

## OPTIMIZATION CHROMATOGRAPHIC ISOLATION OF ANTHOCYANINS

Chabinová J., Zítka O., Húska D., Klejduš B., Kizek R.

Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xspilko1@node.mendelu.cz

### ABSTRACT

Anthocyanins are natural colorants. They have been shown to have some beneficial health effect. Red and amber durum wheats contain as major xanthophylls pigments, carotenoids and flavones. Blue and purple wheats are different from those that contain another group of pigments, anthocyanins. Grain from six wheat lines differing in pigmentation was used in this study: “UC 660 49” (blue aleurone), *A. Arraseita* (purple perikarp), “TBS” (blue aleurone), “ANK 28B” (purple perikarp), “N 67” (red pericarp), Heroldo (white pericarp). Wheat grains were harvested every five days beginning 15<sup>th</sup> day post anthesis, ending once the grains reached physiological maturity (40<sup>th</sup> day post anthesis), for a total six sampling dates. Anthocyanins were extracted with 10 mL acidified methanol (methanol and 1.0 N HCl, 85:15 v/v) and shaking on Ika Ultra-Turrax® Tube Drive, for 2x29 min. The filtered extract were evaporated at 50 °C to dryness and redissolved in acidified methanol. Individual anthocyanins were separated and quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC). Anthocyanin concentration increased rapidly during grain development and then decreased before maturity. Cyanidin 3-glucoside was the predominant anthocyanin in purple wheat. Delphinidin 3-glucoside is the principal one in blue wheat. Anthocyanins are considered to be physiologically active substances, whose importance in promoting health and reducing the risk of chronic disease has been scientifically documented. This means that the presence of wheat anthocyanins in pigmented wheat, can be a source of bioactive compounds for use in the food industry.

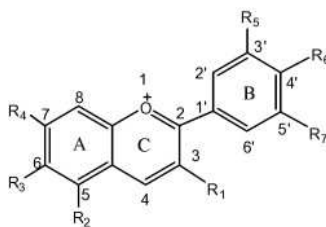
**Key words:** anthocyanins, blue wheat, purple wheat, extraction, HPLC, mass spectrometry

**Acknowledgement:** The work has been supported by the grant of the IGA FA MENDELU No. TP 7/2011.

## ÚVOD

Anthokyany jsou ve vodě rozpustné přírodní pigmenty, zodpovědné za červené, fialové až modré zabarvení květů, plodů a jiných částí rostlin. Aglykonová (necukerná) část anthokyanů se označuje jako anthokyanidin (Obr. 1). Nejčastěji zastoupené sacharidy, které se vyskytují v anthokyanech jsou xylóza, arabinóza, rhamnóza, glukóza, galaktóza. Cukry mohou být acylovány organickými kyselinami. Nejběžnější acylační činidla jsou kyselina octová, malonová, p-kumarová, kávová, hydroxybenzoová. Mezi nejběžnější anthokyanidiny v rostlinných částech patří: pelargonidin, kyanidin, peonidin, delphinidin, petulidin a malvidin (Escribano-Bailón et al., 2004). Delphinidin je zodpovědný za namodralou barvu, kyanidin a pelargonidin dodávají rostlinám fialové a červené zabarvení (Hosseinian et al., 2008; Abdel-Aal, Hucl, 2003; Lee J. et al., 2005; Mazza et al., 2004).

Obrázek 1. Struktura anthokyanidinu (Castaneda-Ovando et al., 2008)



Isolace anthokyanů z rostlinných matric je poměrně složitá díky jejich nestabilitě a zvýšené náchylnosti k degradaci (Giusti, Wrostad, 2003). Stabilita anthokyanů se zvyšuje s počtem methoxy- skupin v kruhu B a klesá s počtem hydroxy- skupin. Nejstabilnější je malvidin, následují peonidin, petunidin, kyanidin a dephinidin. Obecně platí, že anthokyany jsou stabilní při kyselém pH. Glykosilace a acylace sacharidů také zvyšuje stabilitu, proto jsou diglykosidy stabilnější než jejich odpovídající monoglykosidy. Při analýze je důležité kontrolovat teplotu, jelikož rychlost rozkladu anthokyanů stoupá se zvyšující se teplotou. Kromě toho také světelné záření urychluje odbourávání anthokyanů (Escribano-Bailón et al., 2004).

Funkce anthokyanů v rostlinách jsou shodné s obecnými vlastnostmi flavonoidů. Mezi jejich významné vlastnosti patří antioxidační aktivita, která hraje důležitou roli v prevenci kardiovaskulárních a nádorových onemocnění. (Konczak, Zhang, 2004; Castaneda-Ovando et al., 2008). Byla prokázána jejich schopnost vázat těžké kovy, jako je železo, zinek a měď. Působí také jako induktory enzymů glutathion-S-transferázy (GST) a superoxid dismutázy (SOD) (Hosseinian et al., 2008).

Hlavními pigmenty v červené a oranžové tvrdé pšenici jsou xantophyly, karotenoidy a flavony. Anthokyaniny jsou obsaženy v odrůdách modré a fialové pšenice. Modré pigmenty se nachází v aleuronové vrstvě zrna, zatímco fialové pigmenty se soustředí ve vrstvách oplodí. Cyanidin-3-glukosid byl nalezen jako hlavní anthokyanin ve fialové pšenici a jako druhý nejčastější v modré pšenici. Delphinidin-3-glukosid je dominantní v modré pšenici, kde zaujímá zhruba 41% z celkového obsahu anthokyaninů. (Abdel-Aal, Hucl, 2003; Abdel-Aal et al., 2006; Hosseinian et al., 2008). Koncentrace anthokyaninů prudce vzrůstá v průběhu zrání zrna, zatímco v době zralosti zrna poklesne (Kniewel et al., 2009).

Anthokyaniny jsou polární molekuly, proto se pro extrakci obvykle používají vodné směsi ethanolu, methanolu a acetonu. Pro zvýšení stability anthokyaninů se do rozpouštědla přidává malé množství kyseliny (kys. trifluoroctvá, kys. chlorovodíková, kys. mravenčí, kys. octová) (Castaneda-Ovando et al., 2008; Barnes et al., 2009; Downey, Rochfort, 2008; Tian et al., 2005; Huang et al., 2009; Pati et al., 2009; Lee et al., 2008; McCalluma et al., 2007; Hosseinian et al., 2008; Chun Hu et al., 2007; Barnes et al., 2009). V poslední době byly pro extrakci fenolických sloučenin zavedeny nové techniky, jako jsou extrakce urychleným tokem rozpouštědla (PLE), superkritická fluidní extrakce (SFE) (Escribano-Bailón et al., 2004) nebo mikrovlnná extrakce (MAE) (Yang, Zhai 2010; Liazid et al., 2010). Tyto metody mohou být použity i pro extrakci anthokyaninů. Pro izolaci a identifikaci se v současné době nejčastěji používají metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Před provedením této metody se pro přečištění surového extraktu může použít extrakce na pevné fázi (SPE) (Escribano-Bailón et al., 2004). V kombinaci s HPLC lze zvolit celou řadu detektorů. Giusti, Wrostad (2001) a Giusti, Wrostad (2003) se ve svých publikacích zabývali UV-Vis metodami používanými pro charakterizaci a kvantifikaci anthokyaninů. V současné době jsou však nepoužívanějšími technikami pro jejich identifikaci tandemové HPLC-MS, HPLC-NMR (Castaneda-Ovando et al., 2008).

## MATERIÁL A METODIKA

### Chemikálie, standardy

Jako standard byly použity standardní roztoky anthokyaninů (cyanidin-3-glukosid, delphinidin-3-glukosid) od firmy Extrasynthese (Francie). Methanol a ostatní chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA). Standardy byly připraveny navážením 1 mg sloučeniny do 100 ml methanolu a 1,0 M HCl, 85:15 v/v.

### Reálné vzorky

Pro analýzy byly použity obilky barevných pšenic: "UC 660 49" (modrý aleuron), *A. Arraseita* (purpurový perikarp), "TBS" (modrý aleuron), "ANK 28B" (purpurový perikarp), "N 67" (červená

obilka), Heroldo (bílá obilka). Všechny odrůdy byly vysety a sklizeny v areálu Mendelovy univerzity v Brně. Odebrány byly vzorky zrajících obilek vždy 10., 15., 20., 25., 30., 35. a 40. den *post anthesis*. Pro analýzu anthokyanů byly použity odběry 15. – 40. den *post anthesis* (tedy celkem 6 odběrů na genotyp). Obilky byly rozdrceny v třecí misce.

### Extrakce

Pro extrakci byly vybrány dvě metody: extrakce v ultrazvukové lázni (60 min) a extrakce pomocí homogenizátoru Ika Ultra-Turrax® Tube Drive (2x29 min). Pro obě extrakce byly použity vodné směsi methanolu (50: 50 v/v, 70:30 v/v, 90:10 v/v, methanol a 1 M HCl, 85:15 v/v). Objem solventu byl 10 ml. Pro optimalizaci metody byly použity vzorky zralých obilek i nezralých obilek. U všech vzorků se zkoušely navážky 20 mg a 50 mg.

Pro vlastní analýzu byla vybrána extrakce pomocí homogenizátoru Ika Ultra-Turrax® Tube Drive (2x29 min.). Jako rozpouštědlo byl použit roztok methanolu a 1 M HCl, 85:15 v/v. Objem solventu 10 ml. Použité navážky obilek jsou uvedeny v *Tab. 1*. Po extrakci byly vzorky přefiltrovány a odpařeny v proudu předehřátého (50 °C) dusíku za pomoci bezkontaktního systému. Odpařené vzorky byly až do provedení chromatografické analýzy skladovány ve tmě při teplotě 4 °C.

### HPLC a MS/MS

Pro izolaci a identifikaci anthokyanů bylo využito přístroje Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Přístroj je vybaven on-line odplynovačem, binární pumpou, autosamplerem a kolonovým termostatem. Detekce separovaných látek probíhala pomocí UV-Vis detektoru s fotodiodovým polem a MS detektoru Agilent Technologies MSD 1100 Single quad LC/MS. Pro separaci byla použita kolona Zorbax SB-C18 (30 x 2,0; 1,8 µm velikost částic, Agilent Technologies, USA). Rychlost průtoku byla 0,7 l·min<sup>-1</sup>. Separace probíhala při teplotě 40 °C. Gradientová eluce byla v čase 0 min 98 % vodné fáze, 0,5 min 95 % vodné fáze, 0,8 min. 50 % vodné fáze, 1,8 min. 98 % vodné fáze. Složení mobilní fáze bylo acetonitril/0,3 % kyselina mravenčí. Objem nástřiku byl 1-5 µl (ředění 1:100), 1 a 2 µl (ředění 1:10) pro standardní roztok. Nástřik reálného vzorku byl v rozsahu 0,5-5 µl. Pro identifikaci a kvantifikaci látek je MS detektor vybaven elektrosprejovou ionizací a specifické fragmenty jsou následně analyzovány pomocí kvadrupólového analyzátoru, přístroj pracoval v negativním modu. Parametry hmotnostního spektrometru byly: teplota plynu 350 °C, průtok plynu 13 l·min<sup>-1</sup>, tlak nebulizéru 50 psi, napětí na kapiláře 4000 V. Signál byl snímán v SIM modu při m/z → 463 pro delphinidin-3-glukosid a m/z → 447 pro cyanidin-3-glukosid.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

### Optimalizace metody zpracování vzorku

Byla provedena optimalizace různých parametrů ovlivňujících extrakční proceduru, jako je složení rozpouštědla, extrakční čas, množství vzorku a metoda extrakce. Výsledné parametry optimalizace této metody jsou podrobně popsány v části M&M. Pro optimalizaci byly použity vzorky zralých

obílek odrůd Heroldo, „ANK 28B“, UC 660 49 a nezralých obílek odrůdy *A. Arraseita*. Byly testovány dva homogenizační postupy – extrakce v laboratorní ultrazvukové lázni K-5LM (doba extrakce 60 min.) a extrakce pomocí homogenizátoru Ika Ultra-Turrax® Tube Drive (2x29 min). U všech vzorků se pracovalo s navážkami 20 mg a 50 mg. Pro obě extrakce u všech vzorků byly, jako rozpouštědla, použity vodné směsi methanolu (50: 50 v/v, 70:30 v/v, 90:10 v/v , methanol a 1,0 N HCl, 85:15 v/v). Objem solventu byl 10 ml.

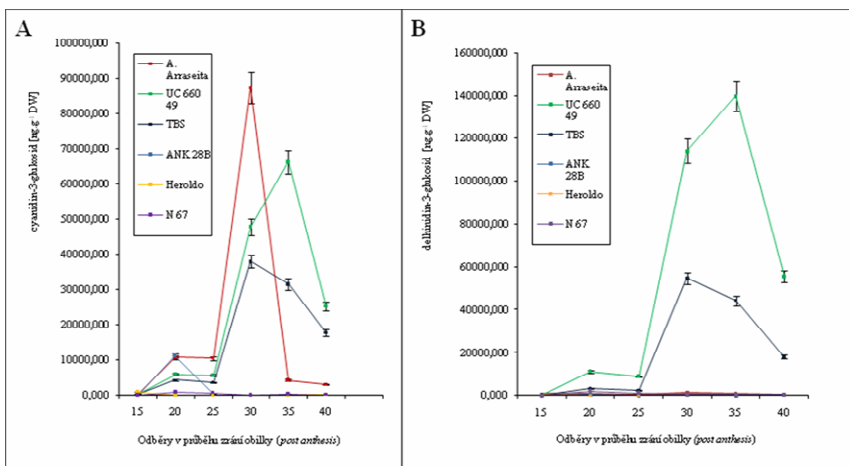
Pro analýzu reálných vzorků byla vybrána extrakce pomocí homogenizátoru Ika Ultra-Turrax® Tube Drive, čas 2 x 29 min., rozpouštědlo methanol a 1 M HCl, 85:15 v/v. Navážky reálných vzorků použitých pro analýzu jsou uvedeny v *Tab. 1*.

*Tabulka 1. Navážky vzorků použitých pro analýzu*

Odrůda	1.	2.	3.	4.	5.	6.
<i>Heroldo</i>	0,08 g	0,14 g	0,09 g	0,09 g	0,09 g	0,07 g
<i>UC 660 49</i>	0,06 g	0,09 g	0,08 g	0,09 g	0,07 g	0,07 g
<i>A.Arraseita</i>	0,08 g	0,07 g	0,08 g	0,05 g	0,06 g	0,08 g
<i>TBS</i>	0,08 g	0,08 g	0,07 g	0,07 g	0,05 g	0,05 g
<i>ANK 28B</i>	0,08 g	0,08 g	0,07 g	0,08 g	0,09 g	0,08 g
<i>N 67</i>	0,09 g	0,08 g	0,09 g	0,07 g	0,05 g	0,05 g

### **Změny obsahu anthokyanů v průběhu zrání obilky**

U všech vzorků byl sledován obsah dvou anthokyanů (cyanidin-3-glukosid, delphinidin-3-glukosid). Při prvním odběru (15. den *post anthesis*) byly zjištěny nízké koncentrace anthokyanů u všech šesti odrůd pšenice. Ke změnám koncentrací docházelo v průběhu zrání. Odrůdy Heroldo (bílá obilka) a N 67 (červená obilka) obsahují nízké koncentrace obou sledovaných látek v průběhu celého zrání. Cyanidin-3-glukosid byl identifikován jako dominantní anthokyanin u pšenice s purpurovým perikarpem (*A. Arraseita*, ANK 28) a jako druhý nejčastěji se vyskytující anthokyanin u modré pšenice (UC 660 49, TBS), což odpovídá publikovaným výsledkům (Abdel-Aal, Hucl, 2003; Abdel-Aal et al., 2006; Hosseinian et al., 2008). Nejvíce zastoupeným anthokyanem ve vzorcích modré pšenice je delphinidin-3-glukosid. UC 660 49 (modrý aleuron) dosahuje nejvyšších koncentrací obou sledovaných látek během 35. dne *post anthesis*, v době zralosti (40. den) však obsah anthokyanů prudce klesá. Trend poklesu je podobný u odrůdy TBS (modrý aleuron) s rozdílem, že zde je nejvyšší obsah anthokyanů zaznamenán během 30. dne *post anthesis*. Odrůdy *A. Arraseita* a ANK 28B (purpurový perikarp) obsahují nízké koncentrace delphinidin-3-glukosidu během celého zrání. Koncentrace cyanidin-3-glukosidu je u *A. Arraseita* nejvyšší během 30. dne *post anthesis*, u ANK 28 během 25. dne. U vzorků pšenice s purpurovým perikarpem je rovněž patrný trend poklesu koncentrace cyanidin-3-glukosidu v době zralosti zrna.

Graf 1. (A) Cyanidin-3-glukosid [ $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$ ], (B) Delphinidin-3-glukosid [ $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$ ]

## ZÁVĚR

Analýze přírodních biologicky aktivních látek v rostlinném materiálu by vždy měla předcházet komplexní optimalizace použitých extrakčních technik a separačních metod. Složitost přírodních matic a stopová množství analytů v nich obsažených vyžaduje aplikaci přesných a citlivých instrumentací. V neposlední řadě je nutná znalost maximálního množství informací o struktuře matrice a lokalizaci analyzovaných látek uvnitř matrice.

Anthokyany jsou považovány za fyziologicky aktivní látky, jejichž význam v podpoře zdraví a snížení rizika chronických onemocnění je vědecky doložen. Přítomnost těchto látek v potravinových surovinách, jako jsou barevné odrůdy pšenice, může významně ovlivnit nutriční hodnotu u výsledných potravinářských produktů.

## LITERATURA

Abdel-Aal el S. M et al., (2006). Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4696–4704.

Abdel-Aal el S. M., Hucl P., (2003). Composition and stability of anthocyanins in blue-grained wheat, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2174–2180.

Barnes J. S. et al., (2009). General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 4728-4735

Castaneda-Ovando A. et al., (2008). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859-871

- Downeya M. O., Rochfortb S., (2008). Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin. *Journal of Chromatography A*, 1201, 43-47
- Escribano-Bailón M. T. et al., (2004). Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography A*, 1054, 129-141
- Giusti M. M., Wrostad R. E., (2001). Anthocyanins. Characterization and measurement of anthocyanins by UV – Visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, F1.2., 1-13
- Giusti M. M., Wrostad R. E., (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems, *Biochemical Engineering Journal*, 14, 217–225
- Hosseinian F. S et al., (2008). Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat. *Food Chemistry*, 109,916-924
- Huang Z. et al., (2009). Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS. *Food Science and Technology*, 42, 819–824
- Chun Hu et al., (2007). Anthocyanin characterization and bioactivity assessment of a dark blue grained wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Hedong Wumai) extract. *Food Chemistry*. 104, 955-961
- Knievel D. C. et al., (2009). Grain color development and the inheritance of high anthocyanin blue aleurone and purple pericarp in spring wheat (*Triticum aestivum* L.), *Journal of Cereal Science*, 50, 113-120
- Konczak I., Zhang W., (2004). Anthocyanins-more than nature's colours, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004, 239–240.
- Lee J. H. et al., (2008). Characterisation of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max* L.) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. *Food Chemistry*, 112, 226–231
- Lee J. et al., (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study, *Journal Association of Official Analytical Chemists International*, 88, 1269–1278.
- Liazid A. et al., (2011). Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry* 124, 1238–1243
- Mazza G. Et al., (2004). Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids, *Journal Association of Official Analytical Chemists International*, 87, 129–145.
- McCalluma J. L. et al., (2007). Improved high performance liquid chromatographic separation of anthocyanin compounds from grapes using a novel mixed-mode ion-exchange reversed-phase column. *Journal of Chromatography A*, 1148, 38–45
- Pati S. et al., (2009). Rapid screening for anthocyanins and anthocyanin dimers in crude grape extracts by high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 3864–3868

Tian Q. et al., (2005). Screening for anthocyanins using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry with precursor-ion analysis, product-ion analysis, common-neutral-loss analysis, and selected reaction monitoring. *Journal of Chromatography A*, 1091, 72–82

Yang, Z, Zhai, W., (2010). Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 470–476