодые растения овощного амаранта в Индонезии, Китае, Индии, странах Юго-Восточной Азии — основной продукт,

* Исследование проводится в рамках темы № 0575-2017-0001, поддержанной программой развития биоресурсных коллекций ФАНО России.

обогащающий питание населения эссенциальными аминокислотами, биологически активными веществами и антиоксидантами (2, 3). Препараты из растений амаранта широко применяются в фитомедицине. В организме человека они выполняют регуляторные, защитные функции и уменьшают риск развития хронических заболеваний, вызванных свободнорадикальным окислением (4).

В России интродукция овощных видов амаранта с высоким содержанием безглютенового белка и низкомолекулярных антиоксидантов (витамина С, фенольных соединений, беталаиновых пигментов, сквалена) актуальна и необходима для устранения дефицита эссенциальных нутриентов. Детальное изучение состава метаболитов амаранта с антиоксидантными свойствами и широким спектром биологической активности необходимо для разработки функциональных продуктов и напитков на основе его листьев (5). Овощные виды амаранта также считаются ценной лекарственной культурой из-за высокого содержания бетацианинов, аскорбиновой кислоты, фенольных соединений и антиоксидантов иной природы (6). Доказаны антидиабетические (6-8), гепатопротекторные (9, 10), гастропротекторные (11), противоопухолевые (12), антимикробные (13, 14) свойства экстрактов из листьев амаранта *Amaranthus tricolor* L.

Применение таких современных аналитических методов, как масс-спектрометрия и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), позволяет выявлять компоненты, не обнаруженные ранее при оценке пищевой и фармакологической ценности растительного сырья, чтобы разрабатывать на его основе инновационные биологически активные растительные препараты и продукты (15, 16).

В настоящей работе в листьях у овощного амаранта сорта Валентина мы впервые идентифицировали 37 метаболитов с антиоксидантными свойствами, относящихся к разным классам соединений (органические кислоты, сахара и их производные, фенолы, тритерпены, аминокислоты). Это расширяет возможности применения листьев амаранта для создания функциональных продуктов, проявляющих антистрессовую активность.

Цель нашего исследования заключалась в оценке качественного состава метаболитов в водных и спиртовых экстрактах листьев амаранта и накопления основных антиоксидантов в органах растений, выращенных в Московской области.

Методика. Материалом служили сырые и высушенные листья, соцветия, стебли, жилки, черешки и корень овощного амаранта (*Amaranthus tricolor* L.) сорта Валентина (оригинатор — Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур, ВНИИССОК, Московская обл.), а также биологически активная добавка фиточай «Амарантил», полученная из листьев амаранта сорта Валентина (ВНИИССОК, Россия). Растения выращивали в открытом грунте на опытных полях ВНИИССОК в 2015-2017 годах. Для изучения брали листья разного возраста: ювенильные, с полностью сформированной листовой пластинкой, старые. Свежий материал помещали в гомогенизатор, образцы готовили в соответствии с методиками для каждого вида исследований. Высушенные образцы измельчали в мельнице до размера частиц 1-2 мм. Использовали водные и спиртовые экстракты из свежего и высушенного растительного материала.

Количество амарантина в водных экстрактах определяли с учетом молярного коэффициента экстинкции $5,66 \times 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ и молярной массы $726,6 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$ (17). Концентрацию восстановленной формы аскорбиновой кислоты (АК) оценивали йодометрическим методом, основанным на титровании АК в экстрактах, окрашенных йодатом калия в

кислой среде в присутствии йодистого калия и крахмала (18). Суммарное содержание антиоксидантов (ССА) в водном и спиртовом экстрактах определяли амперометрически (19), результат выражали в эквивалентах галловой кислоты (мг-экв. ГК/г).

Образцы измельчали в гомогенизаторе в присутствии экстрагирующих жидкостей (бидистиллированная вода или 96 % этиловый спирт) при температуре 20–25 °С. Гомогенаты центрифугировали 15 мин при 10000 г и 4 °С. Аликвоту супернатанта использовали для определения содержания антиоксидантов, при необходимости разбавляя. Измерения проводили на приборе Цвет-Яуза 01-АА (НПО «Химавтоматика», Россия) в режиме постоянного тока.

Во фракциях, полученных из сухих соцветий, листьев и стеблей, определяли содержание простых фенолов и оксибензойных кислот, оксикоричных кислот и их эфиров, флавоноидов, конденсированных и полимерных полифенолов (20).

Спектральные характеристики растворов измеряли на спектрофотометре Helios Gamma («Thermo Electron Corporation», США) при $\lambda = 200$ –600 нм. Количество хлорогеновой, галловой, феруловой кислот и арбутина в водном экстракте из добавки фиточай «Амарантил» определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на жидкостном хроматографе KNAUER («KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH», Германия). Использовали колонку с обращенной фазой длиной 150 мм, заполненную сорбентом Диасфер 110-С18 (Россия); зернение 5 мкм, элюент — смесь 0,03 % трифторуксусная кислота:ацетонитрил (70:30). Пики идентифицировали по времени удерживания, содержание индивидуальных веществ определяли при сравнении с градуировочным раствором. Качественный анализ метаболитов выполняли методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС) на хроматографе JMS-Q1050GC («JEOL Ltd», Япония). Использовали капиллярную колонку DB-5HT («Agilent», США; длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина пленки 0,52 мкм; газ-носитель — гелий). Температурный градиент — от 40 до 300 °С, температура инжектора и интерфейса 280 °С, ионного источника — 200 °С. Скорость потока газа в колонке 2,0 мл/мин, время анализа 45 мин, режим ввода с делением потока, объем вводимой пробы 1 мкл. Для определения веществ проводили дериватизацию с использованием силилирующего агента N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида (БСТФА) (21). Идентификацию веществ осуществляли по параметрам удерживания и масс-спектрам библиотеки NIST-5 National Institute of Standards and Technology (США). Диапазон сканирования 33–900 м/z.

Все измерения проводили в трех повторностях, в таблицах представлены средние значения (\bar{X}) и их стандартные отклонения ($\pm x$).

Результаты. Характерная особенность листьев *A. tricolor* L. сорта Валентина — красная окраска разной интенсивности, которая зависит от их возраста и определяется количеством пигмента амарантина, обнаруженного во всех исследованных органах растения (листья, корни, черешки, стебли, соцветия). Водные экстракты разновозрастных листьев амаранта различались по содержанию основных метаболитов с антиоксидантными свойствами — амарантина, аскорбиновой кислоты каротиноидов (табл. 1). В ювенильных листьях аккумулировалось максимальное количество амарантина, содержание которого по мере роста и старения листовой пластинке снижалось. Аскорбиновая кислота преимущественно накапливалась в активно фотосинтезирующих листьях с полностью оформленной пластинкой, в стареющих — ее количество уменьшалось. В ювенильных листьях также

отмечалась тенденция к повышению содержания аскорбиновой кислоты.

1. Содержание метаболитов-антиоксидантов в органах у растений амаранта (*Amaranthus tricolor* L.) сорта Валентина ($X \pm x$, Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур, Московская обл., 2015 год)

Орган	№ листа (снизу вверх)	Содержание		Суммарное содержание антиоксидантов, мг-экв. ГК/г сырой массы
		аскорбиновая кислота, мг%	амарантин, мг/г сырой массы	
Старые листья	1	161±15,0	0,26±0,02	2,32±0,11
	2	186±15,0	0,29±0,02	2,30±0,11
	3	176±15,0	0,44±0,05	2,25±0,11
Листья с оформленной пластинкой	4	230±15,0	0,48±0,05	2,26±0,11
	5	202±15,0	0,51±0,05	2,20±0,11
	6	216±15,0	0,57±0,05	2,21±0,11
Листья с неоформленной пластинкой и ювенильные	7	149±15,0	0,55±0,05	1,81±0,10
	8	133±15,0	0,72±0,05	2,00±0,11
	9			
	10	167±15,0	0,94±0,05	2,11±0,11
	11			
Жилка листа			0,31±0,02	0,70±0,04
Черешки листьев		17±1,5	0,79±0,05	0,69±0,04
Стебель		10±1,5	0,21±0,02	0,43±0,03
Соцветие		130±15,0	0,75±0,05	1,18±0,05
Корень		10±1,5	0,11±0,02	0,45±0,03

Примечание. ГК — галловая кислота. Пропуски означают отсутствие данных.

Поскольку содержание антиоксидантов в органах амаранта различалось, для анализа закономерностей их совместного изменения можно использовать интегральный показатель — суммарное содержание антиоксидантов (19). В молодых листьях с неоформленной пластиной оно оказалось меньше, чем в листьями с полностью оформленной. При этом жилки, черешки, стебли аккумулировали существенно меньше метаболитов с антиоксидантной активностью по сравнению с листьями.

Среди вторичных метаболитов, которые синтезируются в овощных растениях, биологической активностью выделяется группа фенольных соединений — веществ ароматической природы (13). Мы установили, что в листьях и плодах овощных и пряно-вкусовых растений широко распространены простые фенолы — оксibenзойные, оксикоричные кислоты и их сложные эфиры, флавоноиды, полимерные и конденсированные полифенолы (20, 21). Роль вторичных метаболитов в растениях еще недостаточно изучена. Известно, что они обуславливают лекарственные и ядовитые свойства, участвуют в защите от биотических стрессоров, а также во взаимодействиях растений между собой и с другими организмами, в процессах размножения (окраска, запах цветков и плодов) (22). В листьях амаранта значительную долю фенольных соединений составляли флавоноиды (табл. 2).

2. Фракционный состав и содержание (% на абсолютно сухую массу) фенольных соединений (ФС) в соцветиях, листьях и стеблях у растений амаранта (*Amaranthus tricolor* L.) сорта Валентина ($X \pm x$, Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур, Московская обл., 2015 год)

Орган	Сумма ФС	Простые фенольные соединения и окси- бензойные кислоты	Оксикоричные кис- лоты и их эфиры	Флавоноиды	Конденсирован- ные и полимер- ные ФС
Соцветия	5,52	0,55±0,05	0,09±0,01	3,94±0,11	0,94±0,11
Листья	5,47	0,43±0,05	0,09±0,01	4,21±0,11	0,74±0,11
Стебель	3,23	0,32±0,05	0,05±0,01	0,52±0,11	2,34±0,11

Содержание флавоноидов в листьях амаранта сравнимо с их количеством в лекарственных растениях (22). В соцветиях было обнаружено меньше флавоноидов и оксикоричных кислот, чем в листьях. Экстракты стебля имели минимальное содержание флавоноидов, но более высокие показатели по конденсированным и полимерным фенолам по сравнению с

соцветием и листьями. В экстрактах из свежих листьев амаранта были обнаружены следующие физиологически активные вещества с антиоксидантной активностью: амарантин, аскорбиновая кислота, флавоноиды, простые фенолы и фенолкарбоновые кислоты.

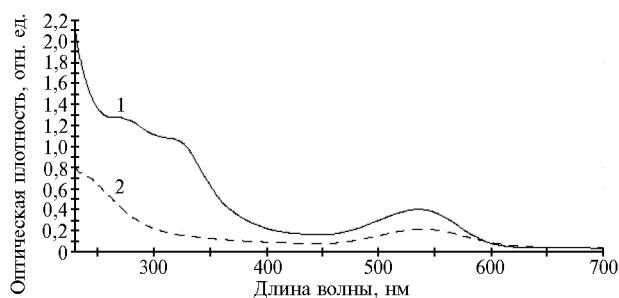


Рис. 1. Спектральные кривые поглощения водных экстрактов из листьев амаранта (*Amaranthus tricolor* L.) сорта Валентина (фиточай «Амарантил») (1) и выделенного из них пигмента амарантина (2) (Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур, Московская обл., 2016 год).

На спектральной кривой экстракта из биологически активной пищевой добавки (фиточай «Амарантил») выделялись три максимума поглощения — 250-270, 325 и 540 нм (рис. 1), что свидетельствует о наличии компонентов фенольной природы. Один из максимумов ($\lambda = 540$ нм) совпадал с максимумом для пигмента амарантина, полученного из листьев.

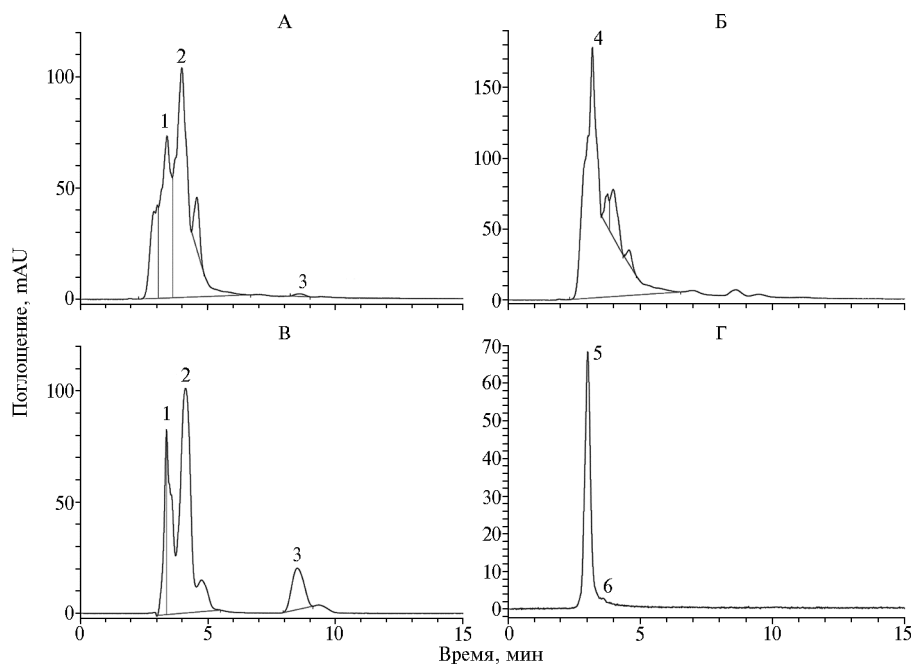


Рис. 2. Хроматографические профили водного экстракта из листьев амаранта (*Amaranthus tricolor* L.) сорта Валентина (фиточай «Амарантил») при $\lambda = 325$ нм (А), стандарта галловой кислоты при $\lambda = 268$ нм (Б), стандартной смеси арбутина, хлорогеновой и феруловой кислот при $\lambda = 325$ нм (В), пигмента амарантина при $\lambda = 540$ нм (Г): 1 — арбутин, 2 — хлорогеновая кислота, 3 — феруловая кислота, 4 — галловая кислота, 5 — амарантин, 6 — изоамарантин (Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур, Московская обл., 2017 год). Жидкостный хроматограф KNAUER (Германия).

При хроматографическом анализе фенольные соединения в водном экстракте листьев амаранта (фиточай «Амарантил») выявляли при 268 и 325 нм. В свежих листьях амаранта обнаружили хлорогеновую, феруловую, галловую кислоты и арбутин (соответственно $2,05 \pm 0,10$; $0,01$; $1,51 \pm 0,04$ и 473 ± 20 мкг/мл), а также неидентифицированные соединения с временем удерживания 4-8 мин (рис. 2, А, В). V.V. Gopal с соавт. (23) в водном

экстракте листьев амаранта обнаружили галловую и феруловую кислоты в количестве 0,083 и 0,001 мкг/мл. Галловую кислоту анализировали при $\lambda = 268$ нм, красный пигмент — при $\lambda = 540$ нм. В области поглощения красного пигмента определялись два компонента — собственно амарантин и его изомерная форма (изоамарантин) (рис. 2, Г). Спектры амарантина, выявленного методом ВЭЖХ, и стандарта пигмента полностью совпали.

Спиртовая вытяжка из листьев амаранта имела интенсивно-зеленую окраску из-за экстрагируемого хлорофилла. Ее спектр существенно отличался от спектра водного экстракта, особенно в области 350-500 нм и 600-700 нм (рис. 3). В диапазоне 250-300 нм спектральные кривые водного и спиртового экстрактов были похожи.

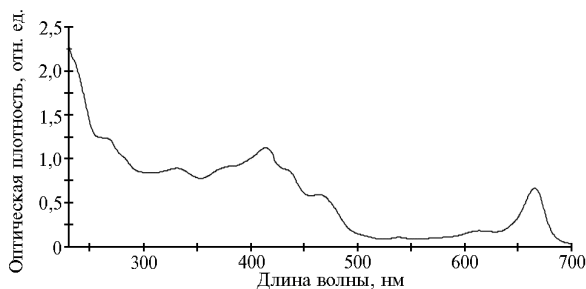


Рис. 3. Спектральная кривая поглощения этанольного экстракта листьев амаранта (*Amaranthus tricolor* L.) сорта Валентина (Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур, Московская обл., 2017 год).

Следовательно, спиртом из листьев экстрагируется большее количество окрашенных компонентов. Хроматографический анализ этанольного экстракта листьев амаранта также провели на длинах волн 268 и 325 нм. Были обнаружены галловая, хлорогеновая и феруловая кислоты (рис. 4). При минимуме поглощения (см. рис. 3, $\lambda = 540$) нм регистрировали только пик растворителя.

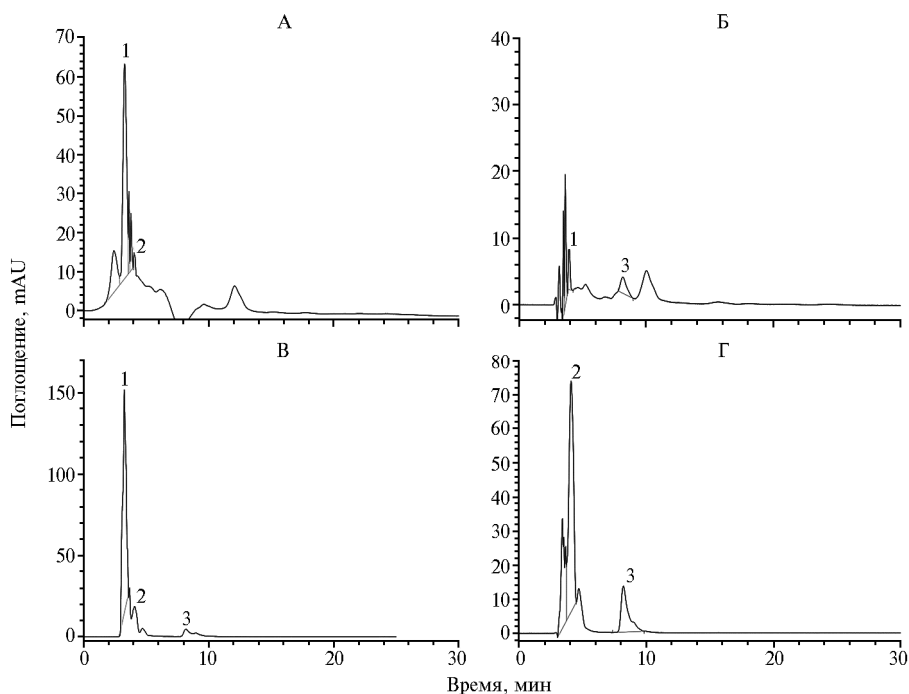


Рис. 4. Хроматографические профили экстракта листьев амаранта (*Amaranthus tricolor* L.) сорта Валентина для анализируемой пробы (А, Б) и стандартной смеси (В, Г) при $\lambda = 268$ нм (А, В) и $\lambda = 325$ нм (Б, Г): 1 — галловая кислота, 2 — хлорогеновая кислота 3 — феруловая кислота (Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур, Московская обл., 2017 год). Жидкостный хроматограф KNAUER (Германия).

Полученные нами данные о количественном содержании феноль-

ных соединений в листьях *Amaranthus tricolor* L. расширяют представление о содержании пищевых и лекарственных низкомолекулярных метаболитов в растениях амаранта и дополняют имеющиеся в научной литературе сведения. Все метаболиты, идентифицированные методом ВЭЖХ, — биологически активные вещества, которые проявляли антиоксидантную активность. Фенольные кислоты и бетацианин — амарантин характеризуются антибактериальными (13, 14), антимикотическими, противовоспалительными, ранозаживляющими свойствами (23). Феруловая кислота обладает радиопротекторными свойствами (24), гликозилированный гидрохинон арбутин проявляет антиоксидантную активность (25).

Результаты качественного ГХ/МС-анализа водного и спиртового экстрактов из листьев амаранта иллюстрирует рисунок 5.

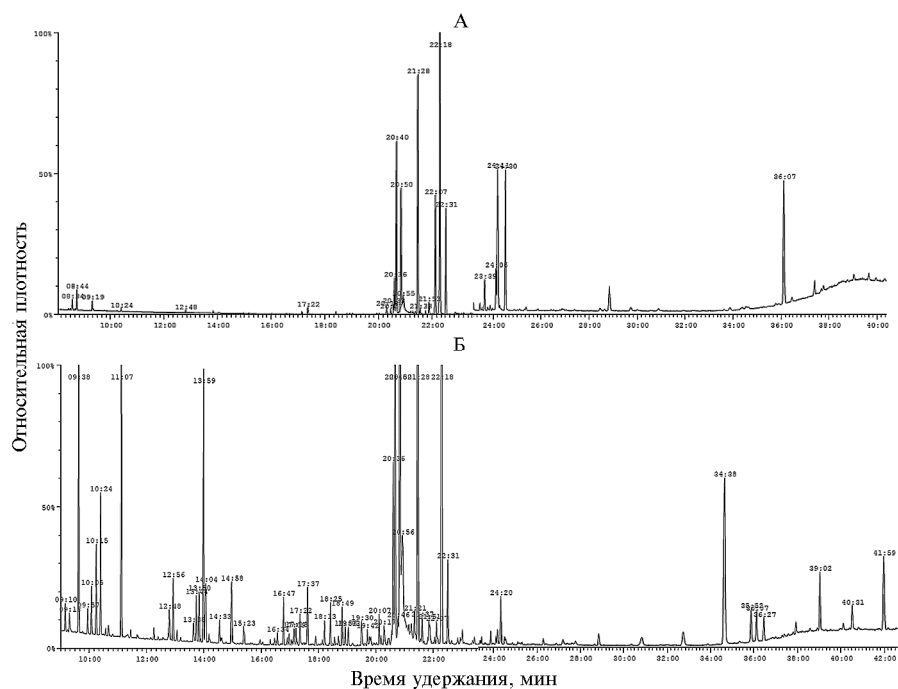


Рис. 5. Фрагменты масс-спектров водного (А) и этанольного (Б) экстрактов из листьев амаранта (*Amaranthus tricolor* L.) сорта Валентина (Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур, Московская обл., 2017 год). Газовый хромато-масс-спектрометр JMS-Q1050GC («JEOL Ltd», Япония).

На хроматограммах хорошо видны качественные различия между экстрактами по компонентному составу. По библиотечным масс-спектрам было идентифицировано более 30 индивидуальных веществ — 15 в водном экстракте и 19 в спиртовом экстракте, относящихся к разным классам химических соединений (табл. 3).

В экстрактах листьев *Amaranthus tricolor* были обнаружены шесть органических кислот: в водном — валериановая и коричная, в спиртовом — янтарная, пропеновая, метилмалоновая и рибионовая. Выявлено пять насыщенных жирных кислот липидов: в водном экстракте — миристиновая ($C_{13:0}$), пальмитиновая ($C_{15:0}$), маргариновая ($C_{15:0}$) и стеариновая ($C_{17:0}$), в спиртовом — пальмитиновая ($C_{15:0}$) и лигноцериновая ($C_{23:0}$). Жирные кислоты обладают бактерицидной, вируцидной и фунгицидной активностью, приводящей к подавлению развития патогенной микрофлоры и дрожжевых грибов. Среди неомыляемых липидов к биологически активным веществам относятся фитостеролы. Известно, что сквален ($C_{30}H_{50}$) — уникальный фитостерол семян амаранта, участвующий в син-

тезе холестерина в качестве его предшественника (26), и активный антиоксидант с антиканцерогенным и ранозаживляющим действием. Адекватное количество потребления сквалена — 400 мг/сут. Сквален служит предшественником ряда ценных фармакологических веществ: сердечных гликозидов, гликоалкалоидов, сапонинов. Сквален, впервые выявленный нами в водном экстракте листьев амаранта сорта Валентина, повышает их фармакологическую ценность.

В водной фракции экстракта листьев амаранта нами идентифицированы пять углеводов: моносахара галактоза и манноза, циклические формы (галактопираноза и фруктофураноза) и кетогексоза тагатоза. В спиртовом экстракте были обнаружены семь углеводов и их циклические формы, производное сахара (глюконовая кислота) и два шестиатомных спирта — инозитол и маннит. Многоатомные спирты проявляют крио- и осмопротекторные свойства в клетке.

3. Метаболиты, выявленные в водном и этанольном экстрактах из листьев амаранта (*Amaranthus tricolor* L.) сорта Валентина методом газовой хромато-масс-спектрометрии (Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур, Московская обл., 2017 год)

Rt, мин	Соединение	Экстракт
О р г а н и ч е с к и е к и с л о т ы		
22:07	Пропеновая кислота, Acrylic acid, C ₃ H ₄ O ₂	С
14:04	Янтарная кислота, Succinic acid, C ₄ H ₄ O ₄	С
16:34	Метилмалоновая кислота, Monoamidoethyl malonic acid, C ₄ H ₆ O ₄	С
20:47	Валериановая кислота, Pentonic acid, CH ₃ (CH ₂)COOH	В
22:41	Рибоновая кислота, Ribonic acid, C ₅ H ₁₀ O ₅	С
22:51	Коричная кислота, Cinnamic acid (Isoferulic acid), C ₉ H ₈ O ₂	В
Ж и р н ы е к и с л о т ы		
17:51	Стеариновая кислота, Octadecanoic (Stearic) acid, C ₁₇ H ₃₅ COOH	В
19:07	Миристиновая кислота, Myristic acid, C ₁₃ H ₂₇ COOH	В
23:11	Маргариновая кислота, Heptadecanoic acid, C ₁₆ H ₃₃ COOH	В
21:15	Пальмитиновая кислота, Hexadecanoic acid, C ₁₅ H ₃₁ COOH	В, С
36:27	Лигноцериновая кислота, Tetracosanoic acid, C ₂₃ H ₄₇ COOH	С
С а х а р а		
18:36	Рибоза, D-(-)-Ribofuranose, C ₅ H ₁₀ O ₅	С
19:03	Галактопираноза, β-L-Galactopyranose, C ₆ H ₁₃ O ₆	В
19:26	Галактоза, D-Galactose, C ₆ H ₁₆ O ₆	В, С
20:11	Тагатоза, D-(-)Tagatofuranose, C ₆ H ₁₂ O ₆	В
20:36	Фруктоза, D-(-)-Fructofuranose, C ₅ H ₈ O ₆	С
20:51	Фруктофураноза, D-(-)-Fructopyranose, C ₅ H ₈ O ₆	С
20:55	Глюкофураноза, Glucofuranose, C ₆ H ₆ O ₆	В
20:56	Талоза, D-(+)-Talofuranose, C ₅ H ₁₂ O ₆	С
21:28	Манноза, D-Mannopyranose, C ₆ H ₁₂ O ₆	В, С
22:17	Глюкопираноза, β-D-Glucopyranose, C ₆ H ₆ O ₆	С
П р о и з в о д н ы е с а х а р о в		
19:43	Лактон глюконовой кислоты, Gluconic acid γ-lacton, C ₆ H ₁₂ O ₇	С
С п и р т ы		
21:51	Инозитол, Inositol, C ₆ H ₁₂ O ₆	С
22:07	Маннит, D-Mannitol, C ₆ H ₁₂ O ₆	С
22:08	Сорбитол, D-Sorbitol, C ₆ H ₁₄ O ₆	В
Д р у г и е с о е д и н е н и я		
36:06	Сквален, ненасыщенный тритерпен, антиоксидант, Squalen, C ₃₀ H ₅₀	В
16:48	Пролин, L-Proline, C ₃ H ₉ NO ₂	С
19:30	D-(+)-Ribono-1,4-lactone	В
23:06	Бетаин безводный, Methaniminium (Betaine) Glycine	В
39:57	Риботимидин, 5-Methyluridine, C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₆	С
40:31	Витамин Е, (+)-α-Tocopherol	С

Примечание. Rt — время удерживания, В — водный экстракт, С — спиртовой экстракт.

В литературе имеются данные, что моносахара и их производные (спирты, лактоны), накапливаясь в клетке, способны выполнять протекторные функции при действии стресс-факторов. Следует отметить глюкозу, фруктозу, маннозу, манит, инозитол, галактозу, которые проявляют антиоксидантные свойства в клетке при низких температурах. Защитное действие моносахаров обусловлено их способностью неспецифически связывать свободные радикалы, предотвращать развитие перекисного окисле-

ния липидов и инактивировать активные формы кислорода (27–30).

В наших опытах в спиртовом экстракте листьев *Amaranthus tricolor* L. сорта Валентина присутствовал витамин Е, который служит универсальным протектором клеточных мембран от окислительного повреждения, проявляет нейропротекторные, антиоксидантные свойства и снижает риск заболевания раком. Микромолярные количества витамина Е уменьшают активность 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазы, отвечающей за синтез холестерина, снижая его количество в организме (31).

Таким образом, комплексный анализ состава метаболитов в листьях амаранта (*Amaranthus tricolor* L.) сорта Валентина показал, что в них присутствуют мощные антиоксиданты — сквален, ранее обнаруженный только в семенах, аскорбиновая кислота, содержание которой сопоставимо с таковым у перца, галловая, а также феруловая, хлорогеновая кислоты, сахара и их производные, тритерпены, бетацианины с антиоксидантной активностью. Фармакологическая ценность идентифицированных метаболитов заключается в их способности снижать риск развития патологий со свободно-радикальной компонентой (сердечно-сосудистых, онкологических, диабета и др.), что позволяет использовать эти природные соединения в антиоксидантной терапии в качестве антистрессоров. Высокое содержание таких метаболитов у изученного сорта, их пищевая и фармакологическая ценность обуславливают его перспективность для применения в пищевых и лекарственных технологиях на основе создания нетоксичных антиоксидантных пищевых добавок, функциональных продуктов (чаев, натуральных красителей, безалкогольных витаминных напитков, кондитерских начинок) и фитопрепаратов на основе листьев и экстрактов из листьев.

ФГБНУ Федеральный научный центр овощеводства,
143080 Россия, Московская обл., Одинцовский р-н,
пос. ВНИИССОК, ул. Селекционная, 14,
e-mail: anirr@bk.ru;

Поступила в редакцию
8 июля 2017 года

²ФГБНУ Всероссийский селекционно-технологический
институт садоводства и питомниководства,
115598 Россия, г. Москва, ул. Загорьевская, 4

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2017, V. 52, № 5, pp. 1030-1040

METABOLITES WITH ANTIOXIDANT AND PROTECTIVE FUNCTIONS FROM LEAVES OF VEGETABLE AMARANTH (*Amaranthus tricolor* L.)

M.S. Gins¹, V.K. Gins¹, S.M. Motyleva², I.M. Kulikov², S.M. Medvedev²,
V.F. Pivovarov¹, M.E. Mertvishcheva²

¹Federal Research Center for Vegetable Growing, Federal Agency of Scientific Organizations, 14, ul. Selektionnaya, pos. VNISSOK, Odintsovskii Region, Moscow Province, 143080 Russia, e-mail anirr@bk.ru (corresponding author);

²All-Russian Horticultural Institute for Breeding, Agrotechnology and Nursery, Federal Agency of Scientific Organizations, 4, ul. Zagor'evskaya, Moscow, 115598 Russia

ORCID:

Gins M.S. orcid.org/0000-0001-5995-2696

Pivovarov V.F. orcid.org/0000-0003-1350-5852

Gins V.K. orcid.org/0000-0002-7053-4345

Mertvishcheva M.E. orcid.org/0000-0001-9126-747X

Motyleva S.M. orcid.org/0000-0003-3399-1958

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The research was carried out under the theme № 0575-2017-0001 supported by the program of Federal Agency of Scientific Organizations for bioresource collections

Received July 8, 2017

doi: 10.15389/agrobiol.2017.5.1030eng

Abstract

Antioxidant metabolites of plant origin are able to regulate many physiological functions of the body and reduce the risk of developing chronic diseases caused by free radical oxidation. Vegetable plants are the most affordable source of essential antioxidant metabolites lack of which leads to a sharp decrease in resistance to environmental stresses. Amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) is a promising

food and medicinal plant. Variety Valentina (originated by V.K. Gins, P.F. Kononkov, M.S. Gins, All-Russian Research Institute of Breeding and Seed Production of Vegetable Crops) was successfully introduced and grown in several Russian regions. Our objective was to study the composition and content of low-molecular biologically active antioxidant metabolites that determine the nutritional and pharmacological value of amaranth leaves, and to assess the main antioxidant accumulation in plant organs under the conditions of the Moscow Region. For analysis, fresh and dried leaves (juvenile, those with a formed blade, and old ones), inflorescences, stems, veins, petioles and roots were used. Amaranthine, reduced ascorbic acid, and total antioxidant content was measured in water and ethanol extracts from fresh and dry leaves and plant organs. Also, simple phenols and oxybenzoic acids, flavonoids, condensed and polymeric polyphenols were assayed. Chlorogenic, gallic, ferulic acids and arbutin content was determined in aqueous extract by high performance liquid chromatography (HPLC). The metabolites were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). It was shown that actively photosynthesizing leaves with a fully formed blade predominantly accumulated ascorbic acid, while in the aging leaves its amount decreased. Veins, petioles and stems contained substantially less metabolites with antioxidant activity compared to leaves. In aqueous extracts, the main betacyanins were amaranthine and iso-amarantine. Chromatography of aqueous extracts from amaranth leaves showed the presence of highly active antioxidants, e.g. arbutin-glucoside hydroquinone and oxycinnamic acids including ferulic, chlorogenic, oxybenzoic (gallic) acids. In the tests, gallic acid concentration was 1.51 µg/100 ml, chlorogenic acid concentration was 2.05 µg/100 ml, ferulic acid concentration was 0.01 µg/100 ml, and arbutin concentration was 472.51 µg/100 ml. Water-extracted squalene (C₃₀H₅₀), a powerful antioxidant usually isolated from amaranth seeds only, was first discovered in amaranth leaves. Ethanol extraction revealed a greater number of the colored components in the spectral range of the 350-700 nm, in addition, gallic, chlorogenic and ferulic acids were found. A total of 37 low-molecular metabolites were identified by gas chromatography-mass spectrometry. Our findings indicate that vegetable amaranth, as a promising reproducible source of antioxidants, can be used in functional foods and phytobiologicals.

Keywords: amaranth, *Amaranthus tricolor* L., Valentina variety, low-molecular antioxidant metabolites, amaranthine, ascorbic acid, phenolic compounds.

REFERENCES

- Berberich S. History of amaranth. *Agriculture Research*, 1980, 29(4): 14.
- Zheleznov A.V. *Khimiya i zhizn'*, 2005, 6: 56-61 (in Russ.).
- Rastogi A., Shukla S. Amaranthus: a new millennium crop of nutraceutical values. Critical reviews in food science and nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2013, 53: 109-125 (doi: 10.1080/10408398.2010.517876).
- Baral M., Datta A., Chakraborty S., Chakraborty P. Pharmacognostic studies on stem and leaves of *Amaranthus spinosus* Linn. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2011, 2: 41-47.
- Gins M.S., Gins V.K., Pivovarov V.F., Kononkov P.F., Derkanosova N.M. *Vestnik Rossijskoi sel'skokhozyaistvennoi nauki*, 2017, 2: 3-5 (in Russ.).
- Kavita P., Puneet G. Rediscovering the therapeutic potential of *Amaranthus* species: a review. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2017, 4: 196-205 (doi: 10.1016/j.ejbas.2017.05.001).
- Rahmatullah M., Hosain M., Rahman S., Akter M., Rahman F., Rehana F., Munmun M., Kalpana M.A. Antihyperglycemic and antinociceptive activity evaluation of methanolic extract of whole plant of *Amaranthus tricolor* L. (*Amaranthaceae*). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 2013, 408(10): 11.
- Clemente A.C., Desai P.V. Evaluation of the hematological, hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant properties of *Amaranthus tricolor* leaf extract in Rat. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2011, 10: 595-602.
- Al-Dosari M.S. The effectiveness of ethanolic extract of *Amaranthus tricolor* L.: a natural hepatoprotective agent. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2010, 38: 1051-1064 (doi: 10.1142/S0192415X10008469).
- Aneja S., Vats M., Aggarwal S., Sardana S. Phytochemistry and hepatoprotective activity of aqueous extract of *Amaranthus tricolor* Linn. roots. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 2013, 4(4): 211-215 (doi: 10.4103/0975-9476.123693).
- Devaraj V.C., Krishna B.G. Gastric antisecretory and cytoprotective effects of leaf extracts of *Amaranthus tricolor* Linn. in rats. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 2011, 9(9): 1031-1038.
- Gins M.S., Bodyagin D.A., Kononkov P.F., Isakova E.B., Gins V.K., Bukhman V.M. *Protivoopukholevoe sredstvo. Patent RU 2 377 008 C2. VNISSOK (RF). Zayavl. 18.12.2007. Opubl. 27.12.2009. Byul. № 36* [Antitumor agent. Patent RU 2 377 008 C2. VNISSOK (RF). Appl. December 18, 2007. Publ. December 27, 2009. Bul. № 36] (in Russ.).
- Tharun Rao K.N., Padhy S.K., Dinakaran S.K., Banji D., Avasarala H., Ghosh S., Prasad M.S. Pharmacognostic, phytochemical, antimicrobial and antioxidant

- activity evaluation of *Amaranthus tricolor* Linn. leaf. *Asian Journal of Chemistry*, 2012, 24(1): 455-460.
14. Pulipati S., Babu P.S., Narasu M.L. Quantitative determination of tannin content and evaluation of antibacterial activity of *Amaranthus tricolor* (L). *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, 2014, 5(7): 623-626.
 15. Lokhov P.G., Archakov A.I. *Biomeditsinskaya khimiya*, 2008, 54(5): 497-511 (in Russ.).
 16. Sosipatrova A.A., Osipov V.I., Demina I.B., Bykov V.A. *Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii*, 2011, 3: 23-29 (in Russ.).
 17. Biswas M., Dey S., Sen R. Betalains from *Amaranthus tricolor* L. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2013, 1(5): 87-95.
 18. Sapozhnikov A.B. *Trudy Mordovskogo gosudarstvennogo universiteta*, 1966, 55-57 (in Russ.).
 19. Gins M.S., Gins V.K., Kononkov P.F., Baikov A.A., Torres M.K., Romanova E.V., Lapo O.A. *Metodika analiza summarnogo sodержaniya antioksidantov v listovykh i listostebel'nykh ovoshchnykh kul'tur* [Analysis of total antioxidants in leaf and leaf stem vegetables]. Moscow, 2013 (in Russ.).
 20. Gins M.S., Gins V.K., Kolesnikov M.P., Kononkov P.F., Chekmarev P.A., Kagan M.Yu. *Metodika analiza fenol'nykh soedinenii v ovoshchnykh kul'turakh* [Analysis of phenolic compounds in vegetable crops]. Moscow, 2010 (in Russ.).
 21. Robbins R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51: 2866-2887 (doi: 10.1021/jf026182t).
 22. Kolesnikov M.P., Gins V.K. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2001, 37(4): 457-465 (in Russ.).
 23. Bihani G.V., Bodhankar S.L., Kadam P., Zambare G.N. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extract of leaves of *Amaranthus tricolor* L. *Scholars Research Library, Der Pharmacia Lettre*, 2013, 5(3): 48-55.
 24. Abisalova I.L., Nazarova L.E., Ogurtsov Yu.A. *Radioprotektornye svoistva ferulovoi kisloty* [Radioprotective effect of ferulic acid]. Pyatigorsk, 2003 (in Russ.).
 25. Shkarina E.I., Maksimova T.V., Lozovskaya E.A., Chumakova Z.V., Pakhomov V.P., Sapezhinskii I.I., Arzamastsev A.P. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*, 2001, 35(6): 40-47 (in Russ.).
 26. Shmal'ko N.A., Roslyakov Yu.F. *Amarant v pishchevoi promyshlennosti* [Amaranth in food industry]. Krasnodar, 2011 (in Russ.).
 27. Aver'yanov A.A., Lapikova V.P. *Biokhimiya*, 1989, 54: 1646-1651 (in Russ.).
 28. Sin'kevich M.S., Deryabin A.N., Trunova T.I. *Fiziologiya rastenii*, 2009, 56(2): 186-192 (in Russ.).
 29. Sin'kevich M.S., Sabel'nikova E.P., Deryabin A.N., Astakhova N.V., Dubinina I.M., Burokhanova E.A., Trunova T.I. *Fiziologiya rastenii*, 2008, 55(4): 501-506 (in Russ.).
 30. Morelli R., Russo-Volpe S., Bruno N., Lo Scalzo R. Fenton-depended damage to carbohydrates: free radical scavenging activity of some simple sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51: 7418-7425.
 31. Chandan K.S., Savita K., Sashwati R. Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols. *Life Sciences*, 2006, 78(18): 2088-2098 (doi: 10.1016/j.lfs.2005.12.001).