

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
( Н И У « Б е л Г У » )

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

КАФЕДРА ОБЩЕЙ ХИМИИ

**ПРОБОПОДГОТОВКА ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ АНТОЦИАНОВ  
ПЛОДОВ РАСТЕНИЙ**

Выпускная квалификационная работа  
обучающегося по направлению подготовки 04.03.01 Химия  
очной формы обучения, группы 07001417  
Боровского Дениса Витальевича

Научный руководитель  
д.х.н., профессор  
Дейнека В.И.

БЕЛГОРОД 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	5
1.1 Антоцианы: строение и свойства .....	5
1.2 Антоцианы в растительных объектах .....	8
1.2.1 Биологически активные вещества и антоцианы кизила .....	9
1.2.2 Биологически активные вещества и антоцианы редиса .....	11
1.3 Методы определения антоцианов .....	13
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	18
2.1 Экстракция антоцианов .....	18
2.2 Твёрдофазная очистка .....	18
2.3 Спектрофотометрическое определение .....	19
2.4 Хроматографический анализ .....	19
2.5 Растворители при определении антоцианов .....	20
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ .....	21
3.1 Определение антоцианов кизила .....	21
3.2 Определение антоцианов редиса .....	28
3.3 Исследование эффективности экстракции соляной кислотой .....	36
ВЫВОДЫ .....	44
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	45

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных направлений в пищевом производстве во всём мире на сегодняшний день является исследование натуральных красителей. К их числу относятся антоцианы, являющиеся водорастворимыми окрашенными антиоксидантами, что даёт возможность использовать их в пищевой и фармацевтической промышленности, а также в медицине.

Известно, что кроме антиоксидантной активности антоцианы обладают и противовоспалительным действием, предотвращают повреждения структуры ДНК, подавление роста злокачественных новообразований. Таким образом, антоцианы имеют широкий спектр применения.

Актуальной проблемой является пробоподготовка при определении антоцианов в плодах растений. Это связано с тем, что при экстракции антоцианов из растений извлекаются и другие водорастворимые соединения. Поэтому после экстракции обязательно должна следовать очистка, поскольку экстракты антоцианов непосредственно вводить в хроматографическую систему нельзя из-за присутствия в них сопутствующих соединений полимерного характера, которые необратимо загрязняют колонку. Также часто встречаются случаи, при которых в ВЭЖХ возникает проблема разделения смеси антоцианов в следствии соэлюирования отдельных веществ. Поэтому встаёт вопрос о разработке эффективных методик пробоподготовки при определении антоцианов.

Целью данной работы является разработка пробоподготовки при определении антоцианов кизила (*Cornus mas L.*) и красного редиса (*red radish*) для определения спектрофотометрическими методами и методами ВЭЖХ.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Разработать способы исчерпывающей экстракции исследуемых объектов.

2. Определить антоцианы исследуемых объектов спектрофотометрическими методами.
3. Разработать способы очистки экстрактов антоцианов.
4. Определить антоцианы исследуемых объектов методами ВЭЖХ.
5. Определить эффективность экстракции антоцианов различными растворителями.

# 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## 1.1 Антоцианы: строение и свойства

Первые опыты по изучению антоциановых соединений и их химической природы были проведены известным английским химиком Робертом Бойлем еще в 1664 г., когда он впервые обнаружил, что под действием кислот синий цвет лепестков василька изменялся на красный, под действием же щелочи лепестки зеленели. Строение антоцианов установлено в 1913 немецким биохимиком Р. Вильштеттером. В 1913-1915 гг. Р. Вильштеттер и А. Штоль опубликовали серию работ, проливших свет на вопрос о сущности природной окраски антоцианов. Из цветков различных растений они выделили индивидуальные пигменты и описали их химическое строение. Оказалось, что антоцианы в клетках находятся преимущественно в виде гликозидов [1].

Антоцианы являются гликозидами, содержащими в качестве агликона-антоцианидина гидрокси- и метоксипроизводные флавилиевого (2-фенилбензопириллиевого) катиона (см. рис. 1.1.). Углеводная часть обычно соединена с агликоном в положении 3, иногда - в положениях 3 и 5, при этом в роли углеводного остатка могут выступать как моносахариды (глюкоза, рамноза, галактоза), так и ди- и трисахариды [2].

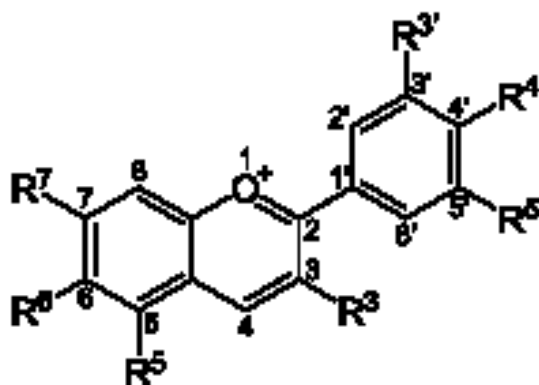


Рис. 1.1. Общая структура антоцианидинов

Агликонами большинства природных антоцианов являются шесть структур, приведённые в табл.1.1.

Таблица 1.1.

## Основные агликоны

Название	R						Окраска
	3	5	7	3'	4'	5'	
Пеларгонидин (Pg)	ОН	ОН	ОН	Н	ОН	Н	Оранжевая
Цианидин (Cy)	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	Н	Оранжево-красная
Дельфинидин (Dp)	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	Красно-синяя
Пеонидин (Pn)	ОН	ОН	ОН	ОСН <sub>3</sub>	ОН	Н	Оранжево-красная
Петунидин (Pt)	ОН	ОН	ОН	ОСН <sub>3</sub>	ОН	ОН	Красно-синяя
Мальвидин (Mv)	ОН	ОН	ОН	ОСН <sub>3</sub>	ОН	ОСН <sub>3</sub>	Красно-синяя

Антоцианы и антоцианидины обычно выделяются из кислых экстрактов растительных источников при умеренно невысоких значениях рН, в этом случае агликоновая антоцианиновая часть антоциана либо антоцианин существуют в форме флавилиевой соли.

Известно, что на окраску органических соединений влияют только определённые участки молекулы, называемые хромофорами, а также наличие заряда.

На окраску антоцианидинов влияет число и природа заместителей: гидроксильные группы, несущие свободные электронные пары обуславливают батохромный сдвиг при увеличении их числа. Гликозилирование, метилирование или ацилирование гидроксильных групп антоцианидинов приводит к уменьшению или исчезновению батохромного эффекта [2, 3].

В первую очередь окраску растений определяют структура и концентрация антоцианов (она повышается в условиях стресса). Голубой или синий цвет имеют дельфинидин и его производные, красно-оранжевый — производные пеларгонидина, а пурпурно-красную — цианидина. При этом голубой цвет обуславливают гидроксильные группы, а их метилирование, то есть присоединение  $\text{CH}_3$ -групп, приводит к покраснению [4].

Окраска растворов антоцианов сильно зависит от pH среды (см.рис. 1.2.). В кислой среде при  $\text{pH} < 3$  антоцианы в основном существуют во флавилиевой форме (пирилиевая соль), дающей красное окрашивание. При повышении pH до 4-5 присоединяется гидроксид-ион и образуется бесцветное псевдооснование. После повышения pH до 6-7 отщепляется вода и образуется хиноидная форма, дающая синее окрашивание. При достижении значения pH 7-8 отщепляется протон и образуется фенолят хиноидной формы, дающий пурпурное окрашивание. В щелочной среде при  $\text{pH} > 8$  происходит гидролиз и образуется халкон, дающий желтое окрашивание (см. рис. 1.2.) [5, 6].

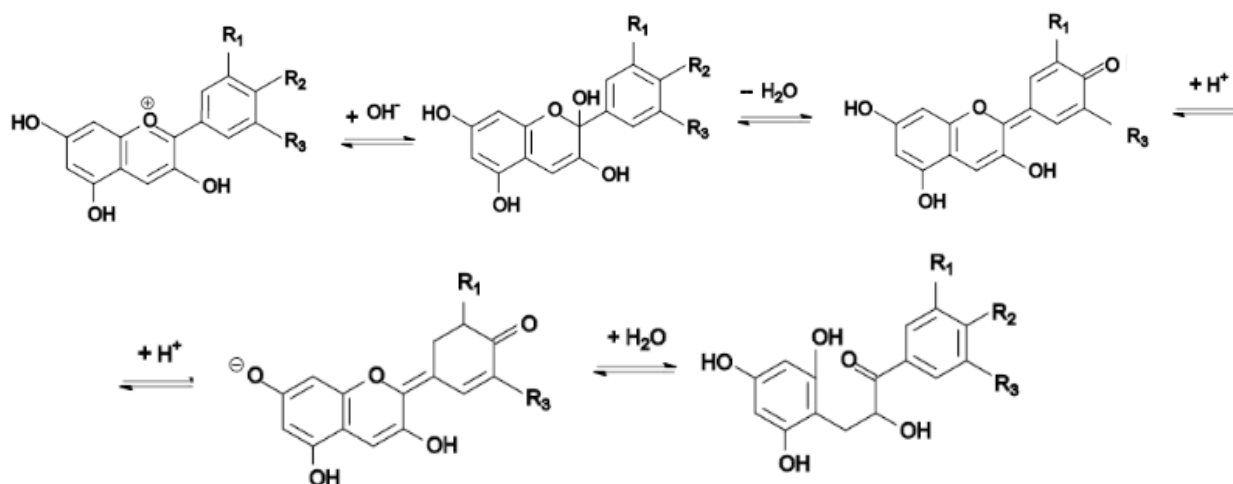


Рис. 1.2. Зависимость структуры антоцианов от pH среды

Пигментация зависит от pH в вакуолях, где накапливаются антоциановые соединения. Одно и то же соединение в зависимости от сдвига в величине кислотности клеточного сока может приобретать различные

оттенки. Так, раствор антоцианов в кислой среде имеет красный цвет, в нейтральной — фиолетовый, а в щелочной — желто-зеленый.

Однако рН в вакуолях может варьировать от 4 до 6, и, следовательно, появление синей окраски в большинстве случаев нельзя объяснить влиянием рН среды. Поэтому были проведены дополнительные исследования, которые показали, что антоцианы в клетках растений присутствуют не в виде свободных молекул, а в виде комплексов с ионами металлов, которые как раз и имеют синюю окраску [7].

Комплексы антоцианов с ионами алюминия, железа, магния, молибдена, вольфрама, стабилизированные копигментами (в основном флавонами и флавонолами), называются металлоантоцианинами [8].

## **1.2 Антоцианы в растительных объектах**

Антоцианы содержатся почти во всех растительных тканях в самых разных частях растений: в лепестках, плодах, листьях. Они выполняют не только роль вещества, придающего их тканям яркую привлекательную окраску. Эти пигменты, появляющиеся в листьях и стеблях при воздействии пониженных температур, в ранневесенний и осенний периоды служат своего рода "ловушкой" солнечных лучей. Усиленное образование антоцианов в клетках растения происходит при снижении температур окружающей среды, при остановках синтеза хлорофилла, при интенсивном освещении УФ-лучами. Поэтому больше всего антоцианов накапливают растения в местностях с суровыми климатическими условиями. Считается, что антоцианы защищают растения от низких температур и от вредного воздействия солнечного цвета на цитоплазму. Высокая концентрация пигментов способствует и защите наследственного аппарата растений от мутагенных воздействий [9].

Качественный состав антоцианов, как правило, специфичен для конкретного вида растений и довольно стабилен. Однако он зависит от сортовых особенностей и условий произрастания растения.



Наиболее известными источниками антоцианов являются ягоды чёрной смородины, черники, бузины, паслёна, красная капуста и т.д.

Во фруктах и овощах антоцианы находятся, прежде всего, в эпидермальном слое. Лучше всего исследовано распространение антоцианов в цветках, листьях и плодах. Часто окраска антоцианидина в листьях маскируется хлорофиллом. У некоторых сортов вишен, черешен, винограда они есть только в эпидермисе, у других — и в мякоти, причем в эпидермисе их больше [10].

### **1.2.1 Биологически активные вещества и антоцианы кизила**

Род кизил (*Cornus mas L.*) насчитывает около 60 видов растений, из них на постсоветском пространстве распространены 13 видов данного рода. В России наиболее широкое распространение получил кизил мужской (*Cornus mas L.*).

Ягоды кизила обладают выраженным целебным действием и издавна используются в народной медицине в качестве вяжущего и тонизирующего средства, при лечении гриппа, ангины, диабета, малокровия, склероза, сердечнососудистых и других заболеваний [11].

Плоды кизила – это высоковитаминный пищевой продукт. Наличие в них органических кислот, а особенно легкоусвояемых солей кальция, натрия, калия, марганца, железа и фосфора позволяет использовать терапевтические свойства кизила для лечения и профилактики самых различных заболеваний.

Ягоды кизила содержат много глюкозы, фруктозы, органических кислот, особенно яблочной, никотиновой, дубильных, азотистых и красящих веществ, эфирное масло, фитанциды, витамины С и Р.

Плоды кизила рекомендуют при подагре, малокровии, геморрое, дизентерии, тифе, желудочно-кишечных заболеваниях, артрите и кожных болезнях. Кизил обладает желчегонным, мочегонным, противогрибковым, бактерицидным жаропонижающим и противовоспалительным действием.

Благодаря содержащимся в них пектинам ягоды кизила ускоряют процесс очищения организма от продуктов метаболизма. Кизил способствует выведению щавелевой и мочевой кислоты.

Биологически активные вещества, входящие в состав плодов кизила, нормализуют артериальное давление, давления сосудов головного мозга, устраняют головные боли, предупреждают склероз.

В плодах кизила содержатся иридоиды – БАВ, имеющие широкий спектр действия. В плодах кизила они представлены 2 иридоидными гликозидами (логаниновая кислота и логанин) и 2 секоиридоидными гликозидами (сверозид и корнузид) [11].

Результаты химического анализа на предмет установления количества сахара, кислот, аскорбиновой кислоты, антоцианов, сухих веществ для множества разных сортов кизила показывают, что содержание сухих веществ в плодах кизила составляют 16,8 – 29,9 %. Общее количество сахаров находится в пределах 9,3 – 18,5%. При этом от 94,9% и до 100% из них приходится на глюкозу и фруктозу. Содержание органических кислот варьируется от 2,5 до 3,9 %. Они представлены в основном яблочной и хлорогеновой кислотами, в небольших количествах присутствуют также лимонная, галловая, кофейная и янтарная. Количество аскорбиновой кислоты в кизиле превосходит многие плодовые и ягодные культуры и составляет до 129,8 мг/100 г. Содержание антоцианов у изученных сортов кизила варьируется от 12,4 до 103,0 мг/100 г [12-14].

Плоды кизила являются ценным источником биологически активных и минеральных веществ. В них накапливаются в большом количестве аскорбиновая кислота, сахара и органические кислоты. По содержанию калия, кальция, магния и цинка плоды кизила превосходят большинство ягодных культур, а повышенное содержание биологически активных веществ позволяет рекомендовать их в качестве сырья для производства продуктов здорового питания.

Из научных статей известно, что основными антоцианами кизила являются пеларгонидин-3-галактозид и цианидин-3-галактозид. В меньшем количестве содержатся пеларгонидин-3-рамнозилгалактозид и цианидин-3-рамнозилгалактозид. Рамнозилгалактозид также часто называют робинобиозидом. Также в небольшом количестве содержится дельфинидин-3-галактозид [15-17].

### **1.2.2 Биологически активные вещества и антоцианы редиса**

Редис содержит жизненно важные фитонутриенты, предотвращающие появление и развитие рака. Редис наделен рядом полезных свойств из-за наличия витамина С, клетчатки и эфирных масел. Эти вещества в особенно большой концентрации оказывают благоприятное влияние на кишечник, почки, печень и желудок.

В редисе содержится большое количество фитонцидов – биологически активных веществ, которые являются природными антибиотиками, блокируют развитие и размножение патогенных бактерий и грибков. Ниацин участвует в преобразовании белков, жиров и углеводов в энергию, регулирует расход крахмала, хранящегося в печени и мышечной ткани. Аскорбиновая кислота, относящаяся к сильнейшим антиоксидантам, укрепляет стенки кровеносных сосудов, ускоряет свертываемость крови, снимает воспаления, ослабляет аллергические реакции, улучшает работу нервной и эндокринной системы, помогает преодолевать стрессы. Фолиевая кислота принимает участие в метаболизме, синтезе ДНК, образовании иммунных клеток крови. Особенно необходима она беременным женщинам, так как контролирует формирование плаценты и нервной системы эмбриона в утробе [18].

Важной задачей является нахождение и производство антоцианов, которые имели бы улучшенную стабильность. К таким антоцианам относят ацилированные, показывающие большую стабильность во время обработки и хранения. Также они иначе реагируют на изменение рН среды в отличие от

неацилированных. Предполагается, что наличие ацилирующих групп защищают ион оксония от гидратации, тем самым предотвращая формирование псевдооснования и халконной форм.

Основным пигментом красного редиса является пеларгонидин-3-софорозид-5-глюкозид с п-кумаровой, феруловой и кофейной кислотами, этерифицированными в сахарные заместители (см. рис. 1.3.). Пеларгонидин имеет оранжево-красный оттенок, ацилирование должно вызывать батохромный сдвиг, менять оттенок на красный и придавать улучшенную стабильность [19].

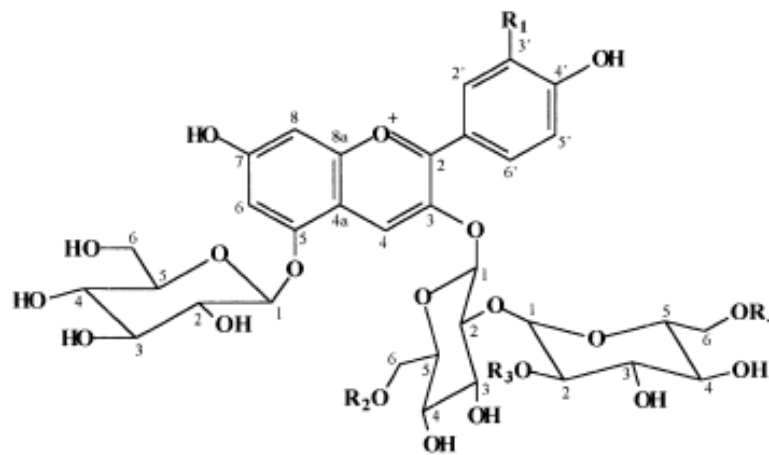


Рис. 1.3. Структурная формула пеларгонидин-3-софорозид-5-глюкозида

В статьях [20-21] приводятся результаты исследования антоцианов редиса, в которых помимо п-кумаровой и феруловой кислот в качестве заместителей, была обнаружена малоновая кислота. Она хоть и часто встречающаяся ацилирующая группа в антоцианах, однако информации о наличии её в антоцианах редиса не было. Считается, что ацилирование дикарбоксильными алифатическими кислотами, такими как яблочная, янтарная и малоновая, часто упускается из виду в результате их гидролиза.

Все основные антоцианы редиса (около 90%) являются пеларгонидин-3-софорозид-5-глюкозидом с одной или несколькими ацилирующими группами. Два основных пигмента (около 70%) ацилированы малоновой

кислотой и п-кумаровой или феруловой в мольном соотношении 1:1. Время удерживания п-кумаровой кислоты меньше, чем феруловой. Ещё два пигмента (около 20%) имеют тот же состав, но без малоновой кислоты [19].

### 1.3 Методы определения антоцианов

В мировой практике установлены следующие методы определения антоцианов:

- метод высокоэффективной обращённо-фазовой жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для качественного определения антоцианов;
- метод рН-дифференциальной спектрофотометрии для определения массовой концентрации (массовой доли) суммы антоцианов.

Диапазон измерений массовой концентрации (массовой доли) суммы антоцианов в пересчёте на цианидин-3-глюкозид.

*Метод обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)*

Метод основан на определении индивидуальных антоцианов путём их разделения на твёрдом носителе С18, привитом на высокочистую силикагелевую основу по обращённо-фазовому механизму с последующим фотометрическим детектированием при длине волны 518 нм.

Для качественного определения антоцианов в концентрированных соках и пюре взвешивают 1 г пробы с записью результата до третьего десятичного знака. Пробу разбавляют в 5 см<sup>3</sup> воды. Подготовленную пробу для удаления мутной взвеси центрифугируют и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм.

Для качественного определения антоцианов 1 г пробы без предварительного разбавления центрифугируют и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Готовят раствор ортофосфорной кислоты с кислотностью 2,0±0,1 рН. Для этого в стакан с водой по каплям добавляют концентрированную ортофосфорную кислоту, регистрируя показания рН-метра.

Для приготовления подвижной фазы полученный раствор ортофосфорной кислоты смешивают с ацетонитрилом в соотношении 88:12 в процентах по объёму. Подвижную фазу фильтруют под вакуумом через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Перед проведением определений хроматографическую систему кондиционируют подвижной фазой до установления стабильной базовой линии.

Условия проведения хроматографических измерений:

- температура термостата колонки -  $35 \pm 1$  °С;
- детектирование – фотометрический детектор с длиной волны 518 нм;
- объём вводимой пробы – 10-20 мм<sup>3</sup>;
- элюент – раствор ортофосфорной кислоты;
- скорость подачи элюента – 1,0 см<sup>3</sup>/мин;
- режим элюирования – градиентный, в соответствии с таблицей 1.2.

Таблица 1.2.

Состав подвижной фазы

Время, мин	Состав подвижной фазы (элюента), об. %		
	Ортофосфорная кислота	Ацетонитрил	Тип градиента
0	90	10	Линейный
20	75	25	
30	60	40	

Регистрируют на хроматограммах соответствующие пики.

Относительное содержание индивидуальных антоцианов  $X_i$ , % вычисляют как отношение площади хроматографического пика индивидуального антоциана к сумме площадей пиков всех идентифицированных антоцианов по формуле 1.1.

$$X_i = \frac{S_i}{\sum_{i=1}^n S_i} * 100, \quad (1.1)$$

где  $S_i$  – площадь пика  $i$ -го антоциана на хроматограмме;

$n$  – количество пиков идентифицированных компонентов на хроматограмме.

#### *Метод рН-дифференциальной спектрофотометрии*

Массовую концентрацию суммы антоцианов в пересчёте на цианидин-3-глюкозид определяют на основе изменения поглощения света с длиной волны 510 нм при изменении кислотности растворов от 1 до 4,4 рН.

Условия проведения измерений:

- Температура окружающего воздуха -  $25 \pm 5$  °С;
- Атмосферное давление -  $97 \pm 10$  кПа;
- Относительная влажность -  $65 \pm 25$  %;
- Частота переменного тока -  $50 \pm 5$  Гц;
- Напряжение в сети -  $220 \pm 10$  В;
- Обеспечение приточно-вытяжной вентиляцией.

В мерную колбу вместимостью  $100 \text{ см}^3$  помещают  $75 \text{ см}^3$  воды, осторожно приливают  $1,7 \text{ см}^3$  концентрированной соляной кислоты, доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Взвешивают  $1,5 \text{ г}$  хлористого калия, переносят в мерную колбу вместимостью  $100 \text{ см}^3$ , доводят до метки водой и тщательно перемешивают. Затем в стакане вместимостью  $100 \text{ см}^3$  смешивают  $25 \text{ см}^3$  полученного раствора с  $67 \text{ см}^3$  раствора соляной кислоты молярной концентрации  $0,2 \text{ моль/дм}^3$ . При необходимости доводят значение рН раствора до 1 концентрированной соляной кислотой, регистрируя показания рН-метра.

Взвешивают  $1,64 \text{ г}$  уксуснокислого натрия, переносят в мерную колбу вместимостью  $100 \text{ см}^3$ , доводят до метки водой и тщательно перемешивают. При необходимости доводят значение рН раствора до 4,5 концентрированной соляной кислотой, регистрируя показания рН-метра.

Пробы предварительно гомогенизируют, а затем центрифугируют в течении 20 мин или фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

После этого в две мерные колбы, вместимостью 50 см<sup>3</sup> каждая, отбирают по 2,5 см<sup>3</sup> аликвоты прозрачного слоя или фильтрата и доводят до метки буферными растворами с 1,0 и 4,5 рН, содержимое в двух колбах перемешивают, выдерживают в течение 15 мин и проводят измерение оптической плотности каждого раствора при длинах волн 510 и 700 нм соответственно. Измерение оптической плотности при 700 нм проводят для установления величины поглощения света посторонними примесями.

Измерение оптической плотности подготовленных проб проводят на спектрофотометре при длинах волн 510 и 700 нм. Результатом измерений является разность оптической плотности  $\Delta D$  растворов с 1,0 и 4,5 рН при длинах волн 510 и 700 нм соответственно, которая пропорциональна массовой концентрации антоцианов в растворе [22].

Значения оптической плотности растворов должны находиться в пределах 0,2-1,0. Если значение оптической плотности растворов более 1,0, то уменьшают объём аликвоты при разбавлении в мерной колбе. Для растворов, имеющих значение оптической плотности менее 0,2, увеличивают объём аликвоты.

Разность оптической плотности  $\Delta D$  вычисляют как разность оптических плотностей растворов при разных длинах волн и соответствующих значениях рН по формуле 1.2.

$$\Delta D = (D_{510} - D_{700})_{pH1,0} - (D_{510} - D_{700})_{pH4,5}, \quad (1.2)$$

где  $D_{510}$  – оптическая плотность раствора пробы при длине волны 510 нм;

$D_{700}$  – оптическая плотность раствора пробы при длине волны 700 нм.

Массовую концентрацию в мг/дм антоцианов в пересчёте на цианидин-3-глюкозид, вычисляют по формуле 1.3.



$$C = \frac{\Delta D * M * V_1 * P * 1000}{V_2 * \varepsilon * l * m}, \quad (1.3)$$

где  $\Delta D$  – разность оптической плотности раствора;

$M$  – молекулярная масса цианидин-3-глюкозида, равная 449,2 г/моль;

$V_1$  – вместимость мерной колбы, взятой для разбавления, см<sup>3</sup>;

$P$  – величина фактора разбавления;

$V_2$  – объём аликвоты, взятой на определение, см<sup>3</sup>;

$\varepsilon$  – молярный коэффициент экстинкции цианидин-3-глюкозида, равный 26900 дм<sup>3</sup>\*моль<sup>-1</sup>\*см<sup>-1</sup>;

$l$  – длина оптического пути кюветы, см;

$m$  – масса пробы, взятой для определения, г.

## **2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

### **2.1 Экстракция антоцианов**

Навеску растительного сырья (мякоти или кожуры) массой 0,5 г заливали 25 мл 0,1 М раствором соляной кислоты. Сырьё растирали под экстрагентом и выдерживали в течении суток. Затем экстракт отфильтровывали через бумажный фильтр. Содержимое с фильтра возвращали обратно и повторяли операцию до исчерпывающей экстракции. При необходимости экстракция проводилась смесью растворов ацетонитрила и 0,1 М раствором соляной кислоты общим объёмом 25 мл.

### **2.2 Твёрдофазная очистка**

Перед хроматографическим определением антоцианов экстракты подвергали твёрдофазной очистке через патрон ДИАПАК С18.

Готовили раствор, содержащий 30% муравьиной кислоты и 30% ацетонитрила. Для этого цилиндром отбирали 30 мл муравьиной кислоты, 30 мл ацетонитрила и приливали 40 мл дистиллированной воды.

Активировали патрон, пропуская через него 2,5 мл раствора ацетона, и затем промывали трёхкратным объёмом 0,1 М раствором соляной кислоты.

Пропускали экстракт через патрон, в результате чего сорбировались антоцианы.

Затем экстрагировали антоцианы раствором, содержащим по 30 об. % муравьиной кислоты и ацетонитрила. Для этого пропускали раствор через патрон. После первой окрашенной капли экстрагировали антоцианы в пенициллиновый пузырьёк до сильного уменьшения яркости выходящего экстракта.

С помощью дозатора переносили экстракт в виалу, разбавляя его в 3 раза дистиллированной водой. Закрывали виалу, повторяли операции с другими образцами и помещали полученные экстракты антоцианов в холодильник.

### 2.3 Спектрофотометрическое определение

При работе использовали спектрофотометр Shimadzu UV-2550. Спектры записывали в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1,0 см в диапазоне 350 – 700 нм. В качестве раствора сравнения использовался этанол. Снимали спектры и отмечали максимумы поглощения. При необходимости разбавляли экстракт и повторяли измерение.

Суммарное содержание антоцианов в растительном сырье рассчитывали в г/100 г исходного сырья по формуле 2.1.

$$C(e/100g) = \frac{D * M * P * V * 100}{\varepsilon * l * 1000 * m}, \quad (2.1)$$

где  $D$  – оптическая плотность раствора;

$M$  – молярная масса хлорида цианидин-3-глюкозида (484 г/моль);

$P$  – разбавление;

$V$  – объём экстрагента, мл;

$\varepsilon$  - молярный коэффициент поглощения (26900);

$l$  – толщина кюветы, см;

$m$  – масса навески сырья, г.

### 2.4 Хроматографический анализ

Хроматографическое определение антоцианов проводили с помощью хроматографической системы Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами.

Хроматографирование в условиях ОФ ВЭЖХ проводили с использованием колонки 4,6×150 Symmetry C18, 3,5 мкм.

Температура термостата колонок 40°C. Состав подвижной фазы: 6% CH<sub>3</sub>CN и 10% HCOOH. Готовили в мерной колбе, доводили до метки дистиллированной водой и дегазировали.

Скорость подачи подвижной фазы 0,8 мл/мин.

Хроматографическое определение проводили на предварительно очищенных образцах методом твёрдо-фазной экстракции при длине волны 515 нм.

## **2.5 Растворители при определении антоцианов**

В нашей лаборатории для экстракции используется 0,1 М водный раствор соляной кислоты. В мировой практике чаще используется экстракция 1%-ным раствором соляной кислоты в этаноле или метаноле. Однако этот метод непригоден для прямого метода определения ВЭЖХ, поскольку компоненты растворителя (спирт) мешают последующему разделению соединений в условиях обращённо-фазовой хроматографии. Поэтому в таком варианте приходится отгонять спирт, удалять липофильные соединения и только после этого растворять образец в подвижной фазе. Экстракция водным раствором не требует отгонки растворителя, но требует очистки. Для очистки используются концентрирующие патроны типа ДИАПАК и метод твёрдо-фазной экстракции. При этом необходим контроль, насколько быстро 0,1 М водный раствор соляной кислоты экстрагирует антоцианы. Опыт нашей лаборатории показывает, что для большинства образцов экстракция соляной кислотой весьма эффективна.

## 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### 3.1 Определение антоцианов кизила

Одним из объектов исследования является кизил. Экстракция привычным для нашей лаборатории способом - настаиванием в 0,1 М водном растворе соляной кислоты привела к неожиданному результату: первая экстракция позволила получить раствор лишь немногим большей концентрации по сравнению с последующими порциями экстрактов (см. рис. 3.1.). Обычно к третьей экстракции остается лишь незначительное количество антоцианов в образце. Это привело к необходимости поиска более эффективного способа экстракции, за которым в дальнейшем следили спектрофотометрическим методом.

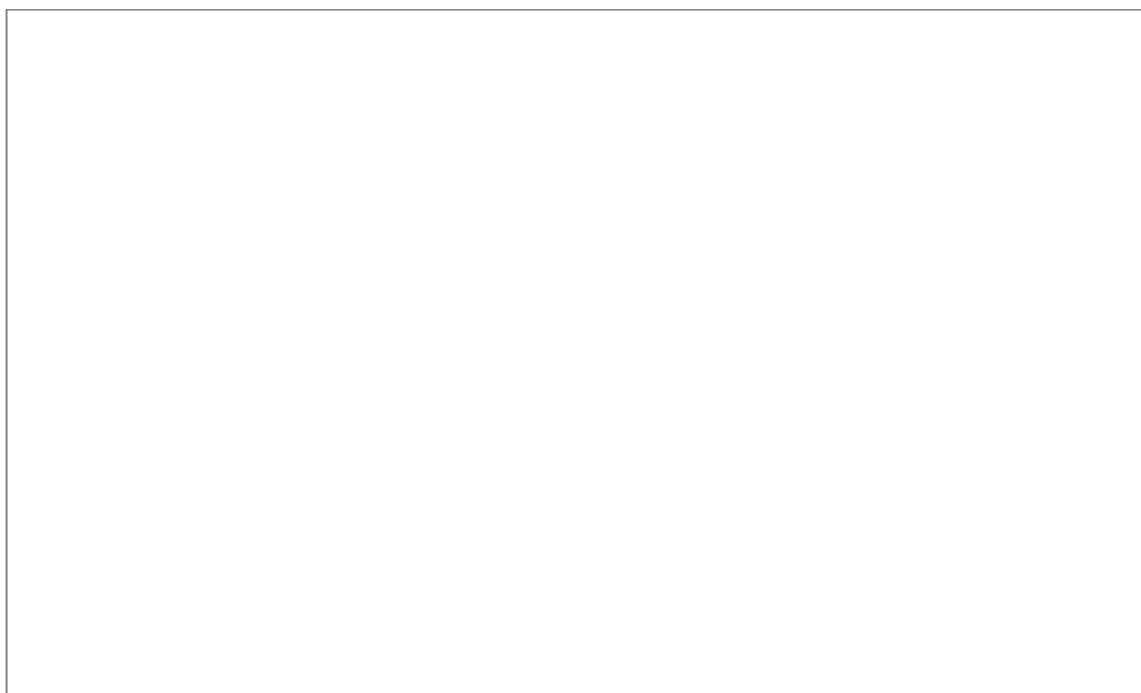


Рис. 3.1. Зависимость оптической плотности экстрактов кизила от стадии экстракции

Повторный опыт по исследованию последовательных экстракций 0,1 М водным раствором HCl с использованием метода ВЭЖХ показал, что при этом и по каждому из компонентов экстракта не было заметных различий (см. рис. 3.2.).

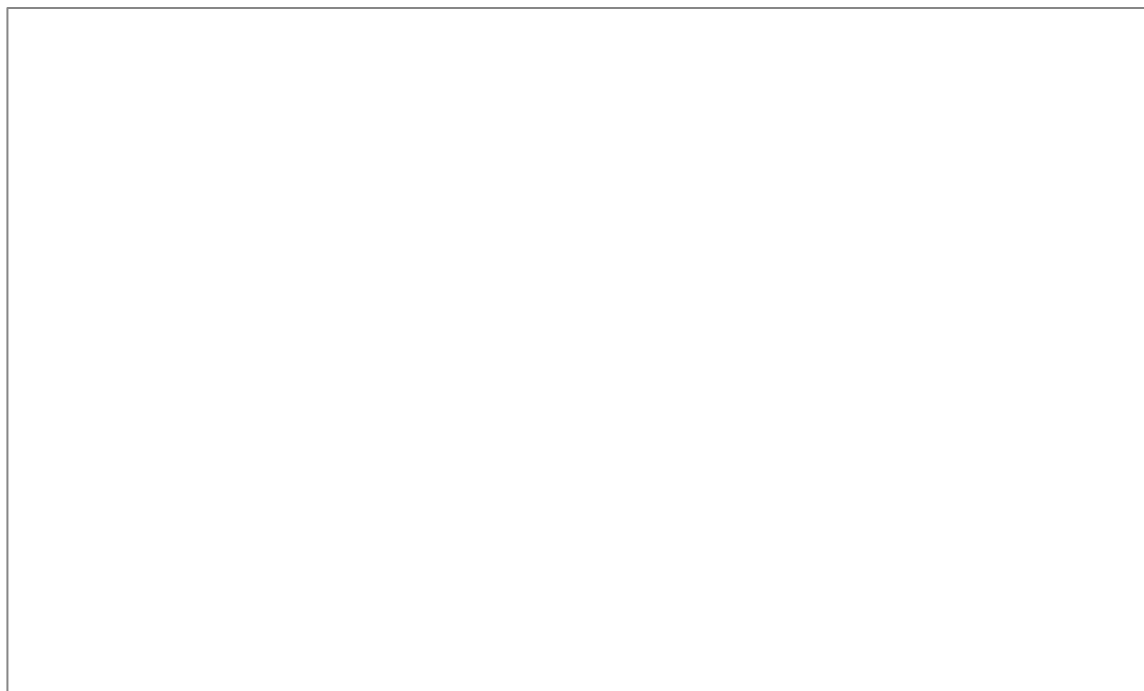


Рис. 3.2. Результаты 4-х последовательных экстракций

Отсюда был сделан вывод, что в мякоти кизила содержатся вещества, сольватирующие антоцианы кизила достаточно прочно, поэтому для полной экстракции необходимо добавлять органический растворитель. Тогда был поставлен следующий опыт: меняли концентрацию ацетонитрила в смеси с 0,1 М водным раствором соляной кислоты, экстрагируя антоцианы из мякоти кизила. Затем отгоняли ацетонитрил и определяли суммарное содержание антоцианов в пересчёте на цианидин-3-глюкозид в мякоти кизила спектрофотометрическим методом по формуле 1.2. Отгонка ацетонитрила осуществлялась на ротационном испарителе. Целью данного опыта было определить, насколько быстро проходит экстракция при добавлении ацетонитрила, а также оптимальный состав экстрагента для наиболее полной экстракции. Опыт показал, что при добавлении ацетонитрила исчерпывающая экстракция достигается за 1-2 стадии.

Спектры экстрактов мякоти кизила с различным содержанием ацетонитрила приведены на рисунке 3.3.

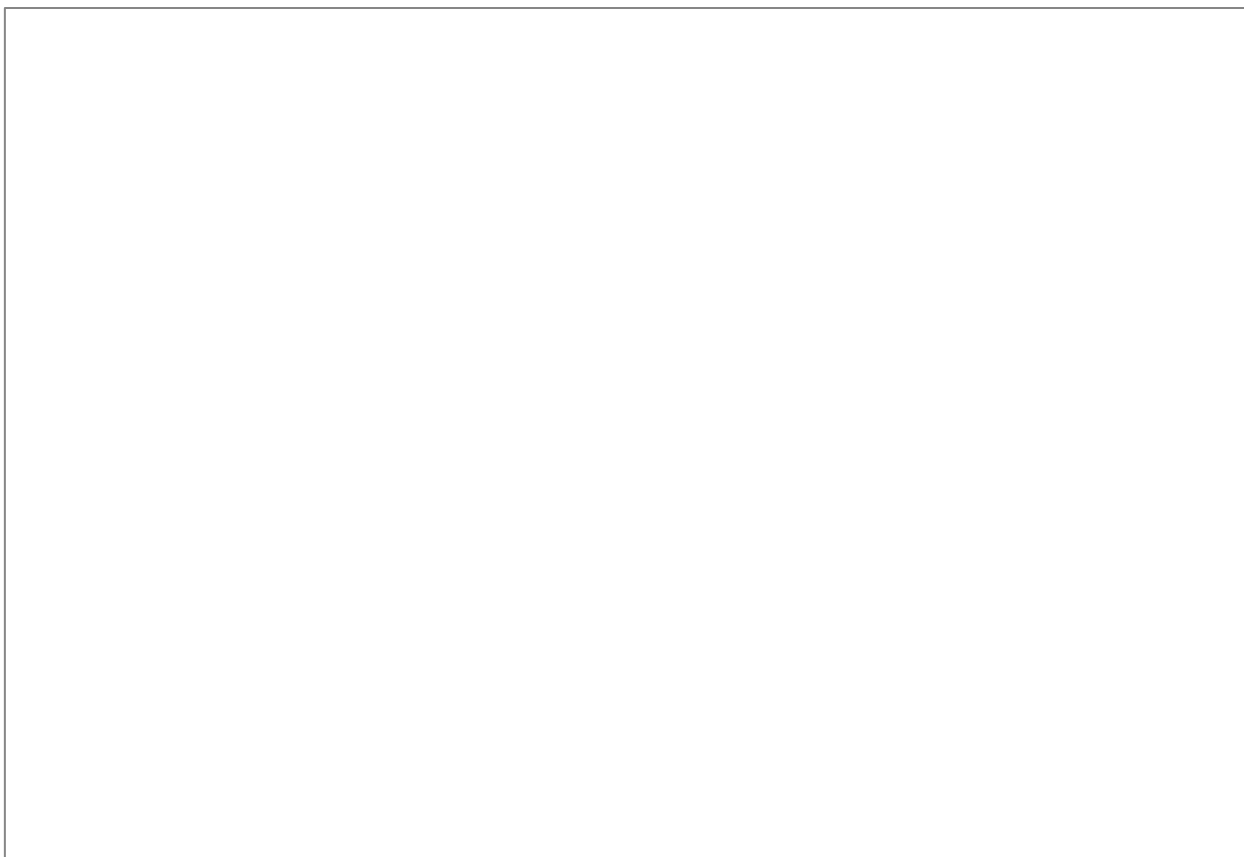


Рис. 3.3. Спектры экстрактов мякоти кизила при разных составах экстрагента

Таблица 3.1.

Суммарное содержание антоцианов в мякоти кизила



Результаты спектрофотометрического определения показали, что с ростом концентрации ацетонитрила в смеси с 0,1 М водным раствором HCl сначала растёт концентрация экстрагируемых антоцианов, а затем снова снижается. Исходя из результатов опыта, представленных в таблице

3.1., оптимальная концентрация ацетонитрила при экстракции антоцианов мякоти кизила составляет 20-40 об.%. В этом случае исчерпывающая экстракция достигается в 1 стадию.

После отгонки ацетонитрила и твёрдо-фазной очистки методом ВЭЖХ определяли качественный и количественный состав антоцианов кизила.

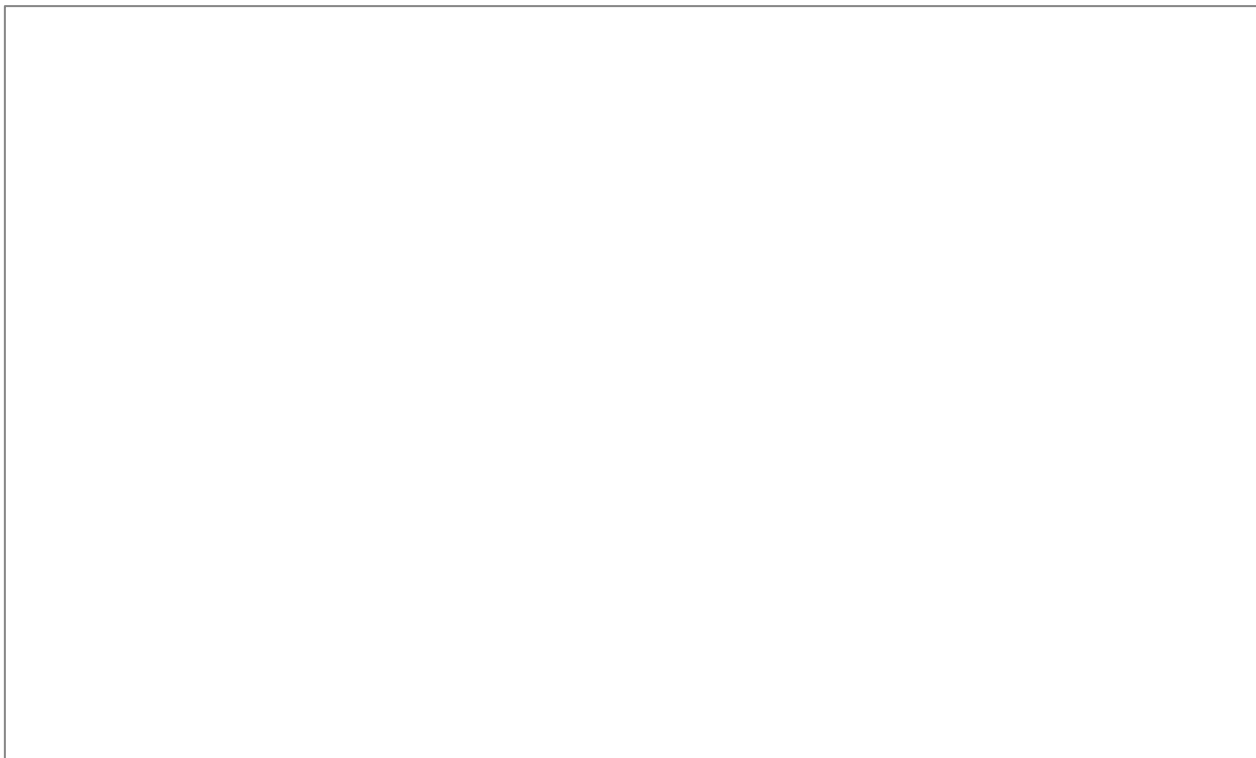


Рис. 3.4. Хроматограммы экстрактов мякоти кизила с разным составом экстрагента

После подсчёта площади пиков на полученных хроматограммах (рис.3.4.) рассчитали содержание всех основных антоцианов в мякоти кизила (см. табл. 3.2.).



Состав антоцианов в мякоти кизила


Более 80% антоцианов кизила приходится на пеларгонидин-3-галактозид и цианидин-3-галактозид. Дельфинидин-3-галактозид лучше всего экстрагируется 0,1 М водным раствором HCl, при этом его содержание составляет всего 7,76%. Рамнозил-производные экстрагируется немного лучше при добавлении ацетонитрила. Однако сильных закономерностей не обнаружено, поэтому можно утверждать, что состав экстрактов антоцианов кизила практически не изменяется с ростом концентрации ацетонитрила.

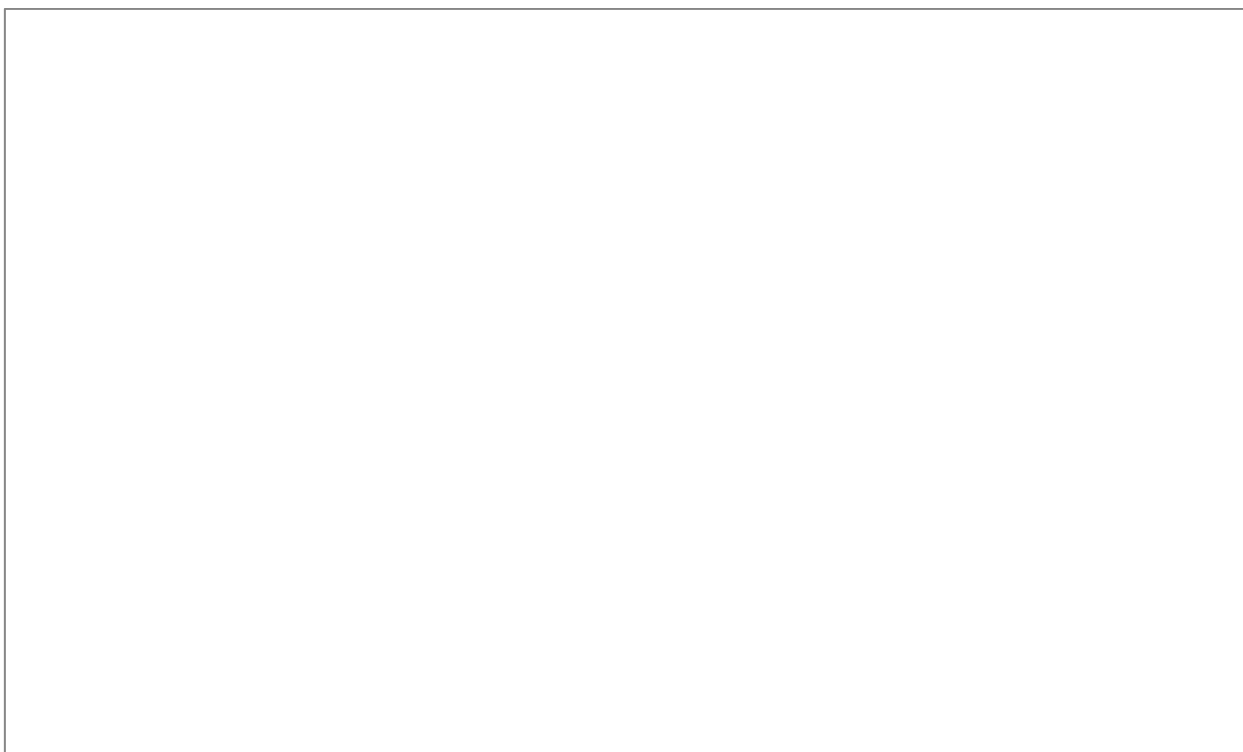


Рис. 3.5. Электронные спектры антоцианов мякоти кизила

Отнесение антоцианов к пикам на хроматограмме проводили спектрофотометрическим методом (см. рис. 3.5. и 3.6.) и при помощи масс-

спектрометрии (см. рис. 3.7.). Спектры антоцианов кизила сильно отличаются и являются весьма характеристическими.

Рис. 3.6. Хроматограмма и спектры антоцианов кизила

Рис. 3.7. Масс-спектры антоцианов кизила

Также использовался вариант сопоставления времён удерживания антоцианов кизила с антоцианами в известных источниках. Строго говоря, масс-спектрометрический метод не способен различить глюкозиды от галактозидов, так как такие вещества имеют одинаковые массы.

При этом тезис о том, что совпадение времен удерживаний в случайно выбранном составе подвижной фазы не является доказательством идентичности веществ, заменяется совпадением двухпараметрических зависимостей, что уже является значительно более надёжным критерием идентичности. Такое сравнение однозначно указывает на то, что в данном случае гексозиды - именно галактозиды, а не глюкозиды (см. табл. 3.3.).

Таблицы 3.3.

Определение состава антоцианов по сравнению времен удерживания в трех составах подвижных фаз


### 3.2 Определение антоцианов редиса

Ещё одним объектом исследования является красный редис. Экстракция 0,1 М водным раствором соляной кислоты антоцианов кожуры редиса оказалась весьма эффективной. Концентрация антоцианов уже ко второй экстракции уменьшается более, чем в 20 раз, что говорит о достижении исчерпывающей экстракции. Спектры экстрактов редиса по двум последовательным экстракциям представлены на рисунке 3.8., а в

таблице 3.4. приведены опытные и расчётные данные. Концентрация антоцианов редиса по двум экстракциям составила 0,968 г/100 г сырья.

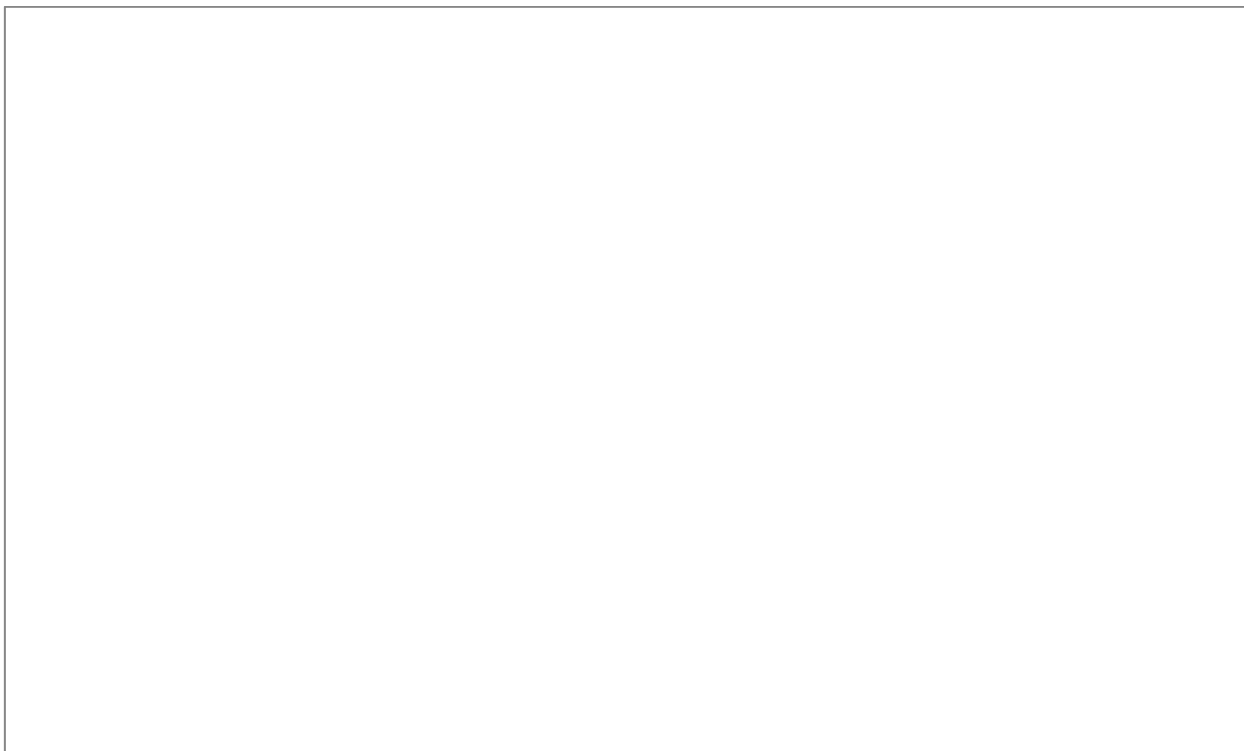


Рис. 3.8. Спектры экстрактов кожуры красного редиса по двум последовательным экстракциям

Таблица 3.4.

Суммарное содержание антоцианов редиса по двум последовательным экстракциям


После экстракции проводили твёрдо-фазную очистку и хроматографировали в условиях градиентной ВЭЖХ. При этом задавали следующий профиль градиента, представленный в таблице 3.5.

## Профиль градиента


Анализ полученных хроматограмм (см. рис. 3.9. и 3.10.) дал понять, что антоциановый состав редиса практически не зависит от стадии экстракции.

Рис. 3.9. Хроматограмма экстракта кожуры редиса по первой экстракции

Рис. 3.10. Хроматограмма экстракта кожуры редиса по второй экстракции

Дальнейшее изучение хроматограмм с использованием спектрофотометрического метода позволило определить, что спектры всех компонентов являются производными пеларгонидина (см. рис. 3.11.).

Рис. 3.11. Хроматограмма и спектр экстракта кожуры редиса

Идентифицировали производные пеларгонидина при помощи масс-спектрометрии. Масс-спектры представлены на рисунке 3.12.

Рис. 3.12. Масс-спектры основных антоцианов красного редиса

Метод масс-спектрометрии не позволяет определить гексозиды, но опираясь на литературные данные (п. 1.2.2.), можно утверждать, что дигексозид в данном случае – это софорозид, а гексозид в положении 5 – глюкозид. Все основные антоцианы редиса являются производными пеларгонидин-3-софорозид-5-глюкозида (см. рис. 1.3.).



Таким образом, основными антоцианами редиса являются пеларгонидин-3-ферулоил-малонилсофорозид-5-глюкозид и пеларгонидин-3-п-кумароил-малонилсофорозид-5-глюкозид. В небольших количествах содержатся аналогичные антоцианы, но не ацилированные малоновой кислотой. Стоит отметить, что спустя какое-то время в экстрактах антоцианов редиса их компоненты выпадают в осадок.

При определении антоцианов красного редиса нами также использовался метод ВЭЖХ разделения антоцианов в условиях гидрофильной хроматографии. Пробоподготовка для гидрофильной хроматографии отличается тем, что в хроматограф должны вводиться образцы, содержащие большое количество ацетонитрила. Первые эксперименты с редиской показали, что некоторые её компоненты не растворяются хорошо в образцах для хроматографирования в условиях гидрофильной хроматографии.

Тогда был проведён опыт, основанный на методе ВЭЖХ с градиентом состава подвижной фазы, но в качестве растворителя использовали ацетонитрил и ортофосфорную кислоту. Антоцианы смывали с патрона порциями экстрагента по 2 мл, содержащим от 80 до 95% ацетонитрила и от 5 до 20% ортофосфорной кислоты. Неэкстрагированные компоненты дополнительно смывали 50% водным раствором ацетонитрила.

Состав антоцианов при использовании смеси 80%  $\text{CH}_3\text{CN}$  и 20%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  практически не изменяется с последовательными экстракциями их с сорбента (см. рис. 3.13.). При этом практически все антоцианы экстрагируются первой порцией экстрагента, ко второй стадии площадь основного пика уменьшается в 14 раз. Пеларгонидин-3-п-кумароилсофорозид-5-глюкозид экстрагируется хуже, поэтому его относительное содержание от первой ко второй экстракции с патрона увеличивается с 15,2 до 21,9 %.

Рис. 3.13. Хроматограммы экстрактов редиса (80%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ )

Состав антоцианов при использовании смеси 95%  $\text{CH}_3\text{CN}$  и 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  значительно отличается (см. рис 3.14.). Антоцианы задерживаются в патроне и плохо смываются данным экстрагентом. Площадь основного пика от первой ко второй стадии уменьшается в 6 раз. При этом содержание пеларгонидин-3-п-кумароил-малонилсофорозид-5-глюкозида увеличивается с 53,6 до 65,4 %, пеларгонидин-3-ферулоил-малонилсофорозид-5-глюкозида увеличивается с 13, 2 до 17,0 %, а пеларгонидин-3-п-кумароилсофорозид-5-глюкозида уменьшается с 13,0 до 7,7%. То есть, наблюдается обратная ситуация в сравнении со смесью, содержащей 80% ацетонитрила. При этом значительное количество антоцианов не смывается смесью с 95%

ацетонитрила. 50% водный раствор ацетонитрила позволил экстрагировать эти антоцианы, при этом концентрация антоцианов, ацилированных малоновой кислотой, лишь в 2 раза меньше, чем при первом смывании с патрона 95%-ным раствором. В то же время концентрация пеларгонидин-3-п-кумароилсфорозид-5-глюкозида практически равна концентрации при первом смывании с патрона.

Рис. 3.14. Хроматограммы экстрактов редиса (95%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ )

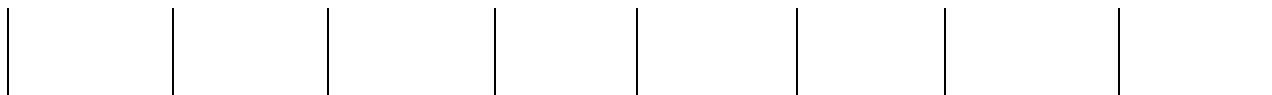
### **3.3 Исследование эффективности экстракции соляной кислотой**

Дополнительно был проведён опыт по изучению эффективности экстракции 0,1 М водным раствором  $\text{HCl}$  и 1%-ным раствором  $\text{HCl}$  в этаноле спектрофотометрическим методом на примере черешни, васильков тёмно-бордовых и гвоздики турецкой.

Для этого проводили две последовательные экстракции данных источников антоцианов в каждом из исследуемых растворителей. После готовили смесь растворителей в соотношении 1:1. Затем для каждого из исследуемых источников антоцианов проводили 3 измерения на спектрофотометре. Первое измерение проводили при разбавлении экстракта тем же растворителем. Второе и третье измерение проводили после разбавления экстрактов другим растворителем так, чтобы соотношение растворителей в образце было 1:1. При необходимости использовали







Антоцианы васильков тёмно-бордовых и гвоздики турецкой также определяли методом ВЭЖХ. При этом использовали только экстракты водным раствором соляной кислоты. Для сопоставления с пиками использовался спектрофотометрический метод и масс-спектрометрия.

Изучение хроматограммы и спектров антоцианов васильков (см. рис. 3.15.) позволило определить, что антоцианы васильков являются производными цианидина.

Рис. 3.15. Хроматограмма и спектры экстракта васильков тёмно-бордовых

Вещества были определены при помощи масс-спектрометрии (см. рис. 3.16.). Таким образом, выяснили, что основными антоцианами васильков являются цианидин-3,5-диглюкозид и цианидин-3-сукцинилглюкозид-5-глюкозид.

Рис. 3.16. Масс-спектры основных пиков антоцианов васильков



Аналогично определяли антоцианы гвоздики турецкой. Спектры всех антоцианов гвоздики также являются производными цианидина (см. рис. 3.17.).

Рис. 3.17. Хроматограмма и спектры экстракта гвоздики турецкой

При помощи масс-спектрометрии определили, что основными антоцианами гвоздики турецкой являются цианидин-3-(малилглюкозид)-5-глюкозид, цианидин-(цикл-малил-3,5-диглюкозид) и цианидин-3-(малилдиглюкозид). При этом последние два получили в виде смеси, пики на хроматограмме не разделились (см. рис. 3.18.).

Рис. 3.18. Масс-спектры основных пиков антоцианов гвоздики



## ВЫВОДЫ

1. В мякоти кизила содержатся вещества, прочно сольватирующие антоцианы кизила. При использовании 0,1 М водного раствора HCl количество стадий для достижения исчерпывающей экстракции может достигать 6. Целесообразно добавлять ацетонитрил, при его концентрации 20-40 об.% исчерпывающая экстракция достигается в 1 стадию. В данном случае суммарное содержание антоцианов в мякоти кизила составляет до 0,095 г на 100 г сырья.

2. Добавление ацетонитрила не изменяет состав антоцианов в экстрактах кизила. Основными антоцианами кизила являются пеларгонидин-3-галактозид, цианидин-3-галактозид, дельфинидин-3-галактозид в порядке уменьшения их доли.

3. Все антоцианы редиса являются пеларгонидин-3-софорозид-5-глюкозидами, ацилированными коричневыми кислотами и малоновой кислотой. Основными антоцианами красного редиса являются пеларгонидин-3-ферулоил-малонилсофорозид-5-глюкозид и пеларгонидин-3-п-кумароил-малонилсофорозид-5-глюкозид.

4. Ацилированные антоцианы красного редиса крайне эффективно экстрагируются 0,1 М водным раствором HCl. Исчерпывающая экстракция достигается в 2 стадии. Суммарное содержание антоцианов в кожуре редиса составляет 0,968 г на 100 г сырья.

5. Сравнение растворителей на примерах черешни, васильков тёмно-бордовых и гвоздики турецкой показало, что для черешни и васильков более эффективным является 1% раствор HCl в этаноле, а для гвоздики – 0,1 М водный раствор HCl.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карабанов И.А. Флавоноиды в мире растений. Минск: Ураджай, 1981. 80 с.
2. Чуб В. Для чего нужны антоцианы // Цветоводство. 2008. №6. С. 22–25.
3. Крешков А.П. Основы аналитической химии. Теоретические основы. Количественный анализ. М.: «Химия», 1976. 480 с.
4. Tanaka Y., Brugliera F., Chandler S. Recent progress of flower colour modification by biotechnology // International Journal of Molecular Science. 2009. V.10. P. 5350–5369.
5. Andersen O.M., Markham K.R. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton: CRC Press, 2006. P. 1256.
6. Макаревич А.М., Шутова А.Г., Спиридович Е.В., Решетников В.Н. Функции и свойства антоцианов растительного сырья // Труды БГУ. 2010. Т. 4. №2. С. 1–11.
7. Yoshida K., Mori M., Kondo T. Blue Flower Color Development by Anthocyanidins: From Chemical Structure to Cell Physiology // Nature Product Reports. 2009. V. 26. №. 7. P. 884–915.
8. Estévez L. Molecular structure of cyanidin metal complexes: Al(III) versus Mg(II). Theoretical chemistry accounts // Theory, Computation, and Modeling (Theoretica Chimica Acta). 1995. V. 128. P. 485–495.
9. Макаревич А.М., Шутова А.Г., Спиридович Е.В., Решетников В.Н. Функции и свойства антоцианов растительного сырья // Труды БГУ: научный журнал. 2010. Т. 4. №2. С. 237–245.
10. Танчев С.С. Антоцианы в плодах и овощах М.: Пищевая промышленность, 1980. 304 с.
11. Попов А.С., Жидехина Т.В. Биологически активные вещества плодов кизила мужского (*Cornus mas L.*) в условиях цчр // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. 2015. №11. С. 264–267.

12. Петрова И.Б., Жогова А.А., Полякова А.В. и др. Биологически активные вещества плодов кизила (*Cornus mas L.*) // Вопросы питания. 2014. Т. 83. № 5. С. 86–94.
13. Попов А.С. Формирование продуктивности кизила в цчр и пригодность для получения продуктов здорового питания: Дисс. ... кандидата сельскохозяйственных наук. – Мичуринск, 2016. – 150 с.
14. Клименко С.В. Биологические основы культуры кизила настоящего (*Cornus mas L.*) и айвы обыкновенной (*Cydonia oblonga Miill*) в Украине : Автореферат дисс. ... доктора биологических наук. – Ялта, 1993. – 49 с.
15. Char-Thanh Du, Frederick JohnFrancis. Anthocyanins from *Cornus mas* // Phytochemistry. 1973. V. 12. P. 2487–2489.
16. Kucharska A.Z., Szumny A., Sokol-Letowska A. and others. Iridoids and anthocyanins in cornelian cherry (*Cornus mas L.*) cultivars // Journal of Food Composition and Analysis. 2015. V. 40. P. 95–102.
17. Milenkovic A., Radovanovic B., Anđelkovic M. and others. The anthocyanin content and bioactivity of cornelian cherry (*Cornus mas*) and wild blackberry (*Rubus fruticosus*): Fruit extracts from the Vlasina region // Advanced technologies. 2015. V. 4. № 2. P. 26–31.
18. Taekyun Shin, Meejung Ahn, Gi Ok Kim, Sang Un Park. Biological activity of various radish species // Springer Science. 2015. V. 15. № 2. P. 105–111.
19. Giusti M.M., Wrolstad R.E. Characterization of Red Radish Anthocyanins // Journal of food science. 1996. V. 61. № 2. P. 322–326.
20. Fumi Tatsuzawa, Kenjuro Toki, Norio Saito and others. Anthocyanin occurrence in the root peels, petioles and flowers of red radish (*Raphanus sativus L.*) // Dyes and Pigments. 2008. V. 79. P. 83–88.
21. Nieves Baenas, Federico Ferreres, Cristina García-Viguera, Diego A. Moreno. Radish sprouts—Characterization and elicitation of novel varieties rich in anthocyanins // Food Research International. 2015. V. 69. P. 305–312.
22. ГОСТ 32709-2014 Продукция соковая. Методы определения антоцианинов. Введ. 2016-01-01. М.: Стандартинформ, 2014. 17 с.