



УДК 543.544.123:547.97

## Закономерности хроматографического поведения бетацианинов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ

Саенко И.И.<sup>1</sup>, Дейнека В.И.<sup>1</sup>, Дейнека Л.А.<sup>1</sup>, Карпеева И.Э.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 28.02.2013 г.

### Аннотация

В работе исследовано хроматографическое поведение бетанина и изобетанина в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. Показано, что для оптимального гидрофобного удерживания бетацианинов необходимо создание кислых подвижных фаз (рН ~ 2). В подвижную фазу необходимо введение небольшого количества (4 ÷ 8 об.%) органического модификатора (ацетонитрила), поэтому необходимо использовать устойчивые к коллапсу стационарные фазы. Бетацианины более устойчивы при рН 4 ÷ 6, что должно быть учтено при пробоподготовке.

**Ключевые слова:** обращенно-фазовая, ВЭЖХ, бетацианины, удерживание, параметры хроматографической системы, стабильность

Chromatographic behavior of betanin and isobetanin in reversed-phase HPLC has been investigated. It has been shown that for optimal betalains hydrophobic retention acidified mobile phases (pH ~ 2) should be applied. The mobile phase must be modified with addition of 4 ÷ 8 vol.% of CH<sub>3</sub>CN; thus stationary phases resistant for phase collapse are to be explored. It must be taken into account during sample preparation that betacyanins in samples under investigation are more stable at pH 4 ÷ 6.

**Keywords:** reversed-phase, HPLC, betacyanins, retention, parameters of chromatographic system, stability

### Введение

Бетацианины (betacyanines, но в англоязычной литературе чаще используют другое название – betalains) являются пигментами исключительно растительного происхождения. И хотя их биосинтез ограничен растениями нескольких семейств одного порядка гвоздичноцветные (Caryophyllales), они хорошо известны, например, благодаря тому, что в значительных количествах накапливаются в корнеплодах красной свеклы – одном из самых популярных овощных растений в России. Но, как это ни странно, до 1960 года эти уникальные, единственные яркоокрашенные из природных алкалоидов соединения не привлекали особого внимания исследователей [1]. Тем не менее, к настоящему времени благодаря уникальному комплексу свойств этих соединений, включающему антиоксидантную активность, многие обычные источники бетацианинов хорошо изучены. При этом для разделения, очистки и определения строения индивидуальных компонентов бетаксантиновых комплексов используют весь набор аналитических методов, в котором особое место занимает

высокоэффективная жидкостная хроматография. Однако, преследуя только цели определения индивидуального состава комплексов бетацианинов, хроматографию обычно использовали лишь как метод разделения и выделения бетаксантинов, не обращая внимания на физико-химические особенности хроматографического поведения этих соединений. К сожалению, эта тенденция прикладного использования ВЭЖХ в современной аналитической химии настолько прочно укоренилась, что масс-спектрометрия уже порой рассматривается как метод, способный полностью вытеснить хроматографию [2].

Если большое разнообразие природных антоцианов (гликозидов антоцианидинов) построено в основном на шести основных базовых структурах агликонов – на шести антоцианидинах, различающихся числом и типом заместителей кольца В флавилиевой структуры [3], то все окрашенные в те же красные цвета бетацианины (гликозиды бетанидинов) происходят в подавляющем большинстве случаев от одного и того же агликона – бетанидина (I), имеющего, впрочем, один изомер (изобетанидин, Ia) – по ориентации карбоксильной группы у  $sp^3$ -гибридного атома углерода в положении 15, рис. 1.

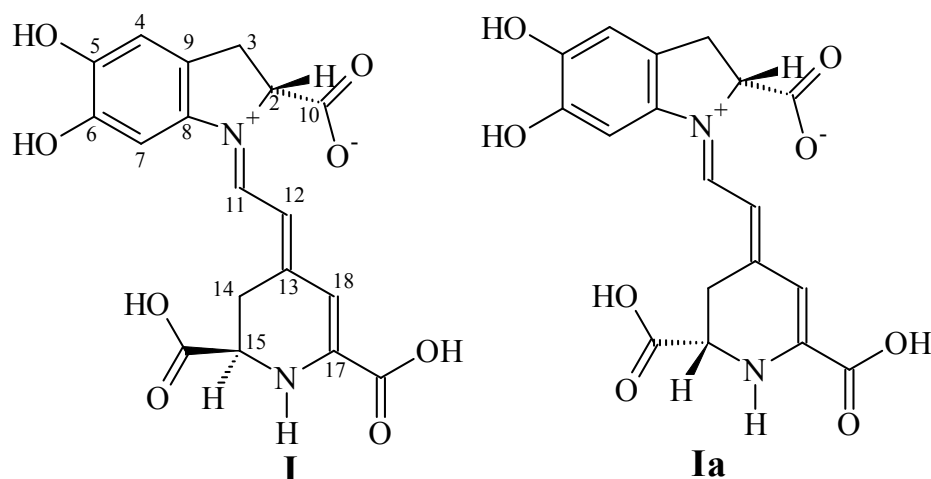


Рис. 1. Структура эпимеров бетанидина

Цель настоящей работы – исследование особенностей хроматографического поведения некоторых бетацианинов в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ, понимание которых необходимо для управления процессом разделения различных соединений и бетацианинов в частности.

## Эксперимент

Бетацианины выделяли настаиванием измельченного растительного материала в 0.1 М растворе HCl или в 2 об.% водном растворе муравьиной кислоты. Экстракт отфильтровывали и очищали методом твердофазной экстракции на патронах ДИАПАК C18.

Закономерности хроматографического поведения бетацианинов исследовали на хроматографической системе Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным детектором. В работе использовали четыре марки хроматографических колонок: 250×4.6 мм Kromasil 100-5C18, 250×4.0 мм Reprosil-Pur C18-AQ, 250×4.0 мм Reprosil-Pur C8, 250×4.0 мм Reprosil-Pur C4. Подвижные фазы готовили смешиванием заданных объемов добавок к ацетонитрилу в мерных колбах с

доведением объема до метки ацетонитрилом. Буферные растворы с различным рН готовили из уксусной кислоты с добавлением раствора NaOH требуемого значения, разбавляя раствор до получения 0.01М ацетатного буфера.

## Обсуждение результатов

Бетацианины относятся к водорастворимым соединениям, поэтому для их элюирования в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ) необходимы водно-органические подвижные фазы с относительно небольшими добавками органического модификатора, а для соединений, изменяющих степень ионизации при изменении рН необходимо в подвижную фазу дополнительно вводить буферные растворы.

В молекуле бетанидина имеется три карбоксильные группы, одна вторичная аминогруппа и заряженный - аммониевый фрагмент, – это приводит к возможности существования 18-ти различных заряженных и незаряженных структур, найденных при интерактивном расчете в тестовом режиме на сайте ChemAxon (<http://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>), рис.2.

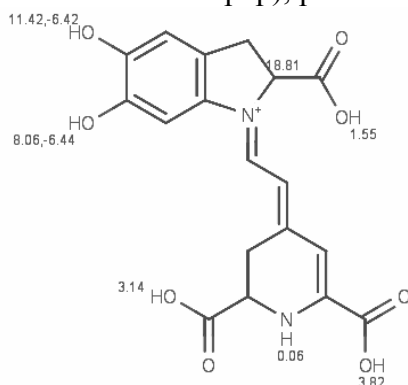


Рис. 2. Расчетные данные по константам диссоциации функциональных групп бетацианина (ChemAxon).

Числами на рисунке указаны  $pK_a$  соответствующих функциональных групп.

При этом расчет (выполненный там же) показывает, что наиболее сильной кислотной группой ( $pK = 1.55$ ) является карбоксильная группа в положении 2 дигидроиндольного фрагмента. Теоретический расчет вклада каждой из возможных форм (выполнен там же), рис.3, показывает, что при рН = 6.0 доминирующей в растворе является отрицательно двухзарядная форма **II** (рис.4), а одна из трех возможных суммарно нейтральных бетаниновых форм, **IIa** (рис.4), оказывается главной в растворе при рН=2.4.

Удерживание аналитов в ОФ-ВЭЖХ может обеспечиваться «остаточной» гидрофобностью частиц, находящихся в заряженной форме [4], но в любом случае без введения ион-парных добавок максимальное удерживание при прочих равных условиях должно соответствовать подвижным фазам с рН, соответствующим существованию незаряженных форм аналита. И действительно, для подвижных фаз, содержащих 7 об.% ацетонитрила в 0.01 М ацетатном буфере с различным рН, зависимость удерживания бетанина (бетанидин-5-β-D-глюкопиранозид) от рН, рис.5, практически идеально воспроизводит соответствующий участок для соединения **IIa** на рис.3.

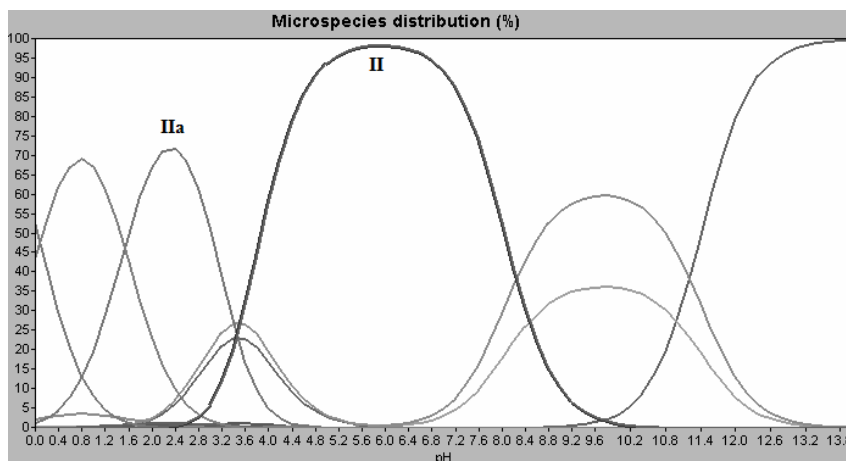


Рис. 3. Распределение микросостояний бетанина при различных рН (ChemAxon)

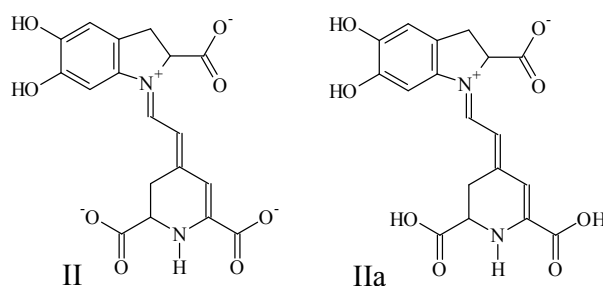


Рис. 4. Две из 18-ти форм состояния бетанина

Следовательно, для стабильного и воспроизводимого элюирования производных бетанидинов необходимы подвижные фазы с достаточно низким значением рН. Поэтому в дальнейших исследованиях в подвижную фазу вводили 2 об. % муравьиной кислоты, обеспечивающую рН = 2.1.

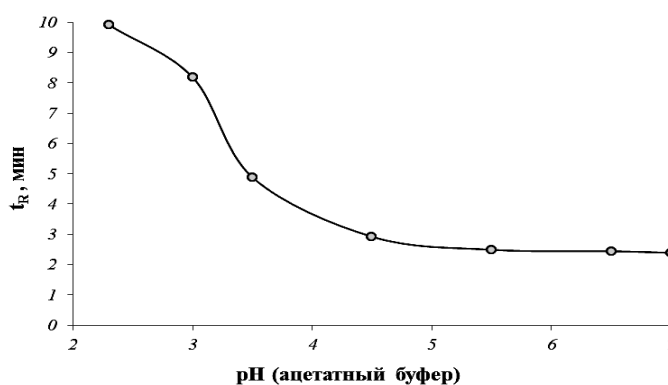


Рис. 5. Зависимость удерживания бетанина от рН  
Колонка: 250×4.0 мм Reprosil-Pur C18-AQ, подвижные фазы: 7 об.% ацетонитрила в 0.01 М ацетатном буфере, 1 мл/мин.

Зависимость удерживания бетанина от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе оказывается столь же крутой, как и для антоцианов [5], рис.6А.

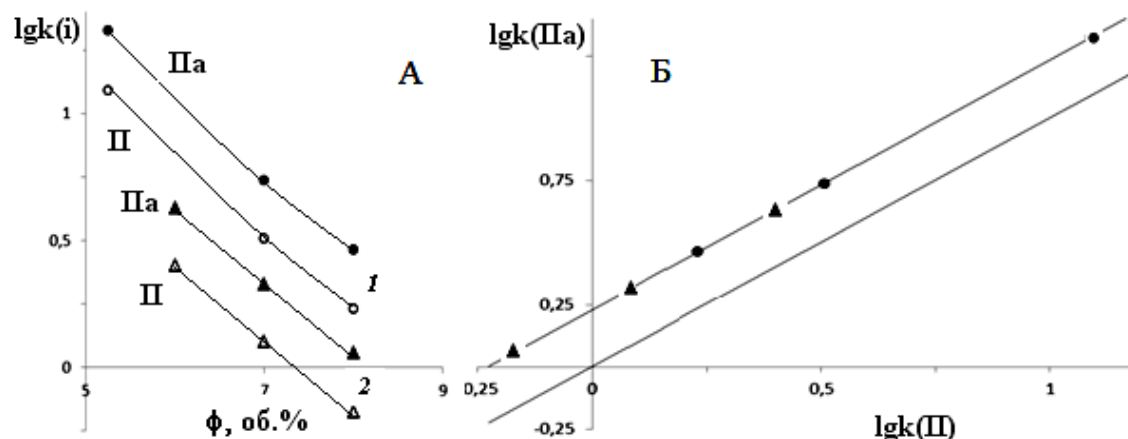


Рис. 6. Сопоставление параметров удерживания бетанина (II) и изобетанина (IIa) Стационарные фазы: 1 – Reprosil-Pure C18-AQ; 2 – Kromasil 110 5C18

При этом:

1) удерживание на стационарной фазе Reprosil-Pur C18 оказывается существенно более высоким, чем на стационарной фазе Kromasil 100-5C18, рис.7, в то время как для липофильных соединений (триацилглицеролов и каротиноидов) наблюдается прямо противоположное изменение удерживания;

2) на всех хроматограммах очищенного экстракта свеклы, рис.7, наблюдается два пика аналитов с идентичными спектрами, которые по литературным данным соответствуют бетанину (1) и изобетанину (2) [6];

3) несмотря на большое различие в абсолютном удерживании бетанина и изобетанина на двух рассмотренных выше стационарных фазах, удерживание изобетанина относительно бетанина (в единицах логарифма фактора удерживания) в пределах ошибки эксперимента ( $\pm 0.002$ ) описывается одной и той же прямой линией, рис.6Б.

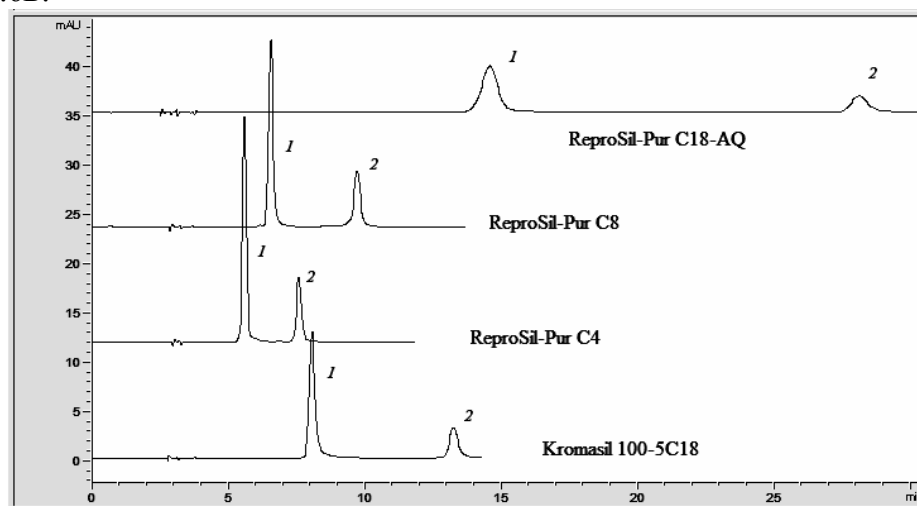


Рис. 7. Удерживание бетанина и изобетанина на различных обращенных фазах

Подвижная фаза: 5.5 об.%  $\text{CH}_3\text{CN}$  2 об.%  $\text{HCOOH}$ , 1 мл/мин.

1 – бетанин; 2 – изобетанин

То, что изобетанин элюируется заметно позже бетанина, рис.7, представляет особый интерес. Дело в том, что обычно в обращенно-фазовой хроматографии положение заместителей в молекуле не столь критично, как в нормально-фазовом

варианте. Но, строго говоря, это утверждение справедливо тогда, когда в первом случае удерживание обусловлено в основном распределительным механизмом, а во втором - адсорбционным механизмом. Для высокополярных и, тем более, заряженных органических структур проникновение вглубь обращенной фазы маловероятно, поэтому для их удерживания должен быть характерен напоминающий нормально-фазовую хроматографию сольвофобный вариант, предложенный еще в работах Хорвата и сотр. [7]. В таком случае возможность упаковки молекулы на поверхности обращенной фазы так, чтобы гидрофильная часть была обращена в сторону элюента, а гидрофобная – в сторону привитых алкильных групп, будет оптимальной для удерживания аналитов. В случае бетанина карбоксильные группы в положении 2 и в положении 15 направлены в различные стороны плоской структуры молекулы, тогда как для изобетанина – в одну, что и обеспечивает большее удерживание изо-форме. Такое объяснение различия в удерживании полностью согласуется с известными литературными данными по удерживанию продуктов декарбоксилирования бетацианинов [8]: удаление COOH-группы из положения 17 не влияет на порядок элюирования продукта, полученного из II и IIa, тогда как после декарбоксилирования в положении 2 различие в удерживании продуктов реакции практически исчезает.

Необычное соотношение в факторах удерживания бетацианинов на различных обращенных стационарных фазах может быть объяснено эффектом коллапса фаз [9]. Действительно, только одна из исследованных нами четырех стационарных фаз (Reposil-Pur C18-AQ) разработана специально для элюентов с низким содержанием органического модификатора. А существенные проблемы с остальными фазами при низком содержании ацетонитрила могут быть проиллюстрированы, например, необычно длительным дрейфом удерживания бетацианинов на C4-фазе, рис.8.

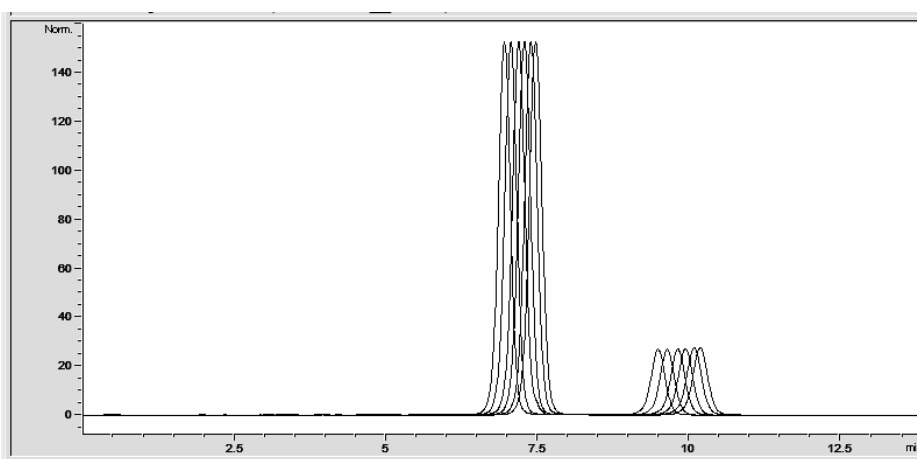


Рис. 8. Дрейф удерживания антоцианов на стационарной фазе Reposil-Pur C4  
Подвижная фаза: 4 об.%  $\text{CH}_3\text{CN}$  и 2 об.%  $\text{HCOOH}$  в воде, 1 мл/мин.  
Температура термостата колонок  $30^\circ\text{C}$  (хроматограммы записаны  
с интервалом в 30 мин)

Наконец, наши данные не подтверждают утверждение [10] о том, что стабильности антоцианов и бетацианинов в экстрактах сопоставимы. Экстракты бетацианинов за несколько недель практически полностью разрушаются при хранении при  $4^\circ\text{C}$ , тогда как изменения в экстрактах антоцианов за аналогичный период хранения практически не обнаруживаются. Более того, концентрация бетацианинов заметно изменяется даже в течение нескольких часов, причем

скорость разрушения этих соединений зависит от рН: при контроле концентрации бетацианинов в экстракте с рН=1 наблюдалось постоянное снижение площади пиков от 100% до 95% за 3 часа.

Таким образом, для определения концентрации бетанина и изобетанина методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (без использования ион-парных добавок [11]) желательно использовать достаточно кислые подвижные фазы и устойчивые к коллапсу стационарные фазы. При этом рН исследуемого образца желательно увеличить до 4 - 6. При использовании стационарной фазы Reprosil-Pur C18-AQ удобным элюентом является состав: 7 – 8 об.% ацетонитрила, 2 об.% муравьиной кислоты в воде.

## Заключение

Таким образом, в настоящей работе исследовано влияние различных параметров хроматографической системы на удерживание бетанина и изобетанина и предложены оптимальные условия для определения этих соединений в природных образцах.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ «Государственное задание вузу на 2013 г, проект № 3.1785.2011»  
Результаты получены в рамках выполнения работ по Постановлению Правительства РФ № 218 договор N 02.G25.31.0007 при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации*

## Список литературы

1. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. М.: Мир, 1986. – 422 с.
2. Чернецова Е.С., Мерлок Г.Е., Ревельский И.А. Масс-спектрометрия DART и ее применение в химическом анализе // Успехи химии. – 2011. – Т.80, №3. – С. 249-271.
3. Delgado-Vargas F., Jiménez A. R., Paredes-López O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. – 2000. – V.40. – P. 173-289.
4. Дейнека В.И., Хлебников В.А., Перистый В.А., Гостищев И.А., Проворная Т.В. Особенности хроматографического поведения берберина в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ // Сорбц. и хроматогр. процессы. - 2007. - Т.7, Вып.2. - С. 228-235.
5. Дейнека В.И., Григорьев А.М. Относительный анализ удерживания гликозидов цианидина // Ж. физ. химии. - 2004. - Т.78, №5. - С.923-926.
6. Swiglo A.G., Szymusiak H., Malinowska P. Betanin, the main pigment of red beet: Molecular origin of its exceptionally high free radical-scavenging activity // Food Additives Contaminants. – 2006. - V.23. – P. 1079–1087.
7. Horváth C., Melander W., Molnár I. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases // J. Chromatogr. A. – 1976. – V.125. - P. 129–156.
8. Wybraniec S. Formation of Decarboxylated Betacyanins in Heated Purified Betacyanin Fractions from Red Beet Root (*Beta vulgaris* L.) Monitored by LC-MS/MSJ // J. Agric. Food Chem. – 2005. - V.53. – P. 3483-3487.
9. Przybyciel M., Majors R.E. Phase Collapse in Reversed-Phase LC // LC GC Europe. - 2002. - V.20, N.10. - P. 2-5.

10. Henriette M.C. Betalains: properties, sources, applications, and stability // International Journal of Food Science and Technology. - 2009. - V. 44. – P. 2365–2376.

11. Wybraniec S. Effect of tetraalkylammonium salts on retention of betacyanins and decarboxylated betacyanins in ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A. – 2006. – V.1127. – P. 70–75.

---

**Саенко Ирина Ивановна** - магистрант, кафедра общей химии, Белгородский государственный университет, Белгород

**Дейнека Виктор Иванович** - д.х.н., профессор кафедры общей химии Белгородского государственного университета, Белгород

**Дейнека Людмила Александровна** - к.х.н., доцент кафедры общей химии Белгородского государственного университета, Белгород

**Карпеева Инна Эльгуджевна** – студентка 5 курса химического факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

Saenko Irina I. - magistrant, Belgorod State University, Belgorod, E-mail: [irinasaenko\\_25@mail.ru](mailto:irinasaenko_25@mail.ru)

**Deineka Victor I.** - Dr.Sci. (Chemistry), professor, Belgorod State University, Belgorod

**Deineka Ludmila A.** - Ph.D. (Chemistry) Belgorod State University, Belgorod

**Karpееva Inna E.** – student of the Voronezh State University, Voronezh