



УДК 543.544.123:577.13

Использование ВЭЖХ при поиске нетрадиционных источников антоцианов. Антоцианы листьев краснолистных форм клена остролистного и клена веерного японского

Доронин А.Г.¹, Дейнека В.И.¹, Дейнека Л.А.¹,
Тохтарь В.К.¹, Селеменев В.Ф.²

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

²ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 11.02.2019 г.

DOI: <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2019.19/732>

В работе определен видовой состав антоцианов листьев клена остролистного, *Acer platanoides* L., сорта «Crimson King» (I) и клена веерного японского, *Acer palmatum* (Thunbergii) Rehdo, сорта «Bloodgood» (II) из Ботанического сада НИУ БелГУ. Установлено что основные антоцианы в I-цианидин-3-глюкозид и он же ацилированный галловой кислотой при наличии небольшого количества продукта двойного ацилирования. Степень ацилирования может различаться для листьев в зависимости от различных условий. Для II установлено основное отличие – биосинтез не только цианидин-3-глюкозида, но и цианидин-3-рутинозида при заметном ацилировании обоих соединений галловой кислотой. Уровень накопления антоцианов также не постоянен для листьев, собранных в различное время и с различных частей дерева, но интенсивно окрашенные в багровые тона листья I могут накапливать более 0.200 г антоцианов на 100 г свежих листьев (в пересчете на Су3Glu), тогда как в листьях II концентрация антоцианов может быть в 2-2.5 раза более высокой (выше 0.500 г на 100 г свежих листьев). Сушка листьев не приводит к существенному разрушению антоцианов.

Ключевые слова: антоцианы, нетрадиционные источники, ацилирование галловой кислотой, листья растений, краснолистные формы кленов

Application HPLC for search of non-traditional anthocyanin sources. Anthocyanins of *Acer platanoides* «Crimson King» leaves

Doronin A.G.¹, Deineka V.I.¹, Deineka L.A.¹,
Tokhtar V.K.¹, Selemenev V.F.²

¹Belgorod National Research State University, Belgorod

²Voronezh State University, Voronezh

Reversed-phase HPLC was used for investigation of anthocyanins in non-traditional sources – in leaves of two *Acer* species. Anthocyanins type composition was determined in leaves of the red-leaves *Acer platanoides* L., variety «Crimson King» (I) and fan Japanese maple, *Acer palmatum* (Thunbergii) Rehdo, variety «Bloodgood» (II) from the Botanical garden of Belgorod National Research university. It was found that the main anthocyanins in I are cyanidin-3-glucoside (39-86 mole %) and that acylated with the gallic acid (10-55 mole %) in the presence of a small amount (1-3 %) of double acylation. The degree of acylation

may vary for leaves depending on different conditions. For II, the main difference was established as biosynthesis of not only cyanidin-3-glucoside, but also cyanidin-3-rutinoside (30 mole %) with some acylation of both compounds by the gallic acid. High hydrophilicity of gallic acid substituent is resulted in relatively low rise of retention of acylated anthocyanins, thus isocratic mode of chromatographic runs is possible to separate all compounds under interest. The separation map of the substances is proposed for 150×4.6 mm Symmetry C18 (3.5 μm) column and 10 vol.% of formic acid, acetonitrile and water mobile phases. The level of anthocyanin accumulation is not constant for leaves collected at different times and from different parts of the tree. Meanwhile intensively crimson-colored leaves I can accumulate more than 0.200 g of anthocyanins per 100 g of fresh leaves (by cyaniding-3-glucoside chloride equivalent), whereas in leaves II the concentration of anthocyanins can be 2-2.5 higher (above 0.500 g per 100 g of fresh leaves). Drying leaves does not lead to significant destruction of anthocyanins.

Keywords: anthocyanins, non-traditional sources, the acylation by gallic acid, plant leaves, red maples form

Введение

Антоцианы в настоящее время используются не только в пищевой [1, 2] и медицинской [2, 3] промышленности как эффективные водорастворимые антиоксиданты с красящим эффектом, но и в косметической химии (краска для волос) [4] и в крашении тканей [5] и даже широко исследуются в качестве фото-сенситизаторов в солнечных батареях [6]. К традиционным источникам антоцианов можно отнести съедобные плоды многих растений. Однако для человека антоцианы из таких объектов выделять не совсем целесообразно, поскольку они могут быть употреблены напрямую в пищу. К нетрадиционным возобновляемым источникам можно отнести цветы ряда растений, которые используются в декоративных целях, или листья с красной или пурпурной окраской, которые к настоящему времени не используются, насколько нам известно, вовсе, хотя их применение для выделения фенольных соединений хорошо известно [7, 8]. Очевидно, что вследствие большого количества листьев даже на одном краснолистом дереве или травянистом растении листья потенциально могут быть важнейшими возобновляемыми источниками (не пригодными для прямого употребления в пищу) антоцианов и других фенольных соединений для промышленной переработки.

Следует учесть, что красная окраска листьев не обязательно должна быть связанной с биосинтезом антоцианов. Так, в ряде растений она обеспечивается биосинтезом бетацианинов [9] и некоторых других соединений [10].

Окраска листьев семи сортов клена дланевидного (*Acer palmatum*) была исследована в работе [11] с помощью портативного колориметра, а антоциановый состав определяли методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Во всех увядающих листьях был найден цианидин-3-глюкозид, и (в меньших концентрациях) цианидин-3-рутинозид. В работе [12] отмечается, что в целом в листьях ряда видов клена обнаруживается цианидин-3-глюкозид (Cy3Glu), а в листьях кленов *A. palmatum* и *A. buergerianum* этот антоциан дополнен цианидин-3-рутинозидом. Из листьев клена остролистного авторы цитируемой работы извлекли два новых антоциана, исследование которых химическими методами позволило определить их как цианидин-3-*O*-[2''-(галлоил)-β-*D*-глюкозид] (Cy3GalGlu) и цианидин-3-*O*-[2''-галлоил-6''-*O*-(α-*L*-рамнозил)-β-*D*-глюкозид] (Cy3GalRut). В работе школы Андерсена [13] в листьях клена остролистного сорта «Crimson King» кроме Cy3Glu и Cy3GalGlu найден продукт двойного ацилирования глюкозидного радикала галловой кислотой: цианидин-3-(2'',3''-дигаллоил-β-глюкозид) (Cy3diGalGlu).

Цель настоящей работы – исследование качественного и количественного антоцианового состава листьев популярного в Белгороде декоративного растения кле-

на остролистного и клена веерного японского из Ботанического сада НИУ БелГУ как возможных источников для выделения природных антоцианов.

Эксперимент

Листья кленов собирали в Ботаническом саду НИУ БелГУ и в различных регионах города Белгород (в случае клена «Crimson king»). Для экстракции измельченные листья настаивали в 0.1 М водном растворе HCl с последующей очисткой методом твердофазной экстракции [14].

Состав антоцианов экстрактов определяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием. Хроматограммы записывали на хроматографе Agilent 1200 Infinity. Хроматографическая колонка 2.1×150 мм Komasil 100-5C18. Разделение выполняли при изоктарическом элюировании, используя подвижные фазы, содержащие 10 об.% муравьиной кислоты и 6-10 об. % ацетонитрила в воде, скорость подачи элюента 0.25 см³/мин. Температура термостата колонки 40°C. Хроматограмму записывали при длине волны 315 нм при определении хлорогеновых кислот и 516 нм для определения антоцианов. Результаты хранили и обрабатывали с использованием программы Agilent ChemStation.

Спектрофотометрические измерения выполняли на спектрофотометре Shimadzu UV-2500 в соответствии с дифференциальным методом по ГОСТ Р 53773-2010. Продукция соковая. Методы определения антоцианинов. Для этого измеряли оптическую плотность растворов при pH=1 и при pH=4.5, пересчитывая результат на цианидин-3-гликозид хлорид.

Обсуждение результатов

Определение видового состава антоцианов. Типичная хроматограмма экстракта листьев двух видов клена остролистного, *Acer platanoides* L., сорта «Crimson King» и клена веерного японского, *Acer palmatum* (Thunbergii) Rehdo, сорта «Bloodgood» из Ботанического сада НИУ БелГУ представлена на рис. 1.

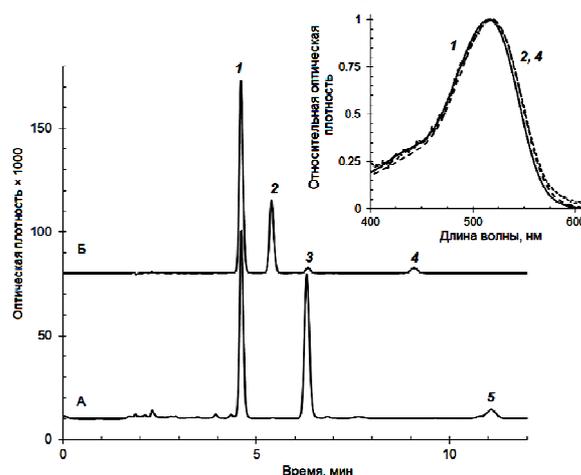


Рис. 1. Хроматограммы антоцианов листьев краснолистных форм кленов
 А – клена остролистного, Б – клена веерного. Вещества 1 – Cy3Glu; 2 – Cy3Rut;
 3 -Cy3GalGlu, 4 – Cy3GalRut; 5 – Cy3diGalGlu. Колонка 2.1×150 мм, Kromasil 100-5C18.
 Подвижная фаза 10 об.% муравьиной кислоты и 8.08 об.% ацетонитрила в воде,
 0.25 см³/мин. Детектирование при 516 нм.

На хроматограмме детектируется основной для большинства исследованных в настоящей работе образцов пик №1 (на рис.1). Было установлено, что пик №1 соответствует цианидин-3-глюкозиду, Cy3Glu, - по сравнению параметров удерживания с одним из компонентов экстракта плодов черной смородины [14], и по параметрам электронного (записанного в кювете детектора, вкладка на рис.1) и масс-спектров, табл.1. Отметим, что все обнаруженные на рис.1 антоцианы были построены на цианидиновой основе, поскольку при фрагментации получали вторичный пик с m/z , равным 287.1.

Таблица 1. Параметры пиков на хроматограмме на рис.1

№*	Тип антоциана и его обозначение	Время удерживания, мин**	λ_{\max} , нм	m/z
1	Цианидин-3-глюкозид, Cy3Glu	4.60	516	449.2 (287.1)
2	Цианидин-3-рутинозид, Cy3Rut	5.40	517	595.4 (287.1)
3	Цианидин-3-галлоилглюкозид, Cy3GalGlu	6.21	518	601.2 (287.1)
4	Цианидин-3-галлоилрутинозид, Cy3GalRut	9.05	519	747.4 (281.1)
5	Цианидин-3-дигаллоилглюкозид, Cy3diGalGlu	11.05	518	753.2 (287.1)

*на рис.1; ** - для подвижной фазы 8.08 об.% ацетонитрила и 10 об.% муравьиной кислоты в воде, 0.25 см³/мин.

Второй по значимости пик различен для исследованных в работе кленов. Так, в листьях клена остролистного этот пик (№3) имеет электронный спектр поглощения, близкий к спектру пика 1. Небольшое (2 нм) батохромное смещение максимума пика характерно для роста числа связанных между собой моноз в положении 3 цианидина. Но по данным масс-спектров этот пик относится к цианидин-3-глюкозиду, гликозидный заместитель которого ацилирован галловой кислотой, - Cy3GalGlu, табл.1. Этот антоциан, чрезвычайно редко встречается в растительных объектах. Последний пик (№5) имеет электронный спектр поглощения, не отличимый от спектра Cy3GalGlu. Уточнение его состава было выполнено по параметрам масс-спектра, - первичный ион имеет m/z , равное 753.2. Следовательно, этот компонент антоцианового состава листьев клена остролистного соответствует дигаллоильному производному цианидин-3-глюкозида, Cy-3diGalGlu.

Для оценки вклада ацилирования галловой кислотой в удерживание антоцианов была построена карта разделения по методу относительного анализа удерживания [15], рис. 2, по уравнениям:

$$\lg k(i) = a_0 + a_1 \cdot \lg k(\text{Cy3Glu}),$$

где $k(i)$ – факторы удерживания соединений (Cy3GalGlu и Cy3diGalGlu) с экспериментально определяемыми коэффициентами a_0 и a_1 .

Во-первых, уравнения относительного удерживания описываются прямыми линиями с R^2 не ниже 0.99997. Во-вторых, линии не параллельны, а коэффициенты a_1 уравнения относительного удерживания больше 1. Следовательно, вклад в дисперсионную составляющую взаимодействия сорбата с сорбентом при ацилировании увеличивается, что и следовало ожидать вследствие увеличения числа атомов в антоцианах Cy3GalGlu и Cy3diGalGlu по сравнению в Cy3Glu, причем это изменение близко к аддитивности: a_1 для моно- и дигаллоильного производного равны 1.112 и 1.203, соответственно. Основное изменение удерживания приходится на коэффициент a_0 0.149 и 0.435 для моно- и дигаллоильных производных. В данном случае вклад второго ацилирования в суммарное удерживание не равен вкладу первого, что не

удивительно для ацилирования по различным положениям глюкозидного радикала [16]. Однако в целом, первое ацилирование галловой кислотой приводит к увеличению удерживания примерно в 1.4 раза, а второе ацилирование практически удваивает удерживание по сравнению с моногаллоильным производным.

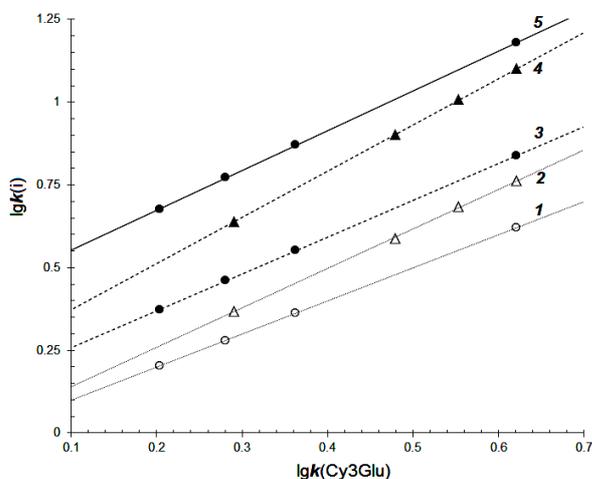


Рис. 2. Карта разделения антоцианов листьев краснолистных форм клена (Номера веществ см. рис.1).

Антоциановый состав красителей листьев клена веерного японского заметно отличался от рассмотренного выше клена остролистного. Во-первых, найден второй по значимости компонент – цианидин-3-рутинозид, пик №2 на рис.1 с m/z , равным 595.2. Небольшой пик $Cy3GalGlu$ (№3) является общим для обоих видов клена, но пик №4 с m/z , равным 747.4, свидетельствует об ацилировании рутинозидного заместителя галловой кислотой – $Cy3GalRut$. Кстати, спектр этого соединения также батохромно смещен на 2 нм относительно спектра $Cy3Rut$, как и в случае глюкозидных производных.

Количественное определение антоцианов.

Видовой состав антоцианов. Анализ большого числа образцов листьев, выполненный в течение нескольких лет, показал, что видовой состав антоцианов в листьях клена остролистного не является постоянным – вариации доли, приходящейся на $Cy3GalGlu$, заметно различались, табл. 2. При расчете использовали метод нормировки по площадям пиков без введения поправочных коэффициентов, что допустимо для случаев построения всех антоцианов на одном и том же антоцианидине. Различия в составе антоцианов могли относиться и ко времени сбора, и к положению листа на дереве, по возрасту и по освещенности, но тщательный анализ таких зависимостей в данной работе не проводили.

Таблица 2. Основные антоцианы листьев *Acer platanoides* сорта «Crimson king» (сезон 2014 года)

Листья Дата анализа	Моль доля антоциана по площадям пиков*, %	
	$Cy3Glu$	$Cy3(GalGlu)$
12 мая	66.4	28.9
13 мая	54.8-61.9	31.9-39.6
20 июня	82.1-86.1	9.8-16.4
26 июня	86.1	11.8
2 июля	38.9	54.2
18 июля	51.8	41.6

*рассчитано по методу нормировки.

Общий уровень накопления антоцианов. В листьях клена остролистного» уровень накопления антоцианов (по данным спектрофотометрического метода) колеблется в зависимости от многих факторов – от практически полного отсутствия биосинтеза антоцианов до более 0.200 г на 100 г (в пересчете на $Cy3Glu$), табл. 3. Листья отличаются высоким содержанием хлорофилла, который также может быть выделен при комплексной переработке сырья. Но в листьях клена веерного, окрашенных в практически чистые красные тона, уровень накопления антоцианов оказался существенно более высоким, - даже выше 0.5 г на 100 г свежих листьев. Выполненный анализ показал, что для обоих видов клена концентрация антоцианов снижается со временем сбора.

Таблица 3. Накопление антоцианов в листьях кленов

№	Время сбора листьев	Дополнительная информация	Содержание антоцианов, г на 100 г в пересчете на $Cy3Glu$	
			<i>Acer palmatum</i> «Bloodgood»	<i>Acer platanoides</i> «Crimson King»
1	01.07-31.07.2014	Ботсад, свежие, верхние	0.166-0.180	Не исследовали
2		Ботсад, свежие, нижние	0.025-0.052	
3		Ботсад, свежие крупные темно пурпурные	0.101-0.120	
4		Парк Гагарина	0.130-0.150	
5		Обл. больница	0.073-0.397	
6	01.07-31.07.2016	Ботсад, большие листья, свежие	0.110-0.154	
7		Большие листья, после сушки	0.460-0.540	
8		(в пересчете на свежие)	0.139-0.154	
9		Ботсад, средние листья, свежие	0.141-0.221	
10		Средние листья, после сушки	0.536-0.634	
11		(в пересчете на свежие)	0.161-0.196	
12	31.05.2018	Ботсад, свежие	0.14-0.16	0.50-0.54
13		После сушки	0.22-0.38	1.32-1.38
14		(в пересчете на свежие)	0.10-0.12	0.43-0.48
15	26.06.2018	Ботсад, свежие	0.063-0.064	0.51-0.57
16	22.08.2018	Ботсад, свежие	0.027-0.056	0.30-0.35

Для технологических целей желательно иметь стандартизованные по влажности образцы, поэтому в работе было выполнено исследование влияния сушки листьев на сохранность антоцианов. Однако оценить сохранность антоцианов довольно сложно, поскольку листья имеют заметно неоднородную окраску, но по полученным данными сушка если и приводит к потере антоцианов, то эта потеря не критична, поэтому сушка листьев допустима.

Заключение

Листья краснолистных кленов являются ценными нетрадиционными растительными источниками антоцианов для промышленной переработки. Антоциановый состав листьев характеризуется накоплением производных цианидина – 3-глюкозидов и 3-рутинозидов, которые частично ацилированы галловой кислотой,

что должно повысить антиоксидантные свойства получаемых природных красителей.

Список литературы

1. Francis F.J., Markakis P.C. // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1989. Vol. 28. pp. 273-314.
2. Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T. et al. // *Food Nutr. Res.* 2017. Vol. 61. 1361779.
3. Kowalczyk E., Krzesiński P., Kura M. et al // *Polish J. Pharmacol.* 2003. Vol. 55. pp. 699-702.
4. Rose P.M., Cantrill V., Benohoud M. et al. // *J. Agric. Food Chem.* 2018. Vol. 66. pp. 6790-6798.
5. Wang H., Li P., Zhou W. // *J. Textiles.* 2014. Vol. 2014. Article ID 587497.
6. Gokilamani N., Muthukumarasamy N., Thambidurai M. et al // *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 2013. Vol. 66. pp. 212-219.
7. Arceusz A., Wesolowski M., Konieczynski P. // *Natural Product Commun.* 2013. Vol. 8. pp. 1821-1829.
8. Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R. // *J. Nutr. Sci.* 2016. Vol. 5, e47.
9. Lee D.W., Collins T.M. // *Int. J. Plant Sci.* 2001. Vol. 162. pp. 1141-1153.
10. Wang Z., Ma P., Xu L. et al. // *Chem. Central J.* 2013. Vol. 7. No 7. 170.
11. Schmitzer V., Osterc G., Veberic R. et al. // *Scientia Horticulturae.* 2009. Vol. 119. pp. 442-446.
12. Ji S.-B., Saito N., Yokoi M. et al. // *Phytochem.* 1992. Vol. 31. pp. 655-657.
13. Fossen T., Andersen O.M. // *Phytochem.* 1999. Vol. 52. pp. 697-1700.
14. Дейнека Л.А., Шапошник Е.И., Гостышев Д.А. и др. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2009. Т. 9. № 4. С.529-536.
15. Дейнека В.И. // *Журнал физической химии.* 2006. Т.80. № 3. С. 507-510.
16. Дейнека В.И., Сидоров А.Н., Дейнека Л.А. // *Журнал аналитической химии.* 2016. Т. 71. № 11. С. 1203-1208.

References

1. Francis F.J., Markakis P.C., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1989, Vol. 28, pp. 273-314. <https://doi.org/10.1080/10408398909527503>
2. Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T. et al., *Food Nutr. Res.*, 2017, Vol. 61, 1361779. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
3. Kowalczyk E., Krzesiński P., Kura M. et al., *Polish J. Pharmacol.*, 2003, Vol. 55, pp. 699-702.
4. Rose P.M., Cantrill V., Benohoud M. et al., *J. Agric. Food Chem.*, 2018, Vol. 66, pp. 6790-6798. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b01044
5. Wang H., Li P., Zhou W., *J. Textiles.*, 2014, Vol. 2014, Article ID 587497. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/587497>.
6. Gokilamani N., Muthukumarasamy N., Thambidurai M. et al., *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2013, Vol. 66, pp. 212-219.
7. Arceusz A., Wesolowski M., Konieczynski P., *Natural Product Commun.*, 2013, Vol. 8, pp. 1821-1829.
8. Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R., *J. Nutr. Sci.*, 2016, Vol. 5, e47, doi:10.1017/jns.2016.41
9. Lee D.W., Collins T.M., *Int. J. Plant Sci.* 2001, Vol. 162, pp. 1141-1153. DOI: 10.1086/321926
10. Wang Z., Ma P., Xu L. et al., *Chem. Central J.*, 2013, Vol. 7, pp. 170. DOI: [10.1186/1752-153X-7-170](https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-170)
11. Schmitzer V., Osterc G., Veberic R. et al., *Scientia Horticulturae*, 2009, Vol. 119, pp. 442-446. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.09.003>
12. Ji S.-B., Saito N., Yokoi M. et al., *Phytochem.*, 1992, Vol. 31, pp. 655-657, [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)90054-T](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)90054-T)
13. Fossen T., Andersen O.M., *Phytochem.*, 1999, Vol. 52, pp. 1697-1700. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00188-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00188-0)
14. Deineka L.A., Shapohnik E.I., Gostyshev D.A. et al. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2009, Vol. 9, No 4, pp. 529-536.

15. Deineka V.I. *Russian Journal of Physical Chemistry*, 2006, Vol. 80, No 3, pp 425-428. <https://doi.org/10.1134/S0036024406030198>

Доронин Андрей Геннадьевич – аспирант кафедры общей химии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород

Дейнека Виктор Иванович – профессор кафедры общей химии, д.х.н., Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород

Дейнека Людмила Александровна – доцент кафедры общей химии, к.х.н., Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород

Тохтарь Валерий Константинович – директор Ботанического сада НИУ, д.б.н., Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород

Селеменев Владимир Федорович - зав. кафедрой аналитической химии, д.х.н., Воронежский государственный университет, Воронеж

16. Deineka V.I., Sidorov A.N., Deineka L.A., *Journal of Analytical Chemistry*, 2016, Vol. 71, No 11, pp. 1145-1150. <https://doi.org/10.1134/S10619348161110034>

Doronin Andrey – Postgraduate of General Chemistry Chair, Belgorod National Research University, Belgorod, 634212@bsu.edu.ru

Deineka Victor I. – Dr.Sc. (Chemistry), Professor of General Chemistry Chair, Belgorod National Research University, Belgorod, deineka@bsu.edu.ru

Deineka Ludmila A. – Ph.D. (Chemistry), Assistant Professor of General Chemistry Chair, Belgorod National Research University, Belgorod, deyneka@bsu.edu.ru

Tokhtar Valery K. – Head of Botanical Garden of Belgorod National Research University, Belgorod National Research University, Belgorod, Tokhtar@bsu.edu.ru

Selemenov Vladimir F. - Head. Department of Analytical Chemistry, Doctor of Chemical Sciences, Voronezh State University, Voronezh