

Определение видового состава антоцианов цветков *Catharanthus*

***В.И. Дейнека¹, Я.Ю. Кульченко¹, А.Н. Сидоров¹, И.П. Блинова¹,
С.М. Варушкина¹, Л.А. Дейнека¹, Ань Тхи Нгок Ву²**

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Российская Федерация, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

²Российский университет дружбы народов,
Российская Федерация. 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

*Адрес для переписки: Дейнека Виктор Иванович, E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 3 июля 2018 г, после доработки – 14 сентября 2018 г.

С использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием исследован видовой состав антоцианов цветков *Catharanthus roseum*. После кислотного гидролиза антоцианов по характерному изменению электронных спектров поглощения и по изменению удерживания было установлено, что все пять антоцианидинов цветков фиолетового цвета отличаются от пяти наиболее часто встречающихся в природе (в виде гликозидов) антоцианидинов однотипным дополнительным метилированием. Направление метилирования по гидроксильной группе в положении 7 флавилиевого скелета было определено при анализе изменения параметров электронных спектров поглощения; таким образом, антоцианы цветков катарантуса построены на пяти необычных антоцианидинах, – являясь производными 7-метилдельфинидина, 7-метилцианидина, 7-метилпетунидина, 7 метилпеонидина (розинидина) и 7 метилмальвидина (хирсутидина). Сопоставление масс-спектрометрических данных, электронных спектров поглощения и параметров удерживания антоцианов цветков *Catharanthus roseum* указывают на присутствие в экстрактах лепестках цветков 3-рамозилгалактозидов указанных антоцианидинов, к которым добавляются (в меньшем количестве) 3-галактозиды.

Ключевые слова: антоцианы, 7-метилованные антоцианы, обращенно-фазовая ВЭЖХ,

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2019, vol. 23, no. 1, pp. 103–109

DOI: 10.15826/analitika.2019.23.1.001

Determination of *Catharanthus* flower anthocyanins

***V.I. Deineka¹, Y.Y. Kulchenko¹, A.N. Sidorov¹, I.P. Blinova¹, S.M. Varushkina¹,
L.A. Deineka¹, Anh Thi Ngoc Vu²**

¹Belgorod National Research University, Pobeda str., 85, Belgorod, 308015, Russian Federation

²RUDN University, Miklukho-Maklaya str. 6, Moscow, 117198, Russian Federation

*Corresponding address: Victor I. Deineka, E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Submitted 03 July 2018, received in revised form 14 September 2018

Using the reversed phase high performance liquid chromatography with diode-array and mass-spectrometric (in ESI mode) detection, a composition of *Catharanthus roseum* petals was established. After the acid hydrolysis, all five anthocyanidins were found to be different comparing to the ordinary anthocyanidins from *Vitis vinifera* fruits. The anthocyanins were elucidated to be 7-O-methyl derivatives of delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin and malvidin by the analysis of retention in RP HPLC, mass- and UV-visible spectra. The anthocyanins were characterized with UV-visible spectra, having the same fixtures as the set of non-methylated (in position 7) anthocyanin with hypsochromic (4 nm) of spectral maxima. The absorption bands for 7-methylcyanidin and 7-methylpeonidin aglycons and derivatives were indistinguishable while for the set of 7-methyl delphinidin, 7-methylpetunidin and 7-methylmalvidine (hirsutidin) a consecutive shift of absorption maxima by approximately 1 – 1.5 nm was found. The same was true for non-methylates at position 7 derivatives. The analysis of retention of anthocyanins of the flowers including the comparison with the retention of *Mangifera indica* skin anthocyanins, mass- and UV-visible spectra indicated that a minor set of anthocyanins included two

sets of derivatives. The minor compounds were found to be 3-galactosides for samples under investigation, while the set of the major anthocyanins was represented by 3-rhamnosylgalactosides. Indeed, though through mass-spectra it was not possible to differentiate 3-rhamnosylgalactosides and 3-(*p*-coumaroyl)galactosides because of *m/z* coincidence, the retention difference between the two found anthocyanins sets as well as UV-visible spectra excluded the latter type of derivatives.

Key words: anthocyanins, HPLC, 7-O-methyl derivatives of delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin and malvidin, 3-galactosides, 3-rhamnosylgalactosides, UV-vis spectra, mass-spectrometric detection.

Введение

Антоцианами называются уникальные соединения класса флавоноидов, отличающиеся существованием нескольких pH-зависимых форм в растворах [1]. Обычно для представления этих соединений используется заряженная (с формальным положительным зарядом на атоме кислорода кольца C), существующая в сильноокислой среде флавилиевая форма (рис. 1).

Антоцианы синтезируются только в растениях, при этом видовой состав этих соединений может значительно различаться не только для растений различных семейств, но даже порой и в пределах одного рода. К настоящему времени в природе обнаружено более 500 различных видов антоцианов [2]. Установление видового состава набора антоцианов в каждом из растительных источников имеет большое значение для хемосистематики растений, а также для медицинской и пищевой промышленности, в которых их использование связано с высокими антиоксидантными и красящими свойствами [3].

В работе итальянских исследователей [4] для установления видового состава антоцианов цветков катарантуса *Catharanthus roseus* (L.) G. Don был использован масс-спектрометрический анализ экстракта с ионизацией электрораспылением. Дополнительно авторы цитируемой работы применили ТСХ на целлюлозных пластинах в двух традиционных системах подвижных фаз: бутанол-1 – ледяная уксусная кислота – вода (4 : 1 : 5) и ледяная уксусная кислота – концентрированная соляная кислота – вода (30 : 3 : 10) для разделения антоцианов и антоцианидинов. Для идентификации соединений сопоставлены полученные значения R_f и параметры спектров поглощения в УФ-видимой области и масс-спектров с литературными данными. В итоге авторами был сделан вывод о том, что антоциано-

вый комплекс цветков катарантуса образован антоцианами на основе трех антоцианидинов: двух обычных (петунидина и мальвидина) и одного редко встречающегося в природе - хирсутидина (7-О-метилмальвидина). В образцах они были обнаружены в виде трех 3-глюкозидов и трех 3-О-(6-*p*-кумароил)глюкозидов. Аналогичные выводы сделаны и в работе [5] и поддержаны в другом исследовании [6], выполненном уже с применением ВЭЖХ.

Однако, в работе [7] для одного из сортов катарантуса с цветками темно-абрикосового цвета на основе анализа ^1H -ЯМР-спектров индивидуально выделенных соединений среди антоцианов обнаружены принципиально иные компоненты: розинидин-3-О-[6-О-(α -рамнопиранозил)- β -галактопиранозид] (розинидин – 7-О-метилпеонидин) и 7-О-метилцианидин-3-О-[6-О-(α -рамнопиранозил)- β -галактопиранозид]. Следствием данной работы является то, что возможно метилирование ОН-группы в положении 7 не только в случае производных мальвидина (с образованием производных хирсутидина), но и в случае других антоцианидинов. Отметим, что по параметрам масс-спектров различить антоцианы, построенные на 7-О-метилдельфинидине и на петунидине, как и на паре производных 7-О-метилпетунидина и мальвидина, не представляется возможным. Для их дифференциации необходимы ортогональные (т.е. не зависящие от удерживания и основанные на другом свойстве аналитов) методы. Второе следствие – по данным масс-спектров различить 3-О-(6-*p*-кумароил)глюкозиды и 3-О-[6-О-(α -рамнопиранозил)- β -галактопиранозиды] одних и тех же агликонов также невозможно, поскольку они имеют одинаковую массу. Отметим также, что отдавая дань методу ТСХ, следует учитывать, что по качеству разделения этот метод не может конкурировать с ВЭЖХ. В выполненном нами исследовании антоцианов одного сорта катарантуса [8] на основании комбинации масс-спектрометрических данных и параметров электронных спектров поглощения был сделан вывод о том, что антоциановый комплекс образован 3-галактозидами и 3-рамнозилгалактозидами четырех из пяти основных антоцианидинов, метилированных по положению 7: дельфинидина, петунидина, пеонидина и мальвидина. Такой вывод кажется логичным, поскольку вряд ли следует предполагать, что ферменты, осуществляющие метилирование ОН-группы в положении 7 (в кольце А) могут быть чувствительными к заместителям пространственно отделенного кольца В.

Цель настоящей работы – определение строения антоцианов цветков катарантуса с акцентом на хроматографические методы.

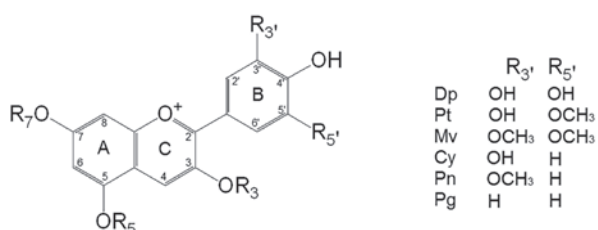


Рис. 1. Флавилиевая форма антоцианов и строение кольца В и обозначение антоцианидинов

Fig. 1. Flavylium form of anthocyanins and trivial names of anthocyanidins depending on the substitution of the B ring

Экспериментальная часть

В работе использовали лепестки цветков образцов катарантуса, сортность которых не контролировалась, выращенных в России и во Вьетнаме. Сравнение проводили с антоцианами из кожицы плодов черноплодного винограда (Испания).

Экстракты получали настаиванием лепестков цветков в 0.1 М водном растворе соляной кислоты при комнатной температуре вне доступа прямого солнечного света. Экстракт отделяли от остатка фильтрованием через бумажный фильтр. Полученный раствор сорбировали на насадочных картриджах ДИАПАК С18, с которых антоцианы реэкстрагировали раствором, содержащим 30 % об. ацетонитрила и 30 % об. муравьиной кислоты в воде. Реэкстракт разбавляли дистиллированной водой в три раза. Такая очистка экстракта обеспечивает длительное использование хроматографической колонки (в течение нескольких лет).

Для гидролиза экстракт смешивали с 20 %-ным водным раствором серной кислоты и кипятили на водяной бане в течение 30-60 минут. После охлаждения экстракт очищали также методом твердофазной экстракции на насадочных картриджах ДИАПАК С18 по выше описанной методике. Отметим, что агликоны неустойчивы при хранении, поэтому желательно ВЭЖХ исследования проводить сразу после очистки экстракта.

Разделение антоцианов осуществляли на оборудовании Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами (в режиме электроспрея, напряжение на фрагменторе 200 В). В работе использовали хроматографические колонки: 150×4.6 мм Symmetry C18 (3.5 мкм) – для серийных исследований и 150×2.1 мм Kromasil 100-5C18 – при масс-спектрометрическом детектировании; температура термостата колонок 40 °С. Мертвое время определяли по урацилу. Разделение осуществляли в водных подвижных фазах, содержащих 10 % об. муравьиной кислоты и от 6 до 10 % об. +-ацетонитрила при расходе подвижной фазы 0.8 мл/мин. Хроматограммы регистрировали и обрабатывали программой ChemStation.

Буквенные обозначения антоцианидинов: **Dp** – дельфинидин, **Cy** – цианидин, **Pt** – петунидин, **Pn** – пеонидин, **Mv** – мальвидин; если у них метилировано положение 7, то перед символом антоцианидина добавляется **7Me**, в случае антоцианов – для 3-глюкозида, 3-галактозида и 3 – рамнозилгалактозида после символа агликона добавляется **3Glu**, **3Ga** или **3Rb** (от робинобиозида), соответственно.

Результаты и их обсуждение

Анализ агликонов (антоцианидинов)

Учитывая разночтения в определении даже антоцианидинов, нами был осуществлен анализ антоцианидинов после кислотного гидролиза антоцианов имевшихся в нашем распоряжении цвет-

ков катарантуса. Для сравнения параллельно проводили гидролиз антоцианов темно-синих плодов винограда, *Vitis vinifera*, по литературным данным [9] содержащих в качестве основных компонентов 3-глюкозида и ацилированные 3-глюкозида пяти основных антоцианидинов: Dp, Cy, Pt, Pn и Mv. Полученные результаты представлены на рис. 2, на которых видны пики агликонов (отмечены номерами) на фоне остаточных пиков исходных компонентов экстракта (не отмечены номерами).

Результаты масс-спектрометрического анализа и сопоставление удерживания антоцианидинов катарантуса (**АК**) и винограда (**АВ**) представлены в табл. 1. Сопоставляя хроматограмму экстракта винограда с пятью традиционными антоцианидинами, с аналогичной хроматограммой, полученной при гидролизе антоцианов цветков катарантуса, можно сделать вывод, что ни один из антоцианидинов не повторяется на двух хроматограммах. Более того, между удерживанием антоцианидинов, отмеченных и неотмеченных звездочкой на рис. 2, существует прямая взаимосвязь (рис. 3), с высоким значением $R^2 = 0.9992$ по уравнению:

$$\lg k(i) = 0.909 \cdot \lg k(i^*) + 0.453, \quad (1)$$

где $k(i)$ и $k(i^*)$ – коэффициенты емкости антоцианидинов (по порядку элюирования) из экстракта катарантуса и винограда, соответственно.

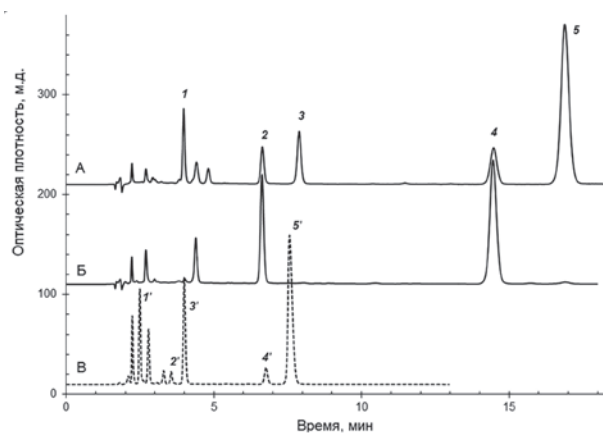


Рис. 2. Разделение антоцианидинов антоцианов цветков катарантуса красно-фиолетовой и красной окраски и плодов черного винограда. Соединения: 1 – 7MeDp, 2 – 7MeCy, 3 – 7MePt, 4 – 7MePn, 5 – 7MeMv, (1* – 5*) – те же антоцианидины, но не метилированные по положению 7. Колонка: 4.6×150 мм Symmetry C18, 3.5 мкм. Подвижная фаза: 15.6 % об. CH₃CN и 10 % об. HCOOH в воде, 0,8 мл·мин⁻¹. Детектор: 515 нм

Fig. 2. Separation of anthocyanidins of red-violet and red colored flowers of *Catharanthus roseus* and that of *Vitis vinifera* fruits. Compounds: 1 – 7MeDp, 2 – 7MeCy, 3 – 7MePt, 4 – 7MePn, 5 – 7MeMv, (1* – 5*) – the same non-methylated at position 7 anthocyanidins. Column: 4.6×150 mm Symmetry C18, 3.5 μm. Mobile phase: 15.6 vol. % CH₃CN and 10 vol. % HCOOH in water, 0.8 ml·min⁻¹. Detection at 515 nm

Таблица 1

Аналитические параметры пиков антоцианидинов на рис. 2

Table 1

Analytical parameters of anthocyanidin peaks from Fig. 2

№	Название	t_{R^*} , мин**	λ_{max} , нм**	M/Z
1	7-метилдельфинидин	3.97	526	317.1
2	7-метилцианидин	6.63	520	301.1
3	7-метилпетунидин	7.88	527	331.1
4	7-метилпеонидин	14.44	520	315.1
5	7-метилмальвидин	16.88	528	345.1
1*	дельфинидин	2.49	530	303.1
2*	цианидин	3.56	524	287.1
3*	петунидин	4.00	531	317.1
4*	пеонидин	6.75	524	301.1
5*	мальвидин	7.56	532	331.1

Примечание: * – метка на рис. 2, ** – для подвижной фазы 15.8 % об. CH_3CN и 10 % об. $HCOOH$ в воде, 0.8 мл/мин.

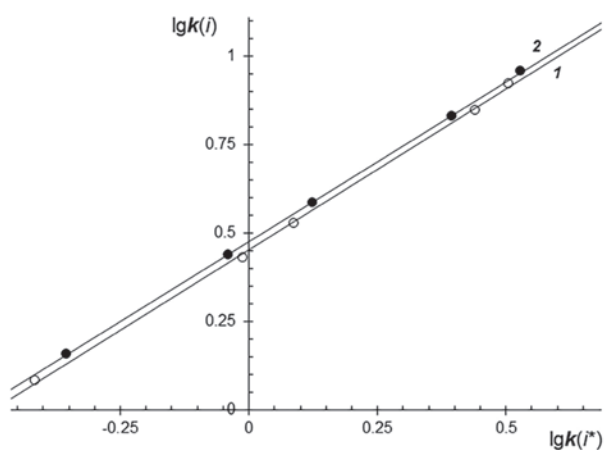


Рис. 3. Сравнительный анализ удерживания антоцианидинов (1) и их 3-рамногалактозидов (2). $lg k(i)$ и $lg k(i^*)$ – логарифмы факторов удерживания 7-метилированных и неметилированных соединений, соответственно. Условия: 1 – см. рис. 2, 2 – колонка: 4.6×150 мм Symmetry C18, 3.5 мкм. Подвижная фаза: 10.2 % об. CH_3CN и 10 % об. $HCOOH$ в воде, 0.8 мл·мин⁻¹

Fig. 3. Comparative analysis of retention of anthocyanidins (1) and their 3-rhamnosylgalactosides (2). $lg k(i)$ and $lg k(i^*)$ – logarithms of retention factors of 7-methylates and non-methylated compounds, respectively. Conditions: 1 – see at Fig. 2 capture, 2 – column: 4.6×150 mm Symmetry C18, 3.5 μ m. Mobile phase: 10.2 vol. % CH_3CN and 10 vol. % $HCOOH$ in water, 0.8 ml·min⁻¹

Отметим, что найденная линейность указывает на однотипность изменения структур соединений двух рядов: незамещенных антоцианидинов и их 3-рамнозилгалактозидов. Отличие наклона прямой от 1 связано с тем, что рост удерживания при таком изменении строения зависит не только от энтальпийной составляющей, которая должна быть одинаковой для обоих рядов антоцианидинов, но и от энтропийной составляющей изменения свобод-

ной энергии переноса веществ из подвижной фазы в стационарную [10]. При этом однотипное изменение, являющееся по данным масс-спектрометрии дополнительным метилированием (по положению 7 в соответствии с литературными данными) приводит к росту удерживания того же порядка, что и рост удерживания в ряду последовательного дополнительного метилирования кольца В в рядах $Dp \rightarrow Pt \rightarrow Mv$ и $Cy \rightarrow Pn$:

$$\Delta(H \rightarrow CH_3) = \lg k(j) - \lg k(i), \quad (2)$$

где при расчете роста удерживания $\Delta(H \rightarrow CH_3)$ из логарифма фактора удерживания вещества j вычитали логарифм фактора удерживания веществ i , для пар антоцианов, среди которых j отличается от i метилированием одной из OH -групп.

Это не удивительно, поскольку по поплавочному механизму [11] флавилиевая часть антоцианов (и, следовательно, и агликоны) проникают в привитой слой в отличие от гидрофильной гликозидной части антоцианов, остающейся на поверхности привитой фазы. Т.е. флавилиевая часть удерживается по распределительному механизму, при котором положение метокси-группы не имеет значения для удерживания.

Следовательно, все антоцианидины антоцианов цветков катарантуса полностью заменены на дополнительно метилированные. Из двух возможных направлений дополнительного метилирования, – по гидроксильным группам в положении 5 или 7, реализуется метилирование по положению 7. Замещение в положение 5 должно было бы привести к характеристическому изменению в электронных спектрах поглощения веществ, – к исчезновению полосы поглощения при 430 нм с небольшим гипсохромным сдвигом максимума абсорбции [12]. В нашем случае для всех соответствующих пар антоцианидинов полоса при 430 нм не исчезает, а только уменьшается по интенсивности и наблюдается заметный (4 нм, табл. 1) гипсохромный сдвиг максимума абсорбции.

Как следует из приведенных хроматограмм, мальвидин и 7-метилпетунидин, не различающиеся по масс-спектрам, имеют не идентичное удерживание и различия в спектрах поглощения также весьма заметны, табл. 1. Таким образом, среди антоцианов цветков катарантуса кроме уже известных имеются производные 7-метилпетунидина и 7-метилдельфинидина, отсутствующих в самых расширенных списках [13, 14] производных обнаруженных в природе антоцианидинов.

Спектральные характеристики агликонов представляют особый интерес. Дело в том, что единственная на сегодня «хрестоматийная» работа, на которую ссылаются в соответствующих публикациях [12], предлагает для идентификации параметры спектров антоцианов и антоцианидинов в метаноле, что мало пригодно для анализа спектров, записанных в кювете диодно-матричного детектора

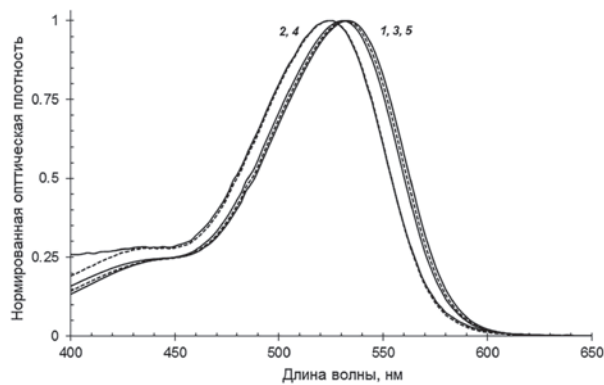


Рис. 4. Электронные спектры поглощения 7-метилантоцианидинов. Соединения: 1 – 7MeDp, 2 – 7MeCy, 3 – 7MePt, 4 – 7MePn, 5 – 7MeMv, растворитель 15.6 % об. CH₃CN и 10 % об. HCOOH в воде

Fig. 4. Electronic absorption spectra of 7-methylated anthocyanidins. Compounds: 1 – 7MeDp, 2 – 7MeCy, 3 – 7MePt, 4 – 7MePn, 5 – 7MeMv, solvent 15.6 vol. % CH₃CN and 10 vol. % HCOOH in water

в подвижной фазе из-за сольватохромного эффекта (приводящего к сдвигу полосы поглощения и к изменению ее интенсивности), наблюдаемого при смене растворителя. Наши исследования показали, что электронные спектры цианидина и пеонидина (как и их однотипных производных) мало различимы между собой, тогда как в ряду дельфинидин – петунидин – мальвидин при заметном батохромном сдвиге максимума абсорбции по сравнению с предыдущей парой дополнительно наблюдается последовательный батохромный сдвиг полосы абсорбции на 1-1.5 нм [15]. Аналогичные результаты получены для агликонов экстрактов всех исследованных в работе сортов катарантуса: спектры 7-метилцианидина (7MeCy) и 7-метилпеонидина (7MePn) мало различимы между собой, а спектры в ряду 7-метилдельфинидин (7MeDp) – 7-метилпетунидин (7MePt) – 7-метилмальвидин (7MeMv, хир-

сутидин) имеют максимумы, последовательно батохромно смещающиеся на 1 – 1.5 нм (рис. 4).

Таким образом, по крайней мере, для всех исследованных нами образцов экстрактов цветков катарантуса способность метил-трансферазы замещать атом водорода гидроксильной группы в положении 7 не зависит от заместителей в кольце В.

Анализ антоцианов (гликозидов антоцианидинов)

Анализ антоцианов экстрактов цветков различных сортов катарантуса показал, что красная окраска цветков обеспечивается биосинтезом производных 7MeCy и 7MePn, тогда как при окраске в более синие тона преобладающими антоцианами являются производные 7MeMv, 7MePt и 7MeDp. Более того, в некоторых сортах обнаруживается по два антоциана (табл. 2), построенных на одном и том же агликоне, с близкими временами удерживания (рис. 5).

По параметрам масс-спектров (и электронных спектров поглощения) пара производных одного и того же агликона представлена 3-гексозидом и еще одним производным – либо 3-рамнозилгексозидом, либо 3-(*l*-кумароилгексозидом). При этом по нашим данным второй вариант исключается, поскольку ацилирование гексозида *l*-кумаровой кислотой (на примере мальвидин-3-глюкозида и мальвидин-3-(*l*-кумароилглюкозида) из экстракта плодов винограда) приводит к очень большому возрастанию удерживания (примерно в 20 раз!). В таком случае принадлежность основных компонентов антоциановых комплексов цветков катарантуса к 3-рамнозилгексозидам очевидна. Именно в ряду родственной пары антоцианов 3-глюкозид – 3-рутинозид наблюдается заметное, но не очень большое увеличение удерживания антоцианов [16].

Отметим также, что при сопоставлении спектров поглощения мальвидин-3-(*l*-кумароилглю-

Таблица 2

Видовой состав антоцианов цветков пяти сортов *Catharanthus roseum*

Table 2

Types of anthocyanins of five cultivar flowers of *Catharanthus roseum*

№	Производные антоцианидинов, мольная доля, % (по площадям пиков)									
	7MeDp		7MeCy		7MePt		7MePt		7MeMv	
	3Gala	3Rb*	3Gala	3Rb	3Gala	3Rb	3Gala	3Rb	3Gala	3Rb
1	0.7	5.2	0.2	0.4	0.5	8.3	0.4	1.1	7.4	74.2
2	0.8	3.7	4.3	9.4	0.6	5.3	8.0	17.5	7.3	38.9
3	< 0.1	< 0.1	3.1	14.6	< 0.1	< 0.1	19.4	48.9	< 0.1	< 0.1
4	1.5	6.7	2.2	3.8	1.0	8.7	2.2	8.7	5.8	57.1
5	1.0	5.4	< 0.1	< 0.1	0.8	8.5	0.7	0.7	11.2	71.6
<i>t</i> _R , мин**	5.90	6.26	6.92	9.65	11.55	12.83	17.86	20.26	23.26	27.20
<i>λ</i> _{max} , нм**	522.0	523.5	514.0	515.5	523.0	524.5	514.0	515.5	524.5	526.0
<i>M/z</i>	479.1, 317.0	625.2, 317.0	463.1, 301.0	609.2, 301.0	493.1, 331.1	639.2, 331.1	477.1, 315.1	623.1, 315.1	507.1, 345.1	653.2, 345.1

Примечание: * – Rb. – робинобиозид – рамнозилгалактозид; ** – для подвижной фазы состава 8 % об. CH₃CN и 10 % об. HCOOH в воде, 0.8 мл/мин.

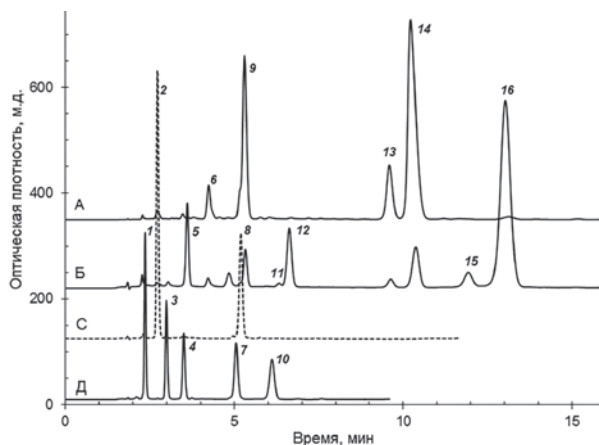


Рис. 5. Хроматограммы антоцианов некоторых экстрактов. Экстракты: А – цветков катарантуса красного цвета, Б – цветков катарантуса фиолетового цвета, В – кожуры плода манго, Г – плодов винограда. 1 – Dp3Glu, 2 – Cy3Ga, 3 – Cy3Glu, 4 – Pt3Glu, 5 – 7MeDpRb, 6 – неизвестный компонент, 7 – Pn3Glu, 8 – 7MeCy3Ga, 9 – 7MeCy3Rb, 10 – Mv3Glu, 11 – 7MePt3Ga, 12 – 7MePt3Rb, 13 – 7MePn3Ga, 14 – 7MePn3Rb, 15 – 7MeMv3Ga, 16 – 7MeMv3Rb. Колонка: 4.6×150 мм Symmetry C18, 3.5 мкм. Подвижная фаза: 11 % об. CH₃CN и 10 % об. HCOOH в воде, 0.8 мл·мин⁻¹. Детектор: 515 нм

Fig. 5. Separation of some extracts with anthocyanins. Extracts: A – red colored *Catharanthus* flowers extract, Б – red-violet colored *Catharanthus* flowers extract, В – *Magnifera indica* skin extract, Г – grape fruits extracts. 1 – Dp3Glu, 2 – Cy3Ga, 3 – Cy3Glu, 4 – Pt3Glu, 5 – 7MeDpRb, 6 – unnown, 7 – Pn3Glu, 8 – 7MeCy3Ga, 9 – 7MeCy3Rb, 10 – Mv3Glu, 11 – 7MePt3Ga, 12 – 7MePt3Rb, 13 – 7MePn3Ga, 14 – 7MePn3Rb, 15 – 7MeMv3Ga, 16 – 7MeMv3Rb. Column: 4.6×150 mm Symmetry C18, 3.5 μm. Mobile phase: 11 vol. % CH₃CN and 10 vol. % HCOOH in water, 0.8 ml·min⁻¹. Detection at 515 nm

козида) и мальвидин-3-глюкозида (из экстракта плодов черного винограда) наблюдается два характеристических эффекта. Первый из них связан с тем, что в коротковолновой области спектра (около 300 нм) появляется полоса, относящаяся к *п*-кумароильному радикалу. На неё ссылались в работе [4] для подтверждения ацилирования глюкозидного радикала *п*-кумаровой кислотой. Но следует учесть, что выводы могут быть ошибочными, поскольку на хроматограмме, записанной при 510 – 530 нм, будут видны только антоцианы. А при записи хроматограммы при коротких длинах волн часто проявляются другие фенольные соединения, искажающие спектр антоцианов при случайном совпадении времен удерживания. Тщательный анализ электронных спектров антоцианов цветков катарантуса показывает отсутствие ацилирования *п*-кумаровой кислотой.

Выяснение вида гексозида (среди двух возможных вариантов – глюкозида или галактозида)

оказалось наиболее сложной хроматографической задачей. Сложность задачи состоит в том, что достоверно установленные производные 7-метилантоцианидинов очень редко встречаются в природе. Но в нашем случае имеется один доступный источник с нужными антоцианами. Это плоды манго, красная окраска кожуры которых обеспечивается антоцианами, среди которых имеется 7-метилцианидин-3-галактозид, 7MeCu3Ga [17]. Поскольку 3-глюкозиды имеют заметно большее удерживание по отношению к 3-галактозидам [18], то совпадение времен удерживания 7-метилцианидин-3-галактозид из экстракта плодов манго с одним производных 7-метилцианидина экстракта цветков катарантуса может служить доказательством того, что гексозиды для данного источника являются галактозидами. При этом рамнозильный заместитель присоединен к галактозидному радикалу (образуя робинобиозид, **Rb**), что было доказано частичным кислотным гидролизом ранее [8]. Соответственно, набор антоцианов цветков катарантуса может содержать (в зависимости от окраски) 3-галактозид и 3-рамнозилгалактозид 7-метилдельфинидина (**7MeDp3Ga** и **7MeDp3Rb**) и аналогичные производные остальных антоцианидинов.

Подчеркнем, что известный тезис неоднозначности доказательства идентичности веществ при совпадении их времен удерживания становится значительно более доказательным, если совпадение времен удерживания устанавливается при двух (а, следовательно, и при любых иных) составах подвижных фаз. В этом случае совпадают не однопараметрические времена удерживания а двухпараметрическое относительное удерживание на карте разделения [18], что реально было выполнено в настоящей работе.

Выводы

В работе с использованием хроматографических методов показано, что антоциановый состав цветков *Catharanthus roseum* включает производные пяти антоцианидинов, являющихся 7-метилзамещенными производными дельфинидина, цианидина, петунидина, пеонидина и мальвидина. При этом антоциановый набор представлен двумя видами производных с близкими временами удерживания, но с различными массами, что было интерпретировано как присутствие 3-галактозидов и 3-рамнозилгалактозидов. Высказанное предположение подтверждено хроматографическими методами

ЛИТЕРАТУРА

- Francis F.J. A new group of food colorants // Trends Food Sci. Technol. 1992. V. 31. P. 27-30.
- Sipahli S., Mohanlall V., Mellem J.J. Stability and degradation kinetics of crude anthocyanin extracts from *H. Sabdariffa* // Food Sci. Technol., Campinas. 2017. V. 37. P. 209-215.

3. Kähkönen M.P., Heinonen M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons // *J. Agric. Food Chem.* 2003. V. 51. P. 628-633.
4. Piovan A., Filippini R., Favretto D. Characterization of the Anthocyanins of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don *In Vivo* and *In Vitro* by Electrospray Ionization Ion Trap Mass Spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998. V. 12. P. 361–367. doi: 10.1002/(SICI)1097-0231(19980415)12:7<361::AID-RCM162>3.0.CO;2-U
5. Piovan A., Filippini R. Anthocyanins in *Catharanthus roseus* in vivo and in vitro: a review. *Phytochem. Rev.*, 2007, vol. 6, pp. 235–242. doi: 10.1007/s11101-006-9052-y.
6. Dai Y., Rozema E., Verpoorte R., Choi Y.-H. Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *J. Chromat. A*, 2016, vol. 1434, pp. 50-56. doi: 10.1016/j.chroma.2016.01.037
7. Toki K., Saito N., Irie Y. Tatsuzawa F., Shigihara A., Honda T. 7-O-Methylated anthocyanidin glycosides from *Catharanthus roseus*. *Phytochem.*, 2008, vol. 69, pp. 1215-1219. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.11.005.
8. Deineka V.I., Vu Thi Ngoc Anh, Deineka L.A. RP HPLC determination of some uncommon anthocyanins // Сорбционные и хроматографические процессы. 2014. Т. 14. Вып. 3. С.360-366
9. Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes / F. He [et al.] // *Molecules*. 2010. V. 15. P. 9057-9091.
10. Дейнека В.И. Метиленовая селективность в условиях обращенно-фазовой хроматографии одного ряда гомологов // Сорбционные и хроматографические процессы. 2007. Т. 7. Вып.2. С. 236-243.
11. «Поплавающий» механизм удерживания в обращенно-фазовой хроматографии / В.И. Дейнека [и др.] // Журнал физической химии. 2015. Т. 89, № 7. С. 1172–1177.
12. Harborne J.B. Spectral methods of characterizing anthocyanins // *Biochem. J.* 1958. V. 70. P. 22-28.
13. Anthocyanins. Biosynthesis, functions, and applications / Ed. Gould K., K. Davies, and C. Winefield. Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY, USA, 2009. – 336 p.
14. Welch C.R., Wu Q., Simon J.E. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization // *Curr. Anal. Chem.* 2008. V. 4. P. 75–101.
15. ВЭЖХ в определении антоцианов плодов некоторых видов винограда / С.Л. Макаревич и др. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2014. Т. 14. Вып. 6. С. 1024-1031
16. Инкрементный подход в анализе антоцианов / В.И. Дейнека [и др.] // Химия природных соединений. 2003. № 2. С. 137-139.
17. 7-O-Methylcyanidin 3-O-β-D-Galactopyranoside, a Novel Anthocyanin from Mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Tommy Atkins') Peels / N. Berardini [et al.] // *Z. Naturforsch.* 2005. Vol. 60b. P. 801-804
18. Дейнека В.И., Григорьев А.М. Относительный анализ удерживания гликозидов цианидина // Журнал физической химии. 2004. Т. 78, № 5. С. 923-926.
19. *In Vitro* by Electrospray Ionization Ion Trap Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1998, vol. 12, pp. 361–367. doi: 10.1002/(SICI)1097-0231(19980415)12:7<361::AID-RCM162>3.0.CO;2-U
20. Piovan A., Filippini R. Anthocyanins in *Catharanthus roseus* in vivo and in vitro: a review. *Phytochem. Rev.*, 2007, vol. 6, pp. 235–242. doi: 10.1007/s11101-006-9052-y.
21. Dai Y., Rozema E., Verpoorte R., Choi Y.-H. Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *J. Chromat. A*, 2016, vol. 1434, pp. 50-56. doi: 10.1016/j.chroma.2016.01.037
22. Toki K., Saito N., Irie Y. Tatsuzawa F., Shigihara A., Honda T. 7-O-Methylated anthocyanidin glycosides from *Catharanthus roseus*. *Phytochem.*, 2008, vol. 69, pp. 1215-1219. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.11.005.
23. Deineka V.I., Vu Thi Ngoc Anh, Deineka L.A. RP HPLC determination of some uncommon anthocyanins. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy* [Sorption and chromatographic processes], 2014, vol. 14, no. 3, pp. 360-366. [In Russian]. <http://www.sorpchrom.vsu.ru/articles/20140301.pdf>.
24. He F., Mu L., Yan G.-L., Liang N.-N., Pan Q.-H., Wang J., Reeves M.J., Duan C.-Q. Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes. *Molecules*, 2010, vol. 15, pp. 9057-9091. doi: 10.3390/molecules15129057.
25. Deineka V.I. [Methylene selectivity of one homologous series in reversed-phase chromatography]. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy* [Sorption and chromatographic processes], 2007, vol. 7, no. 2, pp. C. 236-243 [In Russian].
26. Deineka V.I., Deineka L.A., Saenko I.I., Chulkov A.N. A Float Mechanism of Retention in Reversed-Phase Chromatography. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2015, vol. 89, no. 7, pp. 1300–1304. doi: 10.1134/S0036024415070079.
27. Harborne J.B. Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem. J.*, 1958, vol. 70, pp. 22-28. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1196618/pdf/biochemj00829-0032.pdf>.
28. Anthocyanins. Biosynthesis, functions, and applications / Ed. Gould K., K. Davies, and C. Winefield. Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY, USA, 2009. – 336 p. doi: 10.1007/978-0-387-77335-3.
29. Welch C.R., Wu Q., Simon J.E. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Curr. Anal. Chem.*, 2008, vol. 4, pp. 75–101. doi: 10.2174/157341108784587795
30. Makarevitch S.L., Chulkov A.N., Deineka V.I., Costenko M.O., Deineka L.A., Tokhtar V.K. [Determination of anthocyanins in fruits of some species of grapes by HPLC]. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy* [Sorption and chromatographic processes], 2014, vol. 14, no. 6, pp. 1024-1031 [In Russian]. <http://www.sorpchrom.vsu.ru/articles/20140617.pdf>.
31. Deineka V.I., Grigor'ev A.M., Staroverov V.M., Borzenko O.N. Incremental Approach to HPLC Analysis of Anthocyanins. *Chem. Nat. Comp.*, 2003, vol. 39, no. 2, pp. 182-185. doi: 10.1023/A:1024813914213.
32. Berardini N., Schieber A., Klaiber I., Beifuss U., Carle R., Conradbet J. 7-O-Methylcyanidin 3-O-β-D-Galactopyranoside, a Novel Anthocyanin from Mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Tommy Atkins') Peels. *Z. Naturforsch.*, 2005, vol. 60b, pp. 801-804. <http://www.znaturforsch.com/ab/v60b/s60b0801.pdf>
33. Deineka V.I., Grigor'ev A.M. Relative analysis of the chromatographic retention of cyanidin glycosides. *Russ. J. Phys. Chem.*, 2004, vol. 78, pp. 796-799.

REFERENCES

1. Francis F.J. A new group of food colorants. *Trends Food Sci. Technol.*, 1992, vol. 31, pp. 27-30: doi: 10.1016/0924-2244(92)90112-A.
2. Sipahli S., Mohanlall V., Mellem J.J. Stability and degradation kinetics of crude anthocyanin extracts from *H. sabdariffa*. *Food Sci. Technol., Campinas*, 2017, vol. 37, pp. 209-215. doi: 10.1590/1678-457x.14216.
3. Kähkönen M.P., Heinonen M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, vol. 51, pp. 628-633. doi: 10.1021/jf025551i.
4. Piovan A., Filippini R., Favretto D. Characterization of the Anthocyanins of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don *In Vivo* and