



УДК 543.637:543.54

DOI: 10.18413/2075-4728-2018-41-1-102-108

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТОЦИАНОВ ЦВЕТКОВ  
IXORA COCCINEA****PHYSICAL-CHEMICAL INVESTIGATIONS OF IXORA COCCINEA FLOWERS  
ANTHOCYANINS****Ву Тхи Нгок Ань<sup>1</sup>, Я.Ю. Кульченко<sup>2</sup>, Л.А. Дейнека<sup>2</sup>, В.И. Дейнека<sup>2</sup>  
Vu Thi Ngoc Anh<sup>1</sup>, Ya.Yu. Kulchenko<sup>2</sup>, L.A. Deineka<sup>2</sup>, V.I. Deineka<sup>2</sup>**<sup>1)</sup> Буонматхуотский университет, Вьетнам, 298 Ха Зуи Тай, Вуон Ма Тхуот Даклак, 630000<sup>2)</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет  
Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85<sup>1)</sup> Buon Ma Thuot University, Viet Nam 298 Ha Duy Thai, Buon Ma Thuot, Dac Lac, 630000<sup>2)</sup> Belgorod National Research University, Russia, 308015, Belgorod, Pobedy St., 85

E-mail: kulchenko.1992@mail.ru

**Аннотация**

Цветки иксоры (*Ixora coccinea*) широко используются в аюрведической медицине, а литературные данные свидетельствуют об их высоком фармакологическом потенциале. В работе дифференциальным спектрофотометрическим методом определен уровень накопления антоцианов, которые обеспечивают экстрактам, полученным из цветков иксоры, высокую антиоксидантную активность. Антоцианы экстрагировали из растительного сырья 0.1 М водным раствором HCl. Установлено, что суммарный уровень накопления антоцианов в сушеных лепестках иксоры достигает 400 мг на 100 г растительного сырья. Качественный состав антоцианового комплекса устанавливали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с масс-спектрометрическим и спектрофотометрическим детектированием. При этом было найдено, что антоциановый комплекс цветков иксоры образован четырьмя главными соединениями: 3-рамнозилглюкозидами (рутинозидами) и 3-рамнозилгалактозидами цианидина и пеонидина с большим преобладанием производных цианидина.

**Abstract**

*Ixora* flowers (*Ixora coccinea*) are widely used since Ayurvedic medicine, and literature data prove their high pharmacological potential. In the current investigation differential spectrophotometric method was explored to determine the level of anthocyanins accumulation, that provide extracts under investigation high antioxidant activity. Anthocyanins were extracted from plant material by 0.1 M aqueous solution of HCl by overnight maceration. The total level of anthocyanins accumulation of in dried petals *ixora* was found to be up to 400 mg per 100 g of plant material. The qualitative composition of anthocyanin complex was determined by the method of the reversed-phase HPLC with mass spectrometric and spectrophotometric detections. It was found that *ixora* flowers anthocyanin complex is formed with four main substances: 3-rhamnosylglucosides (rutinoside) and 3-rhamnosylgalactosides of cyanidin and peonidin with a great predominance of the cyanidin derivatives.

**Ключевые слова:** цветки, *Ixora coccinea*, антоцианы, антиоксиданты, экстракция, спектрофотометрия, обращенно-фазовая ВЭЖХ.

**Keywords:** flowers, *Ixora coccinea*, anthocyanins, antioxidants, extraction, spectrophotometry, reversed-phase HPLC.

## Введение

*Ixora coccinea* Linn. (Rubiaceae) – вечнозеленый цветущий кустарник родом из Азии. В нетрадиционной (аюрведической) медицине из различных частей растения готовили препараты с гепатопротекторной, противоболевой, антимиотической и противовоспалительной активностью [Deshpande et al, 2010; Baliga, Kurian, 2012]. При этом цветки использовали для лечения катарального бронхита и дизентерии [Baliga, Kurian, 2012]. Оранжево-красная окраска цветков определяется биосинтезом в них антоцианов: цианидин-3-рутинозида и моногликозида дельфинидина (с неустановленным строением) [Baliga, Kurian, 2012], кроме которых из фенольных соединений в них накапливаются рутин и гликозиды лейкоантоцианидинов. Поэтому водно-метанольный (70 % метанола) экстракт цветков обладает заметной антиоксидантной активностью [Saha et al, 2008]. Важно, что экстракты цветков, полученные при использовании дихлорметана, метанола и воды (10, 50, 100 или 200 мг/мл) в качестве экстрагентов не оказывали мутагенного эффекта на штаммы *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 [Wongwattanasathien et al, 2010]. А, с другой стороны, экстракт из цветков растения может обладать хемопротекторным эффектом против действия некоторых противоопухолевых препаратов (циклофосамида и цисплатина) [Latha, Panikkar, 1999; Latha, Panikkar, 2001].

## Цель

Приведенные данные свидетельствуют о высоком фармакологическом потенциале цветков иксоры, поэтому определение уровня накопления и уточнение состава антоцианового комплекса, как компонентов с наибольшей антиоксидантной активностью, имеет большое значение, что стало целью настоящей работы.

## Материалы и методы

Цветы *Ixora coccinea* были собраны и высушены вне доступа прямого солнечного света во Вьетнаме.

Экстракцию выполняли 0.1 М водным раствором HCl при комнатной температуре. Экстракты отделяли от остатка фильтрованием через бумажный фильтр. Частичный гидролиз антоцианов осуществляли кипячением на водяной бане смеси экстракта с 20%-ным водным раствором серной кислоты в течение одного часа. Смесь охлаждали перед очисткой методом твердофазной экстракции.

Определение суммы антоцианов в растительном материале проводили по традиционному дифференциальному спектрофотометрическому методу [Giusti, Wrolstad, 2001], пересчитывая результат на цианидин-3-глюкозид.

Перед всеми хроматографическими процедурами экстракт очищали от сопутствующих полимерных веществ методом твердофазной очистки. Для этого насадочные картриджи («патроны») ДИАПАК C18 (БиоХимМак СТ, Москва) активировали, пропуская 5 мл ацетона, кондиционировали, пропуская 10-20 мл 0.1 М водного раствора соляной кислоты, сорбировали необходимое количество экстракта, и антоцианы смывали раствором 30 об. % муравьиной кислоты и 30 об.% ацетонитрила в воде, собирая окрашенные фракции, которые перед хроматографированием разбавляли в три раза дистиллированной водой.

Для исследования хроматографического поведения антоцианов использовали обращенно-фазовую ВЭЖХ на оборудовании Agilent Infinity 1200, хроматографическую колонку 150×4.6 мм Symmetry C18 (3.5 мкм) при температуре термостата 40°C в подвижных фазах, содержащих 10 об. % муравьиной кислоты, 6 – 10 об. % ацетонитрила в дистиллированной воде, при скорости подачи подвижной фазы 0.8 мл/мин; детектор диодно-матричный, хроматограммы регистрировали при 515 нм. Для масс-спектрометрических исследований использовали хроматографическую колонку 150×2.1 мм Kromasil 100-5C18, при использовании той же элюентной системы, но при скорости подачи элюента 0.200

мл/мин; детектор масс-спектрометрический квадрупольный с ионизацией электрораспылением; напряжение на фрагменторе 200 В.

Для полупрепаративного выделения индивидуальных компонентов использовали хроматограф Shimadzu LC-20 с колонкой 250×10 мм, Supelcosil C18, 5 мкм в элюенте 10 об. % ацетонитрила, 10 об. % муравьиной кислоты в дистиллированной воде, расход – 5 мл/мин. Детектор – спектрофотометрический.

### Результаты и обсуждение

**Качественное определение антоцианов:** хроматограмма экстракта антоцианов цветков иксоры представлена на рис.1. На ней видны четыре компонента, имеющие очень близкие электронные спектры, характерные для антоцианов цианидинового ряда - производных цианидина и пеонидина -  $\lambda_{\max}$  517 нм, для спектров, записанных в кювете диодноматричного детектора. При этом два вещества имеют удерживание, соответствующее 3-рутинозидам цианидина (пик №2) и пеонидина (пик №4), что установили при сравнении хроматограммы и электронных спектров антоцианов экстракта цветков иксоры с хроматограммой антоцианов плодов магонии падуболистной [Сорокопудов и др, 2005]). Отметим, что близкие значения спектральных характеристик пиков №1 и №3 к пикам 3-рутинозидов указывают на то, что эти вещества также имеют дисахаридный радикал в положении 3, поскольку замена дисахаридного радикала на моносахаридный приводит к заметному гипсохромному сдвигу полосы абсорбции на примерно 1 нм.

Предложенное отнесение пиков полностью подтверждается результатами спектрофотометрического и масс-спектрометрического детектирования, а также параметрами относительного удерживания (табл.1):

$$\lg k(i) = a \cdot \lg k(\text{Cy3Glu}) + b, \quad (1)$$

где  $k$  – логарифмы факторов удерживания веществ №1 - №4, Cy3Glu – цианидин-3-глюкозид (вещество сравнения – определен по удерживания веществ экстракта плодов черной смородины [Дейнека и др., 2009]);  $a$  и  $b$  – коэффициенты. Так для дигликозидов параметр  $a$  должен быть больше единицы примерно на 0.1 логарифмических единиц [Deineka, 2015].

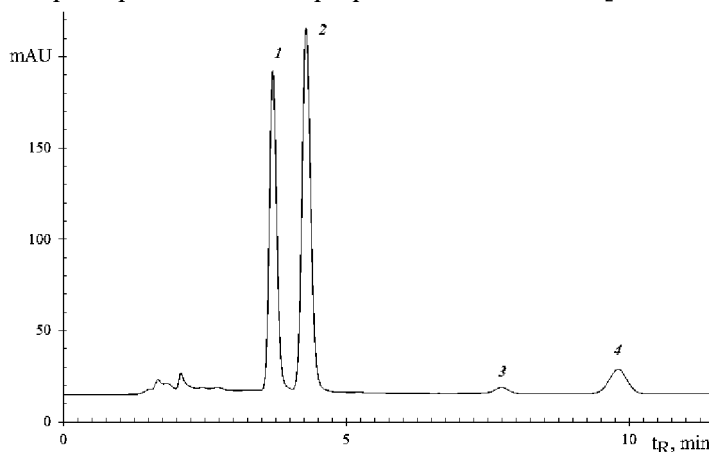


Рис. 1. Хроматограмма антоцианов цветков *Ixora coccinea*  
Колонка 150×4.6 мм Symmetry C18 (3.5 мкм) T = 40°C; подвижная фаза: 10 об. % HCOOH, 8 об. % CH<sub>3</sub>CN в дистиллированной воде, 0.8 мл/мин; детектор: 515 нм. Вещества: 1 – цианидин-3-рамнозилгалактозид, 2 - цианидин-3-рамнозилглюкозид, 3 – пеонидин-3-рамнозилгалактозид, 4 - пеонидин-3-рамнозилглюкозид

Fig. 1. Separation of *Ixora coccinea* flowers anthocyanins  
Column 150×4.6 мм Symmetry C18 (3.5 мкм) T = 40°C; mobile phase: 10 об. % HCOOH, 8 об. % CH<sub>3</sub>CN in distilled water, 0.8 ml/min; detection at 515 нм. Substances: 1 – cyanidin-3-rhamnosylgalactoside, 2 - cyanidin-3-rhamnosylglucoside, 3 – peonidin-3-rhamnosylgalactoside, 2 - peonidin-3-rhamnosylglucoside



Таблица 1  
Table 1

Параметры пиков на хроматограмме антоцианов цветков *Ixora coccinea*  
Peak parameters on the *Ixora coccinea* flowers anthocyanins chromatogram

№*	Антоциан	t <sub>R</sub> <sup>**</sup> , мин	Параметры спектров		Параметры уравнения (1)	
			λ <sub>max</sub> , нм**	M/Z	a	b
1	Цианидин-3-рамнозилгалактозид	3.70	517	595.3; 287.1	1.084	-0.023
2	Цианидин-3-рамнозилглюкозид	4.29	517	595.3; 287.1	1.145	0.081
3	Пеонидин-3-рамнозилгалактозид	7.74	517	609.4; 301.1	1.125	0.431
4	Пеонидин -3-рамнозилглюкозид	9.80	517	609.4; 301.1	1.189	0.540

Примечание: \* - номера соответствуют номерам на хроматограмме на рис.1; 2 – в подвижной фазе 10 об. % СН<sub>3</sub>CN и 10 об. % НСООН в дистиллированной воде, 0.8 мл/мин.

Два остальных пика достаточно необычны – в нашей обширной коллекции образцов экстрактов не нашлось соединений, которые бы имели такие же времена удерживания. Но в соответствии с масс-спектрами и по электронным спектрам соединение, которому соответствует пик №1, содержит в положении 3 цианидина два связанных между собой углевода гексозу и рамнозу, а пик №3 является аналогичным производным пеоницина.

Для уточнения состава соединений этих соединений был выполнен частичный гидролиз индивидуально выделенных веществ №1 и №2 методом полупрепаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии. При кипячении смеси растворов антоцианов с 20%-ной серной кислотой на водяной бане в течение одного часа были получены продукты частичного гидролиза, рис. 2. На представленных хроматограммах исходные соединения №1 и №2 превращаются в 3-галактозид и 3-глюкозид цианидина (и продукт полного гидролиза – незамещенный цианидин), соответственно. Цианидин-3-галактозид идентифицирован по сравнению спектров и времени удерживания с одним из основных компонентов антоцианового комплекса плодов растений подсемейства яблоневые [Дейнека и др., 2005]. На основании полученных результатов можно предложить для соединения №1 структуру цианидин-3-рамнозилгалактозида. При этом, по всей видимости, как и в случае рутинозида рамнозильный радикал гликозилирует положение 6 глюкозидного радикала, уже находящегося в положении 3 агликона.

Выполнить такое исследование для пика №3 было проблематичным вследствие малой концентрации этого вещества в смеси. Но для его идентификации можно воспользоваться специфическими свойствами – параметрами линий тренда на карте относительного удерживания (рис. 3):

$$\lg k(B3X_i) = a \cdot \lg k(A3X_i) + b \tag{2}$$

В уравнении (2) сопоставляется удерживание одинаковых 3-гликозидов (3X<sub>i</sub>) двух различных агликонов (В относительно А, т.е. пеоницина относительно цианидина) в некотором диапазоне составов подвижных фаз. Часто использовавшееся в хроматографии предположение о том, что одинаковое изменение структуры должно приводить к одинаковому изменению удерживания в тех же самых хроматографических условиях, в общем случае не верно, поскольку основано на сопоставлении только энтальпийной составляющей термодинамических параметров процесса. С учетом энтропийной составляющей если при переходе от некоторого типа гликозида к другому соединению с тем же типом гликозилирования агликоны значительно различаются по гидрофильности (в числе ОН-групп, которых в цианидине пять, а в пеонидине – лишь четыре), то должно выполняться соот-

ношение по уравнению (2). И действительно, удерживание пика №4 относительно пика №2 описывается той же прямой линией, что и удерживание в паре пиков №3 относительно №1, поскольку в обоих случаях происходит одинаковая замена основы (цианидина на пеонидин), рис.3. Таким образом, вещества №3 и №4 – пеонидин-3-рамнозилгалактозид и пеонидин-3-рамнозилглюкозид (или рутинозид), но эти вещества содержатся в растительном материале в минорных концентрациях - 1.5 и 7.6 % от суммы площадей пиков против 38.7 и 52.2 % для аналогичных производных цианидина. Никаких производных дельфинидина в существенных количествах (более 1 %) в исследованном в работе образце цветков обнаружено не было.

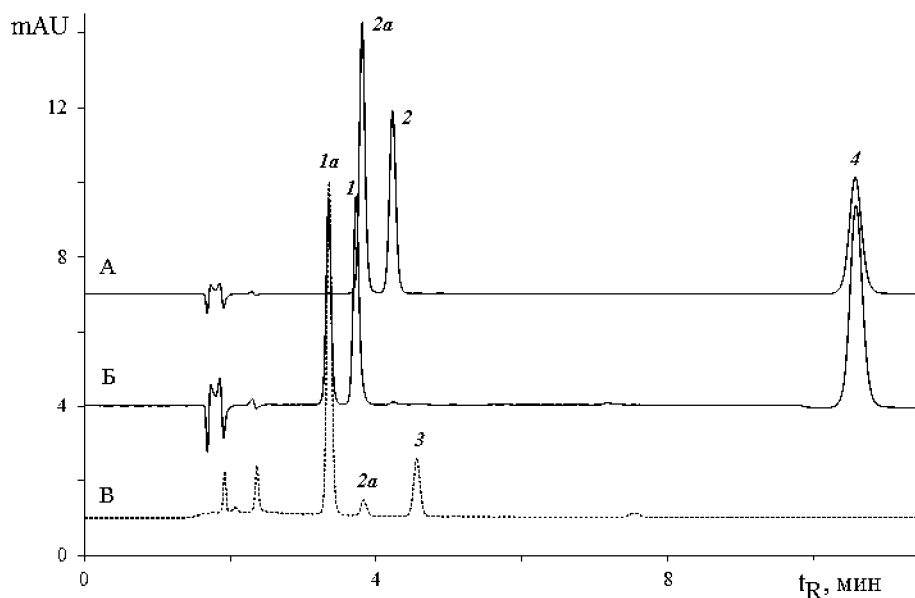


Рис. 2. Хроматограмма частичного гидролиза производных цианидина на фоне хроматограммы антоцианов плодов аронии Мичурина

Условия – см. рис.1. Хроматограммы: А – продукты гидролиза пика №2 на рис.1, Б – продукты гидролиза пика №1 на рис.1, В – антоцианы аронии Мичурина. Вещества: 1а – цианидин-3-галактозид, 1 – цианидин-3-рамнозилгалактозид, 2а – цианидин-3-глюкозид, 2 – цианидин-3-рамнозилглюкозид, 4 – цианидин.

Fig. 2. Chromatograms of partial hydrolysis products of cyaniding drivatives and anthocyanins of aronia michurinii fruits

Conditions see Fig 1. Chromatograms of А – hydrolysis products of peak No2 on Fig.1, Б - hydrolysis products of peak No1 on Fig.1, В – anthocyanins of *Aronia michurinii* fruits. Substances: 1а – cyanidin-3-galactoside, 1 – cyanidin-3-phamnosylgalactoside, 2а – cyanidin-3-glycoside, 2 – cyanidin-3-phamnosylglucoside, 4 – cyanidin.

**Количественное определение антоцианов:** антоцианы из исходного высушенного растительного материала экстрагировали двумя способами: а) экстракцией при растирании в ступке под слоем экстрагента и б) экстракцией неизмельченных лепестков настаиванием в экстрагенте. Первый способ позволяет добиться результата за меньшее время, но вследствие растирания в материале полностью разрушаются мембраны и в экстракт выходят полимерные соединения, осложняющие отделение остатка от экстракта фильтрованием. Второй способ требует большего времени, и, возможно, потребуется несколько последовательных экстракций, но экстракт при этом легко отделяется от остатка фильтрованием через бумажный фильтр. Полученные результаты представлены в табл. 2.

По представленным данным, можно сказать, что, во-первых, результаты, полученные по обоим методам согласуются между собой - доверительные диапазоны содержания перекрываются, тем более, что в первом методе только в одном из образцов найдено заметно большее количество антоцианов, чем в четырех остальных, что может быть случай-

ной флуктуацией. Во вторых, для извлечения антоцианов по методу 2 достаточно двух последовательных экстракций. При этом в первой экстракции извлекается чуть более 80 % антоцианов. В третьих, достаточно высокое содержание антоцианов, легко растворяющихся в воде, объясняет высокую антиоксидантную активность настоев лепестков цветков, найденную другими авторами [Saha et al, 2008].

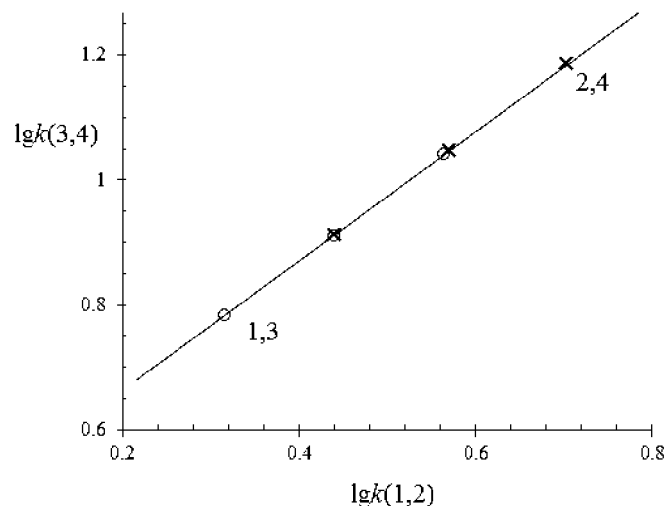


Рис. 3. Корреляционный анализ удерживания двух пар анализов с одинаковым изменением структуры

Вещества: 1 – цианидин-3-рамнозилгалактозид, 2 - цианидин-3-рамнозилглюкозид, 3 – пеонидин-3-рамнозилгалактозид, 4 - пеонидин-3-рамнозилглюкозид.

Fig. 3. Retention correlation analysis of two pairs of substances with the same structural alterations  
 Substances: 1 – cyanidin-3-rhamnosylgalactoside, 2 - cyanidin-3-rhamnosylglucoside, 3 – peonidin-3-rhamnosylgalactoside, 2 - peonidin-3-rhamnosylglucoside.

Таблица 2  
 Table 2

Результаты экстракции антоцианов по двум методам, приведены в г на 100 г исходного материала в пересчете на цианидин-3-глюкозид хлорид  
 Results of anthocyanins extraction by two methods, calculates in g per 100 g of initial material as cyaniding-3-glucoside chloride equivalent

Образец №	Метод 1	Метод 2			Сумма
		1 экстракция		2 экстракция	
	г/100 г	г/100 г	%	г/100 г	г/100 г
1	0.379	0.272	82.5	0.058	0.329
2	0.425	0.261	82.9	0.054	0.315
3	0.420	0.262	84.0	0.050	0.312
4	0.441	0.355	84.0	0.068	0.423
5	0.538	0.398	82.4	0.085	0.483
Среднее значение и доверительный интервал (p=0.95)	0.441±0.073				0.372±0.096



## Выводы

Исследования, выполненные в работе методами ВЭЖХ с масс-спектрометрическим и спектрофотометрическим детектированием, включая частичный гидролиз индивидуально выделенных производных цианидина, показали, что антоциановый комплекс цветков *Ixora coccinea* образован четырьмя главными соединениями: 3-рамнозилглюкозидами (рутинозидами) и 3 рамнозилгалактозидами цианидина и пеонидина. Уровень накопления антоцианов в сушеных лепестках достигает 400 мг на 100 г.

## Список литературы References

1. Дейнека В.И., Григорьев А.М., Дейнека Л.А., Ермаков А.М., Сиротин А.А., Староверов В.М. 2005. Анализ компонентного состава антоцианов плодов и жирных кислот масел семян некоторых видов семейства Rosaceae методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Растительные ресурсы, 1: 91 - 98.  
Deineka V.I., Grigor'ev A.M., Deineka L.A., Ermakov A.M., Sirotin A.A., Staroverov V.M. 2005. Analiz komponentnogo sostava antocianov plodov i zhirnyh kislot masel semyan nekotorykh vidov semejstva Rosaceae metodom vysokoeffektivnoj zhidkostnoj hromatografii. Rastitel'nye resursy [Plant resources], 1: 91 - 98. (in Russian)
2. Дейнека Л.А., Шапошник Е.И., Гостищев Д.А., Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н., Селеменев В.Ф. 2009. ВЭЖХ в контроле антоцианового состава плодов черной смородины. Сорбционные и хроматографические процессы, 9 (4): 529 - 536. <https://elibrary.ru/item.asp?id=12947936>  
Deineka L.A., Shaposhnik E.I., Gostishchev D.A., Deineka V.I., Sorokopudov V.N., Selemenev V.F. 2009. VENZHKH v kontrole antocianovogo sostava plodov chernoj smorodiny. Sorbcionnye i hromatograficheskie process [Sorption and Chromatographic Processes], 9(4): 529 - 536. (in Russian).
3. Сорокопудов В.Н., Хлебников В.А., Дейнека В.И. 2005. Антоцианы некоторых растений семейства Berberidaceae. Химия растительного сырья, 4: 57 - 60. [http://www.chem.asu.ru/chemwood/volume9/2005\\_04/0504\\_057.html](http://www.chem.asu.ru/chemwood/volume9/2005_04/0504_057.html)  
Sorokopudov V.N., Hlebnikov V.A., Deineka V.I. 2005. Antociany nekotorykh rastenij semejstva Berberidaceae. Himiya rastitel'nogo syr'ya [Chemistry of Plant Raw Materials], 4: 57 - 60.
4. Baliga M.S., Kurian P.J. 2012. *Ixora Coccinea* Linn.: Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. Chin. J. Integr. Med., 18(1): 72 - 79. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11655-011-0881-3>
5. Deineka V.I., Deineka L.A., Saenko I.I. 2015. Regularities of Anthocyanins Retention in RP HPLC for "Water-Acetonitrile-Phosphoric acid" Mobile Phase. J. Anal. Methods Chem., 2015: ID 732918. <https://www.hindawi.com/journals/jamc/2015/732918/>
6. Deshpande A., Jadge D., Dhawale S., Patrakar R., Gadgul A. 2010. Flower Extract of *Ixora coccinea* as a Natural Indicator in Acid Base Titration. J. Pharm. Res., 3(10): 2512 - 2513. URL: [https://www.researchgate.net/publication/207109005\\_Flower\\_Extract\\_of\\_Ixora\\_coccinea\\_as\\_a\\_Natural\\_Indicator\\_in\\_Acid\\_Base\\_Titration](https://www.researchgate.net/publication/207109005_Flower_Extract_of_Ixora_coccinea_as_a_Natural_Indicator_in_Acid_Base_Titration)
7. Giusti M.M., Wrolstad R.E. (2001) UNIT F1.2 Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy / In Current Protocols in Food Analytical Chemistry, R.E. Wrolstad (Ed.), John Wiley & Sons, New York, NY: 1 - 13. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142913.faf0102s00/abstract>
8. Latha P.G., Panikkar K.R. 1999. Modulatory effects of *Ixora coccinea* flower on cyclophosphamide-induced toxicity in mice // Phytother. Res., 13: 517 - 520. [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199909\)13:6<517::AID-PTR524>3.0.CO;2-Y/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1099-1573(199909)13:6<517::AID-PTR524>3.0.CO;2-Y/abstract)
9. Latha P.G., Panikkar K.R. 2001. Chemoprotective effect of *Ixora coccinea* L. flowers on cisplatin induced toxicity in mice // Phytother. Res., 15: 364 - 366. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.727/abstract>
10. Saha M.R., Alam M.A., Akter R., Jahangir R. 2008. In vitro free radical scavenging activity of *Ixora coccinea* L. Bangla. J. Pharmacol., 3: 90 - 96. <http://www.banglajol.info/index.php/BJP/article/view/838>
11. Wongwattanasathien O, Kangsadalampai K, Tongyong L. 2010. Antimutagenicity of some flowers grown in Thailand Food // Chem. Toxicol., 48: 1045 - 1051. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691510000700>