

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТОЦИАНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ЛЕПЕСТКОВ ЦВЕТКОВ ПИОНОВ

А.Н. Чулков¹

В.И. Дейнека¹

М.Ю. Третьяков²

Л.А. Дейнека¹

О.В. Нецветова¹

¹ Белгородский государственный национальный исследовательский университет

Россия, 308015, Белгород, ул. Победы, 85

E-mail: deineka@bsu.edu.ru

² ГНУ Белгородский НИИСХ Россельхозакадемии

Россия, 308001, Белгород, ул. Октябрьская, 58

Методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами исследованы антоциановые комплексы лепестков цветков пионов из коллекции Ботанического сада БелГУ. Показано, что основной компонент всех исследованных комплексов (кроме *P. tenuifolia* L.) – пеонидин-3,5-диглюкозид, другие принципиальные компоненты – пеонидин-3-диглюкозид, цианидин-3,5-диглюкозид, цианидин-3-глюкозид и следовые количества пеларгонидин-3,5-диглюкозида, еще реже обнаруживается пеларгонидин-3-глюкозид. Высокий уровень накопления антоцианов в интенсивно окрашенных сортах пионов (до 0.680 г на 100 г свежих лепестков) позволяет рассматривать их как перспективные источники антоцианов для промышленного получения натуральных колорантов.

Ключевые слова: ОФ ВЭЖХ, антоцианы, электроспрей, масс-спектрометрия, цветки, *Paeonia*.

Введение

Род Пион (*Paeonia* L.) относится к семейству пионовые (Paeoniaceae) порядка Камнеломкоцветные (Garryales). Систематизация внутри рода, содержащего более 30 видов, неоднозначна и включает три (*Paeonia*, *Moutan* и *Onaepia* [1]) или четыре (добавляется еще *Albiflora*) подрода (<http://www.peonies.org/PeonySpecies.html>) (может нужно давать ссылку по форме – [2]). Пионы подразделяются на травянистые, у которых надземная часть осенью отмирает, и древовидные, сохраняющие ее круглый год. В культуре наиболее широко распространены травянистые пионы, реже выращиваются древовидные пионы. В России произрастают 7 видов, 4 из которых (*P. lactiflora* Pall., *P. tenuifolia* L., *P. wittmanniana* Hartwiss ex Lindl., *P. officinalis* L.) широко используются в селекции [2].

Само название «пион» (*Paeonia*) имеет мифологическое происхождение и происходит от имени Пеон – ученика мифического целителя Асклепия [1]. Это связано с тем, что из некоторых пионов готовят лекарственные препараты, например, настойка корней пиона уклоняющегося, *Paeonia anomala* L., или марьиного корня, признана в официальной медицине в России [3].

Травянистые пионы достигают 60-100 см высоты и характеризуются мощным мясистым корневищем и крупными рассеченными листьями. На концах стеблей, по одному или соцветиями, расположены крупные махровые, полумахровые или простые цветки, окраска которых может варьироваться от белой до кремовой и желтой или через розовую до красной или фиолетовой, что обусловлено биосинтезом в них антоцианов [4, 5]. Антоциановые комплексы образованы 3-глюкозидами и 3,5-диглюкозидами пеларгонидина, цианидина и петунидина в различных соотношениях.

Антоцианы в настоящее время рассматриваются в качестве пищевых колорантов с высокой биологической активностью [6]. Цветки пионов как непищевые источники антоцианов могут представлять интерес для препаративных целей. Целью настоящей работы было исследование антоциановых комплексов лепестков цветков пионов и оценка их потенциала для препаративного получения колорантов.

Экспериментальная часть

В работе исследовали лепестки цветков пионов из коллекции ботанического сада БелГУ. Антоцианы экстрагировали 0.1 М водным раствором соляной кислоты; сум-

марное содержание антоцианов определяли спектрофотометрическим методом с пересчетом на цианидина-3-глюкозид [7].

Видовой состав антоцианового комплекса лепестков цветков исследовали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием хроматографа фирмы Agilent 1260 с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами. В качестве элюентов использовали систему ацетонитрил муравьиная кислота вода (8 : 10 : 92), при скорости подвижной фазы 1 мл/мин; в работе использовали хроматографическую колонку – Symmetry® C18 4.6×250 мм с термостатированием при 40 °С. Спектры индивидуальных компонентов записывали в ячейке диодно-матричного детектора в диапазоне длин волн 420-600 нм. Масс-спектры записывали на квадрупольном масс спектрометре Agilent 6130 Quadrupole LC/MS в режиме ESI (ионизация распылением в электрическом поле) с позитивным режимом сканирования в диапазоне масс 250-1200. Напряжение на фрагментаторе – 200 В. Давление газа-распылителя 2 бар, скорость газа осушителя 10 л/мин, температура газа осушителя 350 °С, температура испарителя 250 °С.

Результаты и обсуждения

По литературным данным [4, 5] древовидные пионы по антоциановому составу пигментов лепестков цветков подразделяются на четыре группы, различающиеся долей пеларгонидина, цианидина и пеонидина в общей сумме 3-глюкозидов и 3,5-диглюкозидов. В экстрактах лепестков цветков растений исследованных в настоящей работе, основными компонентами оказались только производные цианидина и пеонидина, а гликозиды пеларгонидина присутствовали лишь в следовых количествах (рис. 1).

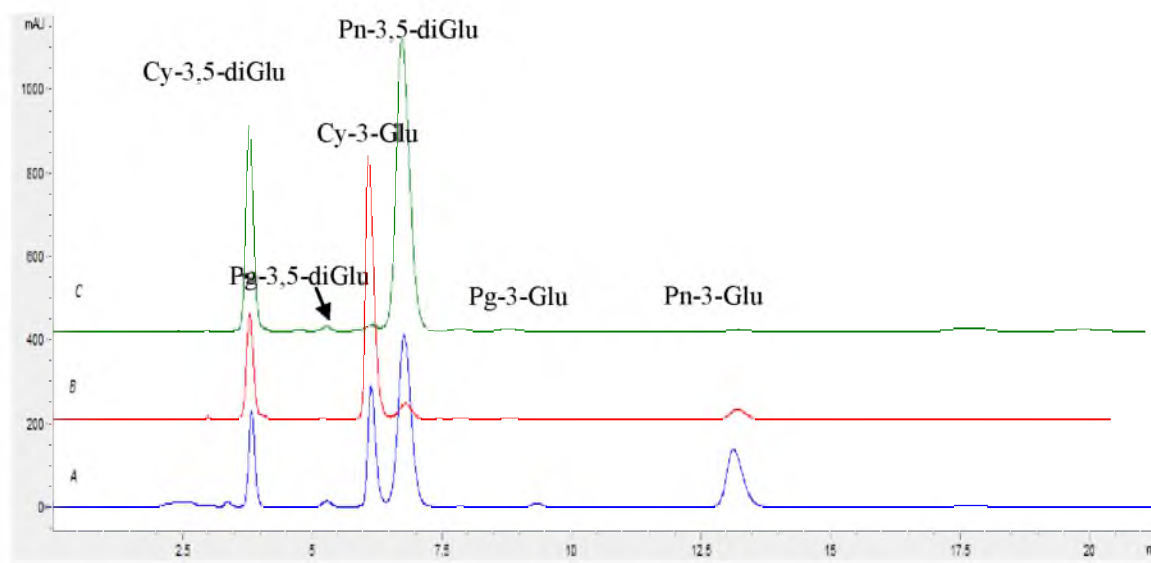


Рис. 1. Хроматограммы исследуемых пионов
А – пион древовидный, В – пион тонколистый, С – пион обыкновенный

Для идентификации индивидуальных компонентов на рис. 1 мы использовали, во-первых, сопоставление удерживания с антоцианами плодов черного винограда (смесь 3-глюкозидов дельфинидина, петунидина, мальвидина, цианидина и пеонидина, [8]), плодов барбариса обыкновенного (3-глюкозиды цианидина и пеларгонидина [9]) и черной смородины [10]. Так были найдены 3-глюкозиды цианидина, пеларгонидина и пеонидина.

Для идентификации 3,5-диглюкозидов использовали специфическую общность для всех антоцианидинов карты относительного удерживания «антоцианидин-3,5-диглюкозид относительно антоцианидин-3-глюкозид», построенной с использованием цианидин-3-глюкозида из плодов черной смородины и 3,5-диглюкозида цианидина из лепестков цветков красной розы по методу, изложенному ранее [11].

Во-вторых, для подтверждения правильности отнесения мы использовали спектральные характеристики антоцианов, записанные в ячейке диодно-матричного детектора. Для 3-глюкозидов цианидина и пеонидина получены практически идентичные спектры с максимумом поглощения при 516 нм, тогда как в спектрах производных пеларгонидина максимум абсорбции смещается в коротковолновую область до 498 нм (рис. 2). При этом введение второго глюкозидного радикала в положение 5 приводит к характерному изменению спектра – к небольшому гипсохромному смещению основного пика (на 1-2 нм) и к исчезновению полосы при ~ 440 нм.

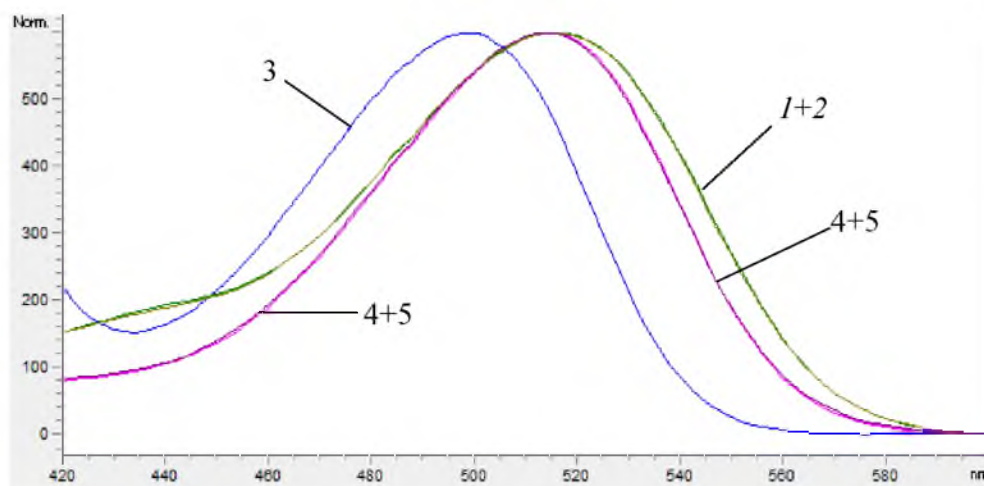


Рис. 2. Спектры компонентов антоцианов пионов

1 – цианидин-3-глюкозид (Cy-3-Glu), 2 – пеонидин-3-глюкозид (Pn-3-Glu), 3 – пеларгонидин-3-глюкозид (Pg-3-Glu), 4 – цианидин-3,5-диглюкозид (Cy-3,5-diGlu), 5 – пеонидин-3,5-диглюкозид (Pn-3,5-diGlu)

И наконец, в-третьих, для подтверждения идентификации использовали масс-спектрометрические параметры компонентов элюата. Спектры записывали в режиме электроспрей – Electrospray ionization, ESI, т.е. ионизацией распылением в электрическом поле (рис. 3). Этот метод, за разработку которого американскому физика Дж. Фенну в 2002 г. была присуждена Нобелевская премия, был впервые реализован в Ленинградском институте аналитического приборостроения Академии Наук [12], где он получил название ЭРИАД – экстракция ионов из растворов при атмосферном давлении. Метод характеризуется возможностью контроля фрагментации – в том числе и возможностью получения молекулярных ионов, но в нашем случае, как и по литературным данным, молекулярные ионы (M^+) не удается получить в индивидуальном виде – отщепление углеводного фрагмента происходит очень легко (см. схема 1).

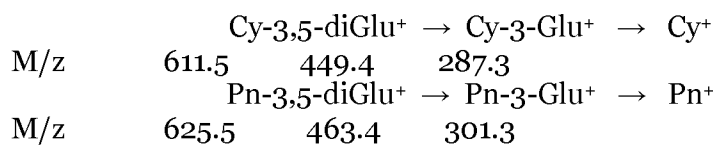


Схема 1. Фрагментация ионов антоцианов

Так, в случае цианидина-3-глюкозида основным является не молекулярный ион с $M/z = 449.1$, а продукт отщепления глюкозы – катион цианидина $M/z = 287.0$. Удивительно, но в случае цианидин-3,5-диглюкозида сигнал молекулярного иона оказывается основным. Следовательно, при анализе элюата, во-первых, нельзя быть уверенным в надежности определения массы аналита и, во-вторых, возможны проблемы при идентификации в том случае, если происходит соэлюирование двух или более веществ. По этой причине, исследование хроматографического поведения компонентов смеси и построение карты разделения [13] является необходимой процедурой в ВЭЖХ не

только при использовании спектрофотометрического, но и масс-спектрометрического детекторов.

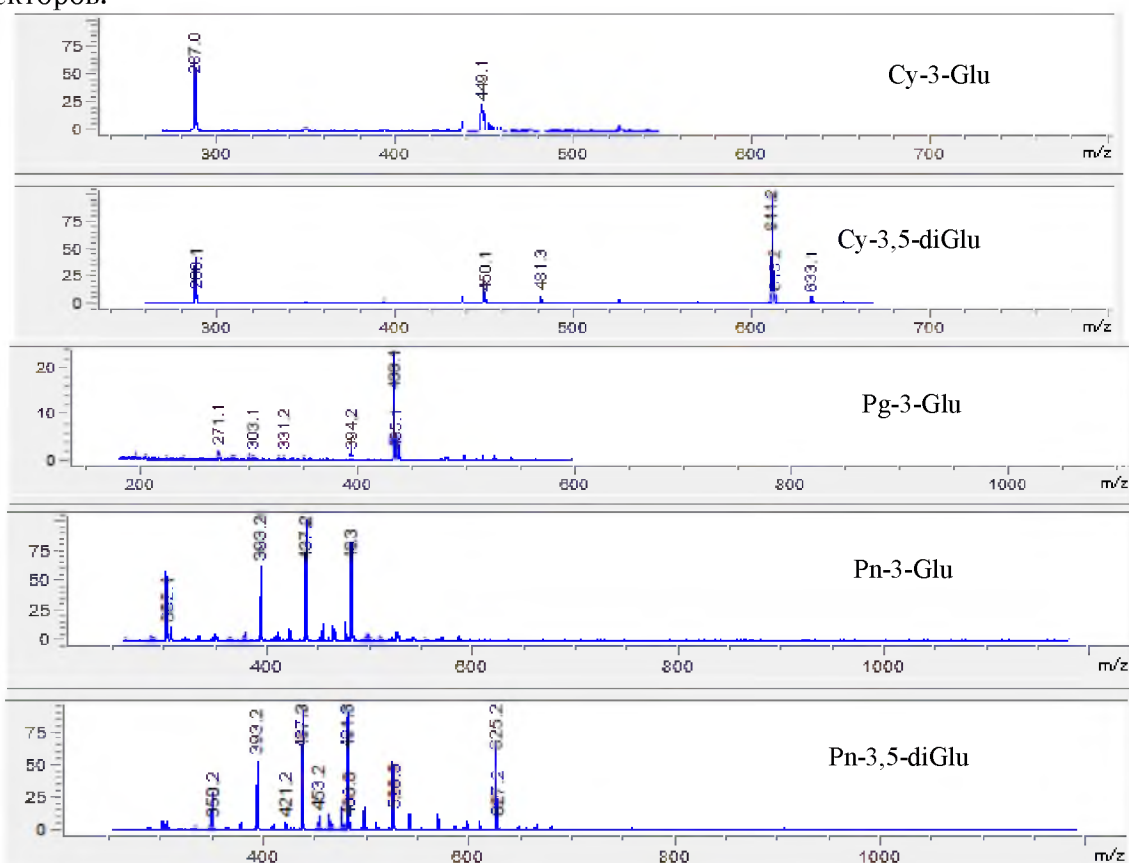


Рис. 3. Масс-спектры антоцианов в режиме ESI

Результаты определения антоцианов лепестков цветков пионов, исследованных в данной работе, представлены в таблице. Для сопоставления найденных составов удобно использовать обобщенные параметры относительной активности ферментов, определяющих набор антоцианов.

Так, для всех антоцианов активности двух флавоноид гидроксилаз (F3'N и F3',5'N) определяет в конечном итоге образование антоцианов цианидинового (цианидина и пеонидина) и дельфинидинового (дельфинидина, петунидина и мальвидина) рядов [14]. Но в нашем случае расчет параметров, оценивающих активность этих ферментов, практически лишен смысла, поскольку во всех случаях доля производных пеларгонидина была очень низкой, что говорит о высокой относительной активности F3'N и об отсутствии F3',5'N для всех пионов из коллекции ботанического сада БелГУ. Однако, судя по литературным данным, существуют сорта пионов с низкой активностью F3'N.

Второй параметр может быть определен как активность фермента, вводящего глюкозидный заместитель в положение глюкозил-5-трансфераза, G5T, которая может быть рассчитана по доле 3,5-диглюкозидов в сумме всех антоцианов:

$$\alpha(G5T) = \frac{n(Cy-3,5-diGlu) + n(Pg-3,5-diGlu) + n(Pn-3,5-diGlu)}{\sum n(i)}$$

Третий параметр отвечает за дифференциацию антоцианов внутри каждого из рядов и определяется активностью метилтрансфераз, превращающих производные цианидина в производные пеонидина. Он рассчитывается по доле всех производных пеонидина в сумме всех производных пеонидина и цианидина:

$$\alpha(Me) = \frac{\sum n(Pn)}{\sum n(Pn) + \sum n(Cy)}$$

Таблица

**Антоциановые комплексы цветков пионов из коллекции
Ботанического сада БелГУ**

	Доля индивидуальных антоцианов, моль %						$\alpha(Me)$	$\alpha(G5T)$
	Cy35G	Pg35G	Cy3G	Pn35G	Pg3G	Pn3G		
Пион древовидный (<i>P. x suffruticosa</i> Andrews)	11.7	0.9	20.0	45.8	0.9	20.6	0.67	0.57
Пион тонколиственный (<i>P. tenuifolia</i> L.)	22.1	0.0	66.9	6.1	0.0	4.9	0.11	0.28
Пион Делавей (<i>P. delavayi</i> Franchet)	17.1	0.0	9.7	63.7	0.0	9.5	0.73	0.81
Сортовые пионы								
группа гибридные								
Хэнри Бокстоус	7.2	0.8	0.0	90.9	0.0	1.1	0.92	0.98
Рэд Чарльз	6.3	3.6	0.0	88.5	0.0	1.6	0.90	0.95
Кэрл	1.2	0.4	0.0	97.8	0.0	0.6	0.98	0.99
группа розовидные								
Франсуа Ортега	3.8	1.9	0.0	93.4	0.0	0.9	0.94	0.97
Зе Майти Мо	2.9	0.8	0.0	94.2	0.0	2.0	0.96	0.97
Парковый	2.8	1.5	0.0	95.0	0.0	0.7	0.96	0.98
Сэр Томас Липтон	2.1	1.1	0.0	95.9	0.0	0.8	0.97	0.98
группа японские								
Золотое руно	8.6	1.7	0.6	87.7	0.0	1.4	0.89	0.96
Бэтти Гров	3.3	3.7	0.0	93.0	0.0	0.0	0.93	0.96
неизвестные сорта								
№1	28.0	0.0	1.3	69.9	0.0	0.8	0.71	0.98
№2	11.9	1.6	0.0	86.2	0.0	0.3	0.86	0.98

Как следует из представленных данных, для большинства исследованных сортов пионов характерна высокая активность как глюкозил-5-трансферазы, так и метилтрансфераз, приводящая к преимущественному образованию пеонидин-3,5-диглюкозидов. При этом примечательно то, что уровень накопления антоцианов в лепестках цветков пиона сорта Хэнри Бокстоус довольно высок – порядка 0.680 г на 100 г свежих лепестков. Это меньше, чем для плодов бузины, черники и аронии черноплодной, но с учетом величины цветков (под 50 г) и несъедобности материала они становятся перспективными источниками антоцианов с относительно простой технологией выращивания (пионы – многолетники) и сбора продукции.

Заключение

Таким образом, лепестки цветков пионов из коллекции Ботанического сада БелГУ накапливают в основном пеонидин-3,5-диглюкозид, другие принципиальные компоненты – пеонидин-3-диглюкозид, цианидин-3,5-диглюкозид, цианидин-3-глюкозид и следовые количества пеларгонидин-3,5-диглюкозида, еще реже обнаруживается пеларгонидин-3-глюкозид. Высокий уровень накопления антоцианов в интенсивно окрашенных сортах позволяет рассматривать их как перспективные источники антоцианов для промышленного получения.

Список литературы

1. Halda J.J., Waddick J. W. The genus *Paeonia*. – Portland: Timber Press, 2004. – 226 p.
2. Ефимов С.В. Род *Paeonia* L. Современные направления интродукции и методы оценки декоративных признаков: автореф. дис... канд. биол. наук. – М., 2008. – С. 4-5.
3. Турова А.Д., Сапожникова Э.Н. Лекарственные растения СССР и их применение. – М.: Медицина, 1984. – С. 45-47.



4. Analysis of Petal Anthocyanins to Investigate Flower Coloration of Zhongyuan (Chinese) and Daikon Island (Japanese) Tree Peony Cultivars / L.-S. Wang, A. Shiraishi, F. Hashimoto et al. // *J. Plant Res.* – 2001. – V.114. – P. 33-43.
5. Analysis of petal anthocyanins to investigate coloration mechanism in herbaceous peony cultivars / N. Jia, Q.-Y. Shu, L.-S. Wang et al. // *Sci. Hortic.* – 2008. – V.117. – P. 167-173.
6. He J., Giusti M.M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties // *Annual Rev. Food Sci. Technol.* – 2010. – V.1. – P. 163-187.
7. Giusti M., Wrolstad R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy // *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (2001) F1.2.1-F1.2.13. (?)
8. Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes / F. He, L. Mu, G.-L. Yan et al. // *Molecules.* – 2010. – V.15. – P. 9057-9091.
9. Сорокопудов В.Н., Хлебников В.А., Дейнека В.И. Антоцианы некоторых растений семейства Berberidaceae // *Химия растительного сырья.* – 2005. – №4. – С. 57-60.
10. ВЭЖХ в контроле антоцианового состава плодов черной смородины / Л.А. Дейнека, Е.И. Шапошник, Д.А. Гостищев и др. // *Сорбц. хром. процесс.* – 2009. – Т.9, Вып.4. – С. 529-536.
11. Дейнека В.И., Григорьев А.М. Относительный анализ удерживания гликозидов цианидина // *Ж. физ. химии.* – 2004. – Т.78, №5. – С. 923-926.
12. Механизм молекулярной фрагментации и атомизации ионов в газодинамической транспортирующей ячейке / А.Н. Баженов, С.В. Булович, Л.Н. Галль и др. // *Письма в ЖТФ.* – 2010. – Т.36, Вып. 7. – С. 45-53.
13. Дейнека В.И. Карта хроматографического разделения и инкрементные зависимости в методе относительного анализа удерживания в ВЭЖХ // *Ж. физ. химии.* – 2006. – Т.80, №3. – С. 511-516.
14. Дейнека Л.А., Литвин Ю.Ю., Дейнека В.И. Критерии для классификации винограда по антоциановому комплексу плодов // *Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки.* – 2008. – №7(47), Вып.7. – С. 71-78.

INVESTIGATION OF PAEONIA FLOWERS PETALS ANTHOCYANIN COMPLEXES

**A.N. Chulkov¹, V.I. Deineka¹
M.Yu. Tretyakov², L.A. Deineka¹
O.V. Netzvetayeva¹**

Belgorod State National Research University

Pobedy St., 85, Belgorod, 308015, Russia

E-mail: deineka@bsu.edu.ru

² Belgorod Agricultural Research Institute

Oktyabrskaya St., 58, Belgorod, 308001, Russia

Anthocyanin complexes of peony flowers petals from the collection of Botanical Garden of Belgorod State University were investigated by reversed-phase HPLC with diode array and mass spectrometric detectors. Peonidin-3,5-diglucoside has been shown to be the main component in all but *P. tenuifolia* L. species under investigation – peonidin-3-glucoside, cyanidin-3,5-diglucoside, cyanidin-3-glucoside as well as pelargonidin-3,5-diglucoside were also with a trace level of pelargonidin accumulation. Pelargonidin-3-glucoside is found even more rarely. A high overall concentration of anthocyanins in deeply colored flower (up to 0/680 g per 100 of fresh petals) prove the material to be a rich source of anthocyanins for industrial natural colorants manufacture.

Keywords: RP HPLC, anthocyanins, electrospray, ESI-MS, flowers, *Paonia*.