

Chromatographic Behavior of Petanin in Reversed-Phase HPLC in Mobile Phases with a Wide Range of pH

V. I. Deineka^{a,*}, Ya. Yu. Kul'chenko^a, and L. A. Deineka^a

^a Belgorod State National Research University, Belgorod, 308015 Russia

*e-mail: deineka@bsu.edu.ru

Received June 4, 2018

Abstract—The chromatographic behavior of petanin, petunidin-3-*O*-[6-*O*-(4-*O*-(*E*)-*para*-coumaroyl-*O*- α -rhamnopyranosyl)- β -glucopyranoside]-5-*O*- β -glucopyranoside, is studied for the first time under conditions of reversed-phase high performance liquid chromatography in mobile phases with different pH values. The relationship between chromatographic behavior (retention time and peak efficiency) and transitions between different forms of anthocyanins is discussed. Analysis of the data obtained in the 2 to 6.5 range of mobile pH phases, the absorption spectra of petanin, and the results from studying the effect of adding tetrabutylammonium bromide to the mobile phase shows that increasing the pH results in the formation of uncharged and anionic forms, in addition to the pseudobase form.

Keywords: anthocyanins, flavin form, quinoid structures, HPLC, pH

DOI: 10.1134/S0036024419030038

INTRODUCTION

Anthocyanins are of great interest as natural food dyes that have a beneficial effect on human health [1]. While belonging to the class of flavonoids, they differ from other members of this class by their ability to form a great many pH-dependent forms in aqueous solutions [2]. This property, along with a tendency toward co-pigmentation of several types and complexation [3, 4], allows us to obtain many of the colors found in natural objects (fruits, flowers, and leaves) that contain anthocyanins and their derivatives [5, 6]. Equilibria and mutual transitions between forms of anthocyanins have been studied thoroughly. In addition, the wide variety of natural anthocyanin species that differ in chemical structure results in differences between their behavior in solutions with changing pH. In an acidic medium (pH 1 or lower), anthocyanins generally exist in the flavilium form (**I**) in shades of red that depend on its structure (Fig. 1). As the pH rises, they undergo two types of transformations. The first of these (hydration) begins with a nucleophilic attack by water molecules and ends with the formation of a colorless pseudobase (cyclic hemiketal (**II**)) (Fig. 1). Product **II** evolves quickly and reversibly, forming a lightly colored yellow-green *cis*-chalcone form (**IIIa**) that slowly [7, 8] converts into a *trans*-chalcone form (**IIIb**). The rapid elimination of protons competes with this process to form intensely colored bluish quinoid (quinonoidal bases) forms (**IVa** and **IVb**) as well, the number of which depends on how many substituents are in the structure. Finally, upon another

increase in pH, charged quinoid structures (**V**) intensely colored with a bathochromic shift of absorption maxima can also form, the number of which also depends on the structure of the anthocyanin. For some types of anthocyanins, even dianionic (based on quinoid) structures can form [8].

Reversed-phase chromatography is widely used for the separation of anthocyanins [9], but only in the flavilium form (i.e., in strongly acid mobile phases). The aim of this work was to determine the characteristics of the chromatographic behavior of anthocyanins during reversed-phase chromatography in mobile phases in the pH range of 2 to 7 normally used for traditional octadecyl-modified silica gels.

EXPERIMENTAL

An extract of nightshade fruit (*Solanum retroflexum*) was obtained via infusion in a 0.1 M aqueous solution of hydrochloric acid with subsequent purification using solid-phase extraction on Diapak C18 concentrating cartridges (Biokhimmak ST, Moscow).

Chromatographic studies were performed on an Agilent 1200 Infinity chromatograph equipped with a diode array detector. A Kromasil 100-5C18 chromatographic column of 4.6 \times 100 mm was used. Mobile phase A was 36 vol % acetonitrile (pure for analysis, Component-Reaktiv) in distilled water. Phase B consisted of a 0.01 M phosphate buffer solution whose pH was adjusted to the required value by adding sodium

SHORT
COMMUNICATIONS

Using Karapet'yants Comparative Analysis in Chromatography

V. I. Deineka^{a,*}, Ya. Yu. Kul'chenko^a, A. N. Chulkov^b, I. P. Blinova^a, and L. A. Deineka^a

^a Belgorod State National Research University, Belgorod, 308015 Russia

^b Center for Assessing the Quality of Grain and Its Products, Belgorod Branch, Belgorod, Russia

*e-mail: deineka@bsu.edu.ru

Received July 4, 2018; revised July 4, 2018; accepted September 11, 2018

Abstract—Karapet'yants comparative analysis is applied to anthocyanin retention using the example of an extract of *Adonis aestivalis* petals. The attribution of anthocyanin peaks according to the comparative analysis is confirmed by the parameters of the mass spectra. A set of purple maize anthocyanins is used as a reference sample.

Keywords: comparative analysis, anthocyanins, flowers, *Adonis aestivalis*, reverse phase HPLC

DOI: 10.1134/S003602441905008X

INTRODUCTION

The retention of sorbates under RP RPLC conditions is a physicochemical process determined by the free energy of sorption of substances. Existing means of comparative calculation should therefore be applicable to the physicochemical study of this chromatographic process.

The aim of this work was to study the possibility of transferring the comparative analysis (comparing properties in two rows) developed by Karapet'yants [1] to analyzing sorbate retention in HPLC.

EXPERIMENTAL

Anthocyanins were obtained via extraction from the petals of *Adonis aestivalis* flowers, wrappers of purple maize, black currant, and barberry, using a 0.1 M aqueous solution of HCl. All solutions of the anthocyanins were purified by means of solid-phase extraction on Diapak C18 cartridges prior to chromatography.

Chromatographic studies were performed on an Agilent 1200 instrument with a diode array and mass spectrometric detection. The chromatographic behavior of anthocyanins was studied using the following columns (1) 150 × 4.6 mm; Symmetry C18; 5 μm, with diode array detection in the range of 270–700 nm and (2) 150 × 2.1 mm Kromasil 100-5C18, with mass spectrometric detection in the electrospray ionization mode and positive ion scanning. The voltage on the fragmentor was 175 V.

In the gradient elution mode, eluent A was 6 wt % CH₃CN, 10 wt % HCOOH in water; eluent B was 20 wt % CH₃CN, 10 wt % HCOOH in water. The program was 0 min for 100% A; 20 min 100% for B; 21 min 100 % for A; and 30 min for 100% A. The rate

of eluent supply was 0.8 mL/min for column (1) and 0.2 mL/min for column (2). In the isocratic mode, eluents A and B were mixed in a specified ratio.

RESULTS AND DISCUSSION

A chromatogram of the extract of summer pheasant's-eye (*Adonis aestivalis*) flowers using the 0.1 M aqueous solution of hydrochloric acid is presented in Fig. 1. It shows 12 components that can be divided into three groups, according to the absorption spectra: four derivatives each of pelargonidin ($\lambda_{\max} = 500$ nm),

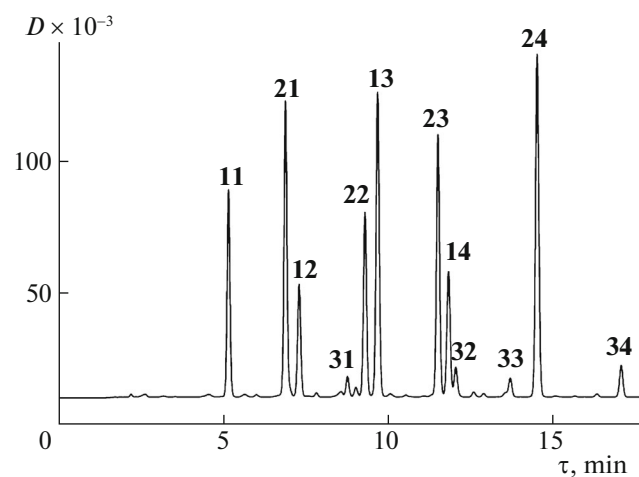


Fig. 1. Anthocyanin separation of *Adonis aestivalis* flowers. Column: 150 × 4.6 mm; symmetry C18; 5 μm. Mobile phase, gradient mode (see text). For the list of compounds, see Table 1.

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

Л. В. Колчанова, Л. А. Дейнека, Ю. Н. Козырева, Е. Ю. Олейниц, Я. Ю. Кульченко
Белгородский государственный национальный исследовательский университет

ВИКТОРИНА

«Встречи у Периодической системы»

Это самый компактный и полный значения сгусток знания, когда-либо изобретённый человеком.

Харлоу Шепли, американский астроном

В последние годы наблюдается снижение интереса школьников к изучению химии. Нарастание сложности программного материала, сокращение учебного времени на его усвоение, уменьшение самостоятельной работы учащихся — причины негативных изменений в обучении химии. Отрицательно сказывается и недостаточное оснащение материальными средствами (реактивами и химическим оборудованием) кабинетов химии. Для учителя особую актуальность приобретает проблема поддержания интереса учащихся к предмету, их стремления к активному и творческому участию в процессе познания. Решение этой проблемы связано с правильной организацией внеурочной работы. В настоящее время уже нельзя удовлетвориться проведением эпизодических внеурочных мероприятий, хотя бы и с массовым охватом учащихся. Необходимо стремиться к организации системы внеурочной деятельности по предмету, хорошо продуманной, учитывающей задачи и возможности школы, склонности учащихся.

В большей степени, чем уроки, внеклассные занятия приспособлены для развития у школьников творческой самостоятельности и изобретательности, формирования практических умений и навыков, самореализации личности каждого учащегося.

Актуальной становится разработка и организация внеурочной деятельности путём сотрудничества с вузами, что позволяет

моделировать стратегию внеучебной деятельности в школе. Расширение поля сотрудничества, поиск социальных партнёров позволяет делать работу интереснее.

В течение многих лет при кафедре общей химии Белгородского государственного национального исследовательского университета действует очная школа «Юный химик», на занятиях которой учащиеся слушают лекции по актуальным вопросам химии, решают сложные задачи, усваивают основные приёмы лабораторной работы. Проводятся научно-практическая конференция учащихся «Юность науки Центрального Черноземья» и химический десант. Очень популярны среди учащихся ежегодные химические викторины, которые организуют преподаватели и студенты факультета.

К знаменательной дате — 150-летию Периодической системы Д. И. Менделеева — на кафедре общей химии была проведена викторина, включающая теоретический и опытный этапы. Предлагаем сценарий этого внеурочного мероприятия.

Викторина начинается с выступления ведущих, сообщающих участникам и зрителям интересные факты о Периодической системе.

Знаете ли вы, что:

- до Д. И. Менделеева делали попытки создать систему элементов учёные Доберейнер, Одлинг, Шанкуртуа, Ньюлендс, Мейер, но периодический закон они не открыли;