



УДК 543.544.52:615.322

Определение антоцианов лепестков цветков тюльпанов способом обращенно-фазовой ВЭЖХ

Дейнека В.И.¹, Кульченко Я.Ю.¹, Дейнека Л.А.¹,
Чулков А.Н.², Селеменев В.Ф.³

¹ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
Белгород

²ФГБУ Белгородский филиал «Центр оценки качества зерна и продуктов его переработки», Белгород

³ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 10.02.2016 г.

В работе методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с масс-спектрометрическим и с диодно-матричным (спектрофотометрическим) детектированием и с привлечением литературных данных определен набор антоцианов, обеспечивающих окраску лепестков цветков тюльпанов сортов доступных на рынке цветов. Установлено, что основой антоциановых комплексов являются 3-рутинозиды и продукты их ацилирования уксусной кислотой по положениям 2''' и 3''' трех антоцианидинов: дельфинидина, цианидина и пеларгонидина, - в соотношениях, зависящих от окраски. Для идентификации предложен вариант корреляционного анализа параметров удерживания веществ сходственных рядов. На основе параметров линий трендов антоцианов на карте разделения выявлены особенности хроматографического поведения антоцианов и их спектральных свойств, как следствие особенности конформационных состояний антоцианов в сорбционном слое.

Ключевые слова: обращенно-фазовая ВЭЖХ, антоцианы, тюльпаны, особенности удерживания, корреляционный анализ, сходственные ряды, карта разделения.

Determination of tulip flower anthocyanins by reversed-phase HPLC

Deineka V.I.¹, Kulchenko Ya.Yu.¹, Deineka L.A.¹,
Chulkov A.N.², Selemenev V.F.³

¹Belgorod National Research University, Russia, Belgorod

²Belgorod Branch of Federal State-Funded Institution «Federal Centre of Quality and Safety Assurance for Grain and Grain products», Belgorod

³Voronezh State University, Voronezh

Reversed-phase HPLC with mass spectrometric and diode array detection as well as some literature data were used to reveal the individual types of solutes in anthocyanin complexes of tulip flower petals that are responsible for tulip flower petals coloration of the samples available in the local flower market. It has been found that the main components of the complexes are 3-rutinosides and their 2''' and 3''' acylated with acetic acid derivatives of the three anthocyanidins - delphinidin, cyanidin and pelargonidin in the color dependent ratios, though trace quantities of 3-glucosides were found in some cases. For the anthocyanin structure confirmation a correlation analysis of solute retentions of cyanidin or pelargonidin derivatives vs that of delphinidin was proposed based upon equivalence of structures alteration in the solute pairs for each series. The specificity of solutes retention modes was revealed by relative retention analysis, the trend parameters reflected particularities of chromatographic behavior as well as that of electron spectra of the solutes. The difference of acylated anthocyanins retentions was proposed to disclose the conformation states of solutes in the sorbent interface.

Keywords: reversed-phase HPLC, anthocyanins, tulip, retention particularities, correlation analysis, similarities series, separation map.

Введение

Тюльпаны относятся к очень популярным декоративным весенним раноцветущим растениям. Их первое упоминание в Западной Европе датируется серединой XVI-го века. Поэтому не удивительно, что антоцианы цветков этого растения были в числе первых объектов исследований будущего лауреата Нобелевской премии Вильштеттера [1]. Но лишь в 1956 году из лепестков цветков были выделены в кристаллическом состоянии 3-рамнозилглюкозиды (рутинозиды) дельфинидина и цианидина. Затем было выделено аналогичное производное пеларгонидина вместе в 3-глюкозидами трех антоцианидинов [1]. Длительное время основным методом разделения и выделения антоцианов была тонкослойная (в том числе и бумажная) хроматография [1-4]. И только к концу XX-го века стали использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию [4-8], но по странной традиции хроматограммы в публикациях обычно не приводят, поэтому оценить качество разделения и полноту определения состава сложных комплексов невозможно. Суммируя известные литературные данные можно заключить, что окраска лепестка зависит от набора и соотношения антоцианов и может отличаться у основания листовой пластинки и его верхней (основной) части. Антоциановый состав тычинок значительно отличается от состава лепестков. В целом, по литературным данным, в лепестках различных сортов тюльпанов обнаружены 3-рутинозиды и 3-рутинизиды, ацилированные уксусной кислотой по положениям 2 или 3 рамнозильного радикала трех антоцианидинов – пеларгонидина, цианидина и дельфинидина, рис. 1. Известны также сообщения об определении 3-глюкозидов [5] этих же антоцианидинов.

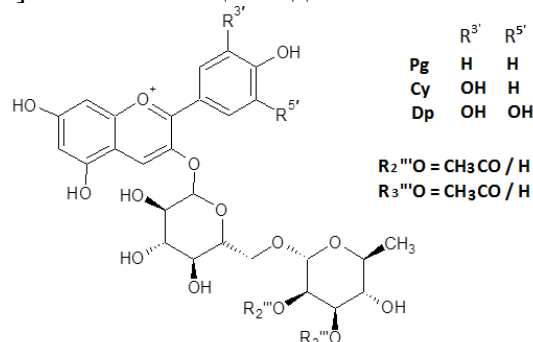


Рис.1. Строение основных антоцианов лепестков цветков бархатцев

Цель настоящей работы – определение антоцианов в цветках современных сортов тюльпанов и оценка возможности ВЭЖХ для разделения всех возможных компонентов.

Эксперимент

Разделение осуществляли на оборудовании Agilent 1200 Infinity с диодноматричным и масс-спектрометрическим детекторами. В работе использовали хроматографические колонки: 250×4.6 мм Symmetry C18 (5 мкм) – для серийных исследований и 150×2.1 мм Kromasil 100-5C18 – при масс-спектрометрическом детектировании. Мертвое время определяли по урацилу. Хроматограммы регистрировали и обрабатывали программой ChemStation.

Для элюирования использовали элюент: 10 об. % HCOOH и 8 об. % CH₃CN в воде. При построении карты разделения использовали изократические режимы для четырех элюентов, в которых постоянным оставалось содержание муравьиной кислоты (10 об. %), а содержание ацетонитрила и воды составляло 4 и 86, 6 и 84, 8 и 82, 10 и 80 об. %, соответственно. Во всех случаях скорость подачи подвижной фазы была постоянной – 1 мл/мин, а температура термостата колонки 40°C. Лепестки цветков сушили в лабораторном суховоздушном термостате ТС 1/20 СПУ при 30°C.

Экстракты готовили настаиванием свежих или высушенных лепестков цветков в 0.1 М водном растворе HCl. Перед хроматографированием экстракты, отделенные от остатка фильтрованием через бумажный фильтр, очищали методом твердофазной экстракции на концентрирующих патронах Диапак С18 (БиохимМак СТ, Москва) [9].

Обсуждение результатов

Хроматограммы экстрактов некоторых исследованных в настоящей работе образцов приведены на рис. 2. Они показывают зависимость составов антоциановых комплексов цветков от их окраски, табл. В состав каждого образца входит набор из трех гликозилированных антоцианидинов: дельфинидина (Dp), цианидина (Cy) и пеларгонидина (Pg). Следовательно, в биосинтезе антоцианов принимают участие флавонол-3'-гидроксилаза и флаванол-3'.5'-гидроксилаза, причем степень активности этих ферментов весьма различна для различных сортов (окрасок) цветков, и не проявляется активность метилтрансферазы.

Среди всех антоцианов в качестве основных, но в различных соотношениях в зависимости от сорта цветка, обнаруживаются 3-рутинозиды, включая 3-рутинозиды, ацилированные уксусной кислотой. Кроме них на хроматограммах можно обнаружить несколько минорных пиков, к которым относятся 3-глюкозиды цианидина и пеларгонидина. В полном соответствии с литературными данными [5] состав антоцианов интенсивно окрашенных тычинок заметно отличается от состава антоцианов лепестков этого же цветка. Отсутствие на хроматограммах на рис. 2 пика дельфинидин-3-глюкозида для использованного при записи «быстрого» элюента не удивительно, поскольку в данных условиях не разделяются дельфинидин-3-глюкозид и дельфинидин-3-рутинозид.

Для идентификации соединений, в том числе и антоцианов [10], широко использовали параметры электронных спектров [11]. Но в настоящее время на электронные спектры соединений внимание почти не обращают, несмотря на возможность их записи непосредственно в измерительной кювете диодно-матричного детектора. В ВЭЖХ это объясняется широким использованием градиентного режима элюирования, при котором каждое вещество попадает в кювету в растворе с различным составом, и вследствие сольватохромных эффектов [12] лишается смысла не только простое сопоставление спектров, но и метод внутренней нормировки. В то же время при использовании изократического режима такое сравнение не только возможно, но и весьма информативно. Так, все вещества, обозначенные на рис. 2, можно легко разделить на три ряда производных по положению максимума абсорбции: производные дельфинидина ($\lambda_{\max} \sim 526$ нм), цианидина (~ 517 нм) и пеларгонидина (~ 507 нм).

Таблица. Антоцианы экстрактов лепестков цветков тюльпанов различной окраски

	Dp*	Dp**	Dp***	Cy3'	Cy*	Cy**	Cy***	Pg3'	Pg*	Pg**	Pg***
t _R . МИН	4.91	6.12	10.76	6.08	6.86	8.6	14.13	8.16	9.3	11.46	17.66
λ _{max} . НМ	526.5	524.5	526.5	-	517.5	515.0	517.5	-	503.5	501.5	503.5
M/z	611.2	653.2	653.2	-	637.2	695.2	695.2	-	579.2	621.2	621.2
Доля по площадям пиков. %											
Свежие лепестки											
1	94.1	-	0.2	-	4.2	-	-	-	0.3	-	-
2	1.7	-		2	20.8	0.2	18.6	1.2	15.9	0.5	36.5
2*	48.7	15.1	27.9	-	2.2	1.5	2.3	-	-	-	0.3
3	7.8	0.8	2.2	-	55.1	0.9	12.6	-	10.9	0.5	9
4	7.8	1.6	1.1	-	30.6	0.3	6.2	0.6	30.6	1	15.2
5	0.2	-	0.1	-	9.3	1.6	7.2	-	22.1	9.2	49.3
6	7.6	1.6	1.2	-	35.4	0.3	6	-	31.3	1	14.9
7	35.9	4.1	5.5	-	14.1	1.8	5.1	-	10.6	2.6	20.2
После сушки											
4	3.6	3.1	0.8	-	53.7	8.2	29.4	-	0.4	-	0.4
5	-	-	-	-	10.9	2.4	5.6	-	26.6	14.4	38.6
6	9.7	1.8	1.3	-	35.2	2.4	3.8	-	30.1	5.7	8.7

* - 3-Rut, ** - 3-(3'''AcRut), *** - 3-(2'''AcRut), ' - 3-Glu; Dp – дельфинидин; Cy - цианидин; Pg - пеларгонидин. Окраска лепестков цветка: 1 – фиолетовый; 2 – красный; 2* - тычинки; 3 – бордо; 4 – красный с желтой бахромой; 5 – красный; 6 – красный с желтыми краями; 7 – фиолетовое пятно в начале лепестка цветка 2.

Положение ацилирования доказано в серии работ [7-8], поэтому и было принято в настоящей работе. Данные, полученные при таком допущении, показывают, что ацилирование по положению 2''' практически не приводит к изменению параметров электронных спектров трех исследованных в работе 3-рутинозидов, рис.3. С одной стороны, это не удивительно, поскольку рутинозный фрагмент не сопряжен с хромофорной группировкой флавилиевой основы. Но с другой стороны, возможно локальное изменение электрических полей, создаваемых полярными группами углеводных радикалов, что может привести к ситуации, аналогичной сольфатохромным эффектам. Так, по этой причине при переходе от 3-глюкозидов к 3-рутинозидам всегда наблюдается небольшое (1÷1.5 нм) батохромное смещение максимума абсорбции для любых антоцианидинов [13].

В соответствие с литературными данными [5] антоциановый комплекс интенсивно окрашенных тычинок имеет одну особенность – в нем относительно велика доля, приходящаяся на дельфинидин-3-рутинозид, ацилированный по положению 3''' (при присутствии в смеси и антоцианов, ацилированных по положению 2'''). Такой изомер, имеющий меньшее удерживание (по сравнению с изомером, ацилированным в положение 2''') был обнаружен и в настоящей работе, рис. 2. Более того, этот изомер и его аналоги для цианидина и пеларгонидина детектируются во всех экстрактах лепестков цветков, хотя и в небольших количествах. Для обнаружения таких изомеров в настоящей работе использовали вариант корреляционного анализа, по которому:

а) по оси OX откладываются логарифмы факторов удерживания дельфинидин-3-рутинозида, и продуктов его ацилирования по положениям 3''' и 2''';

б) по оси OY откладываются логарифмы факторов удерживания аналогичных производных цианидина (ряд 1) и пеларгонидина (ряд 2);

в) анализируется расположение точек для однотипных производных в первом ряду и во втором ряду: эти точки должны принадлежать прямой линии, как данные для трех вариантов одинаковой замены основы, рис.4. Нелинейность на такой корреляционной диаграмме может свидетельствовать об ошибках в отнесении пиков на хроматограмме. Справедливость отнесения может быть подтверждена сопоставлением электронных спектров для веществ одного ряда: при смене положения ацилировании с 2''' на 3''' не только уменьшается удерживание, но и происходит небольшой гипсохромный сдвиг полосы абсорбции, рис.3.

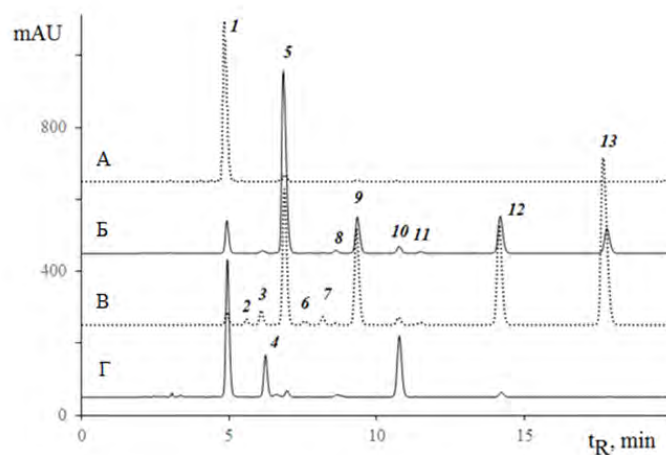


Рис. 2. Разделение антоцианов цветков тюльпанов

Колонка: 250×4.6 мм Symmetry C18. 5 мкм. Подвижная фаза: вода – муравьиная кислота – ацетонитрил (82:10:8 об.). 1 мл/мин. Запись хроматограммы при 515 нм. Образцы экстрактов: А – фиолетовый (тюльпан 1 из табл.1), Б – бордо (тюльпан 3 из табл.1), В – красный (тюльпан 2 из табл.1), Г – тычинки (тюльпана 2). Вещества: 1 – Dp3Rut; 2 – Cy3Gly; 3 – Cy3Glu; 4 – Dp3(3'''AcRut); 5 – Cy3Rut; 6 – Pg3Gly; 7 – Pg3Glu; 8 – Cy3(3'''AcRut); 9 – Pg3Rut; 10 – Dp3(2'''AcRut); 11 – Pg3(3'''AcRut); 12 – Cy3(2'''AcRut); 13 – Pg3(2'''AcRut)

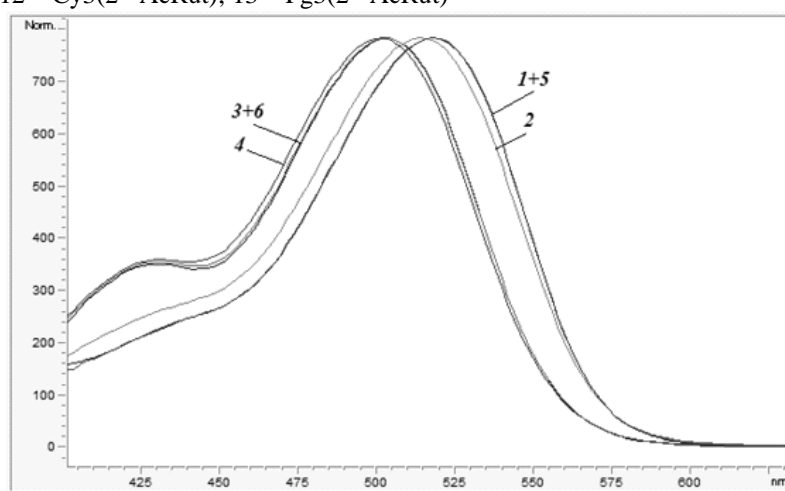


Рис. 3. Электронные спектры производных цианидина и пеларгонидина, записанные в изократических условиях

Подвижная фаза: 10 об. % HCOOH и 8 об. % CH₃CN в воде. Электронные спектры соединений: 1 – Cy3Rut; 2 – Cy3(3'''AcRut); 3 – Cy3(2'''AcRut); 4 – Pg3Rut; 5 – Pg3(3'''AcRut); 6 – Pg3(2'''AcRut)

Отметим, что в таких диаграммах не следует ожидать одинакового изменения удерживания при замене, например, дельфинидина на цианидин для всех типов сходственных структур. Равенство вкладов функциональных групп (как следствие одинакового изменения энтальпии сольватации) лежало в основе почти всех иссле-

дований зависимости удерживания анализов от введенных функциональных групп [14]. Но это предположение неверно, поскольку не учитывается изменение энтропийных факторов [15].

Антоциановый состав лепестков цветков тюльпанов может включать по три производных каждого из трех «базовых» антоцианидинов, в которых отсутствует метилирование гидроксильных групп в кольце В. Для разделения девяти компонентов в условиях обращенно-фазовой хроматографии необходим выбор подвижной фазы, исключающей соэлюирование каких-либо пар веществ. Эта задача решается анализом карт разделения, рис. 4-5, построенных по методу относительного анализа [16]. Как следует из представленных данных, только одна пара соединений не будет разделена в медленном элюенте, хотя проблемы в отделении 3-глюкозидов (не указаны на карте) от 3-рутинозидов остаются.

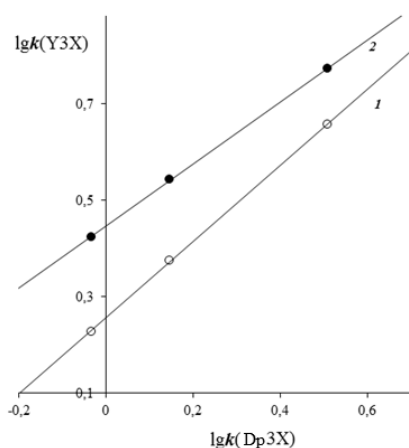


Рис. 4. Корреляционный анализ удерживания антоцианов
Производные: 1 – цианидина;
2 – пеларгонидина

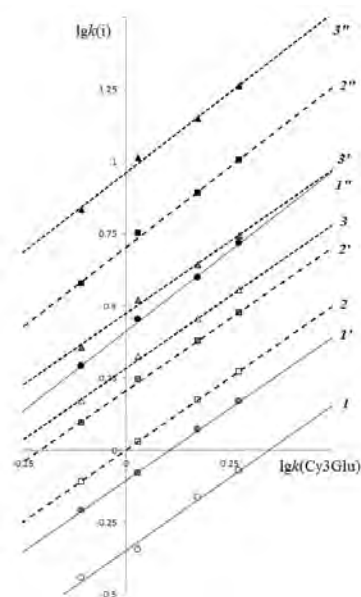


Рис. 5. Карта разделения основных антоцианов лепестков цветков тюльпанов
Вещества: 1 – Dp3Rut; 1' – Dp3(3'''AcRut); 1'' – Dp3(2'''AcRut); 2 – Cy3Rut; 2' – Cy3(3'''AcRut); 2'' – Cy3(2'''AcRut); 3 – Pg3Rut; 3' – Pg3(3'''AcRut); 3'' – Pg3(2'''AcRut)

На карте разделения тангенсы углов наклона для шести соединений близки к единице: 1.006 и 0.993 для Dp3Rut и для Dp3(3'''AcRut), соответственно. 1.000 и 0.992 для Cy3Rut и для Cy3(3'''AcRut). 0.996 и 0.996 для Pg3Rut и для Pg3(3'''AcRut). Это свидетельствует о примерно равной липофильности 3-рутинозидов трех антоцианидинов между собой – наблюдается лишь с небольшим ростом этого параметра в ряду Pg – Cy – Dp в соответствии с ростом числа атомов в молекуле, т.е. с ростом числа дисперсионных взаимодействий «сорбат – сорбент». При переходе к антоцианидин-3(3'''AcRut) этот параметр несколько даже уменьшается, что указывает на уменьшение суммы дисперсионных взаимодействий, несмотря на добавление новых атомов в структуру, вследствие конформационных особенностей антоцианов в сорбированном состоянии. При этом переход к антоцианидин-3(2'''AcRut) во всех случаях сопровождается почти 10%-ным ростом этого параметра, что можно интерпретировать как возможность прямого контакта метильной группы ацильного радикала с привитой стационарной фазой в сорбционном слое. Именно такие особенности строения веществ отвечают и за различие в хроматографическом поведении двух

изомеров ацилированных 3-рутинозидов: удерживание R3(2''Rut) всегда существенно выше, чем удерживание R3(3''Rut) в условиях обращенно-фазовой хроматографии для любых антоцианидинов. Различия в строении конформаций изомерных углеводных радикалов (но не флавиевой основы) в сорбционном слое определяют селективность разделения изомеров в соответствии с «поплавочным» механизмом удерживания [17] гликозидов антоцианидинов.

Важным результатом проведенной работы стало то, что при сушке лепестков цветков заметно изменяется антоциановый состав растительного материала, табл. Это связано с разрушением антоцианов, - по предварительным данным потери могут достигать 10÷30 %. Следовательно, для увеличения выхода антоцианов желательно исключить сушку из технологических стадий.

Заключение

Таким образом, обращенно-фазовая ВЭЖХ является эффективным способом определения 9-ти компонентов антоцианового комплекса цветков тюльпанов при их совместном присутствии. При этом ацилирование 3-рутинозидов трех антоцианидинов (дельфинидина, цианидина и пеларгонидина) уксусной кислотой по положению 2 рамнозильного радикала приводит к большему росту удерживания по сравнению с направлением ацилирования по положению 3 того же фрагмента.

Список литературы

1. Halevy A.H. // *Biochem. J.* 1962. Vol. 83. p.p. 637.
2. Halevy A.H., Asen S. // *Plant Physiol.* 1959. Vol. 34. pp. 494-499.
3. Shibata M., Ishikura N. // *Naturwissenschaften.* 1959. Vol. 46. pp. 601-601.
4. Van Eijk J.P., Nieuwhof M., Van Keulen H.A., Keijzer P. // *Euphytica.* 1987. Vol. 36. pp. 855-862.
5. Makayama M. et al. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1999. Vol. 63. pp. 1509-1511.
6. Torskangerpoll K., Fossen T., Andersen Ø.M. // *Phytochem.* 1999. Vol. 52. pp. 1687-1692.
7. Makayama M. et al. // *JARO.* 2004. Vol. 38. pp. 185-190.
8. Torskangerpoll K. et al. // *Biochem. System. Ecol.* 2005. Vol. 33. pp. 499-510.
9. Дейнека В.И. и др. // *Химия растительного сырья.* 2014. № 4. С. 163-168.
10. Harborne J.B. // *Biochem. J.* 1958. Vol. 70. pp. 22-28.
11. Pretsch E., Bühlmann P., Badertscher M. *Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2009. pp. 401-420.
12. Дейнека Л.А. и др. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2009. Т. 9. Вып.4. С. 529-536.
13. Дейнека Л.А. и др. // *Научн. ведомости БелГУ, С. Естеств. науки.* 2011. № 9 (104). Выпуск 15/2. С. 271-276.
14. Retention and selectivity in liquid chromatography. Prediction, standardisation and phase comparisons. (Journal of Chromatography library. Vol. 57). Ed. by Roger M. Smith. 1995 Elsevier Science B.V. 462 p.
15. Дейнека В.И. // *Сорбционные и хроматографические процессы* 2007. Т. 7. Вып. 2. С. 236-243.
16. Дейнека В.И. // *Ж. физ. химии.* 2006. Т. 80. № 3. С. 511-516.
17. Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Саенко И.И., Чулков А.Н. // *Ж. физ. химии.* 2015. Т. 89. С. 1172-1177.

References

1. Halevy A.H., *Biochem. J.*, 1962, Vol. 83, pp. 637.
2. Halevy A.H., Asen S. , *Plant Physiol.*, 1959, Vol. 34, pp. 494-499.

3. Shibata M., Ishikura N., *Naturwissenschaft*, 1959, Vol. 46, pp. 601-601.
4. Van Eijk J.P., Nieuwhof M., Van Keulen H.A., Keijzer P., *Euphytica*, 1987, Vol. 36, pp. 855-862.
5. Makayama M. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1999, Vol. 63, pp. 1509-1511.
6. Torskangerpoll K., Fossen T., Andersen Ø.M., *Phytochem.*, 1999, Vol. 52, pp. 1687-1692.
7. Makayama M. et al., *JARO*, 2004, Vol. 38, pp. 185-190.
8. Torskangerpoll K. et al., *Biochem. System. Ecol.*, 2005, Vol. 33, pp. 499-510.
9. Deineka V.I. et al., *Himiya Rastitelnogo Syr'a.*, 2014, No 4, pp. 163-168.
10. Harborne J.B., *Biochem. J.*, 1958, Vol. 70, pp. 22-28.
11. Pretsch E., Bühlmann P., Badertscher M., *Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2009, pp. 401-420.
12. Deineka L.A. et al., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2009, Vol. 9, No 4, pp. 529-536.
13. Deineka L.A. et al., *Nauchnye Vedomosti BelGU. Estestvennye Nauki*, 2011, Vol. 9(104), No 15(2), pp. 271-276.
14. Retention and selectivity in liquid chromatography. Prediction, standardisation and phase comparisons. (Journal of Chromatography library. Vol. 57). Ed. by Roger M. Smith. 1995 Elsevier Science B.V. 462 p.
15. Deineka V.I., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2007, Vol. 7, pp. 236-243.
16. Deineka V.I., *Russian J. Phys. Chem.*, 2006, Vol. 80, pp. 429-434.
17. Deineka V.I., Deineka L.A., Saenko I.I., Chulkov A.N., *Russian J. Phys. Chem. A*, 2015, Vol. 89, pp. 1300-1304.

Дейнека Виктор Иванович - д.х.н., профессор, профессор кафедры общей химии Института инженерных технологий и естественных наук Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород

Дейнека Людмила Александровна - к.х.н., доцент, доцент кафедры общей химии Института инженерных технологий и естественных наук Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород

Селеменев Владимир Федорович – д.х.н., профессор кафедры аналитической химии, химический факультет, Воронеж

Чулков Андрей Николаевич – сотрудник Белгородского филиала «Центр оценки качества зерна и продуктов его переработки», Белгород

Кульченко Ярослава Юрьевна – магистрант института инженерных технологий и естественных наук Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород

Deineka Victor I. - Dr. Sci.(Chemistry) Prof., Common Chemistry Chair of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences of Belgorod National Research University, Belgorod, e-mail: deineka@bsu.edu.ru

Deineka Ludmila A. - Ph.D., Professor assistant of Common Chemistry Chair of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences of Belgorod National Research University, Belgorod

Selemenev Vladimir V. – doctor of science, professor, head of Department of analytical chemistry, chemical faculty, Voronezh State University, Voronezh

Chulkov Andrey N. – Belgorod Branch of Federal State-Funded Institution «Federal Centre of Quality and Safety Assurance for Grain and Grain products», Belgorod, E-mail: Ach87@mail.ru.

Kulchenko Yaroslava Yu. – graduate student of Institute of Engineering Technology and Natural Sciences, Belgorod State National Research University, Belgorod