

Проблемы идентификации ксантофиллов лепестков *Lilium pumilum* Delile при применении метода обращенно-фазовой ВЭЖХ со спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием

*В.И. Дейнека, Т.Г. Буржинская, Л.А. Дейнека

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Российская Федерация, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

*Адрес для переписки: Дейнека Виктор Иванович, E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 31 августа 2019 г., после доработки – 22 сентября 2019 г.

Предложен способ определения видового состава ксантофиллов высушенных цветков карликовой лилии *Lilium pumilum* Delile красного цвета с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием. Установлено, что данное растение является уникальным растительным источником производных капсорубина. Основными компонентами каротиноидного комплекса являются диэферы полностью *транс*- и *цис*-изомеров капсорубина (около 70 моль %), образованные насыщенными жирными кислотами от каприновой до стеариновой с наибольшим вкладом миристиновой (~ 36 моль %) и лауриновой (~ 31 моль %) кислот. Кроме диэферов в экстрактах обнаружены моноэферы капсорубина и капсантина (около 30 % по площадям пиков). Варьирование состава подвижной фазы – ацетона и пропанола-2 как компонентов с высокой элюирующей способностью и ацетонитрила и метанола как компонентов с меньшей элюирующей силой, – позволяет разделять диэферы и дифференцировать производные капсантина и капсорубина, предотвращая наложения пиков различных гомологов двух рядов. Особенностью масс-спектрометрического детектирования в использованном режиме химической ионизации при атмосферном давлении (APCI) является образование аддуктов с ионами калия. Показана и обоснована возможность использования параметров удерживания диэферов капсорубина для определения имеющего термодинамический смысл мертвого времени колонки.

Ключевые слова: капсорубин, капсантин, диэферы, *Lilium pumilum* Delile, обращенно-фазовая ВЭЖХ, APCI, селективность разделения.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2019, vol. 23, no. 4, pp. 501-508

DOI: 10.15826/analitika.2019.23.4.002

Lilium pumilum Delile petal xanthophylls identification problems by the reversed-phase HPLC method with spectrophotometric and mass-spectrometric detections

V.I. Deineka, T.G. Burzhynskaya, L.A. Deineka

Belgorod State National Research University, Russian Federation, 308015, Belgorod, ul. Pobedy, 85

*Corresponding author: Victor I. Deineka, E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Submitted 31 August 2019, received in revised form 22 September 2019

With the use of the reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) with diode-array and mass spectrometric detection, the species composition of xanthophylls of dried red color *Lilium pumilum* Delile flowers was determined. It was established that this plant was a unique source of capsorubin derivatives. The main components of the carotenoid complex were diesters of all-*trans* and *cis*-isomers of capsorubin (about 70 mol %) formed by the saturated fatty acids from capric to stearic with the largest contribution of myristic (~ 36 mol %) and lauric (~ 31 mol %) acids. In addition to diethers in the extracts, monoesters of capsorubin and capsanthin were also found (about 30 % of the peak areas). The possibilities of varying the

composition of the mobile phase - acetone and propanol-2 as components with the high eluting capacity and acetonitrile and methanol as components with the lower eluting power - for the separation of diethers and differentiation of derivatives of capsanthin and capsorubin and to prevent the imposition of peaks of two series homologues were considered. The features of ion formation during the mass spectrometric detection in the mode of chemical ionization at the atmospheric pressure (APCI) were determined. The possibility of using the parameters of capsorubin diester retention to determine the thermodynamically substantiated dead time of the column was considered.

Key words: capsorubin, capsanthin, esters, *Lilium pumilum* Delile, RP-HPLC, APCI, separation selectivity.

ВВЕДЕНИЕ

Длительное время единственным вызывавшим интерес свойством каротиноидов была провитаминная А активность некоторых из них [1, 2]. И только относительно недавно была установлена роль двух ксантофиллов (лютеина и зеаксантина) для профилактики возрастной макулярной дистрофии [3]. К настоящему времени большое значение уделяется антиоксидантной активности каротиноидов различного строения [4-6]. Именно с антиоксидантной активностью в значительной степени связана польза этих соединений для здоровья человека [2].

Протяженная цепь сопряжения С=С-связей обеспечивает каротиноидам способность поглощать электромагнитное излучение в диапазоне 360 – 550 нм, придавая растительным источникам окраску от лимонно-желтой до оранжевой и даже красной. Поэтому каротиноиды являются важнейшими жирорастворимыми природными красителями для пищевой промышленности [7].

Графические формулы каротиноидов довольно громоздки, но условно средняя часть молекул большинства каротиноидов имеет одинаковое строение, а различия связаны со структурами терминальных фрагментов (схема 1). Спектры каротиноидов, как спектры сопряженных полиеновых соединений, имеют электронно-колебательную структуру, в которой обычно хорошо выражены три взаимно перекрывающиеся полосы, возникающие при переходе электрона на различные колебательные уровни второго возбужденного электронного состояния [8], (вставка на рис. 1) При этом в качестве аналитической длины волны выбирают обычно второй (по энергии) и самый интенсивный максимум спектра. Положение

максимума абсорбции на шкале длин волн зависит от структуры хромофора. Так, например, в случае β-каротина, имеющего две одинаковые концевые группировки I, сопряжение 9-ти двойных связей в центральном фрагменте полное, а двойная связь фрагментов I частично выведена из плоскости сопряжения по стерическим причинам [8], поэтому максимум абсорбции для ряда растворителей находится при λ = 450 нм.

При замене кольцевых фрагментов I на ациклический II с обеих сторон стерические напряжения исчезают, и максимум полосы батохромо смещается на ~ 10 нм (при переходе от β-каротина к ликопину). Смещение двойной связи в кольце структуры III (с одной стороны молекулы) приводит к гипсохромоному смещению этого максимума на 5 нм (так дифференцируются β- и α-каротины).

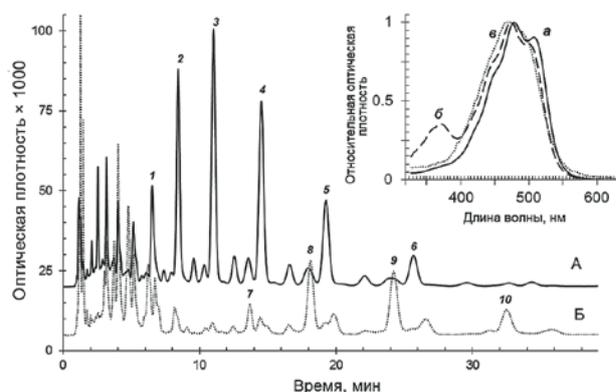


Рис. 1. Хроматограмма экстракта цветков карликовой лилии и плодов красного перца в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ в подвижной фазе, содержащей 50 % об. ацетона и 50 % об. ацетонитрила. Колонка 100×4.6 мм Kromasil 100-5C18; скорость подвижной фазы 0.4 мл/мин, детектор 470 нм. Номера пиков см. таблицу. Вставка – электронные спектры поглощения веществ: а – диэфиров *транс*-капсорубина (пиков 1-6), б – *цис*-изомеров диэфиров капсорубина, в – диэфиров *транс*-капсантина (пиков 7-10).

Fig. 1. Chromatogram of the extract of the *Lilium pumilum* flowers and *Capsicum annuum* fruits using the reversed-phase HPLC in the mobile phase containing 50 vol. % acetone and 50 vol. % acetonitrile. Column 100×4.6 mm Kromasil 100-5C18; mobile phase rate 0.4 ml/min, detector 470 nm. See Table for peak numbering. Insert – electronic absorption spectra of substances: а – *trans*-capsorubin diesters (peaks 1-6), б – *cis*-isomers of capsorubin diesters, в – *trans*-capsanthin diesters (peaks 7-10).

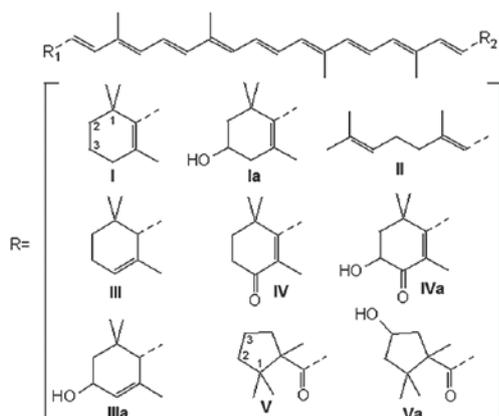


Схема 1

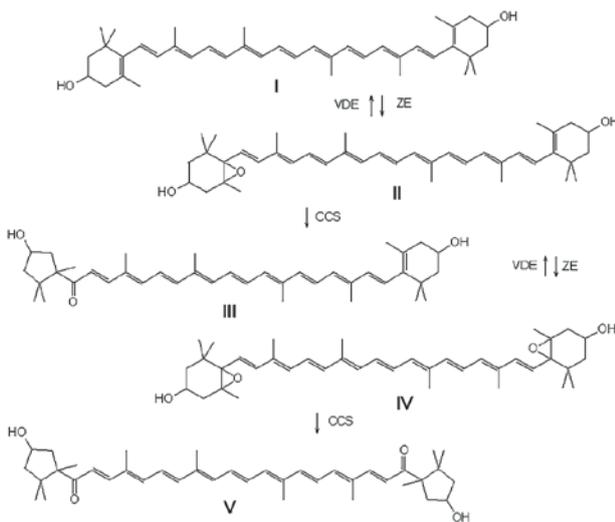


Схема 2

Батохромный сдвиг сопровождается добавлением к цепи сопряжения карбонильной группы в случае двух типов конечных фрагментов: **IV** и **V**.

Добавление группировок типа **IV** и **V** на концы отмеченного на схеме 1 фрагмента обеспечивает соответствующим каротиноидам красную окраску, которая хорошо известна по окраске красной икры и мяса рыб семейства лососёвых (*Salmonidae*) [9], или сладкого болгарского перца (*Capsicum annuum* L.) красного цвета [10]. Впрочем, в случае перцев окраска определяется не только капсорубином, но и капсантином ([11, 12], схема 2). Более того, по нашим данным концентрация эфиров капсорубина обычно намного меньше концентрации капсантина. В этом отношении природные источники преимущественно капсорубина представляют особый интерес для получения соответствующего красителя.

По литературным данным капсантин и капсорубин довольно уникальные ксантофиллы, хотя и синтезируются не только в плодах сладкого перца красной окраски, но и в некоторых других растениях, включая цветки лилий [13, 14]. Способность ксантофиллов образовывать серии моно- и диэфиров существенно осложняет анализ каротиноидов реальных природных объектов и поэтому обычная практика – предварительное омыление перед последующим определением, хотя при этом может быть потеряна важная информация, а также возможны потери химически лабильных соединений. Данные по составу эфиров капсорубина в цветках *Lilium pumilum* Delele в научной литературе нами не обнаружены; известна только информация о том, что в цветках этого растения на долю капсорубина приходится порядка 80 % каротиноидов [15]. Цель настоящей работы – разработка хроматографической методики анализа с диодно-матричным и масс-спектрометрическим вариантами детектирования и определение основных нативных каротиноидов (без предварительного омыления) цветков лилии карликовой (*L. pumilum*) красного цвета.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали высушенные лепестки цветков *Lilium pumilum* Delile, приобретенные в интернет-магазине сибирских таежных даров (<http://www.taiga.etnoshop.net>).

Для спектрофотометрического определения навеску лепестков растирали в фарфоровой ступке под порциями бензола до обесцвечивания экстрагента. Порции раствора объединяли, и экстракт доводили до метки в мерной колбе бензолом. После соответствующего разбавления и фильтрования через насадочный фильтр PTFE HP 20 мкм определяли оптическую плотность экстракта при 488 нм. Содержание каротиноидов (г на 1 г сырья в пересчете на капсорубин) рассчитывали по формуле:

$$\alpha = \frac{A}{A_{1cm}^{1\%}} \cdot \frac{V \cdot d}{100 \cdot m}, \quad (1)$$

где A – оптическая плотность экстракта при 488 нм, V – объем экстракта, мл; d – кратность разбавления; $A_{1cm}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения капсорубина в бензоле, равный 2200 [16], m – масса навески растительного сырья, г.

Для ВЭЖХ экстракты готовили как указано выше, но вместо бензола в качестве экстрагента использовали *n*-гексан. Конечный экстракт упаривали на вакуумном ротационном испарителе, сухой остаток растворяли в подвижной фазе и перед хроматографированием фильтровали через насадочный фильтр PTFE HP 20 мкм.

Разделение каротиноидов осуществляли на хроматографе Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами (в режиме химической ионизации при атмосферном давлении, **APCI**). В работе использовали хроматографические колонки: 100×4.6 мм Kromasil 100-5C18 и 100×4.6 мм Kromasil 100-5C8 при спектрофотометрическом детектировании и 150×2.1 мм Kromasil 100-5C18 при масс-спектрометрическом детектировании, температура термостата колонок 30 °С. Хроматограммы регистрировали и обрабатывали программой ChemStation.

Для приготовления подвижных фаз использовали ацетон (analytical reagent grade, «Fisher Chemical»), пропанол-2 («х.ч.», «Компонент-Реактив»), ацетонитрил (ООО «НПК Криохром») и метанол (HPLC, «LabScan»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При спектрофотометрическом определении было установлено, что концентрация каротиноидов в пересчете на капсорубин составляет $0.6 \div 0.4$ % по массе.

Хроматограмма экстракта цветков карликовой лилии в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ на стационарной фазе Kromasil 100-5C18 в подвижной фазе, содержащей 50 % об. ацетона и 50 % об. ацетонитрила, представлена на рис. 1. На рис. 1 обнаруживаются 6 наиболее интенсивных (в

случае детектирования при 470 нм) пиков с характеристическим для производных капсорубина [14] электронным спектром поглощения (вставка на рис. 1, спектр а). Наличие большой группы соединений с одинаковыми спектрами указывает на нахождение капсорубина в исследуемом объекте в виде эфиров, образованных несколькими насыщенными жирными кислотами. Это подтверждается простым тестом на применимость уравнения Зенкевича [17], по которому свойство членов гомологического ряда (в данном случае – время удерживания, t_R) связано между собой рекуррентным соотношением:

$$t_R(N+1) = a \cdot t_R(N) + b \quad (2)$$

Для параметров пиков 1-6 на рис. 1 получена линейная зависимость с высоким значением R^2 (0.999998):

$$t_R(N+1) = 1.350 \cdot t_R(N) - 0.652. \quad (3)$$

Физический смысл такой зависимости в данном случае обосновывается одинаковым изменением свободной энергии сорбции в ряду членов гомологического ряда, что соответствует постоянству инкремента (вклада в суммарное удерживание, приходящегося на две метиленовые группы) для всего ряда:

$$\lg k(N+1) - \lg k(N) = \Delta(CH_2 - CH_2) \equiv \Delta, \quad (4)$$

где $\lg k(i)$ – логарифм фактора удерживания компонента i , $\Delta \equiv \Delta(CH_2 - CH_2)$ – инкремент, приходящийся на две метиленовые группы. Разность не в одну, а в две метиленовые группы в данном гомологическом ряду связана с тем, что в природе обычно синтезируются кислоты с четным числом атомов углерода в цепи (лауриновая – $C_{11}H_{23}COOH$; миристиновая – $C_{13}H_{27}COOH$; пальмитиновая – $C_{15}H_{31}COOH$ и др.).

Кстати, в данном случае уравнение (3) может быть использовано для определения термодинамически обоснованного значения «мертвого времени» колонки, t_0 . Уравнение (4) легко преобразуется в уравнение рекуррентных соотношений:

$$t_R(N+1) = 10^{\Delta} \cdot t_R(N) - (10^{\Delta} - 1) \cdot t_0, \quad (4)$$

откуда «мертвое время» рассчитывается по уравнению, использующему коэффициенты рекуррентного соотношения (2):

$$t_0 = \frac{-b}{a-1}. \quad (5)$$

Обнаружение каротиноидов с одинаковыми хромофорами не вызывает особых затруднений, если существует возможность записи электронных спектров в кювете детектора. Но следует учитывать, что электронный спектр указывает только на строение хромофора молекулы, и практически не зависит от наличия или отсутствия гидроксильных (или сложноэфирных) групп в положении 3 обеих концевых групп. Так, например, электронные спектры погло-

щения идентичны для β -каротина, β -криптоксантина (одна из концевых групп I содержит ОН-группу в положении 3) и его моноэфиров и зеаксантина (гидроксильрованы обе концевые группы I), его моно- и диэфиров. Для надежной идентификации по этой причине необходимо воспользоваться такими свойствами, как параметры масс-спектров, и/или удерживанием веществ в сравнении с удерживанием веществ известного строения. В настоящей работе для сравнения использовали экстракт красного перца, возможный каротиноидный состав которого определен в ряде работ [10 – 12, 18].

На рис. 1 хроматограмма экстракта лепестков карликовой лилии дополнена хроматограммой экстракта плодов сладкого перца красной окраски. При этом между пиками гомологов диэфиров капсорубина (пики с аналогичными электронными спектрами обнаруживаются и в экстракте перца) появляется пара дополнительных компонентов. Один из них соответствует диэфрам *цис*-изомеров капсорубина, что видно по небольшому гипсохромному сдвигу максимума абсорбции и по появлению характеристической *цис*-полосы (около 370 нм на см. рис. 1 – спектр б на вставке). Второй ряд пиков уширен, и для гомологов с большим временем удерживания этот пик постепенно раздваивается. При этом, как следует из сопоставления двух хроматограмм, один из двух соэлюирующихся компонентов – диэфир капсантина. Это принципиально важное преимущество предложенных условий разделения, поскольку для ряда условий возможно перекрывание диэфиров капсантина и капсорубина на хроматограммах со смещением пиков производных более липофильного капсантина в сторону большего удерживания [14]. Таким образом, в экстракте лепестков карликовой лилии основной компонент – диэфиры капсорубина, а вкладом диэфиров капсантина можно пренебречь. Это делает данный природный источник уникальным сырьем для выделения капсорубина и его эфиров.

Но на хроматограмме перед пиками диэфиров видны пики моноэфиров (порядка 30 % по площадям пиков), при этом в используемых хроматографических условиях пики моноэфиров капсорубина и капсантина не разделяются, что следует из заметного отличия электронных спектров пиков на хроматограмме экстракта лилии от спектров диэфиров капсорубина.

Исследуя влияние компонентов подвижной фазы на селективность разделения основных компонентов мы применили в качестве подвижных фаз смеси ацетонитрила с пропанолом-2 и пропанола-2 с метанолом, рассчитывая, что добавки спирта должны иначе (по сравнению с ацетоном) разделять вещества с различным числом атомов кислорода в их структурах.

Элюирующая способность пропанола-2 оказалась заметно более высокой (в ~ 1.7 раза) по сравнению с ацетоном. На хроматограмме экстракта лепестков лилии (рис. 2) обнаруживается аналогичная группа основных компонентов – диэфиров капсорубина,

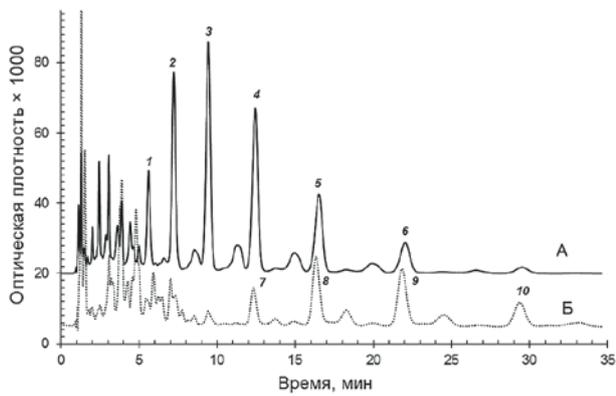


Рис. 2. Хроматограмма экстракта цветков карликовой лилии и плодов красного перца в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ в подвижной фазе, содержащей 35 % об. пропанола-2 и 65 % об. ацетонитрила. Колонка 100×4.6 мм Kromasil 100-5C18; скорость подвижной фазы 0.4 мл/мин, детектор 470 нм.

Fig. 2. Chromatogram of the extract of the *L. pumilum* flowers and *C. annuum* fruits using the reversed-phase HPLC in the mobile phase containing 35 vol. % propanol-2 and 65 vol. % acetonitrile. Column 100×4.6 mm Kromasil 100-5C18; mobile phase rate 0.4 ml/min, detector 470 nm.

но при этом между основными пиками появляется иной профиль изомерных соединений (не менее трех). Существенно, что в данном случае происходит соэлюирование некоторых диэфиров капсантина и капсорубина: пики диэфиров капсорубина 4, 5 и 6 вследствие относительно более быстрого элюирования перекрываются с пиками диэфиров капсантина 7, 8 и 9. При этом заметно изменился хроматографический профиль более слабо удерживаемых компонентов, хотя дифференциация пиков остается по-прежнему проблематичной. Анализ площадей пиков на хроматограмме показал, что на долю моноэфиров приходится около 30.0 ± 2.0 % суммарной оптической плотности, поэтому доля диэфиров капсорубина составляет 70.0 ± 1.0 % (при пренебрежении вкладом диэфиров капсантина). На *транс*-изомеры диэфиров капсорубина при этом приходится 53.8 ± 0.8 %.

Увеличение концентрации ОН-групп в подвижной фазе за счет замены ацетонитрила метанолом привело к дальнейшему увеличению относительной подвижности производных капсорубина: время удерживания пиков 4, 5 и 6 уже оказывается меньшим чем для пиков 7, 8 и 9. Следовательно, замена акцепторов протонов (ацетона и/или ацетонитрила) на доноры при образовании водородной связи (пропанол-2 и/или метанол) в составе подвижной фазы является важным методом для изменения селективности разделения веществ с различным числом атомов кислорода (акцепторов водородной связи).

Определение жирнокислотного состава пиков диэфиров было выполнено с использованием масс-спектрометрического детектирования в условиях

химической ионизации при атмосферном давлении. Для записи хроматограммы использовали микроколону (2.1×150 мм, Kromasil 100-5C18) и подвижную фазу, содержащую 35 % об. пропанола-2 в ацетонитриле. В работе использовали условия записи спектров близкие к использованным в нашей лаборатории ранее для регистрации спектров диэфиров лютеина [19]. Но на этот раз получены несколько отличающиеся результаты: на масс-спектрах обнаруживались наиболее интенсивные пики, являющиеся аддуктами диэфиров капсорубина с катионом калия $[M(\text{дэ}) + K^+]$, а не ионов $[M(\text{дэ}) + Na^+]$, как в работе [19]; при этом также полностью отсутствовали ионы $[M(\text{дэ}) + H^+]$. Кроме основных пиков примерно лишь немногим меньшей интенсивности обнаруживались сигналы ионов, получаемых удалением одной молекулы кислоты – как протонированные продукты потери молекулы воды моноэфирами капсорубина $[M(\text{мэ}) - H_2O + H^+]$. Разумеется, таких пиков должно быть два в случае несимметричных эфиров, но реально в спектрах часто обнаруживали и дополнительные ионы. Появление дополнительных ионов данного типа является следствием одинакового удерживания диэфиров с одинаковым числом суммы атомов углерода в радикалах: например, димиристату (28 атомов углерода) может сопутствовать лаурат-пальмитат (также 28 атомов углерода) (таблица). Наконец, пики *цис*-изомеров (расположенные между основными пиками диэфиров полностью *транс*-капсантина) имели масс-спектры, соответствующие масс-спектрам предыдущих основных пиков. Отметим, что для разделения *транс*- и *цис*-изомеров каротиноидов порядок элюирования зависит от места появления *цис*-C=C-связи и от типа обращенной фазы («мономерной» или «полимерной») [20, 21]. Но в случае диэфиров ксантофиллов, сорбция которых происходит в первую очередь за счет проникновения алкильных радикалов сложно-эфирных групп вглубь привитого C18-слоя, при появлении *цис*-связи вероятность сорбции молекулы радикалами с обеих сторон несколько увеличивается по сравнению с диэфирами полностью *транс*-изомера. Проникновение радикалов в привитой слой подтверждается резким уменьшением удерживания диэфиров при замене стационарной фазы C18 на фазу C8 для сорбентов той же торговой марки (Kromasil 100-5C8 vs Kromasil 100-5C18).

Определить вклад каждой из жирных кислот в состав диэфиров при их разделении в условиях «мономерной» обращенно-фазовой ВЭЖХ [19] нельзя из-за совпадения удерживания диэфиров различного состава, но одинаковой суммы числа атомов углерода в радикалах кислот. Но мы выполнили оценку вклада кислот при предположении равновероятного распределения радикалов кислот по диэфирам, получив в итоге следующие результаты: вклад каприновой кислоты ~12 моль %, лауриновой ~31 моль %, миристиновой ~36 моль %, пальмитиновой ~16 моль % и стеариновой ~5 моль %.

Таблица

Аналитические параметры основных диэфиров капсорубина экстракта лилии карликовой (*Lilium pumilum*) лилии и диэфиров капсантина плодов красного перца (*Capsicum annuum*)

Table

Analytical parameters of the main capsorubine diesters of petal extract of *Lilium pumilum* and capsanthin diesters in fruit extract of *Capsicum annuum*

№*	Состав ксантофилла	$t_{R^{***}}$, мин	$\lambda_{max^{***}}$, нм	$M/Z [M(дэ) + K^+], + [M(мэ) - H_2O + H^+]$
	Дикаприлат капсорубина****	6.47	-	-
1	Каприлат-лаурат капсорубина	8.07	476	975.8 + 737.5 + 765.7
2	Дилаурат капсорубина (каприлат-мирилат капсорубина)	10.23	476	1003.7 + 765.7 + (737.7 + 793.6)
3	Лаурат-мирилат капсорубина	13.22	476	1031.7 + 765.7 + 793.6
4	Димирилат капсорубина (лаурат-пальмитат капсорубина)	17.31	476	1059.7 + 793.6 + (465.7 + 821.7)
5	Мирилат-пальмитат капсорубина (лаурат-стеарат капсорубина)	22.87	476	1087.8 + 793.6 + 821.7 + (765.4 + 849.6)
6	Дипальмитат капсорубина (мирилат-стеарат капсорубина)	30.41	476	1115.6 + 821.7 + (793.5 + 849.8)
	Пальмитат-стеарат капсорубина****	40.56	-	-
7	Дилаурат капсантина	17.46	468	987.9 + 777.6
8	Лаурат-мирилат капсантина	468	468	1015.6 + 749.7 + 777.6
9	Димирилат капсантина	30.53	468	1043.7 + 777.6
10	Мирилат-пальмитат капсантина	40.88	468	1071.7 + 777.6 + 805.4
	Дипальмитат капсантина****	55.00	-	-

Примечания: * – номера пиков на рис. 1; ** – времена удерживания и масс-спектры для рис. 2; *** – для пиков на рис. 1; найдено экстраполяцией параметров удерживания других гомологов.

При использовании подвижных фаз на основе пропанола-2 и метанола наблюдается наилучшее разделение моноэфиров капсорубина и капсантина среди трех исследованных подвижных фаз (рис. 3),

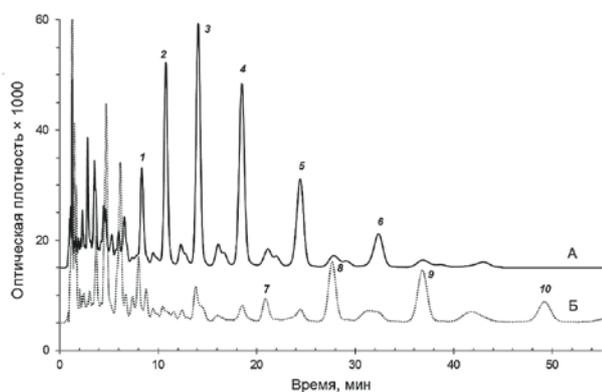


Рис. 3. Хроматограмма экстракта цветков карликовой лилии и плодов красного перца в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ в подвижной фазе, содержащей 25 % об. пропанола-2 и 75 % об. метанола. Колонка 100×4.6 мм Kromasil 100-5C18; скорость подвижной фазы 0.4 мл/мин, детектор 470 нм.

Fig. 3. Chromatogram of the extract of the *L. pumilum* flowers and *C. annuum* fruits using the reversed-phase HPLC in the mobile phase containing 25 vol. % propanol-2 and 75 vol. % methanol. Column 100×4.6 mm Kromasil 100-5C18; mobile phase speed 0.4 ml/min, detector 470 nm.

хотя для анализа состава каротиноидов в данном диапазоне лучше воспользоваться предварительным разделением фракций моноэфиров от диэфиров, например, методом препаративной ТСХ на силикагеле. Но интересно то, что доля моноэфиров капсантина по сравнению с долей моноэфиров капсорубина существенно выше, чем в случае диэфиров, хотя в целом экстракт лепестков цветков карликовой лилии оказывается наиболее богатым источником капсорубина среди известных к настоящему времени природных источников. Это важно, поскольку данный вид растения естественно произрастает на больших территориях: в Горном Алтае, Монголии, Китае, на полуострове Корея и в Японии. Территория, занимаемая этим мало изменчивым видом лилии в России (хотя по литературным данным существуют цветки не только красной, но и желтой окраски), велика — от реки Енисей до Японского моря.

Выводы

Цветки карликовой лилии *Lilium pumilum* Delile являются уникальным растительным источником производных капсорубина. Основными компонентами каротиноидного комплекса являются диэфиры полностью *транс*- и *цис*-изомеров капсорубина (около 70 моль %). Сложные эфиры образованы в основном насыщенными жирными кислотами от каприновой до стеариновой с наибольшим вкладом миристиновой (~36 моль %) и лауриновой (~31 моль %) кислот. В экстрактах обнаружены и моноэфиры

капсорубина и капсантина (около 30 % по площадям пиков).

Установлены составы подвижной фазы, позволяющие не только разделять диэфир с различным числом атомов углерода в двух радикалах, но и предотвращать наложения пиков гомологов двух рядов (диэфиров капсорубина и капсантина).

Особенностью масс-спектрометрического детектирования в использованном режиме химической ионизации при атмосферном давлении (APCI) является образование аддуктов Na^+ как основных аналитических частиц.

Показана и обоснована возможность использования параметров удерживания диэфиров капсорубина для определения имеющего термодинамический смысл мертвого времени колонки.

ЛИТЕРАТУРА

1. b-Carotene is an important vitamin A source for humans / T. Grune [et al.] // *J. Nutr.* 2010. V. 140. P. 2268S–2285S.
2. Non-provitamin A and provitamin A carotenoids as immunomodulators: Recommended dietary allowance, therapeutic index, or personalized nutrition? / E. Toti [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018. V. 2018. Article ID 4637861.
3. Carpentier S., Knaus M., Suh M. Associations between lutein, zeaxanthin, and age-related macular degeneration: An overview // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2009. V. 49. P. 313–326.
4. Fiedor J., Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease // *Nutrients*. 2014. V. 6. P. 466–488.
5. Stahl W., Sies H. Antioxidant activity of carotenoids // *Molecular Aspects of Medicine*. 2003. V. 24. P. 345–351.
6. Sies H., Stahl W. Lycopene: antioxidant and biological effects and its bioavailability in the human // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1998. V. 218. P. 121–124.
7. Gordon H.T., Bauernfeind J.C. Carotenoids as food colorants // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1982. V. 18. P. 59–97.
8. Llansola-Portoles M.J., Pascal A.A., Robert B. Electronic and vibrational properties of carotenoids: from in vitro to in vivo // *J. R. Soc. Interface*. 2017. V. 14. 20170504.
9. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - A review / R.R. Ambati [et al.] // *Mar. Drugs*. 2014. V.12. P. 128–152.
10. Red pepper (*Capsicum annuum*) carotenoids as a source of natural food colors: analysis and stability—a review / R. Arimboor [et al.] // *J. Food Sci. Technol.* 2015. V. 52. P. 1258–1271.
11. Valadon L.R.G., Mummery R.S. Carotenoids of lilies and of red pepper: Biogenesis of capsanthin and capsorubin // *Z. Pflanzenphysiol.* 1977. Bd. 82. S. 407–410.
12. A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: Deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper / S.-H. Ha [et al.] // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. P. 3135–3144.
13. Banba H. Pigments of lily flowers. II. Survey of carotenoid // *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 1968. V. 37. P. 368–378. (in Japanese).
14. Дейнека В.И., Лабунская Н.А., Сорокопудова О.А. Каротиноиды и антоцианы листочков околоцветников некоторых видов и сортов лилий (*Lilium* L.) // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация, 2008, № 2. С. 20–25.
15. Carotenoids from the flowers of *Lilium pumilum* / V. Partali [et al.] // *Die Pharmazie*. 1987. V. 42. P. 208.

16. Rodriguez-Amaya D.B. A Guide to carotenoid analysis in foods. ILSI Press. International Life Sciences Institute One Thomas Circle, N.W. Washington. – 64 p.

17. Зенкевич И.Г. Рекуррентные соотношения для аппроксимации физико-химических констант гомологов // *Ж. физической химии*. 2008. Т.82. С. 807–816.

18. Characterization of carotenoids and carotenoid esters in red pepper pods (*Capsicum annuum* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry / U. Schweiggert [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005. V. 19. P. 2617–2628.

19. Идентификация ксантофиллов в экстракте лепестков цветков бархатцев / М.С. Лапшова [и др.] // *Ж. аналит. химии*. 2013. Т. 68. С. 1130–1136.

20. Lesellier E., West C., Tchaplal A. Classification of special octadecyl-bonded phases by the carotenoid test // *J. Chromat. A*. 2006. V. 1111. P. 62–70.

21. Development of Engineered Stationary Phases for the Separation of Carotenoid Isomers / L.C. Sander [et al.] // *Anal. Chem.* 1994. V. 66. P. 1667–1674.

REFERENCES

1. Grune T., Lietz G., Palou A., Ross A.C., Stahl W., Tang G., Thurnham D., Yin S.-a., Biesalski H.K. b-Carotene is an important vitamin A source for humans. *J. Nutr.*, 2010, vol. 140, pp. 2268S–2285S. doi: 10.3945/jn.109.119024.
2. Toti E., Chen C.-Y.O., Palmery M., Valencia D.V. Peluso I. Non-provitamin A and provitamin A carotenoids as immunomodulators: Recommended dietary allowance, therapeutic index, or personalized nutrition? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, vol. 2018, Article ID 4637861, doi:10.1155/2018/4637861.
3. Carpentier S., Knaus M., Suh M. Associations between lutein, zeaxanthin, and age-related macular degeneration: An overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2009, vol. 49, pp. 313–326. doi: 10.1080/10408390802066979.
4. Fiedor J., Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 2014, vol. 6, pp. 466–488. doi: 10.3390/nu6020466
5. Stahl W., Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 2003, vol. 24, pp. 345–351. doi: 10.1016/S0098-2997(03)00030-X.
6. Sies H., Stahl W. Lycopene: antioxidant and biological effects and its bioavailability in the human. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1998, vol. 218, pp. 121–124. doi: 10.3181/00379727-218-44285a.
7. Gordon H.T., Bauernfeind J.C. Carotenoids as food colorants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1982, vol. 18, pp. 59–97. doi: 10.1080/10408398209527357.
8. Llansola-Portoles M.J., Pascal A.A., Robert B. Electronic and vibrational properties of carotenoids: from in vitro to in vivo. *J. R. Soc. Interface*, 2017, vol. 14, 20170504. doi: 10.1098/rsif.2017.0504.
9. Ambati R.R., Phang S.M., Ravi S., Aswathanarayana R.G. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - a review. *Mar. Drugs*, 2014, vol. 12, pp. 128–152. doi: 10.3390/md12010128.
10. Arimboor R., Natarajan R.B., Menon K.R., Chandrasekhar L.P., Moorkoth V. Red pepper (*Capsicum annuum*) carotenoids as a source of natural food colors: analysis and stability - a review. *J. Food Sci. Technol.*, 2015, vol. 52, pp. 1258–1271. doi: 10.1007/s13197-014-1260-7.
11. Valadon L.R.G., Mummery R.S. Carotenoids of lilies and of red pepper: Biogenesis of capsanthin and capsorubin. *Z. Pflanzenphysiol.*, 1977, Bd. 82, ss. 407–410.

12. Ha S.-H., Kim J.-B., Park J.-S., Lee S.-W., Cho K.-J. A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: Deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *J. Exp. Bot.*, 2007, vol. 58, pp. 3135–3144. doi: 10.1093/jxb/erm132.
13. Banba H. Pigments of lily flowers. II. Survey of carotenoid. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.*, 1968, vol. 37, pp. 368—378 (in Japanese). doi: 10.2503/jjshs.37.368.
14. Deineka V.I., Labunskaya N.A., Sorokopudova O.A. [Carotenoids and anthocyanins of perianths of some varieties and cultivars of lily (*Lilium* L.)]. *Vestnik VGU, Ser.: Khimiia. Biologija. Farmaciia*, [Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy], 2008, no. 2, pp. 20-25.
15. Partali V., Liaaen-Jensen S., Huneck S., Khaidav T. Carotenoids from the flowers of *Lilium pumilum*. *Die Pharmazie*, 1987, vol. 42, p. 208.
16. Rodriguez-Amaya D.B. A Guide to carotenoid analysis in foods. ILSI Press. International Life Sciences Institute One Thomas Circle, N.W. Washington. 64 p.
17. Zenkevich I.G. Recurrent relations for the approximation of the physicochemical constants of homologues. *Russ. J. Phys. Chem.*, 2008, vol. 82, pp. 695-703. doi.org/10.1134/S0036024408050014
18. Schweiggert U., Kammerer D.R., Carle R., Schieber A. Characterization of carotenoids and carotenoid esters in red pepper pods (*Capsicum annuum* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2005, vol. 19, pp. 2617–2628. doi: 10.1002/rcm.2104
19. Lapshova M.S., Deineka V.I., Deineka L.A., Blinova I.P. Tret'yakov M.Yu. Identification of xanthophylls in a marigold petal extract. *J. Anal. Chem.*, 2013, vol. 68, pp. 1014-1019. doi: 10.1134/S1061934813110075
20. Lesellier E., West C., Tchaplal A. Classification of special octadecyl-bonded phases by the carotenoid test. *J. Chromat. A*, 2006, vol. 1111, pp. 62–70. doi: 10.1016/j.chroma.2006.01.107.
21. Sander L.C., Sharpless K.E., Craft N.E., Wise S.A. Development of Engineered Stationary Phases for the Separation of Carotenoid Isomers. *Anal. Chem.*, 1994, vol. 66, pp. 1667-1674. doi: 10.1021/ac00082a012