

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» (НИУ «БелГУ»)

На правах рукописи

ТЫНЯНА ИРИНА ИВАНОВНА

**РАЗДЕЛЕНИЕ, КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ
АНТОЦИАНОВ И БЕТАЦИАНИНОВ В ЭКСТРАКТАХ
РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОПТИЧЕСКИХ
И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ**

02.00.02 – аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата химических наук

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

Белгород – 2015 г.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Свет и цвет	11
1.2. Природные и синтетические красители. Производство в мире	14
1.3. Антиоксидантная активность и емкость. Методы определения	18
1.4. Природные красители	20
1.4.1. Строение антоцианов и бетацианинов	20
1.4.2. Физико-химические характеристики антоцианов и бетацианинов	24
1.4.3. Природные источники антоцианов и бетацианинов	26
1.4.4. Факторы, влияющие на стабильность антоцианов и бетацианинов	27
1.4.5. Методы качественного и количественного определения антоцианов и бетацианинов	30
1.5. Твердофазная очистка антоцианов и бетацианинов	33
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	36
2.1. Объекты исследования	36
2.2. Экстракция антоцианов и бетацианинов из растительного сырья	36
2.3. Приготовление экстрактов с заданным рН	37
2.4. Запись электронных спектров	37
2.5. Определение концентрации антоцианов спектрофотометрическим методом	37
2.5.1. Приготовление рабочих растворов	37
2.5.2. Определение оптической плотности растворов и расчет концентрации антоцианов	38
2.5.3. Определение оптической плотности растворов и расчет концентрации антоцианов по скорректированной методике	38

2.6. Определение концентрации и степени распада бетацианинов спектрофотометрическим методом	39
2.7. Определение бетацианинов в различных частях корнеплода красной столовой свеклы	40
2.8. Теоретический расчет зарядовых форм бетацианинов	40
2.9. Определение заряда бетацианинов методом горизонтального электрофореза	40
2.10. Пробоподготовка перед хроматографическим определением антоцианов и бетацианинов	41
2.11. Определения антоцианов хроматографическим методом	41
2.12. Запись масс-спектров	42
2.13. Полупрепаративное выделение индивидуальных антоцианов	44
2.14. Определения бетацианинов хроматографическим методом	44
2.15. Полупрепаративное выделение индивидуальных бетацианинов	46
2.16. Расчет хроматографической эффективности	46
2.17. Сорбция антоцианов и бетацианинов	47
2.17.1. Сорбция антоцианов и бетацианинов на ОФ сорбентах	47
2.17.2. Сорбция антоцианов и бетацианинов на глинах	47
2.18. Приготовление сухих композиций, подкрашенных бетацианинами	47
2.19. Контроль сохранности бетацианинов в сухих композициях	48
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	49
3.1. Сопоставление электронных спектров растворов антоцианов и бетацианинов	49
3.1.1. Влияние рН на электронные спектры растворов антоцианов и бетацианинов	50
3.1.2. Влияние рН на электронные спектры растворов антоцианов	51
3.1.3. Влияние рН на электронные спектры растворов бетацианинов	56
3.1.4. Некоторые важные особенности электронных спектров реальных смесей антоцианов	58

3.1.5. Некоторые важные особенности электронных спектров экстрактов из растительных источников бетацианинов	59
3.1.6. Особенности спектрофотометрического определения концентрации антоцианов	62
3.1.7. Особенности спектрофотометрического определения концентрации бетацианинов	66
3.2. Очистка антоцианов и бетацианинов	74
3.2.1. Очистка бетацианинов на концентрирующих патронах	75
3.2.2. Очистка антоцианов и бетацианинов на бентонитовых глинах	81
3.3. Определение антоцианов и бетацианинов с использованием ВЭЖХ	83
3.3.1. Особенности ОФ ВЭЖХ антоцианов	83
3.3.1.1. Влияние состава элюента на качество хроматограмм при разделении антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ	83
3.3.1.2. Специфические особенности разделения антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ	86
3.3.1.3. Исследование качественного состава комплекса антоцианов некоторых растений в условиях ОФ ВЭЖХ	91
3.3.2. Особенности ОФ ВЭЖХ бетацианинов	99
3.3.3. Разделение антоцианов и бетацианинов в условиях гидрофильной хроматографии на диольной стационарной фазе	108
3.4. Приготовление готовых форм на основе бетацианинов и контроль их сохранности	116
ВЫВОДЫ	120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	121
ПРИЛОЖЕНИЯ	141

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АО – антиоксидант;

АОА – антиоксидантная активность;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ВЭЖХ-СФД - высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим детектором;

ВЭЖХ-МС - высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрофотометрическим детектором;

ДМД – диодно-матричный детектор;

КП – концентрирующий патрон;

ОВР – окислительно-восстановительная реакция;

ОФ – обращенно-фазовая;

ПГ – природная глина;

ПФ – подвижная фаза;

СФ – стационарная фаза;

ТФЭ – твердофазная экстракция;

ХГФВ – хроматография гидрофильных взаимодействий.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Качество и биологическая ценность натуральной пищевой продукции определяются ее химическим составом и целым комплексом интегральных органолептических свойств, зависящих от этого состава. Природные красители – антоцианы, бетацианины и др., не только придают цвет растительному сырью, но и обладают известной физиологической активностью, в частности, антиоксидантной. Очищенные природные красители в последнее время находят всё более широкое применение для улучшения потребительских свойств пищевой продукции, в биологически активных добавках, в фармацевтических препаратах для лечения и профилактики различных заболеваний. В то же время состав антоцианов и бетацианинов даже для одного и того же сорта растительного сырья сложен и вариативен, он зависит от климатических условий, от зрелости ягод, корнеплодов, качества сельскохозяйственных работ. Антоцианы и бетацианины легко претерпевают ряд превращений в зависимости от условий экстракции и анализа.

Наиболее подходящими методами контроля состава экстрактов растительных пищевых красителей являются высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим (ВЭЖХ-СФ), а в последнее десятилетие – с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС), и электронная спектроскопия. Но анализ литературных данных показывает, что эти два общепринятые в мировой практике метода могут давать серьезно (в несколько раз!) различающиеся результаты, что свидетельствует о наличии в используемых методиках неточностей. Поэтому проблема усовершенствования способов как количественного, так и качественного определения антоцианов и бетацианинов является актуальной в настоящее время.

Спектрофотометрическое определение антоцианов осложнено существованием целого комплекса соединений с различным строением для большинства растительных источников, при этом для каждого мономерного антоциана существует несколько форм, из которых в средах от кислой до нейтральной только флавилиевая форма является окрашенной. Кроме того, в ряде

случаев большой вклад в суммарный электронный спектр вносят полимерные антоцианы, проблема исключения влияния которых относится к числу сложных задач. В ВЭЖХ основная проблема связана с полнотой разделения всех компонентов смеси вследствие возможности соэлюирования нескольких веществ или инверсия их времен удерживания. В этом отношении актуален поиск хроматографических систем с ортогональными по отношению к традиционным режимам обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ характеристиками. К числу таких систем можно отнести гидрофильную хроматографию, разделение антоцианов в которой практически не исследовано в мировой литературе.

Не менее актуальной проблемой в химическом анализе с применением ВЭЖХ-СФ и ВЭЖХ-МС для рассматриваемых соединений является пробоподготовка, экстракционное и сорбционное концентрирование и очистка от мешающих веществ.

Целью данной диссертационной работы является разработка способов выделения из растительного сырья и готовой продукции антоцианов и бетацианинов, их идентификации и количественного анализа с помощью оптических и жидкостнохроматографических методов.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Разработать способ количественного определения антоцианов и бетацианинов в экстрактах с учетом их физико-химических свойств в растворах спектрофотометрическим методом.
2. Усовершенствовать схему идентификации и количественного анализа сложных смесей антоцианов и бетацианинов в обращенно-фазовой и гидрофильной высокоэффективной жидкостной хроматографии.
3. Теоретически обосновать и предложить модели разделения компонентов сложных смесей антоцианов и бетацианинов в условиях обращенно-фазовой и гидрофильной высокоэффективной жидкостной хроматографии.
4. Разработать методику пробоподготовки (частичной очистки и концентрирования) бетацианинов методом твердофазной экстракции на обращенно-фазовых сорбентах и на бентонитовых глинах.

Научная новизна

Разработан способ количественного определения антоцианов спектрофотометрическим методом, учитывающий медленное превращение псевдооснования и халконных форм антоцианов друг в друга, влияние природы органического растворителя на положение максимума абсорбции и на коэффициент экстинкции.

Разработан способ количественного определения бетацианинов спектрофотометрическим методом при их совместном присутствии с бетаксантинами.

Установлены закономерности удерживания антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ при использовании в составе подвижной фазы ортофосфорной кислоты. Предложены способы группового анализа однопипных антоцианов по числу ОН-групп в структуре флавилиевого иона и определения типа гликозилирования по параметрам относительного удерживания на картах разделения. Обоснован и предложен «поплавочный» механизм удерживания антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ.

Установлены закономерности удерживания бетацианинов в условиях ОФ ВЭЖХ. Предложен адсорбционный механизм, объясняющий особенности поведения бетацианинов и изобетацианинов в условиях ОФ ВЭЖХ и определены требования к характеристикам обращенных фаз, пригодных для разделения.

Установлены закономерности удерживания гликозидов цианидина (и бетацианинов) в условиях гидрофильной хроматографии на диольной стационарной фазе и предложены условия разделения антоцианов сложных смесей.

Разработан способ твердофазной очистки бетацианинов на природных бентонитовых глинах. Предложен вариант очистки и концентрирования бетацианинов на традиционных ОФ сорбентах.

Практическая значимость

Разработаны способы спектрофотометрического и хроматографического определения антоцианов и бетацианинов в растительном сырье и готовой

продукции.

Получены готовые формы бетацианинов с использованием метода лиофильной сушки.

По теме исследования получен патент – Патент РФ №2381245 «Способ получения концентрированного красителя».

Результаты работы используются в ООО «Флора-БАВ» и в ГНУ Белгородском НИИСХ Россельхозакадемии, а также внедрены в учебный практикум по курсам: «Современные методы анализа биологически активных веществ» и «Хроматографические и ионообменные методы».

Положения, выносимые на защиту:

1. Учет факторов, влияющих на характеристики электронных спектров при определении антоцианов и бетацианинов в экстрактах спектрофотометрическим методом позволяет уменьшить суммарную погрешность определения более чем на 10%.

2. Анализ разработанных карт разделения антоцианов в методе ОФ ВЭЖХ позволяет сопоставить эффективность хроматографических систем и выбрать подходящие условия для разделения различных типов антоцианов, определяемые специфическим «поплавочным» механизмом.

3. Разделение изомеров бетацианинов в условиях ОФ ВЭЖХ на устойчивых к коллапсу стационарных фазах обусловлено адсорбционным механизмом удерживания.

4. Гидрофильная хроматография является альтернативой обращенно-фазовой с рядом важных преимуществ.

Апробация работы. Основные результаты исследований были доложены на следующих конференциях: Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Нано- и супрамолекулярная химия в сорбционных и ионообменных процессах» (г. Белгород, 2010 г.); XIII, XIV Конференции «Физико-химические основы ионообменных и хроматографических процессов (ИОНИТЫ 2011, 2014); IV Международная Научно-практическая конференция «Научно-техническое творчество молодежи – путь к обществу, основанному на

знаниях» (г. Москва, 2012 г.), II Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (г. Краснодар, 2013); 1-ая Зимняя молодежная школа-конференция с международным участием «Новые методы аналитической химии» (г. С.-Петербург, 2013 г.), VI Всероссийская конференция «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (г. Барнаул, 2014 г.).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 9 статей в периодических изданиях, рекомендованных ВАК РФ для опубликования научных трудов, 1 из них из базы Scopus и 5 тезисов и материалов конференций; зарегистрирован 1 патент РФ и 3 ноу-хау.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 3 глав, списка литературы из 214 источников, 7 приложений. Материал работы изложен на 147 страницах, содержит 66 рисунков, 27 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Свет и цвет

Человек способен различать до 15000 оттенков и цветов [1]. Но часто возникает несоответствие между зрительным ощущением цвета и длиной волны света, являющейся объективной характеристикой самого источника излучения.

Человеческий глаз воспринимает электромагнитные колебания в довольно узком диапазоне длин волн (или частот) $\sim 380 \div 780$ нм [2]; этот диапазон называется «видимой областью». При этом видимая область по специфике цветового восприятия разделяется на семь «спектральных цветов» с характеристическим (узким) диапазоном длин волн: красный, оранжевый, желтый, зеленый, голубой, синий, фиолетовый (рис. 1.1). Но реально человеческий глаз одновременно воспринимает не один узкий диапазон длин волн, а сложную суперпозицию полос с различными частотами, что обуславливает своеобразную интегральную восприимчивость. Это требует иной количественной оценки цвета, которая стала возможной после введения понятия «цветовое пространство».

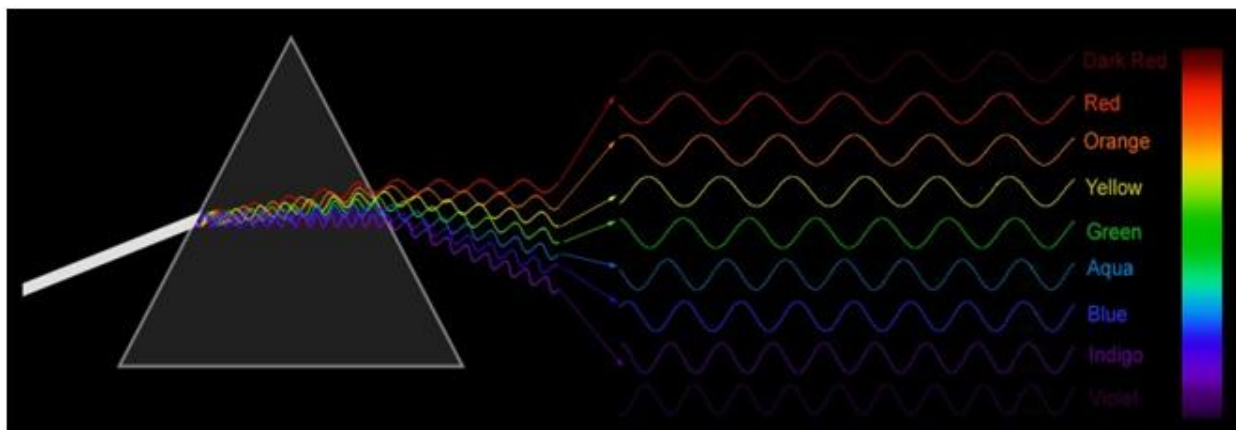


Рисунок 1.1 - Разложение света в спектр вследствие дисперсии при прохождении через призму

Цветовое пространство – это модель представления цвета, основанная на использовании цветовых координат. Цветовые модели позволяют с помощью математического аппарата описать определенные цветовые области спектра, т.е.

разложить на оттенки основных цветов любой цвет и обозначить его набором цифр – цифровых координат.

По принципу действия все цветовые модели делят на три группы:

- Аддитивные (RGB) – основанные на сложении лучей света разных цветов. В этой системе отсутствие всех цветов дает черный цвет, а присутствие – белый. Система аддитивных цветов работает с излучаемым светом.
- Субтрактивные (CMY, CMYK) – основанные на вычитании цветов. Белый цвет проявляется в отсутствии всех цветов, тогда как их присутствие дает черный цвет. Система субтрактивных цветов работает с отраженным светом.
- Перцепционные (HSB, HSL, Lab) – базирующиеся на интуитивном восприятии цвета человеком. Цвет задается путем указания двух компонентов: цветности (цветового тона и насыщенности) и яркости.

Наиболее распространенной сегодня моделью цветности, описывающей способ синтеза цвета в системах освещения, видеосистемах, устройствах записи на фотопленку, мониторах, сканерах и цифровых камерах является система RGB. Для этой цветовой модели выбрано три основных цветовых тона монохроматического излучения: *R* (red, красный цвет) - $\lambda = 700,0$ нм; *G* (green, зеленый цвет) - $\lambda = 546,1$ нм; *B* (blue, синий цвет) - $\lambda = 435,8$ нм. Цветовым пространством RGB-модели является куб (рис. 1.2).

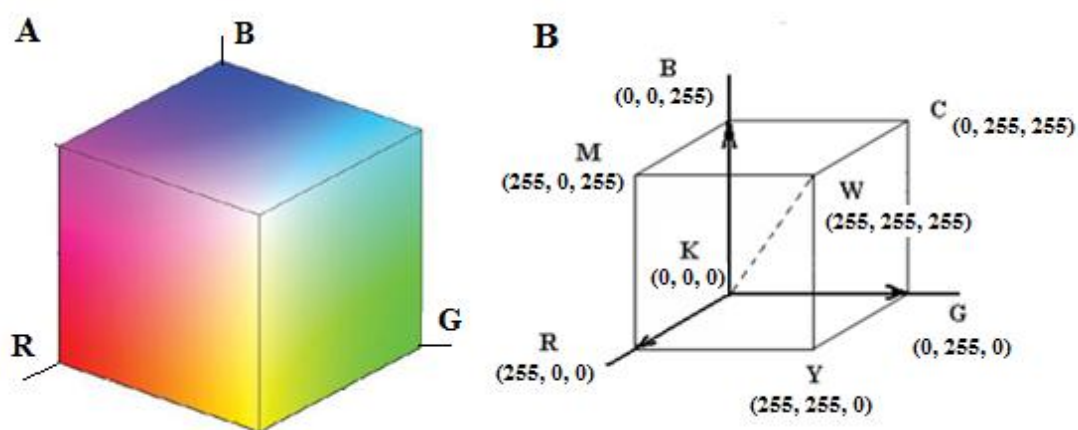


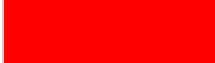









Рисунок 1.2 - Цветовое пространство для модели RGB

На главной диагонали куба KW, образованного равными количествами каждого из основных цветов, лежат оттенки серого цвета. Любой другой цвет в

таким пространством (точка внутри куба) получается путем сложения трех основных, каждый из которых имеет свой отдельный параметр, указывающий на количество соответствующей компоненты в конечном цвете (R, G, B).

В случае, например, ЖК-мониторов каждый пиксель отображает цвета, как сочетание красного, зеленого и синего светодиодов. Все возможные интенсивности каждого цвета укладываются в интервале от 0 до 255 (8 бит на каждый цвет). Максимально возможное число цветов, синтезируемых в системе RGB, равно $256 \times 256 \times 256 = 16777216$. Когда, например, красный пиксель установлен на 0, светодиод выключен, а когда на 255 – включен полностью. Любое значение в интервале от 0 до 255 приводит к частичному световому излучению. В таблице 1.1 приведен перечень нескольких цветов, синтезируемых моделью RGB.

Таблица 1.1 - Перечень некоторых цветов с кодировкой для модели RGB

Цвет	Название цвета	Кодировка (R, G, B)
	Красный	(255, 0, 0)
	Оранжевый	(255, 165, 0)
	Желтый	(255, 255, 0)
	Зеленый	(0, 128, 0)
	Голубой	(0, 255, 255)
	Синий	(0, 0, 255)
	Фиолетовый	(139, 0, 255)
	Серый	(128, 128, 128)
	Черный	(0, 0, 0)
	Белый	(255, 255, 255)

Существующие модели цветности позволяют безошибочно интерпретировать многообразные оттенки цветов независимо от индивидуального восприятия цвета отдельным человеком.

1.2. Природные и синтетические красители. Производство в мире

Для придания продуктам питания привлекательного внешнего вида производители подкрашивают их широким спектром красителей, которые классифицируются на три группы: натуральные, неорганические (минеральные) и синтетические [3]. Но для того, чтобы краситель можно было использовать в пищевой промышленности, он должен соответствовать следующим требованиям:

- абсолютная безвредность;
- устойчивость к температурным воздействиям;
- высокая красящая способность;
- отсутствие неприятных посторонних вкусов и запахов;
- стабильность окраски в процессе хранения продукта [4].

Натуральные красители уступают по технологическим характеристикам синтетическим соединениям, являясь менее устойчивыми как при хранении, так и в ряде производственных нагрузок [5-10]. Но доминирующие на Российском рынке синтетические красители не соответствуют основному требованию по безопасности для организма человека (табл. 1.2). В средствах массовой информации и в научной литературе нередко упоминается о нарушении нормального функционирования органов и тканей, о появлении аллергических реакций, а также о развитии тяжелых хронических заболеваний в связи с употреблением в пищу продуктов, подкрашенных синтетическими компонентами [9-14].

Поэтому, для улучшения качества жизни населения в современном обществе, необходимо менять курс на доминирующее использование в пищевой промышленности натуральных веществ, в частности, природных красителей, которые являются не просто красящими добавками, но и биологически активными компонентами, обогащающими продукты питания антиоксидантными и антиканцерогенными свойствами [15-22].

Таблица 1.2 - Пищевые красители, разрешенные к применению для производства пищевых продуктов на территории РФ [4]

Индекс/ Примечание	Название	Цвет	
Натуральные красители			
E100	*	Куркумин, турмерик	Желто-оранжевый
E101		Рибофлавин (витамин В2)	Желтый
E120	*	Кармины	Красный
E140		Хлорофилл	Зеленый
E141		Хлорофилла зеленый комплексы	Зеленый
E150 (a-d)		Сахарный колер	Коричневый
E160 (a-f)		Каротины	Желто-оранжевый
E161 (b, g)		Каротиноиды	Желтый
E162		Красный свекольный	Красный
E163		Антоцианы	
E163a		Цианидин	Красно-фиолетовый
E163b		Дельфинидин	Красно-синий
E163c		Мальвидин	Синий
E163d		Пеларгонидин	Оранжевый
E163e		Пеонидин	Пурпурно-красный
E163f		Петунидин	Пурпурный
E181		Танины пищевые	Желто-белый
Минеральные красители			
E152	*	Уголь	Черный
E153		Уголь растительный	Черный
E170		Карбонаты кальция	Белый
E171	*	Диоксид титана	Белый
E172		Оксиды железа	Черный, красный, желтый
E174		Серебро	Металлический
E175		Золото	Металлический
Синтетические красители			
E102	**	Тартразин	Желтый
E104	**	Желтый хинолиновый	Желто-зеленый
E110	*	Желтый «солнечный закат»	Желто-оранжевый
E122	*	Кармуазин (азорубин)	Красный
E124	**	Понсо 4R (пунцовый 4R)	Красный
E129	*	Красный очаровательный АС	Красный
E131	*	Синий патентованный V	Синий
E132	*	Индигокармин (индиготин)	Синий
E133	**	Синий блестящий FCF	Синий
E142	**	Зеленый S	Зеленый
E151	*	Чёрный блестящий BN	Черный
E155	*	Коричневый НТ	Коричневый

* - опасные для здоровья человека пищевые красители;

** - опасные для здоровья человека красители, разрешенные на территории РФ, но запрещенные в других странах.

В некоторых случаях применение натуральных красителей безальтернативно. Это, прежде всего, касается окрашивания кисломолочных продуктов. Молочнокислые бактерии разлагают синтетические азокрасители в течение нескольких часов (анаэробная деградация азокрасителей лежит даже в основе технологий, связанных с понижением уровня загрязняющих веществ в экосистемах) [23]. Поэтому для окрашивания таких продуктов желательно применение натуральных пигментов, являющихся в такой среде достаточно стойкими.

К числу водорастворимых природных красителей – антиоксидантов, способных окрашивать продукты питания в различные оттенки красного (альтернатива канцерогенному азокрасителю – кармуазину), относятся антоцианы и бетацианины [24].

Бетацианины используются как пищевые колоранты с начала XX века для подкрашивания кондитерских изделий, сухих смесей, молочной и мясной продукции. Известно применение красителя в виде сокового концентрата и сухого порошка, получаемого методом лиофильного высушивания или распылением [25]. Из-за нестабильности бетацианинов их применяют для подкрашивания продуктов питания, не подвергаемых особым термическим обработкам и имеющих небольшой срок годности (табл. 1.3) (данные получены из рекламных материалов и официальных сайтов компаний).

Считается, что бетацианины используются относительно редко из-за их ограниченной распространенности в природе [26], хотя с этим трудно согласиться, поскольку основной источник этих красителей – красная столовая свекла выращивается повсеместно и в больших количествах. Это справедливо, по крайней мере, для России. Известно, что выделяемые из корнеплодов свеклы бетацианины, входят в состав «Красного свекольного» красителя под кодовым названием E162 (Beet Red - E162) [27]. Главными поставщиками свекольного красителя на территорию России являются Франция («Diana Naturals») и Германия. Среди других мировых производителей также можно отметить Индию, Китай («Cotion LTD»), Иран, Данию («Chr. Hansen») и США. Сведений об

отечественных производителей бетацианинов нами не обнаружено. Известны лишь варианты получения криопорошков из мелкоизмельченных корнеплодов красной столовой свеклы.

Таблица 1.3 - Применение натурального бетацианинового красителя в пищевой промышленности

Продукт	Цвет	Содержание бетацианинов, %_{масс.}
Йогурт	Розовый	0.09
Мороженое	Темно-розовый	0.20-0.25
Сосиски	Розовый	0.60
Ветчина вареная	Коричнево-розовый	0.17
Сухие порошки для приготовления напитков	Клубничный	1.20
	Малиновый	1.50
	Черносмородиновый	1.00
Хлебобулочные изделия	Коричнево-розовый	2.50
Карамель	Розовый	0.10
Желе	Малиново-красный	0.20

Среди красных красителей немаловажную роль играют и антоциановые пигменты, также используемые на сегодняшний день не только в пищевой, но и в фармацевтической промышленности. Они разрешены в качестве пищевой добавки E163 и рекомендованы СанПиН для подкрашивания некоторых видов сыров, вин, безалкогольных напитков, консервированных овощей, сухих завтраков (до 200 мг/кг), джемов, желе, мармеладов.

На российском рынке сегодня представлены как жидкие водорастворимые, так и сухие антоциановые красители. К производителям антоцианосодержащих препаратов относятся: ЭКОМИР («Антоциан форте»), ООО Алина-Фарма («Остроглаз»), Nutripharma Ltd («Винекс»), Эвалар («Черника форте»), ООО «Ньюман нутриентс АГ» («Визуалон»), ООО ПТФ «Фармаком» («Чорница»). В розничной торговле широко представлены концентраты антоцианов «ЭКОТАН» (Китай).

Сопоставление антоцианов и бетацианинов в качестве потенциальных колорантов для пищевой и фармацевтической промышленности особенно

интересно тем, что они являются альтернативой друг другу, обладая аналогичной биологической активностью и сходной окраской. Особенно интересны бетацианины как красители для продуктов с нейтральным значением pH, где антоцианы практически обесцвечиваются [28].

Антоцианы и бетацианины (красный свекольный) разрешается использовать для изготовления всех пищевых продуктов без особого количественного ограничения, за исключением тех, подкрашивание которых не допускается в соответствии с требованиями СанПиН, и в которые могут быть добавлены только определенные красители [29].

1.3. Антиоксидантная активность и емкость. Методы определения

Антиоксидантная активность (АОА) - это свойство соединений, которому в современном мире уделяется особое внимание. Свободные радикалы являются промежуточными частицами, возникающими в организме по различным, в том числе и по естественным механизмам. Ухудшение экологии, напряженный темп жизни, несбалансированное питание – эти и многие другие факторы способствуют ускорению окислительных процессов, протекающих в организме человека и накоплению свободных радикалов. Для их нейтрализации организм человека обладает собственной антиоксидантной ферментативной системой, но эта система не рассчитана на повышенное образование свободных радикалов - следствия оксидативного стресса современного общества и употребления некачественных продуктов питания. Поэтому для профилактики множества заболеваний, сопутствующих чрезмерному образованию свободных радикалов, необходимо использование «скорой помощи» - природных антиоксидантов, которыми богаты определенные виды пищи [30].

Для измерения АОА биологически активных веществ (БАВ) используют широкий спектр методов, основанных на определении суммарного количества восстановителей в анализируемом образце [31]. При этом возможно получение двух типов параметров АОА: емкостного, связанного с содержанием АО в

анализируемой смеси, и кинетического, определяющегося константой скорости протекающей окислительно-восстановительной реакции (ОВР) [32].

По способу регистрации проявляемой АОА выделяют хемилюминесцентные, флуоресцентные, фотометрические, электрохимические и ряд более специфических методов. В основе таких методов лежит определенная модельная реакция, по завершении (или в процессе протекания) которой фиксируется аналитический сигнал, находящийся в математической зависимости от концентрации антиоксидантного компонента в анализируемом образце. Так, *хемилюминесцентный* метод основан на люминесценции (свечении) люминола, вызванной химическим взаимодействием со свободными радикалами [33-34]. *Газометрические* методы основаны на определении количества молекулярного кислорода, поглощаемого антиоксидантом [35]. *Спектрофотометрические* методы анализа основаны на исследовании изменения оптической плотности раствора при проведении ОВР (железо-восстанавливающий метод, DPPH, ABTS и др.) [36-37]. Среди *электрохимических* методов определения АОА наиболее распространен амперометрический метод, основанный на регистрации электрического тока, возникающего при окислении АО на поверхности рабочего электрода при определенном потенциале [38]. При комбинации амперометрического детектора с методом ВЭЖХ возможно определение АОА индивидуальных компонентов после разделение смеси.

Антиоксидантная активность антоцианов и бетаанинов

Антоцианы, как АО, широко применяются сегодня в фармацевтической промышленности при изготовлении офтальмологических препаратов [39-42] из-за широкого спектра полезных для человеческого организма свойств [43-45]. Так антоцианам присуща Р-витаминная активность, т.е. способность укреплять стенки кровеносных капилляров, что способствует беспрепятственному току крови во всех частях глаз, поддерживая давление на низком уровне. Также антоцианы обеспечивают сохранность соединительных тканей и коллагена – основного

компонента хрусталика, обуславливая его прозрачность [46]. Антоцианам присуща противомикробная и противораковая активность [47-48].

Согласно современным исследованиям, красная столовая свекла, содержащая бетацианиновые пигменты, входит в десятку овощей, обладающих самой высокой АОА [49]. Несмотря на то, что структура бетацианинов родственна алкалоидам, эти пигменты не оказывают токсического воздействия на организм человека. Напротив, бетацианинам приписывается

- противовирусная и противомикробная деятельность [50-51];
- обеспечение сбалансированных окислительно-восстановительных процессов с участием жиров [27];
- защита эритроцитов от оксидативного гемолиза [52];
- ингибирование процесса разложения гема (небелковой части молекулы гемоглобина и цитохромов) [12];
- сокращение заболеваний сердечно-сосудистой системы [12]
- ингибирование процесса развития онкологических заболеваний [53-54];
- участие в процессе активации фермента хинонредуктазы – мощного детоксиканта при химиотерапии онкологических заболеваний [49];

Бетацианины обладают высокой биодоступностью [55]. Они способны проникать в кровь из желудочно-кишечного тракта при употреблении в пищу бетацианинсодержащих продуктов. В литературе не найдено данных о пределах приема бетацианинов в пищу, что указывает на их абсолютную безвредность.

1.4. Природные красители

1.4.1. Строение антоцианов и бетацианинов

Бетацианины – группа водорастворимых растительных красителей. Это единственные из класса алкалоидов соединения, имеющие цвет [56]. Бетацианины определяют окраску цветов, плодов (или корнеплодов), листьев и других частей растений в разные оттенки от красного до глубокого фиолетового цвета [57].

Биохимия этих природных соединений долгое время оставалась загадкой. Сегодня известно, что они входят в группу беталаиновых пигментов, которых к

настоящему времени насчитывается более 100. Помимо красно-фиолетовых бетацианинов (от греч. *kyaneos* – синий) (рис. 1.3а) в эту группу входят окрашенные в желтый цвет бетаксантины (от лат. *beta* - свекла; от греч. *xanthos* – желтый) (рис. 1.3б) [52].

В структуру обоих компонентов входит фрагмент беталамовой кислоты (рис. 1.3в), но в случае бетаксантинов он сконденсирован с аминосоединениями (табл. 1.4), а в случае бетацианинов с *цикло*-3-(3,4-дигидроксифенил)-L-аланином (*цикло*-ДОФА) (рис. 1.3г) [55].

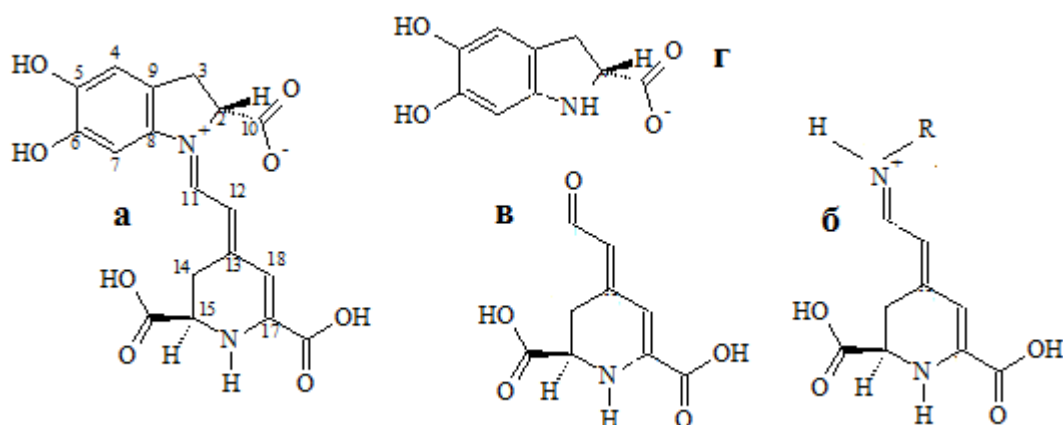


Рисунок 1.3 - Структуры бетацианидинов (а), бетаксантинов (б), беталамовой кислоты (в), *цикло*-ДОФА (г)

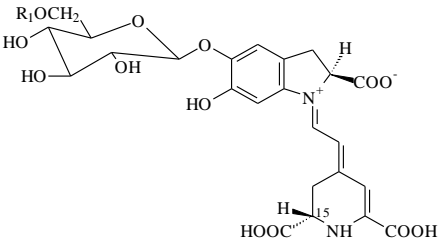
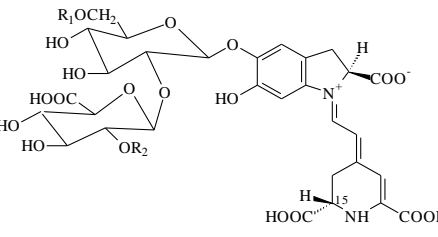
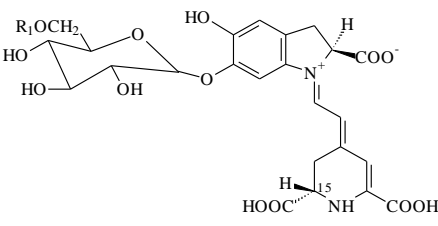
Таблица 1.4 - Перечень основных бетаксантинов [53, 58]

Формула	Аминосоединение (R)	Название	λ_{\max} , нм
	Гидроксипролин	Портулаксантин I	483
	Глицин	Портулаксантин III	470
	Аспарагин	Вульгаксантин III	474
	Гистидин	Мускаарин	478
	Глутамин	Вульгаксантин I	475
	Глутаминовая кислота	Вульгаксантин II	474
	Пролин	Индикаксантин	483
	Лейцин	Вульгаксантин IV	473

Основная структура бетацианинов состоит из двух N-гетероциклических систем – дигидроиндольной и дигидропиридиновой, связанных между собой sp^2 -гибридизованными атомами углерода. В большинстве случаев природные бетацианины представляют собой гликозиды, у которых к OH-группе в

положении C₅ или C₆ (но никогда к обеим) дигидроиндольного кольца присоединен моно- или дисахарид. Остатки сахаров могут быть ацилированы. Чаще всего встречаются малоновая, кофейная, *n*-кумаровая, феруловая, синаповая и 3-гидрокси-3-метилглутаровая [59].

Таблица 1.5 - Перечень основных бетацианинов [60-62]

Формула	Заместители		Название	λ_{\max} , нм
	R ₁	R ₂		
Производные бетанинового ряда				
	Н		Бетанин	538
	НМГ		Хилоцеренин	
	Малонил		Филокактин	
Производные амарантинового ряда				
	Н	Н	Амарантин	536
	НМГ*	Н	Иресинин I	298, 540
	Н	<i>n</i> -кумароил	Целосианин I	306, 546
	Н	ферулоил	Целосианин II	312, 546
	малонил	Н	Маммилларинин	
Производные гомфренинового типа				
	Н		Гомфренин I	540
	<i>n</i> -кумароил		Гомфренин II	310, 552
	ферулоил		Гомфренин III	322, 552

* НМГ – 3-гидрокси-3-метилглутарил

С различными углеводными остатками, присоединяющимися через гидроксильные группы в положениях 5 и 6, связано разнообразие структур бетацианинов (табл. 1.5). Сегодня их насчитывается более 50 видов [63].

Антоцианы по химической природе являются гликозидами гетероциклических соединений агликонов – полигидрокси- и полиметокси-

производных 2-фенилбензопириллиевого катиона (флавилиевого катиона) (рис. 1.4) [64]. Углеводные остатки в молекулах антоцианов соединены с агликоном через гидроксильные группы в положении 3, реже – 3 и 5. На сегодняшний день известно более 600 антоцианов, выделенных из растений [65]. Их разнообразие определяется различными углеводными фрагментами, присоединенными к основе (табл. 1.6).

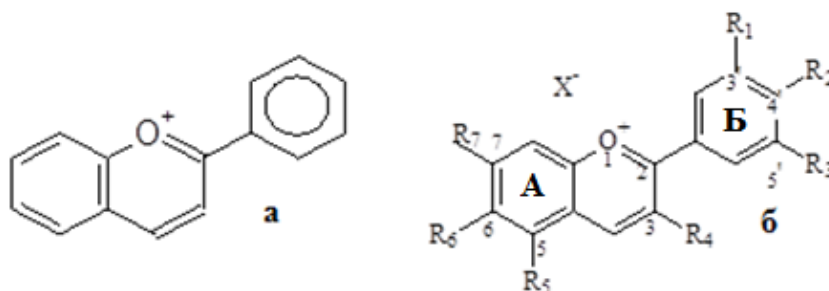


Рисунок 1.4 - Структурная формула катиона 2-фенилбензопириллия (а) и его производных антоцианидинов (б)

Таблица 1.6 - Основные агликоны – антоцианидины [3,64,66]

Агликоны	Заместители в положении						
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Пеларгонидин	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Цианидин	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Пеонидин	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Дельфинидин	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Петунидин	-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
Мальвидин	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
Аурангинидин	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-OH
Аррабидин	-H	-OH	-OCH ₃	-H	-H	-OH	-OH
Апигенин	-H	-OH	-H	-H	-OH	-H	OH
Европинидин	-OCH ₃	-OH	-OH	-OH	-OCH ₃	-H	-OH
Лютеолинидин	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OH
Розинидин	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OCH ₃

Агликоны отличаются друг от друга различной степенью гидроксирования и метоксилирования. Углеводная часть антоцианов, чаще всего представленная глюкозой, может содержать и другие моно- и дисахариды: арабинозу, ксилозу, глюкозу, галактозу, арабинозилглюкозу, глюкуронозилглюкозу и др. [66].

Остатки сахаров могут быть ацилированы. Чаще всего встречаются фрагменты таких органических кислот, как кумаровая, кофейная, синаповая, феруловая, галловая, уксусная, щавелевая, малоновая и др [67-70].

Существуют и более сложные структуры – так называемые пироантоцианы (антоцианы, объединенные двухосновной кислотой), образующиеся при конденсации антоцианов с некоторыми альдегидами [71-74].

1.4.2. Физико-химические характеристики антоцианов и бетацианинов

Известно, что в большинстве пигментов «ответственными» за появление окраски являются не молекулы целиком, а лишь их определенные участки, называемые хромофорами (например, азогруппа $-N=N-$, нитрогруппа $-NO_2$, нитрозогруппа $-N=O$, карбонильная группа $=C=O$, сопряженные системы двойных связей, хиноидные группировки и др.) [75]. Цветность органических соединений может определяться также наличием заряда. Все остальные фрагменты молекул либо не влияют на окраску, либо лишь несколько изменяют её (ауксохромы). Влияние ауксохромов редко бывает значительным, однако оно позволяет углублять или повышать цвет, менять оттенки «основного» цвета, характерного для хромофора [76].

Бетацианины имеют два максимума светопоглощения – основной в видимой области спектра в диапазоне от 535 до 540 нм и в УФ-области при $\lambda=270\div 280$ нм, обусловленный структурным фрагментом *цикло*-ДОФА. Различные оттенки пигмента связаны в основном с наличием или отсутствием заместителей в структуре агликона – бетацианидина, что проявляется в смещении максимума абсорбции (табл. 1.7) [52]. Бетацианины, являясь гликозидами, испытывают некоторое влияние углеводного фрагмента, входящего в их состав, на свойства хромофоров. Так гликозилирование одной из гидроксильных групп способствует небольшому гипсохромному сдвигу. Ацилирование гидроксикоричными кислотами приводит к третьему максимуму адсорбции в УФ-области в диапазоне от 260 до 330 нм. Отношение максимума абсорбции в видимой части к максимуму в УФ-области может быть использовано для определения числа ацильных

фрагментов в структуре [22]. Степень декарбоксилирования бетацианинов также приводит к некоторым смещениям максимума [52].

Таблица 1.7 - Зависимость максимума светопоглощения от строения бетацианинов [27,60]

	λ , нм
Бетанидин	540
Бетанидин 5- <i>O</i> - β -глюкозид	538
Бетанидин-5- <i>O</i> - β -софорозид	535
2-декарбоксибетанидин 5- <i>O</i> - β -глюкозид	533
17-декарбоксибетанидин 5- <i>O</i> - β -глюкозид	507
2,17-бидекарбоксибетанидин 5- <i>O</i> - β -глюкозид	505
Бетанидин 5- <i>O</i> - β -глюкуронозилглюкозид	536
Бетанидин 5- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -3-гидрокси-3-метилглутарил)- β -глюкуронозилглюкозид	298, 540
Бетанидин 5- <i>O</i> -(2''- <i>O</i> - <i>E</i> -4-кумароил)- β -глюкуронозилглюкозид	306, 546
Бетанидин 5- <i>O</i> -(2''- <i>O</i> - <i>E</i> -ферулоил)- β -глюкуронозилглюкозид	312, 546
Бетанидин 6- <i>O</i> - β -глюкозид	540
Бетанидин 6- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> - <i>E</i> -4-кумароил)- β -глюкозид	310, 552
Бетанидин 6- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> - <i>E</i> -ферулоил)- β -глюкозид	322, 552

Изомеры бетацианинов в видимой части спектра проявляют идентичные хроматические свойства.

Антоцианы обладают своей характерной окраской лишь в кислых средах. При этом ответственной за наличие цвета является флавилиевая форма пигмента (рис. 1.5) [77-78]. Увеличение числа фенольных гидроксильных групп приводит к изменению цвета красителя с розового на синий цвет, а увеличение числа метильных групп приводит к обратному эффекту [3].

Изменение значения pH среды в растворах антоцианов влечет за собой образование новых хромофоров, и, следовательно, смену окраски пигмента. При повышении pH до 4.5 в растворе превалирует бесцветная форма псевдооснования, которая при подщелачивании превращается в хиноидные структуры, окрашенные в сине-серо-зеленые тона [79-85]. Форма псевдооснования находится в равновесии с халконными формами [86-87]. Причем *транс*-халконная форма

быстро превращается в дикетопроизводные, что является одной из причин неустойчивости агликонов.

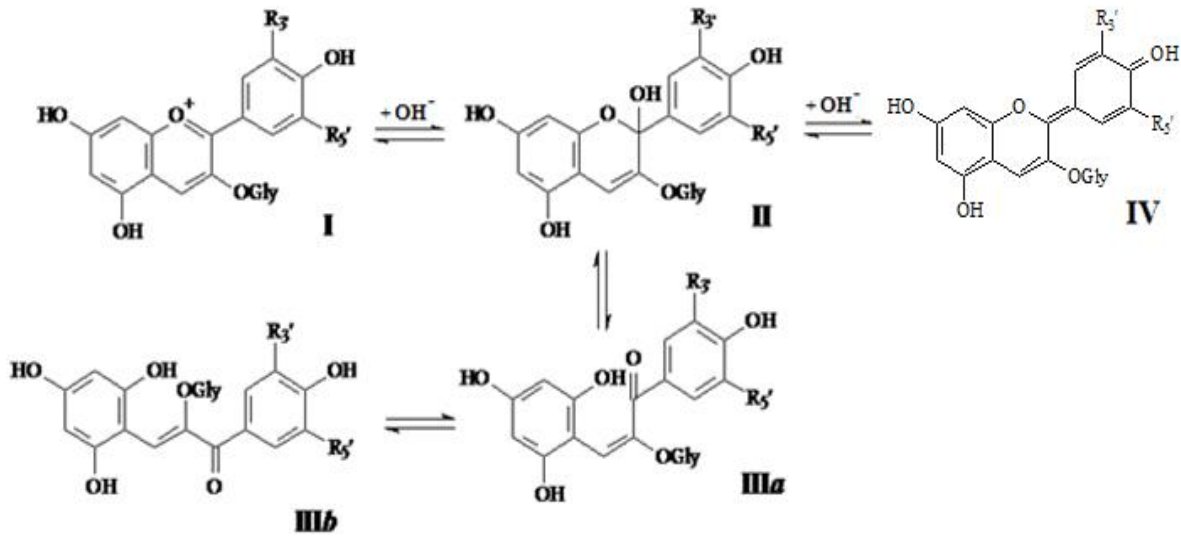


Рисунок 1.5 - Равновесия в растворах антоцианов: **I** – флавилиевый ион; **II** – псевдооснование; **III** – халконные формы (*цис*- (a) и *транс*- (b)); **IV** – хиноидное основание

Антоциановая пигментация во многом зависит от комплексообразования с ионами некоторых металлов, что является основным фактором появления широкого спектра окраски цветов и плодов в природе [88].

1.4.3. Природные источники антоцианов и бетацианинов

Антоцианы и бетацианины не синтезируются в одних и тех же растениях. Распространение бетацианинов в природе ограничено растениями порядка гвоздичноцветные (*Caryophyllales*), кроме семейств гвоздичные (*Caryophyllaceae*) и моллюгиновые (*Molluginaceae*) [89-90]. Также бетацианины синтезируются в растениях семейств *Aizoacea*, *Amaranthaceae*, *Basellaceae*, *Cactaceae*, *Chenopodiaceae*, *Didieraceae*, *Holophytaceae*, *Nyctaginaceae*, *Phytolaccaceae*, и *Portulacaceae* [58]. Присутствуют они и в высших грибах *Amanita*, *Hygrocybe* и *Hygrosporus*.

Особый интерес как богатый источник бетацианинов вызывает свекла [92]. Также возможно выращивание амаранта (*Amaranthus* sp.), пурпурный цвет

листьев которого определяется наличием пигментов этого класса [93-95] и нескольких видов кактуса (*Opuntia, Hylocereus*) [52].

Широкое коммерческое использование для выделения бетацианинов имеют корнеплоды красной столовой свеклы, содержащие в качестве основного бетацианина бетанин [96]. Хотя в некоторых случаях предпочтение отдается фруктовым кактусам. Это связано с тем, что экстракты фруктов кактусов не обладают характерным свекольным запахом и вкусом [97]. Слабый аромат, присутствующий у красителя из плодов кактусов делает их более перспективными. К тому же, пигменты, выделенные из кактусов, охватывают более широкий спектр цветов (от желто-оранжевого до красно-фиолетового) в отличие от пигментов красной столовой свеклы [98].

Фруктовые кактусы содержат значительно меньше желтого пигмента и бесцветных фенольных соединений, способных вступать в обширные взаимодействия с бетацианинами, приводя к деградации последних [89]. К тому же кактусы могут стать альтернативой при выращивании их в засушливых районах, где свекла в должном качестве произрастать не будет.

К числу известных источников антоцианов относятся ягоды черники [99], черной смородины [100], паслена [101], бузины [102], черноплодной рябины [103], винограда [104-105], цветки чая каркаде [106] многие другие [107-108]. Качественный состав антоцианов, как правило, специфичен для конкретного вида растений и довольно стабилен. Однако он зависит от сортовых особенностей и условий произрастания растений, которыми определяется активность соответствующих ферментов, способствующих синтезу определенных компонентов антоцианового комплекса [109-110]. Так в работах [111-112] на основании схемы биосинтеза предложены критерии предсказания антоцианового состава винограда.

1.4.4. Факторы, влияющие на стабильность антоцианов и бетацианинов

Несмотря на значительные преимущества натуральных пигментов в благоприятном воздействии на организм человека, они уступают синтетическим

красителям по устойчивости, что делает их неконкурентоспособными на рынке пищевых красителей [52]. Поэтому для улучшения эксплуатационных свойств природных антоцианов и бетацианинов необходимо исследование факторов, влияющих на срок хранения, и поиск условий для их стабилизации.

Устойчивость антоцианов зависит от температуры [113]. Известно, что антоцианы остаются стабильными при нагревании до 80°C. При дальнейшем повышении температуры происходит деструкция антоцианов. При понижении температуры потеря окраски замедляется. Присутствие ферментов [114] и кислорода [115] также пагубно сказываются на устойчивости антоцианов. Стабилизирующее воздействие на антоциановые пигменты оказывает высокая концентрация сахаров, дубильные вещества [116-117].

Среди бетацианинов в литературе как более устойчивые позиционируются гликозилированные структуры в отличие от агликонов. При дальнейшем гликозилировании стабильность не усиливается, что доказывается в литературе одинаковой устойчивостью бетанина и амарантина [118]. Известно повышение стабильности бетацианинов при ацилировании их алифатическими кислотами (хилоцеренин, филокактин). Это может быть связано со стерической защитой альдиминовых связей углеводородными радикалами. Стабильность бетацианинов может быть повышена также за счет замещения ароматическими кислотами из-за внутримолекулярной укладки; U-образно свернутая молекула также может защитить альдиминовую связь от гидролитической атаки. Также в ряде зарубежных работ показано, что 6-*O*-замещение является более эффективным для стабилизации молекулы пигмента, чем 5-*O*-замещение [118].

Огромное влияние на устойчивость бетацианинов оказывает наличие соответствующих ферментов. Известно, что красная столовая свекла содержит в своем составе такие ферменты, как β -глюкозидаза, пероксидаза, полифенолоксидаза. Если их не дезактивировать, это приводит к отщеплению сахарного фрагмента и батохромному сдвигу максимума абсорбции около 4 нм [118]. Максимальная активность этих ферментов наблюдается при pH 3.4.

Ряд авторов определяет максимальную стабильность красителя в достаточно широком диапазоне рН от 3 до 7, что позволяет применять эти пигменты для продуктов питания с пониженной кислотностью. За пределами этих значений рН интенсивность окраски снижается.

При низких значениях рН возможна изомеризация у C_{15} -атома и дегидрирование, чем в литературе объясняется смещение максимума адсорбции бетацианинов при хранении в кислых средах [5]. Интересно, что различные структуры пигмента проявляют различные тенденции к изомеризации.

Температура является одним из основных факторов, влияющих на стабильность бетацианинов при технологической обработке продукта [98]. С увеличением температуры растет и скорость разрушения молекул [61]. При термических нагрузках бетацианины могут быть подвержены изомеризации и декарбоксилированию, что ведет к потере исходной окраски и появлению коричневого оттенка. А в случае дегидрирования образуются желтые продукты [107], что трудно объяснить, так как система сопряжения усиливается.

Декарбоксилирование теоретически может происходить у C_2 , C_{15} и C_{17} атомов бетацианинов. Так C_{17} -декарбоксилирование бетанина приводит к гипсохромному сдвигу от 537 нм к 505 нм и оранжевой окраске [119].

Молекулы бетацианинов активно взаимодействуют с кислородом. Для подавления окисления пигментов, их необходимо хранить в анаэробных условиях (например, в атмосфере азота) или в присутствии антиоксидантов [52]. Воздействие света также отрицательно сказывается на стабильности бетацианинов.

Ускорять процесс деградации пигментов способны и некоторые катионы металлов, например, Fe^{2+} , Fe^{3+} , Sn^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} . Комплексообразование может привести как гипсохромному, так и батохромному сдвигу. Причем соки растительных объектов более устойчивы по отношению к разрушающему действию металлов по сравнению с очищенными пигментами. Это связано с тем, что соки содержат соединения, связывающие металлы в более прочные

комплексы [52]. Тогда для связывания ионов металлов могут быть использованы такие хелатирующие агенты, как лимонная кислота или ЭДТА.

Растворители также оказывают существенное влияние на стабильность красителя. Так в литературе описано влияние этанола на разрушение бетацианинов в связи с ускорением протекания процессов моно- и бидекарбоксилирования [52].

Активность воды также значительно сказывается на стабильности бетацианинов [97]. Из литературных источников известно, что наибольшая степень деградации бетацианинов наблюдается в продуктах с высоким содержанием влаги. Это может быть связано с повышенной мобильностью реагентов и высоким уровнем содержания растворенного кислорода. Поэтому одним из возможных способов хранения бетацианиновых красителей можно считать хранение в сухом виде, получаемом при лиофильном высушивании очищенных экстрактов и сырья, содержащего бетацианины [120-121].

1.4.5. Методы качественного и количественного определения антоцианов и бетацианинов

Экстракция. При выделении антоциановых и бетацианиновых красителей следует по возможности учитывать приведённые выше факторы, влияющие на стабильность рассматриваемых соединений и их окраски. Извлечение антоцианов и бетацианинов из растительного сырья обычно осуществляется методом статической экстракции. В качестве кислот - экстрагентов могут быть выбраны молочная, лимонная, соляная, винная и др. [108]. В работах [122-125] использованы водные или подкисленные водные растворы метанола или этанола (20-50%). В работе [126] рассматривается также возможность сверхкритической экстракции не только антоцианов, но и других полифенольных соединений.

Но стоит отметить, что использование дорогостоящих и дефицитных пищевых кислот и растворителей делает экстракцию малодоступной для широкого производственного применения. Кроме того, экстракты,

приготовленные на основе водных растворов органических кислот, не стойкие к действию микроорганизмов, хранить их можно не более 15 дней.

В связи с низким уровнем устойчивости бетацианинов экстракцию рекомендуют проводить при низких температурах и в темноте. В работе [127] предлагают инактивировать энзимы нагреванием (70°C , 2 мин), хотя это может разрушить и сам краситель.

Существует мнение, что незначительное подкисление экстрагента увеличивает стабильность бетацианинов, препятствуя окислению полифенолоксидазой, в то время как стабильность самих бетацианинов наблюдается в нейтральных средах [52].

Бетацианины, являясь водорастворимыми пигментами, могут быть легко экстрагированы дистиллированной водой [128], что для антоцианов недопустимо. Для экстракции антоцианов предпочтительнее использование подкисленных растворов из-за необходимости перевода всех форм антоцианов в окрашенную флавилиевую (рис. 1.5). Наиболее простым и удобным является способ, предложенный в работе [75] с использованием 0.1М раствора соляной кислоты.

Спектрофотометрический анализ. С использованием спектрофотометрического анализа возможна качественная идентификация компонентов. В работе [130] приводятся длины волн максимумов абсорбции некоторых антоцианов в кислых водных и метанольных растворах (табл. 1.8). Аналогичные данные по бетацианинам представлены в таблице 1.7.

Спектрофотометрический анализ позволяет осуществлять также и количественное определение суммы антоцианов и бетацианинов, выделяемых из растительных объектов [131-132]. Пересчет принято вести на основной компонент в сложнокомпонентной смеси красителей. Коэффициенты молярного погашения для антоцианов и бетацианинов определить не так просто по причине сложности получения чистых стандартных веществ. Поэтому экспериментальные данные существенно различаются у различных авторов [133-134]. Для получения возможности сопоставления результатов определения антоцианов и бетацианинов

в качестве величин коэффициентов молярного погашения принято значение $\varepsilon = 26900 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ и $60000 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, соответственно [135-148].

Таблица 1.8 - Спектральные максимумы антоцианов в видимой области [149]

Название соединений	λ_{max} , нм
пеларгонидин	504*
пеларгонидин-3- глюкозид	496°
цианидин	510°
цианидин-3-глюкозид	510°
дельфинидин	522°
дельфинидин-3-глюкозид	520°
петунидин	536*
петунидин-3-глюкозид	522°
мальвидин	520*
мальвидин-3-глюкозид	546*
пеонидин	511*
пеонидин-3-глюкозид	512°

* - 0,1% раствор HCl в метаноле; ° - растворитель 0,1M раствор соляной кислоты

Хроматографический анализ. Хроматографический метод анализа давно и эффективно используется в разделении и идентификации многокомпонентных смесей антоцианов и бетацианинов [150-151]. В случае обращено-фазовой ВЭЖХ в качестве подвижных фаз использую смеси воды и метанола [152] или ацетонитрила [153], подкисленные такими кислотами, как уксусная [154], муравьиная [155], фосфорная [156] и др. Причем добавки кислот бывают достаточно высокими - до 10 об. %. Однако роль добавок каждой конкретной кислоты в элюентах до конца не выяснена.

Альтернативой ОФ ВЭЖХ является гидрофильная хроматография. При довольно широком применении метода хроматографии гидрофильных взаимодействий (ХГФВ) известно лишь несколько публикаций о его использовании для определения антоцианов, а публикаций по определению бетацианинов нами не было обнаружено вовсе. Например, в работе [157] исследована эффективность 7 типов стационарных фаз в элюентах различного состава, но представлены результаты разделения некоторых антоцианов в одном оптимизированном градиентном режиме. К сожалению, из представленных

данных, во-первых, невозможно определить особенности хроматографического поведения антоцианов различного типа. И, во-вторых, приведенные авторами цитируемой работы хроматограммы по качеству значительно уступают хроматограммам антоцианов, получаемым в традиционном обращенно-фазовом режиме.

Из хроматографических методов разделения бетацианинов возможно использование ВЭЖХ в варианте ионообменной хроматографии с ионпарными добавками [158-160].

Разделение и определение индивидуальных компонентов бетацианинов сегодня зачастую ведется методом высокоэффективной жидкостной хроматографии совместно с масс-спектрометрией [161-162].

1.5. Твердофазная очистка антоцианов и бетацианинов

Эффективным вариантом очистки экстрактов природных материалов, содержащих антоцианы или бетацианины, является прием, получивший название метода твердофазной экстракции [161]. Но по закономерностям сорбции антоцианов и бетацианинов, необходимым для разработки технологии очистки этих двух классов натуральных красителей, нами обнаружено лишь незначительное количество публикаций.

И антоцианы, и бетацианины могут находиться в различных зарядовых формах в зависимости от pH. При этом наиболее эффективными сорбентами для антоцианов являются ОФ сорбенты, несмотря на то, что антоцианы сорбируют из растворов, в которых они присутствуют в растворах в окрашенной катионной форме (флавилиевый ион, Гл. 1, рис. 1.5). При этом данных по сорбции антоцианов при других pH нами обнаружено не было.

В сильно кислых растворах и антоцианы и бетацианины находятся в катионной форме, при этом их сорбция может быть обусловлена ионообменными процессами. Однако, традиционные катионообменные смолы оказываются малоэффективными, вследствие чрезвычайно медленных внутренних массообменных процессов [162]. Альтернативой этому методу является

твердофазная экстракция природными глинами. При чем в работе [163] исследованы закономерности сорбции антоцианов из экстрактов растительных материалов на нескольких коммерческих марках глин; установлена взаимосвязь между сорбируемостью и строением сорбатов.

Сведений о применении глин в технологических стадиях с участием бетацианинов в научной литературе нами обнаружено не было.

На сегодняшний день наиболее эффективным, но и наиболее дорогостоящими, являются хроматографические методы разделения и очистки (табл. 1.9).

Таблица 1.9 – Некоторые способы очистки экстрактов антоцианов и бетацианинов

Объект	Условия
Гель-хроматография	
Корнеплоды <i>Beta vulgaris sp.</i>	СФ - Sephadex G-25 (6 г) и Sephadex LH-20 (5 г); ПФ – деионизированная вода; скорость потока 2.2 мл/мин и 0.25 мл/мин, соответственно; проба - сок [164].
	Колонка - Sephadex G-25 (40×2.2 см), ПФ - 1% водный раствор уксусной кислоты; проба – сок, подкисленный до pH 3.0 [90].
	Колонка - Sephadex LH-20 (2.5×75 см); ПФ - 50-95% метанол; проба – лиофилизированная форма, растворенная в водном растворе метанола [54].
Листья <i>Amaranthus L.</i>	Колонка - Sephadex G-25и G-50 (50×3 см); ПФ – дист. вода; проба – солянокислый экстракт с pH 2.8 [165].
Сок <i>Hylocereus polyrhizus</i>	Колонка - Sephadex LH-20 650×30 мм; пробу предварительно отделяют от пектинов добавлением 25% NH ₄ OH с доведением pH до 5 ÷ 6, промывают деионизированной водой. [166].
Экстракт <i>Vitis L.</i>	Колонка - Sephadex G-25 (1.5×60 см); пробу растворяют в 50% водном растворе ацетона, содержащего до 0.15% HCl _{конц} [167]
Ионообменная хроматография	
Корнеплоды <i>Beta vulgaris sp.</i>	СФ - Q-Sepharose; ПФ - 0.1 ÷ 0.5 М хлорид натрия; скорость потока 0.1 мл/мин [165].
Сок корнеплодов <i>Beta vulgaris sp.</i>	СФ – катионообменная смола Dowex 50W×4 фракция 100-200 [62].
Экстракт <i>Vaccinium uliginosum</i>	СФ – АВ-8; ПФ – 60% этанола [168]

Препаративная ВЭЖХ	
Корнеплоды <i>Beta vulgaris sp.</i>	Колонка Zorbax SB-C18 (5 мкм, (250×9.4 мм) с предколонкой SB-C8 (5 мкм, 15×9.4 мм); ПФ - В - 80% метанол, А - 1% муравьиная кислота; 4 мл/мин, ДМД, $\lambda = 540$ нм [165].
Лиофилизированный сок <i>Beta vulgaris sp.</i>	Колонка - Discovery C18 (250×21.2 мм, 5 мкм); ПФ - 5% ацетонитрила, 0.5% муравьиной кислоты в воде, скорость потока 7мл/мин [54].
	Колонка - Luna C18 (250×10 мм); градиентный режим, ПФ – А - ацетонитрил, В – 2 % муравьиная кислота; скорость потока 0.5 мл/мин; ДМД, $\lambda = 538$ нм; В (для декарбоксилированных производных) – формиатный буфер с рН 5.0 с ион-парной добавкой - 1.5 мМ тетрабутиламмония бромид; скорость потока 3 мл/мин [169].
Экстракт <i>Vitis L.</i>	Колонка: Shimpack PRC-ODS (250×20 мм, 5 мкм); ПФ: А – 2% муравьиная кислота и Б – ацетонитрил : вода : муравьиная кислота (49 : 49 : 2); градиентный режим. Поток 10 мл/мин. СФД 516 нм [170].

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Объекты исследования

Источники антоцианов: чай каркадэ (бутоны *Hibiscus Sabdariffa* L.), чай Анчан (цветки *Clitoria ternatea* L.), цветки гибискуса китайского (*Hibiscus rosa-sinensis* L.), цветки гибискуса сирийского (*Hibiscus syriacus* L.); цветки гибискуса болотного (*Hibiscus moscheutos* L.), цветки штокрозы, (*Alcea* L.), плоды винограда (*Vitis* L.), ягоды земляники (*Fragaria* L.), аронии (*Aronia melanocarpa*), малины красной (*Rubus idaeus* L.), соки «Сады Придонья», «Лента», «Золотая Русь», «Rich», «Я».

Источники бетацианинов: корнеплоды красной столовой свеклы (*Beta Vulgaris* L.), лепестки бугенвиллеи (*Bougainvillea*), плоды шпината земляничного (*Chenopodium foliosum*), листья амаранта (*Amaranthus* L.).

2.2. Экстракция антоцианов и бетацианинов из растительного сырья

Навеску растительного сырья, величина которой зависит от содержания красителя, заливали объемом 0.1 М раствора соляной кислоты. Ягоды разминали под слоем экстрагента и выдерживали при периодическом перемешивании в течение суток. После этого экстракт отфильтровывали через бумажный фильтр. При необходимости процедуру повторяли до исчерпывающей экстракции.

В случае бетацианинов экстракцию осуществляли 0.1 М ацетатным буферным раствором с рН 5 ÷ 6 (для спектрофотометрического определения (п. 2.5) или 0.1 М раствором соляной кислоты (перед твердофазной очисткой (п. 2.9)). Выдерживание экстракта в течение длительного времени приводит к количественным потерям красителя. Поэтому навески растительного сырья, содержащего бетацианины, исчерпывающе (до обесцвечивания исходного материала) экстрагировали порциями соответствующего 0.1 М раствора при гомогенизации в фарфоровой ступке под слоем экстрагента. Порции экстракта отделяли от сырья фильтрованием через бумажный фильтр.

2.3. Приготовление экстрактов с заданным рН

При исследовании зависимости спектров поглощения экстрактов антоцианов и бетацианинов от рН аликвотные объемы экстрактов переносили в химический стакан, доводили значение рН до необходимого значения добавлением 0.1-1.0 М растворов гидроксида натрия или соляной кислоты. Раствор доводили до метки в мерной колбе дистиллированной водой и вновь определяли рН полученного раствора.

В работе использовали комбинированный стеклянный электрод ЭСК-10601/7 и иономер рН-150М.

2.4. Запись электронных спектров

В работе использовали спектрофотометры СФ 56 и Shimadzu UV-2550. Спектры записывали в кварцевых кюветах с длиной оптического пути $0.1 \div 1.0$ см относительно водно-спиртовых смесей. Перед спектрофотометрическим определением бетацианинов раствор доводили до рН $5 \div 6$, соответствующему максимальному проявлению окрашенной зарядовой формы бетацианинов.

2.5. Определение концентрации антоцианов спектрофотометрическим методом

2.5.1. Приготовление рабочих растворов

Раствор А: 0.025 М КС1, рН 1.0

Навеску КС1 массой 0.465 г растворяли в 240 мл дистиллированной воды в химическом стакане. Доводили значение рН до 1.0 раствором концентрированной соляной кислоты, добавляя её по каплям. Перенесли полученный раствор в мерную колбу вместимостью 250 мл и довели до метки дистиллированной водой с последующим контролем рН.

Раствор Б: 0.4 М CH_3COONa , рН 4.5

Навеску $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ массой 13.6 г растворяли в 240 мл дистиллированной воды в химическом стакане. Доводили рН до 4,5 раствором концентрированной соляной кислоты, добавляя её по каплям. Переносили

полученный раствор в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводили до метки дистиллированной водой, повторно контролируя pH.

Аликвотные объемы анализируемого экстракта V_a антоцианов (с предварительным подбором разбавления) переносили в мерные колбы V_k и доводили до метки, соответственно, растворами А и Б.

2.5.2 Определение оптической плотности растворов и расчет концентрации антоцианов

Оптическую плотность приготовленных растворов измеряли с использованием спектрофотометра СФ 56 и Shimadzu UV-2550. Спектры записывали в кварцевых кюветах с длиной оптического пути $0.1 \div 1.0$ см относительно водно-спиртовых смесей.

Концентрацию антоцианов (моль/л) рассчитывали по формуле [78]

$$c = n \cdot \left\{ \left[A_{\max}(pH=1) - A_{700}(pH=1) \right] - \left[A_{\max}(pH=4.5) - A_{700}(pH=4.5) \right] \right\} / (\varepsilon_{st} \cdot l), \quad (2.1)$$

где $A_{\max}(pH=1)$, $A_{\max}(pH=4.5)$, $A_{700}(pH=1)$ и $A_{700}(pH=4.5)$ – оптическая плотность растворов в максимуме абсорбции для образцов с pH=1 и pH=4.5, соответственно; n – степень разбавления исходного раствора; ε_{st} – коэффициент экстинкции, $26900 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ в случае пересчета на цианидин-3-глюкозида хлорид [80]; l – длина оптического пути, см.

Содержание антоцианов в растительном сырье выражали в г/100 г исходного материала:

$$m = c \cdot \frac{100}{m} \cdot M, \quad (2.2)$$

где $M = 484,8 \text{ г/моль}$ – молярная масса хлорида цианидин-3-глюкозида;

m – масса навески источника антоцианов, г.

2.5.3 Определение оптической плотности растворов и расчет концентрации антоцианов по скорректированной методике

Первый аликвотный объем экстракта антоцианов (в зависимости от необходимого для спектрофотометрирования разбавления) доводили до метки в мерной колбе 0.1 М раствором соляной кислоты для получения pH раствора 1.0.

При необходимости к раствору по каплям добавляли при перемешивании концентрированную соляную кислоту.

Вторую порцию экстракта растворяли в дистиллированной воде и доводили рН до ~ 4.5 0.1 М раствором щелочи. Растворы переносили в мерные колбы и доводили до метки кислотой и дистиллированной водой, соответственно, с повторным контролем рН.

Отклонение от рН 4.5 определяли для каждого конкретного образца для наблюдения условия минимума светопоглощения.

В случае присутствия в исходном экстракте органического растворителя его удаляли с использованием вакуумного ротационного растворителя.

Оптическую плотность растворов измеряли после выдерживания в течение суток.

Концентрацию рассчитывали по формуле, приведенной в п. 2.4.2.

2.6. Определение концентрации и степени распада бетацианинов спектрофотометрическим методом

Оптическую плотность приготовленных растворов бетацианинов измеряли с использованием спектрофотометров СФ 56 и Shimadzu UV-2550. Спектры записывали в кварцевых кюветах с длиной оптического пути $0.1 \div 1.0$ см относительно водно-спиртовых смесей.

Количественные потери бетацианинов в связи с быстрым процессом деконденсации и образованием беталамовой кислоты учитывали по изобестической точке на электронных спектрах поглощения:

$$\alpha = \frac{A(538 \text{ нм}) \cdot 12000}{60000 \cdot A(446 \text{ нм})} \cdot 100, \quad (2.3)$$

где α – степень разрушения бетацианинов, %; $A(538 \text{ нм})$ и $A(446 \text{ нм})$ – оптические плотности раствора бетацианинов в максимуме абсорбции бетацианинов и в изобестической точке, соответственно; 12000 и 60000 – коэффициенты экстинкции для бетацианинов при длинах волн 446 и 538 нм, соответственно.

2.7. Определение бетацианинов в различных частях корнеплода красной столовой свеклы

Из корнеплода свеклы вырезали вертикальную пластинку вдоль центральной оси толщиной ~ 1 см. Из полученной пластинки вырезали пробы

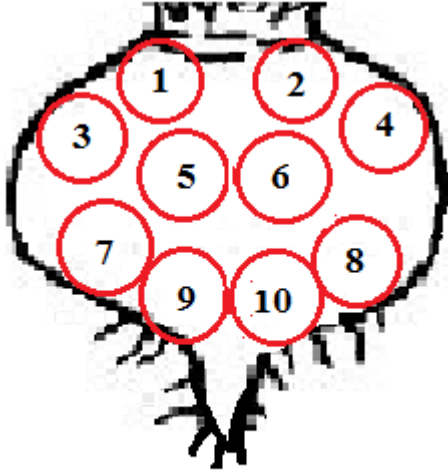


Рисунок 2.1 - Схема пробоотбора частей корнеплода красной свеклы

согласно схеме на рисунке 2.1. Пробы взвешивали, заливали одинаковым объемом экстрагента и помещали в УЗ баню на 20 мин. По окончании заданного времени экстракции растворы отфильтровывали и измеряли концентрацию бетацианинов спектрофотометрическим методом с предварительным подбором разбавления согласно п. 2.5.

2.8. Теоретический расчет зарядовых форм бетацианинов

Теоретический расчет зарядов всех возможных форм бетацианинов осуществляли в тестовом режиме на сайте ChemAxon [171]. Для этого запускали программу ChemSkech. После построения графической формулы интересующего бетацианина на панели инструментов выбирали функцию Tools. Через контекстное меню «Protonation → pKa» переходили в диалоговое окно, в котором открывались все возможные зарядовые состояния для заданной молекулы.

2.9. Определение заряда бетацианинов методом горизонтального электрофореза

Навеску агар-агара массой 1.25 г помещали в кипящий буферный раствор объемом 50 мл, перемешивая до однородной массы, охлаждали до 50°C и заливали в форму. После застывания геля, форму помещали на площадку для электрофореза. Отверстия от гребешка заполняли анализируемым образцом. После чего заполняли площадку соответствующим буферным раствором, выступающим в качестве электролита, проводящего электрический ток, и

создающего определенное значение pH. Направление и расстояние, пройденное образцом после подачи напряжения за 40 мин, определяли с помощью линейки.

2.10. Пробоподготовка перед хроматографическим определением антоцианов и бетацианинов

Перед хроматографическим определением антоцианов и бетацианинов образцы подвергали твердофазной очистке. Для этого концентрирующий патрон ДИАПАК C18 (БиоХимМак СТ, Москва) активировали, пропуская 5 ÷ 7 мл ацетона и кондиционировали, пропуская 10 ÷ 15 мл 0.01М раствора соляной кислоты. Через подготовленный патрон пропускали экстракт до проскока окрашенных фракций. Затем в случае антоцианов патрон промывали 2 мл 0.01М раствора HCl, а в случае бетацианинов - до прекращения элюирования интенсивно желтого раствора.

Антоцианы и бетацианины для определения методом гидрофильной хроматографии экстрагировали с сорбента безводными смесями ацетонитрила и фосфорной кислоты. В случае ОФ ВЭЖХ для экстракции антоцианов использовали раствор, содержащий по 30 об. % ацетонитрила и муравьиной кислоты в воде, а для бетацианинов – 28-30 об. % ацетонитрила и 8 об. % муравьиной кислоты. Затем образцы разбавляли дистиллированной водой до состава подвижной фазы.

2.11. Определения антоцианов хроматографическим методом

Закономерности хроматографического поведения антоцианов исследовали на хроматографической системе Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами.

В работе использовали хроматографические колонки:

- 250×4.0 мм Symmetry C18, 5 мкм;
- 250×4.0 мм Reprosil-Pur C18-AQ, 5 мкм;
- 250×4.0 мм Reprosil-Pur C8, 5 мкм;
- 250×4.0 мм Reprosil-Pur C4, 5 мкм;
- 250×4.6 мм Kromasil 60-5DIOL.

Температура термостата колонок 40°C. Подвижные фазы готовили смешиванием заданных объемов ацетонитрила и муравьиной (или ортофосфорной) кислоты в мерных колбах с доведением объема до метки дистиллированной водой.

Скорость подачи подвижной фазы 1 мл/мин.

Электронные спектры регистрировали непосредственно в кювете диодно-матричного детектора. Хроматографическое определение антоцианов осуществляли из образцов, предварительно очищенных методом твердофазной экстракции (п. 2.16).

2.12 Запись масс-спектров

Запись масс-спектров антоцианов и бетацианинов осуществляли на той же хроматографической системе Agilent 1260 Infinity с масс-спектрометрическим детектором.

В работе использовали хроматографическую колонку 150×2.1 мм Kromasil 100-5C18. Подвижная фаза 8 об. % ацетонитрила, 10 об. % муравьиной кислоты в дистиллированной воде. Скорость подачи элюента 150 мкл/мин. Температура термостата колонки 40°C.

Таблица 2.1 - Спектральные характеристики веществ, использованных в работе веществ

	λ_{\max} , нм	m/z
Антоцианы		
Cy-3-Gala	516	449.0; 287.0
Cy-3-Glu	516	449.0; 287.0
Cy-3-Ara	516	419.2; 287.0
Cy-3-Sopho	516	611.2; 287.0
Cy-3-Sam	517	581.2; 287.0
Cy-3-Rut	517	595.2; 287.0
Cy-3-AGlu	516	581.2; 287.0
Cy-3-GRut	519	557.2; 287.0
Cy-3-XRut	519	727.2; 287
Бетацианины		
Бетанин	538	551
Амарантин	538	727

Масс-спектры записывали в режиме электроспрея при напряжении на фрагменторе $100 \div 200$ В (табл. 2.1, рис. 2.2, 2.4). Электронные спектры поглощения записывали в ячейке диодно-матричного детектора (рис. 2.3).

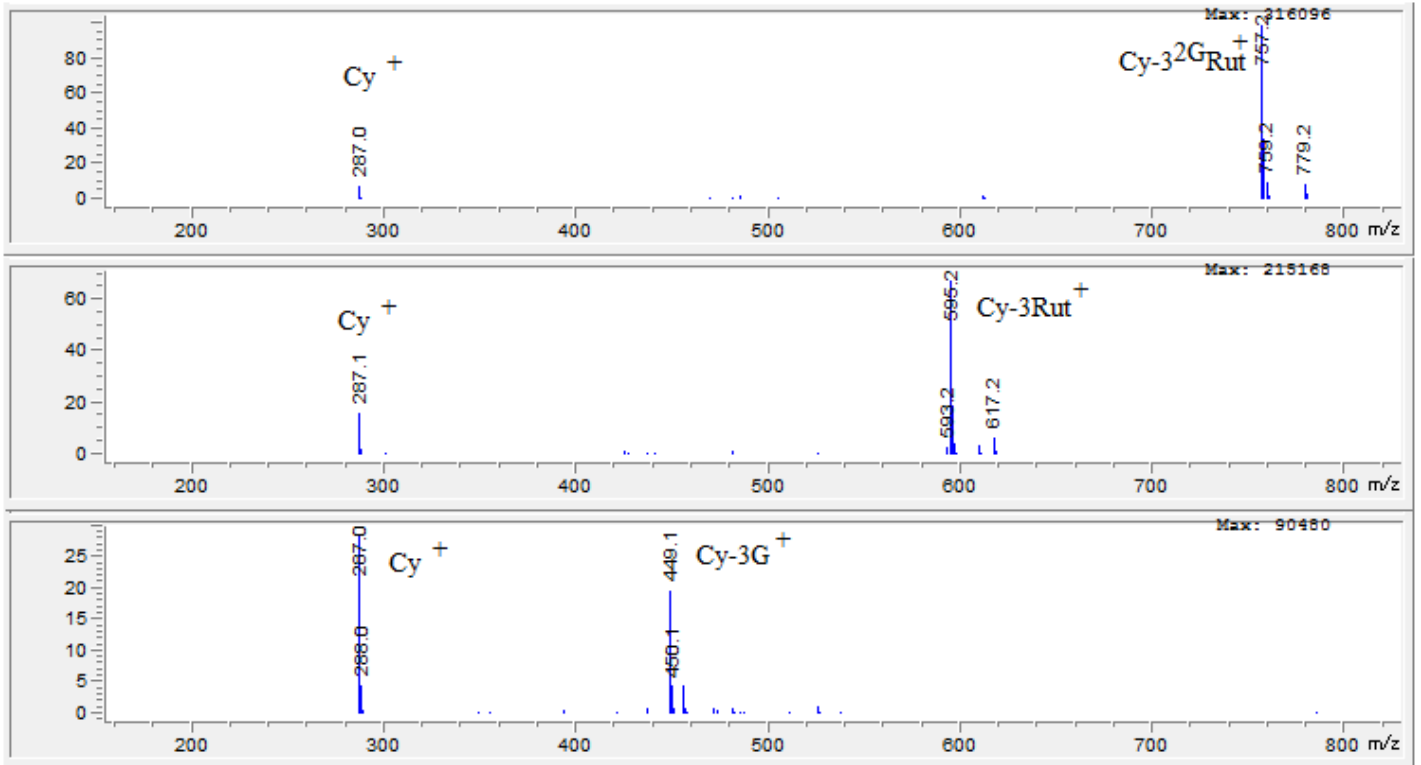


Рисунок 2.2 - Масс-спектры некоторых производных цианидина

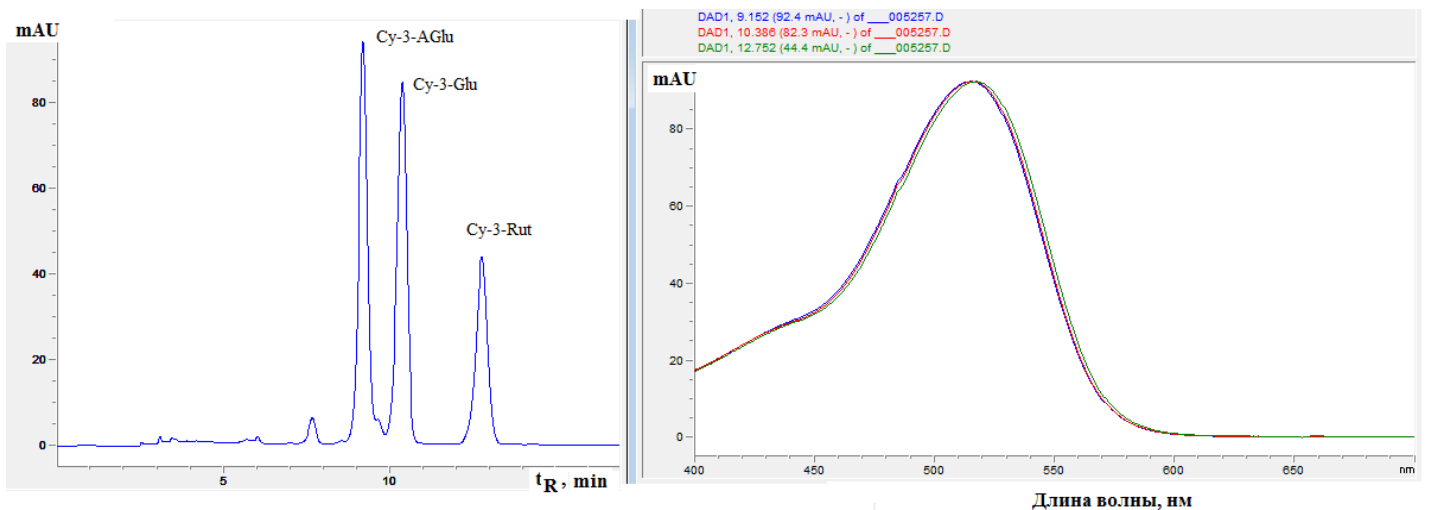


Рисунок 2.3 - Разделение антоцианов калины обыкновенной и электронные спектры веществ

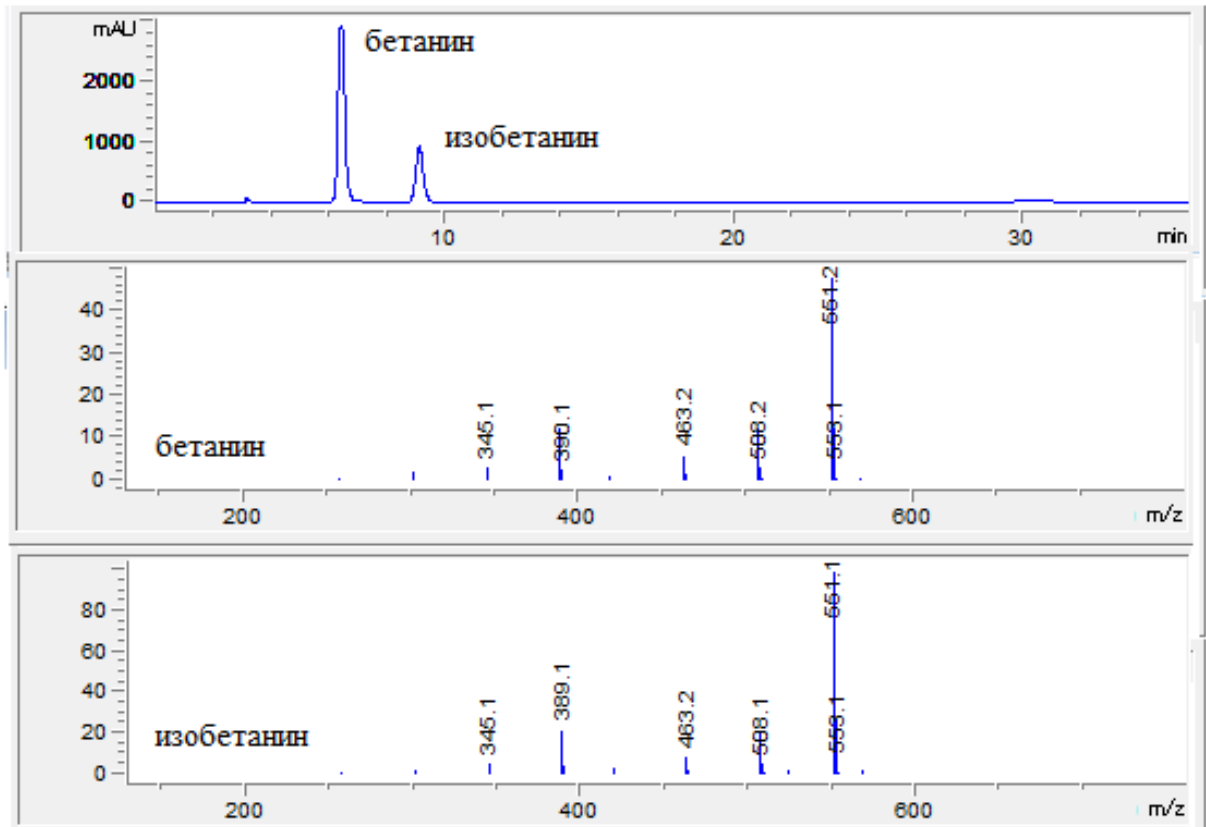


Рисунок 2.4 - Масс-спектры бетанина и изобетанина

2.13. Полупрепаративное выделение индивидуальных антоцианов

Выделение индивидуальных антоцианов осуществляли на препаративном хроматографе SHIMADZU LC-20.

Подвижная фаза 8 об. % ацетонитрила, 10 об. % муравьиной кислоты в дистиллированной воде.

В работе использовали хроматографическую колонку SUPELCOSIL LC-18 250×10 мм, 5 мкм. Скорость подачи подвижной фазы 5 мл/мин.

Все выделенные образцы были проверены на чистоту по п. 2.11 со спектрофотометрическим и масс-спектрофотометрическим контролем их строения.

2.14. Определения бетацианинов хроматографическим методом

Закономерности хроматографического поведения бетацианинов исследовали на той же хроматографической системе Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами.

В работе использовали хроматографические колонки:

- 250×4.0 мм Reprosil-Pur C18-AQ, 5 мкм;
- 250×4.0 мм Reprosil-Pur C8, 5 мкм;
- 250×4.0 мм Reprosil-Pur C4, 5 мкм;
- 250×4.6 мм Kromasil 60-5DIOL, 5 мкм.

Температура термостата колонок 30°C. Подвижные фазы готовили смешиванием заданных объемов ацетонитрила и муравьиной (или ортофосфорной) кислоты в мерных колбах с доведением объема до метки дистиллированной водой.

Буферные растворы с различным рН готовили на основе уксусной кислоты с добавлением раствора NaOH, разбавляя раствор до получения 0.01М ацетатного буфера. Скорость подачи подвижной фазы 1 мл/мин.

Линейность отклика детектора при исследовании в условиях ОФ ВЭЖХ нестабильных бетацианинов осуществляли на примере красителей корнеплодов *Beta Vulgaris* L. – бетанина и изобетанина. Растворы бетацианинов в элюенте состава 7 об. % ацетонитрила, 2 об. % муравьиной кислоты в 0.01М формиатном буфере вводили в хроматографическую систему при подвижной фазе состава 7 об. % ацетонитрила, 2 об. % муравьиной кислоты в воде. Разделение проводили на колонке 250×4.0 мм Reprosil-Pur C18-AQ с диаметром частиц 5 мкм. Детектирование осуществляли при 538 нм. Объем вводимой пробы 20 мкл. Результаты представлены в таблице 2.2 и на рисунке 2.5.

Таблица 2.2 Метрологическая оценка результатов ОФ ВЭЖХ

	Содержание бетацианина, n, мкмоль	Площадь пика, S, мВ·с	S/n
Бетанин	0.01101	14774.74	1343071
	0.00550	7486.67	1361130
	0.00275	3698.67	1344889
X _{ср.}			1349696
S _r			9943
Изобетанин	0.00158	2050.01	1297468
	0.00081	1041.33	1293582
	0.00040	512.67	1284879
X _{ср.}			1291976
S _r			6446

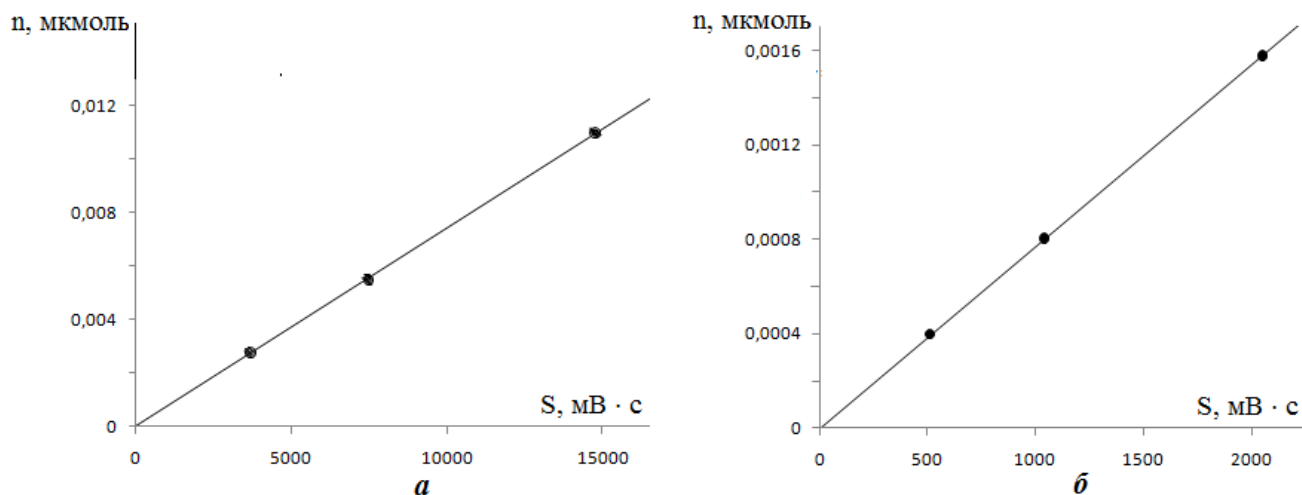


Рисунок 2.5 Зависимость отклика детектора от концентрации бетанина (а) и изобетанина (б)

2.15. Полу препаративное выделение индивидуальных бетацианинов

Выделение индивидуальных бетацианинов осуществляли на препаративном хроматографе SHIMADZU LC-20.

Подвижная фаза 8 об. % ацетонитрила, 2 об. % муравьиной кислоты в дистиллированной воде.

В работе использовали хроматографическую колонку SUPELCOSIL LC-18 250×10 мм, 5 мкм. Скорость подачи подвижной фазы 5 мл/мин.

Все выделенные образцы были проверены на чистоту по п. 2.11 со спектрофотометрическим и масс-спектрофотометрическим контролем их строения.

2.16. Расчет хроматографической эффективности

Эффективность (число теоретических тарелок) хроматографических систем определяли по уравнению:

$$N = 5.54 \cdot (t_R / \Delta_{1/2})^2, \quad (2.4)$$

где t_R – время удерживания компонента; $\Delta_{1/2}$ – полуширина пика, рассчитываемая программой ChemStation, которая была использована для управления хроматографом, записи, хранения и обработки хроматограмм.

Для расчета факторов удерживания мертвое время определяли по удерживанию CCl_4 (ХГФВ) или урацила (ОФ ВЭЖХ).

2.17. Сорбция антоцианов и бетацианинов

2.17.1. Сорбция антоцианов и бетацианинов на обращенно-фазовых сорбентах

Динамическую сорбцию антоцианов и бетацианинов из солянокислых (0.1 М) водных экстрактов, экстрактов с добавками этанола или экстрактов с различным значением рН исследовали динамическим методом, пропуская растворы выбранной концентрации по антоцианам или бетацианинам через концентрирующие патроны марки ДИАПАК (БиоХимМак СТ, Москва), заполненные различными сорбентами, со скоростью 0.5 мл/мин с использованием перистальтического насоса LS 301 – до выравнивания концентраций исходного раствора и элюата. Остаточное содержание антоцианов и бетацианинов в порциях элюата определяли спектрофотометрическим методом в максимуме светопоглощения.

2.17.2 Сорбция антоцианов и бетацианинов на глинах

Для сорбции антоцианов и бетацианинов из солянокислых растворов глину предварительно подвергали кислотной обработке, высушивали и размалывали в фарфоровой ступке. Навески глины помещали в центрифужные пробирки и добавляли к ним порции приготовленного экстракта (в соляной кислоте или в соответствующем буферном растворе), смесь перемешивали в течение 1 – 2 ч, и затем центрифугировали. Концентрацию несорбированных антоцианов (и бетацианинов) определяли спектрофотометрическим методом.

Для определения сорбционной емкости глины раствор над осадком после первого центрифугирования удаляли, а к остатку добавляли новую порцию экстракта той же концентрации, что и в первом случае, повторяя процедуру до прекращения сорбции дополнительного количества антоцианов (и бетацианинов) из последующей порции экстракта.

2.18. Приготовление сухих композиций, подкрашенных бетацианинами

Сухие формы бетацианинов готовили из концентрированных очищенных (п. 2.16) экстрактов.

Для приготовления композиций к порциям водных концентратов бетацианинов известной концентрации добавляли матрицу в определенных массовых соотношениях. В качестве матрицы опробованы коммерческие формы полисахаридов: агар-агар (Биотехновация, г. Москва, РФ) и каррагинан (Aromarti, г. Москва, РФ). Полученные образцы после предварительной заморозки в течение суток в морозильной камере бытового холодильника подвергли лиофильному высушиванию в сушилке Free Zone объемом 2,5 л: вакуум - 0,024 мBar, температура -47°C.

Следует отметить, что для полного удаления растворителя из образцов однократного высушивания недостаточно. Для последующей лиофилизации композиции подвергали вторичному замораживанию. Этап замораживания образцов является обязательным требованием перед лиофилизацией объекта.

Лиофилизации подвергали и мякоть корнеплодов красной столовой свеклы, полученную с использованием блендера.

2.19. Контроль сохранности бетацианинов в сухих композициях

Для контроля стабильности бетацианинов в приготовленных сухих композициях образцы оставили на хранение в камере бытового холодильника при температуре 4°C. Через определенные промежутки времени экстракцию красителя проводили согласно п. 2.1. Изменение содержания красителя в образцах определяли спектрофотометрическим методом согласно п. 2.1, 2.5). Процедуру проводили в несколько параллелей для всех образцов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Сопоставление электронных спектров растворов антоцианов и бетацианинов

Одна из важнейших характеристик красителей – их окраска. Наличие окраски антоцианов и бетацианинов связано с наличием в их структурах большой системы сопряженных sp^2 -гибридных атомов углерода (Гл.1.4.1), включая гетероатомы.

Окраска антоцианов в водных растворах не очень сильно зависит от строения молекул, тогда как обеспеченная ими окраска различных частей растений намного более разнообразна благодаря различным эффектам: внутримолекулярной и межмолекулярной копигментации (специфической взаимной ориентации частей молекул или ионов), супрамолекулярному стэкингу и комплексообразованию с катионами металлов и сольватацией органическими растворителями [158]. Окраска растений бетацианинами существенно менее разнообразна и определяется в основном присутствием или отсутствием бетаксантинов и их концентрацией [161,172].

Отметим, что по имеющимся к настоящему времени данным в природных объектах бетацианины и антоцианы не синтезируются одновременно [26]. Но, несмотря на принципиальные различия в строении, антоцианы и бетацианины в кислых растворах обладают схожей (красной) окраской, характеризуясь близкими значениями λ_{\max} (рис. 3.1). При этом следует учесть, что точное положение максимумов абсорбции антоцианов зависит как от строения флавилиевой основы, так и от наличия и положения углеводных заместителей и типа ацилирующих их кислот, с возможным батохромным или гипсохромным смещением максимума полосы на один - два десятка нанометров. Поэтому даже в научной литературе часто возникает путаница: в источниках бетацианинов не обладающие достаточным опытом исследователи ошибочно определяют «антоцианы»! [173-175]. Это удивительно, поскольку электронные спектры антоцианов зависят от pH среды растворов, благодаря чему их (но не бетацианины) предлагают использовать в качестве pH-индикаторов [176-177].

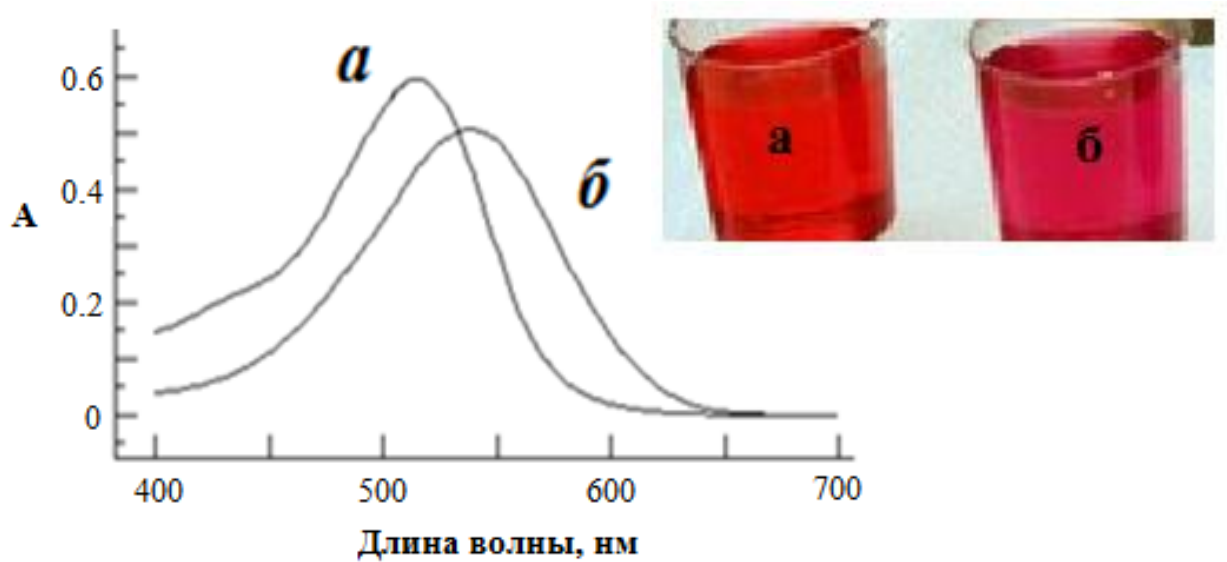


Рисунок 3.1 - Электронные спектры антоцианов бутонов *H. sabdariffa* (а) бетацанинов корнеплодов *B. vulgaris* (б)

3.1.1. Влияние pH на электронные спектры растворов антоцианов и бетацанинов

Результат изменения электронных спектров, точнее интенсивности абсорбции антоцианов и бетацанинов в максимуме поглощения, при изменении pH представлены на рис. 3.2.

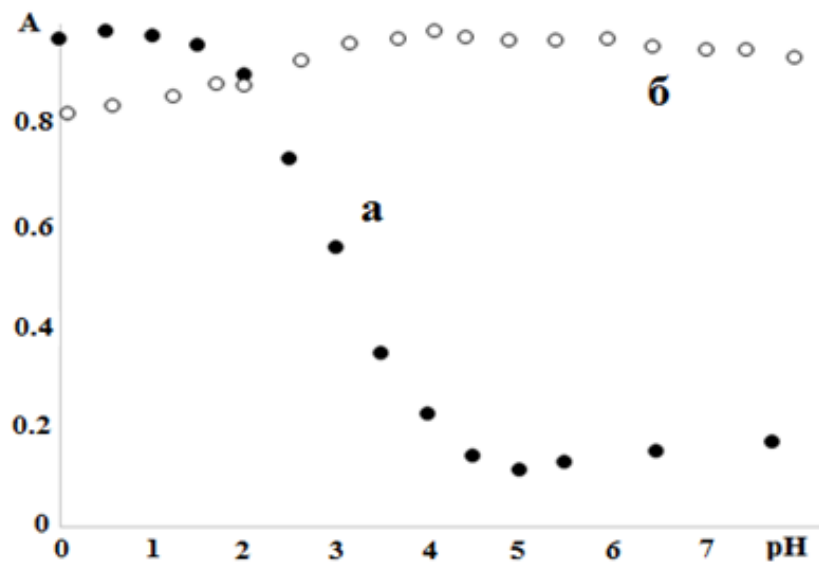


Рисунок 3.2 - Интенсивность окраски экстрактов бутонов *H. sabdariffa* (а) и корнеплодов *B. vulgaris* (б) как функция pH

Из представленных данных следует, что в случае антоцианов (рис. 3.2а), интенсивность абсорбции при $\lambda(a)=518$ нм резко снижается при росте рН от 1 до 5, в то время как интенсивность абсорбции бетацианинов при $\lambda(б)=537$ нм (рис. 3.2б), изменяется не столь сильно.

3.1.2. Влияние рН на электронные спектры растворов антоцианов

В общепринятом в мировой практике способе определения антоцианов спектрофотометрическим методом предлагается измерять оптическую плотность растворов антоцианов при рН = 1 и при рН = 4.5, причем выдержка раствора находится в интервале 15 ÷ 60 мин [132] для исключения получения завышенных результатов.

Действительно, в кислых средах ниже рН=1 антоцианы присутствуют во флавилиевой форме (Гл. 1, рис. 1.5 (I)). Именно эта форма отвечает за окраску растворов, содержащих антоцианы, - таких как виноградный, вишневый, гранатовый и многие другие ягодные и фруктовые соки и даже чай бутонов *Hibiscus sabdariffa*, известный под названием «Каркадэ» (рис.3.3в).



Рисунок 3.3 - Экстракт цветков *C. ternatea* (а – рН 6.95; б – рН 1.0) и бутонов *H. sabdariffa* (а – рН 2.89; б – рН 11.32)

При повышении рН до 4.5 флавилиевая форма переходит в бесцветную полуацетальную форму, называемую также псевдооснованием (Гл. 1, рис. 1.5 (II)). Псевдооснование со своей стороны находится в равновесии с двумя (*цис*- и *транс*-) слабо окрашенными халконными формами (Гл. 1, рис. 1.5 (III)). При подщелачивании появляются новые структуры - хиноидные, также окрашенные, но в отличные от флавилиевой формы цвета (чаще всего сине-серо-зеленых

тонов), из которых наиболее известна голубая окраска «тайского императорского чая» - экстракта цветков *Clitoria ternatea* (рис. 3.3а).

Изменение электронных спектров на первом этапе (при повышении pH от 1 до примерно 4) сказывается практически исключительно лишь в уменьшении интенсивности абсорбции без изменения положения и формы полосы поглощения (рис. 3.4).

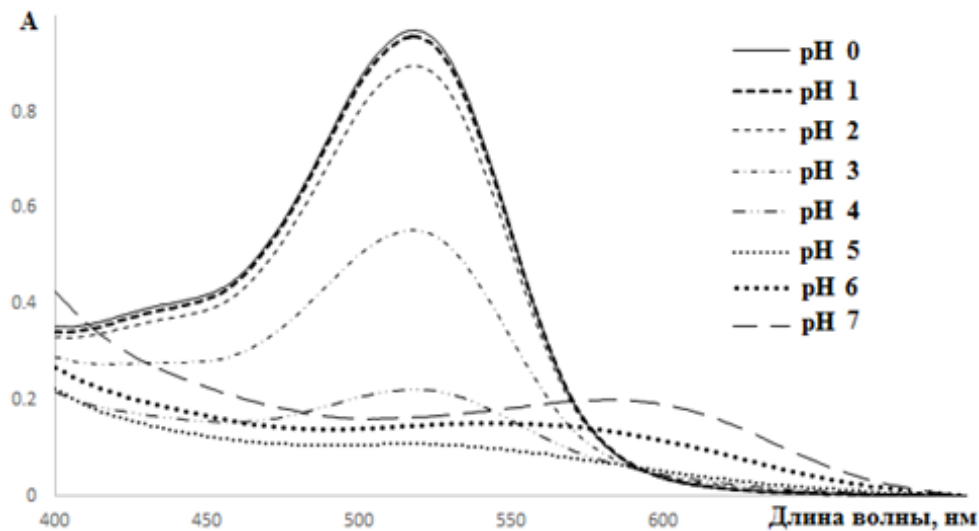


Рисунок 3.4 - Изменение электронных спектров экстракта *H. sabdariffa* при изменении pH

При этом переход между выше названными структурами не является мгновенным. Так при подкислении натурального вишневого сока (с pH 3.65) до pH = 1 с последующим выдерживанием раствора в течении 3 часов наблюдается прирост оптической плотности на 14 % (рис. 3.5а). Аналогичная тенденция наблюдается и в случае работы с препаративно выделенными индивидуальными антоцианами (рис. 3.5б). Это свидетельствует о медленном достижении равновесия между бесцветными и окрашенной формами антоцианов. Выдерживание вишневого сока при pH 4.5 приводит к менее заметным изменениям абсолютного значения оптической плотности, но это может быть следствием низкой оптической плотности раствора при pH = 4.5. Действительно, если использовать экстракт кожуры плодов винограда в 0.1 М растворе HCl, то

после увеличения рН до 4.5 падение оптической плотности продолжается почти 40 мин (рис. 3.6).

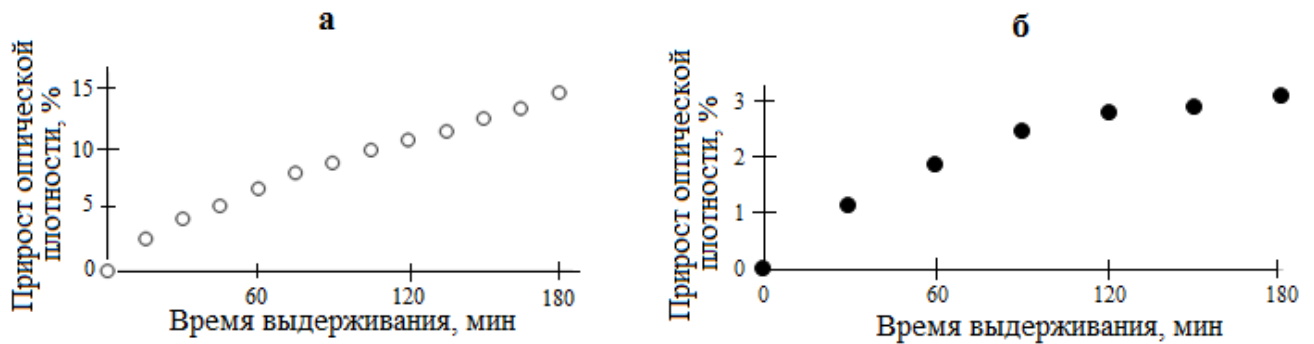


Рисунок 3.5 - Изменение интенсивности окраски вишневого сока (а) и цианидин-3-глюкозида (б) при выдерживании при рН = 1

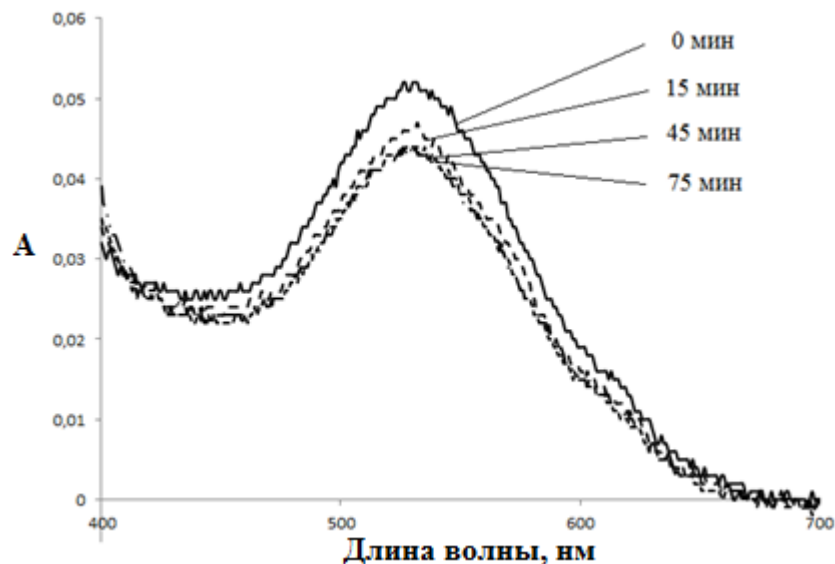


Рисунок 3.6 - Изменение интенсивности окраски экстракта плодов винограда при выдержке при рН = 4.5

По нашим данным и для ряда других объектов выдержки раствора при рН = 4.5 в течение 45 мин достаточно для получения стабильных результатов, не влияющих на конечный результат расчета концентрации антоцианов. Но серьезного обоснования выбора рН = 4.5 для рН-дифференциального метода, строго говоря, нет.

Рассмотрим равновесие между флавилиевой формой A^+ и псевдооснованием B :



с константой равновесия, определяемой по формуле:

$$K = \frac{[B] \cdot [H^+]}{[A^+] \cdot [H_2O]} \quad (3.2)$$

Если для серии растворов берется одинаковая суммарная концентрация всех форм антоцианов, C , то, исключая хиноидные структуры, и принимая, что под формой псевдооснования B можно понимать сумму псевдооснования и халконных форм, равновесие между которыми не зависит от рН, то выражение для константы равновесия можно переписать:

$$K[H_2O] = K^* = \frac{([C] - [A^+]) \cdot [H^+]}{[A^+]} \quad (3.3)$$

Это выражение легко преобразуется:

$$K^* \cdot [A^+] = ([C] - [A^+]) \cdot [H^+], \quad (3.4)$$

$$[A^+] \cdot (K^* + [H^+]) = [C] \cdot [H^+], \quad (3.5)$$

$$\frac{[A^+]}{[C]} = \frac{[H^+]}{K^* + [H^+]} \quad (3.6)$$

Последнее выражение прямопропорционально интенсивности окраски раствора антоцианов для серии растворов с одинаковой суммарной концентрацией антоцианов. Задавая K^* , можно построить теоретическую кривую, предсказывающую изменение интенсивности окраски антоцианов, правда без учета хиноидных структур (рис. 3.7).

Расчет показывает, что, если константа гидратации K^* примерно равна 0.003, то определяя оптическую плотность при рН = 1, мы недоопределяем около 3% антоцианов. При этом же значении K^* при рН = 4.5 во флавилиевой форме остается еще около 1% антоцианов, таким образом, потери антоцианов по рН-дифференциальному методу составят около 4%. Если K^* снижается до примерно 0.001, то при рН = 1 флавилиевая форма составит 99%, но при рН = 4.5 ее доля возрастает до 3% с суммарным недоопределением антоцианов на те же 4%. В любом случае для обесцвечивания антоцианов следует использовать рН порядка 5.

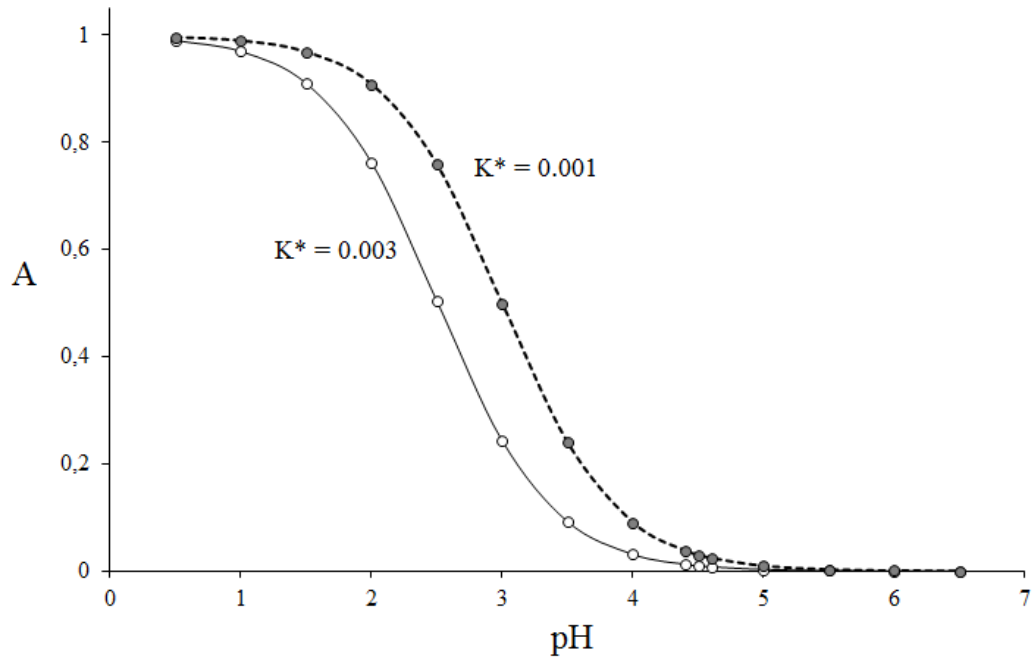


Рисунок 3.7 - Изменение интенсивности окраски растворов антоцианов при изменении рН за счет образования неокрашенных форм антоцианов

И действительно, при приготовлении растворов антоцианов с рН в диапазоне $4.2 \div 4.8$ (4.5 ± 0.3) наблюдается тенденция уменьшения оптической плотности (рис. 3.8) что свидетельствует о том, что минимум светопоглощения находится за пределами рН = 4.5.

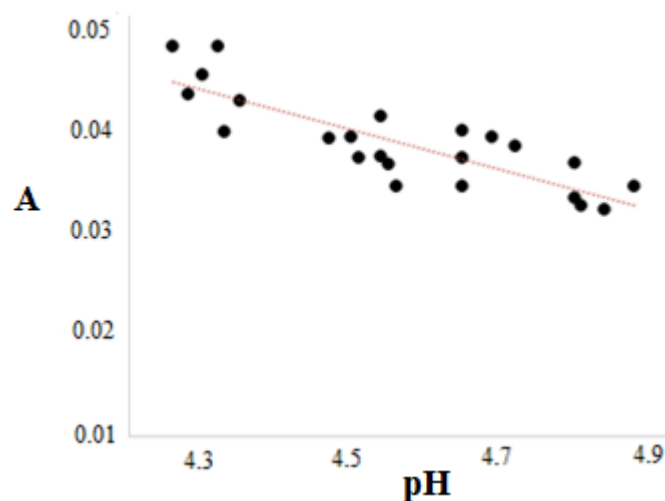


Рисунок 3.8 - Изменение интенсивности окраски растворов антоцианов в диапазоне рН 4.5 ± 0.3

Впрочем, при росте рН может вырасти доля хиноидных структур, что также приведет к недооценке содержания антоцианов. Следовательно, выбирать второе значение рН лучше экспериментально для каждого конкретного образца. Отметим, что контроль справедливости такого подхода можно осуществлять по положению максимума абсорбции, который для полимерных антоцианов смещен батохромно на несколько нанометров.

3.1.3. Влияние рН на электронные спектры растворов бетацианинов

Изменения в спектрах растворов бетацианинов с одинаковой начальной концентрацией в том же диапазоне рН также заметны, но касаются в основном интенсивности абсорбции, смещение максимума абсорбции не имеет принципиального значения (рис. 3.9).

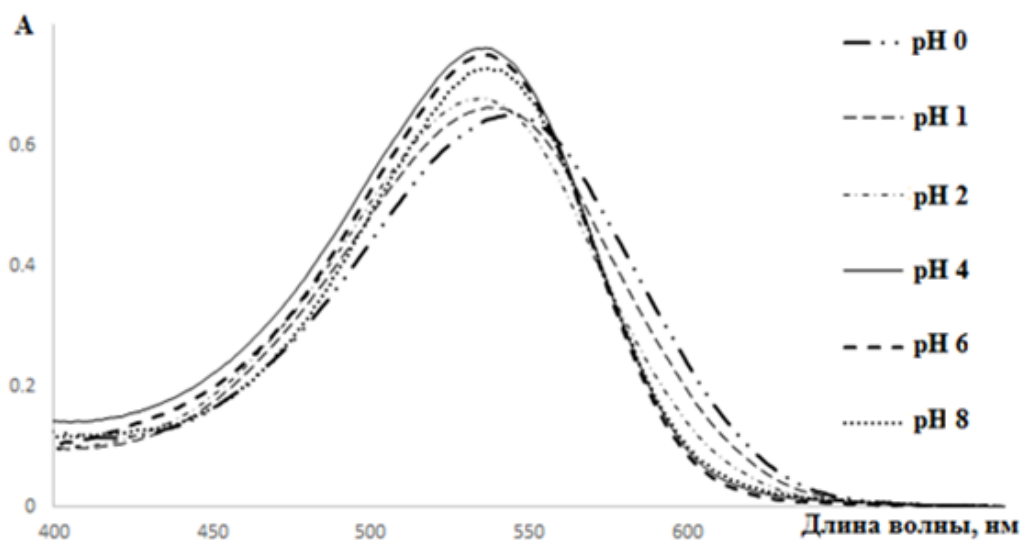


Рисунок 3.9 - Спектры растворов бетацианинов *B. vulgaris* при различных рН

В структуре бетацианинов имеется три карбоксильные группы, один атом азота в шестичленном гетероцикле и одна фенольная группа, которые могут изменять свое зарядовое состояние при изменении рН, образуя ряд структур с различным зарядовым состоянием:

- от +2 в сильнокислой среде, в которой подавлена диссоциация всех трех карбоксильных групп, но протонирован атом азота шестичленного гетероцикла (рис. 3.10а);

- до -2 при полной диссоциации всех карбоксильных групп и депротонировании атома азота шестичленного гетероцикла (рис. 3.10б) и даже до -3 (за счет диссоциации фенольной группы).

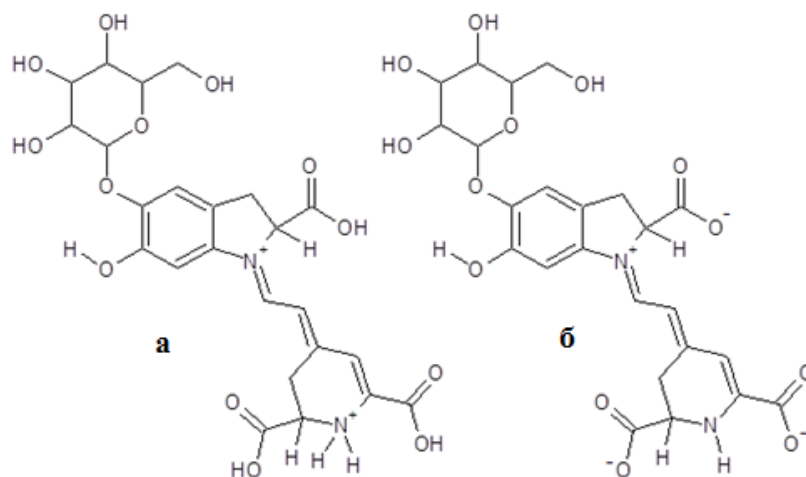


Рисунок 3.10 - Структуры бетанина с противоположными зарядовыми состояниями: а – заряд +2; б – заряд -2

Однако не все превращения должны приводить к изменению электронных спектров, поскольку две карбоксильные группы (в положениях 2 и 15) не входят в цепь сопряжения, поэтому окраска бетацианинов мало зависит от состояния их ионизации. Но протонирование или депротонирование атома азота в шестичленном гетероцикле, ионизация карбоксильной группы в положении 17 или фенольного гидроксила могут сказаться на энергии электронных переходов. Действительно, изменения электронных спектров при изменении рН растворов наблюдаются, но не столь значительные, как в случае антоцианов (рис. 3.4).

Таким образом, изменения в зарядовом состоянии (в исследованном диапазоне рН) сказываются лишь на небольшом смещении полосы поглощения и некотором изменении коэффициентов молярного погашения. При этом наивысшей интенсивностью абсорбции бетацианины обладают при рН = 4 ÷ 8, что позволяет использовать эти красители в продуктах, окраска которых в красный цвет антоцианами невозможна. Именно это свойство и позволяет легко дифференцировать исследуемые природные красители.

3.1.4. Некоторые важные особенности электронных спектров реальных смесей антоцианов

Определение антоцианов спектрофотометрическим способом в исходном экстракте на самом деле имеет весьма условный характер, поскольку:

а) реально, как правило, экстракты представляют собой смесь антоцианов с различным строением флавилиевых основ, а, следовательно, и с заметно различающимися положениями максимумов абсорбции. Так, например, различие в положении λ_{\max} составляет более 20 нм для однотипных производных пеларгонидина и дельфинидина (рис. 3.11).

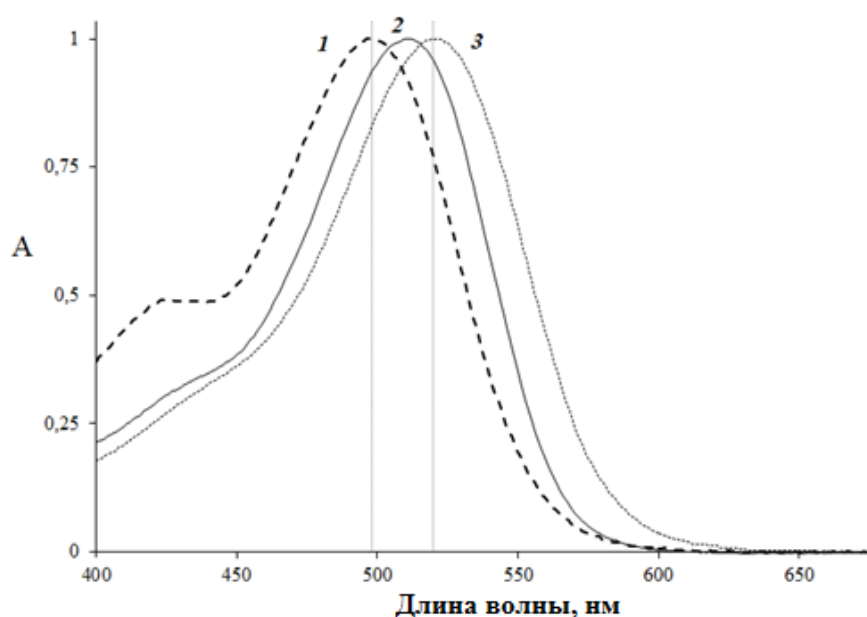


Рисунок 3.11 Приведенные спектры экстрактов плодов земляники (1), аронии (2) и винограда (3)

При этом даже положение максимума абсорбции смеси может зависеть от соотношения между такими индивидуальными компонентами; и оно может изменяться не только при переходе от одного сорта растения к другому, но и в течение созревания плодов;

б) различие в положении λ_{\max} может быть большим для смеси антоцианов, построенных на одной и той же флавилиевой структуре (например, для различных производных наиболее часто синтезируемого в растениях антоцианидина - цианидина),

- если основа гликозилирована по различным гидроксильным группам,
- при изменении строения гликозидного радикала для одного положения в молекуле,
- особенно, если углеводные радикалы ацилированы органическими кислотами, способными к внутримолекулярной копигментации.

В принципе, в данном случае задача может быть решена методом Фирордта, но для его применения необходимо наличие всего набора стандартных веществ (антоцианов), или информации об их коэффициентах экстинкции при всех необходимых аналитических длинах волн;

в) и хотя к настоящему времени коммерчески доступен ряд образцов очищенных антоцианов, коэффициенты экстинкции одних и тех же соединений, определенные различными авторами, могут различаться весьма существенно [178-180], поэтому для стандартизации принято использовать договорные коэффициенты экстинкции для пересчета показаний спектрофотометра на одно (желательно являющееся доминирующим компонентом) вещество. В качестве такого вещества обычно используют цианидин-3-глюкозид хлорид или мальвидин-3-глюкозид хлорид (в случае виноградов).

3.1.5. Некоторые важные особенности электронных спектров экстрактов из растительных источников бетацианинов

Бетацианины входят в состав беталаинового комплекса пигментов: в экстрактах, получаемых из растительных объектов, бетацианинам всегда сопутствуют бетаксантины. Молекулы бетацианинов и бетаксантинов обладают разными размерами систем сопряженных двойных связей (Гл. 1, рис. 1.3), и, как следствие, различными электронными спектрами поглощения (рис. 3.12).

Добавление ароматического кольца дигидроиндольного фрагмента при переходе от бетаксантинов к бетацианинам приводит к батохромному смещению максимумов абсорбции. Поэтому в исходном экстракте обычно обнаруживается наличие двух перекрывающихся полос; причем, как следует из полученных в

настоящей работе результатов соотношение между бетацианинами и бетаксантинами различно, например, для различных сортов свеклы (рис. 3.13).

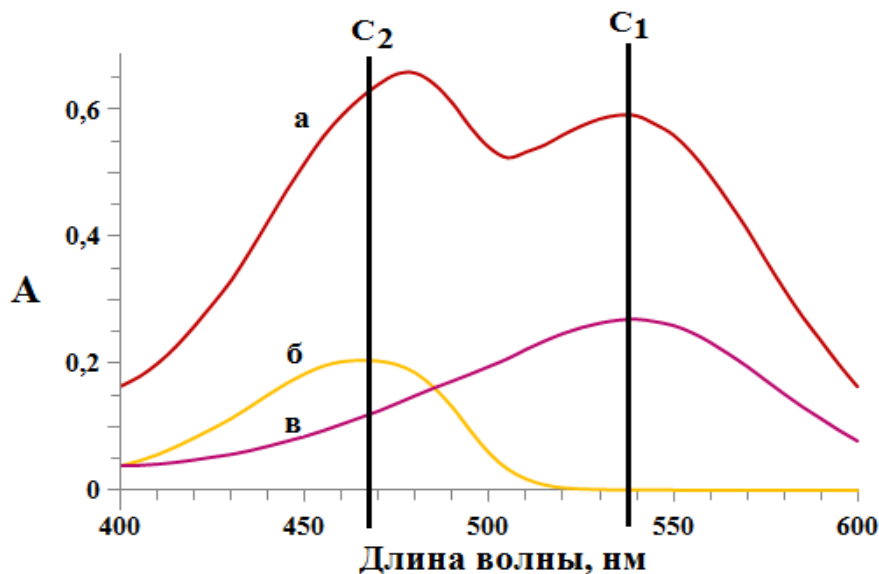


Рисунок 3.12 - Спектры комплекса беталаиновых пигментов *B. vulgaris*: а – исходный экстракт беталаинов; б – бетаксантины; в – бетацианины.

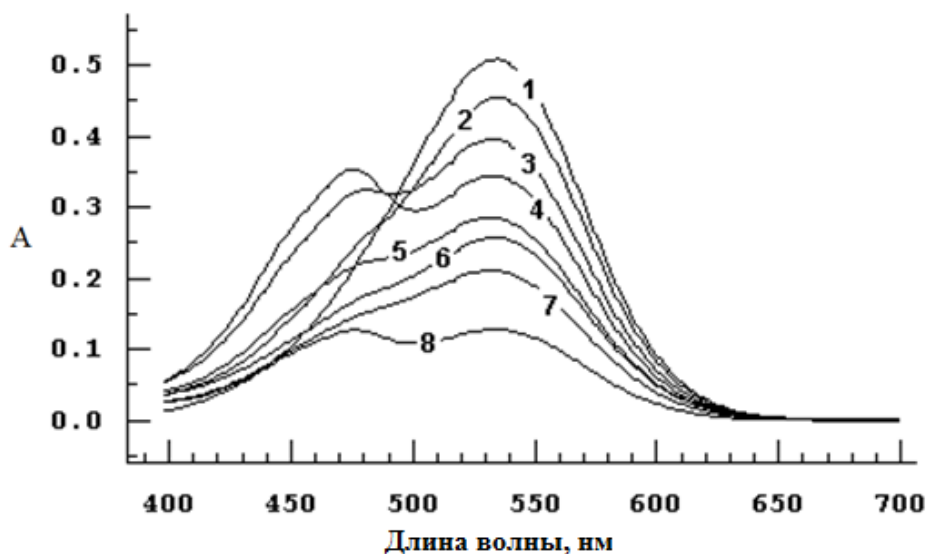


Рисунок 3.13 - Спектры экстрактов корнеплодов некоторых сортов *B. vulgaris*: 1 – «Красный шар»; 2 – «Мулатка»; 3 – «Цилиндра»; 4 – «Кубинка»; 5 – «Тема Потема»; 6 – «Голландская»; 7 – «Цыганочка»; 8 – «Бордо»

Вследствие перекрывания полос абсорбции бетацианинов и бетаксантинов при спектрофотометрическом определении необходимо убедиться в отсутствии перекрывания полос абсорбции при аналитической длине волны для

бетацианинов (538 нм, [60]), или учесть вклад каждого из компонентов. Получить отдельно спектры бетаксантинов и бетацианинов можно, используя твердофазное концентрирование экстрактов беталаинов на патронах ДИАПАК С18. Спектры несорбированной части экстракта содержат только желтые пигменты (бетаксантины).

Отметим, что спектры несорбируемой части экстрактов различных сортов свеклы оказываются практически идентичными (рис. 3.14).

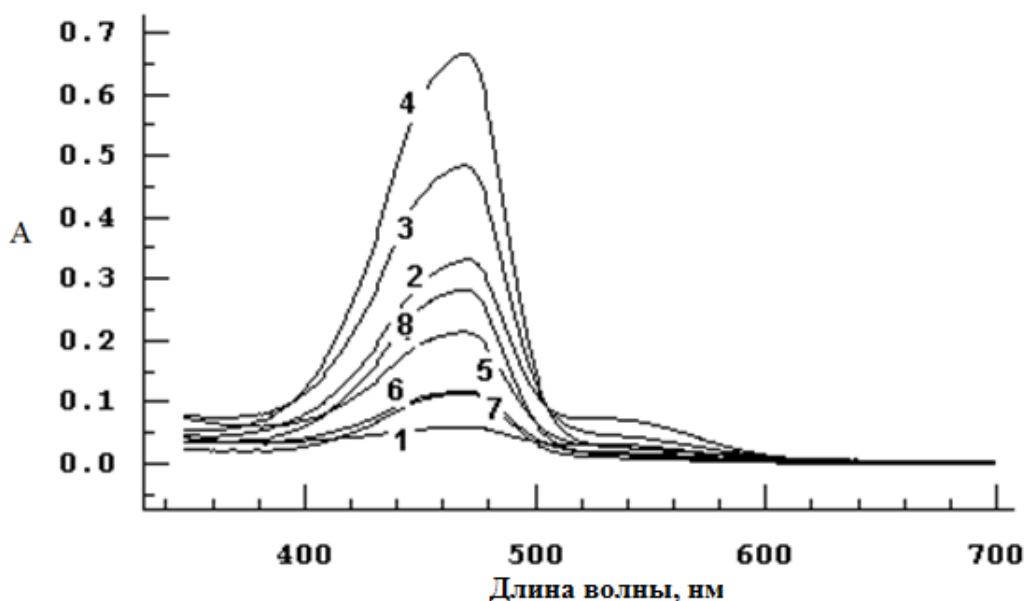


Рисунок 3.14 - Спектры бетаксантинов некоторых сортов *B. Vulgaris*. Номера сортов см. рис.3.13

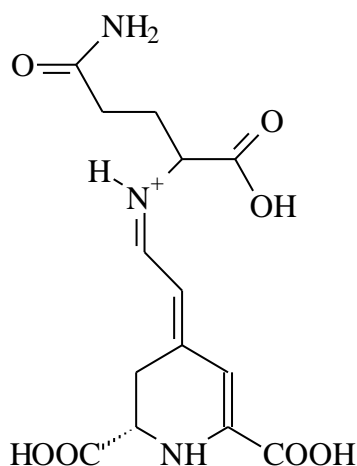


Рисунок 3.15 - Структура вульгаксантина – представителя бетаксантинов

Это упрощает количественное определение бетаксантинов - расчет предлагается производить на один конкретный бетаксантин, в качестве которого можно использовать, например, вульгаксантин I (рис. 3.15). Это связано с тем, что различие между бетаксантинами касается части молекулы, не влияющей на хромофор (Гл. 1, табл. 1.4).

3.1.6. Особенности спектрофотометрического определения концентрации антоцианов

Для определения антоцианов используется достаточно простая процедура, позволяющая рассчитать концентрацию этих красителей в исследуемом растворе (экстракте) в пересчете на один антоциан (чаще всего – цианидин-3-глюкозид хлорид) по уравнению 2.1 [132]. Но за простотой кроется на самом деле, как следует из гл.3.1.2 и 3.1.4, упрощение.

Действительно, измерение оптической плотности при $\text{pH} = 4.5$ введено для поправки на так называемые полимерные антоцианы. Но предложенная формула была бы верна, если бы спектр полимерных антоцианов (или других сопутствующих экстрактивных веществ) не изменялся с pH , что на самом деле не выполняется (рис. 3.16).

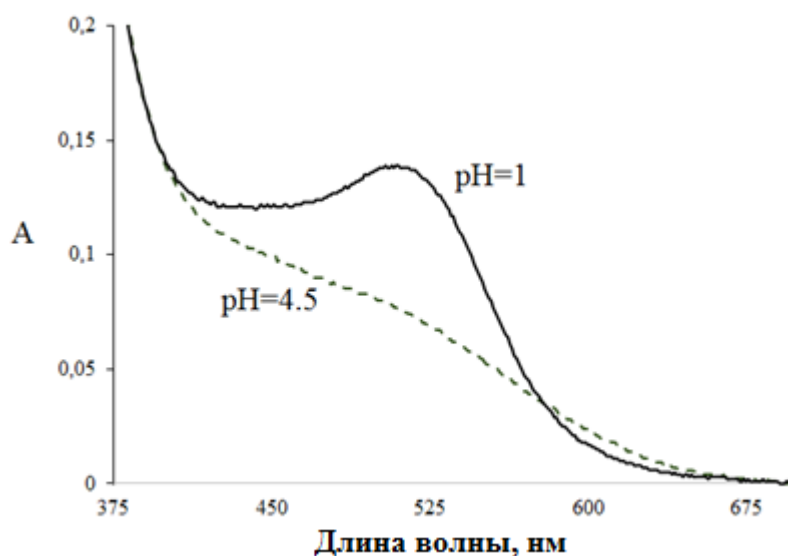


Рисунок 3.16 - Электронные спектры растворов сока яблочно-вишневого «Дары Кубани»

Так, например, для яблочно-вишневого сока «Дары Кубани» при $\text{pH}=4.5$ в длинноволновой части проявляется бóльшая абсорбция, чем при $\text{pH} = 1$. Кроме того, очевидно, что остаточное поглощение сопутствующих веществ делает надежность метода весьма неопределенной.

Второй аспект имеет отношение к скорости установления равновесия между всеми формами антоцианов (п. 3.1.4). По нашим данным равновесие между флавилиевой и полуацетальной формами устанавливается очень быстро, но халконные формы возвращаются во флавилиевую медленно (рис. 3.6 и рис. 3.17). Это определяет особенность, не отмеченную в методике [132]: если исходный объект (плод, цветок, сок и т.д.) содержит антоцианы при pH больше 1, то может потребоваться значительное время (до 6-ти часов) для перевода всех форм во флавилиевую (рис. 3.5, табл. 3.1).

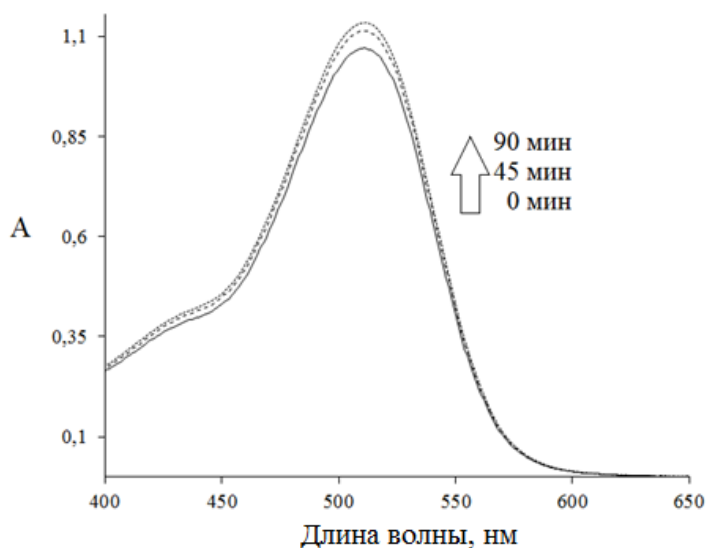


Рисунок 3.17 - Развитие окраски быстро приготовленного (за 5 мин) экстракта плодов малины красной во времени

Поэтому лучше образец залить экстрагентом и оставить на ночь, - при этом и экстракция полнее и степень перевода всех форм антоцианов во флавилиевую достигает единицы. Это же справедливо и для $\text{pH}=4.5$, хотя вследствие снижения оптической плотности раствора влияние времени выдержки может быть незначительным.

Таблица 3.1 - Спектрофотометрическое определение антоцианов

Время выдерживания, ч	Образцы соков с исходным значением pH ~ 3.5					
	Спектрофотометрическое определение с использованием МО					
	<i>Сады Придонья</i>	<i>Лента</i>	<i>Золотая Русь</i>	<i>Rich</i>	<i>Я</i>	<i>Cy-3-Glu</i>
	Содержание антоцианов (С), мкмоль/л					
0	9.2	27.8	33.3	31.4	32.1	16.9
1	9.8	28.6	34.5	32.9	33.2	18.6
2	10	29.1	35.3	34.0	33.9	18.8
3	10.4	29.6	36.1	34.9	34.7	19.0
24	11.3	30.8	37.5	36.3	35.9	19.3
$\Delta_{24ч}$ %	23.2	10.7	12.8	15.7	11.9	14.2

Кроме того, при условности пересчета содержания на цианидин-3-глюкозид хлорид возникает вопрос об осмысленности вычитания вклада полимерных антоцианов (если не исследуется характер биосинтеза антоцианов) – эту процедуру можно опустить для упрощенного определения антоцианов, если их основное назначение – использование в качестве красителей.

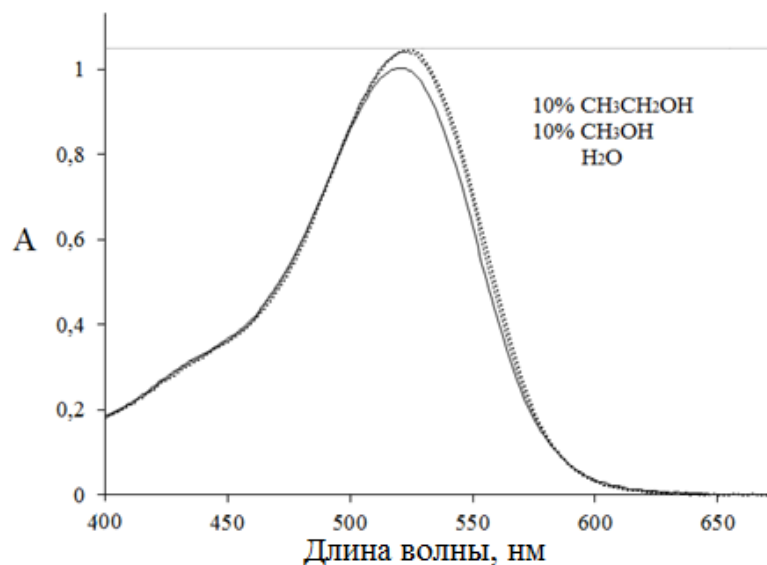


Рисунок 3.18 - Спектры экстрактов аронии Мичурина без и с добавкой метанола и этанола

Дело в том, что полимерные антоцианы имеют близкие к мономерным электронные спектры (с небольшим батохромным сдвигом), и они как красители даже более удобны – могут использоваться в большем диапазоне pH. Кстати, то

же самое можно сказать и о еще одном типе метаболитов антоцианов – о пироантоцианах (с небольшим гипсохромным сдвигом максимума абсорбции).

Наконец, следует учесть, что образец не должен содержать органические растворители, которые могут не только сместить положение полосы (батохромно), но еще и с отчетливым гиперхромным эффектом (рис. 3.18).

При содержании этанола (наиболее часто используемого в научном мире сегодня экстрагента антоцианов) до 1% не влияет на количественное определение антоцианов. Дальнейшее повышение содержания этого растворителя приводит к появлению систематической ошибки в спектрофотометрическом анализе экстрактов до 3.8% (табл. 3.2).

Таблица 3.2

Спектрофотометрическое определение антоцианов в экстрактах, содержащих добавки этанола

Содержание этанола, %	A_{518}	ΔA^* , %	λ_{max}
0	0,495		518
1	0,495	0,0	518
2	0,494	-0,2	519
3	0,497	0,4	519
4	0,499	0,8	520
5	0,500	1,0	520
10	0,513	3,6	521
20	0,515	4,0	526
40	0,512	3,4	534
60	0,506	2,2	536
90	0,476	-3,8	543

* - прирост (или уменьшение) значения оптической плотности, %

После всех вышперечисленных поправок в рН-дифференциальный способ определение оптической плотности антоцианов при исследовании раствора возможно с погрешностью до 1.5 % (табл. 3.3).

Таблица 3.3 - Спектрофотометрическое определение антоцианов после введения поправок в МО (в единицах оптической плотности)

1 день	0.590	0.591	0.594	0.591	0.580	0.578	0.588	0.591	0.588 ± 1.2%
2 день	0.586	0.586	0.588	0.593	0.585	0.574	0.598	0.588	0.587 ± 1.5%

3.1.7. Особенности спектрофотометрического определения концентрации бетацианинов

Первая и самая главная особенность метода и его отличие от метода для определения антоцианов состоит в том, что стабильность бетацианинов заметно ниже, чем антоцианов. О некоторой нестабильности бетацианинов было известно из литературных данных [5-6 и др.], но в них отсутствовали конкретные характеристики процесса, поэтому нами были выполнены обстоятельные исследования.

Из литературы известны три основных типа превращений, которым может подвергаться этот класс натуральных красителей: обращение конденсации соединений **I** и **II** (реакция 1), декарбоксилирование (реакция 2) и окисление (реакция 3) [6] (рис. 3.19).

Для исследования красная бетацианиновая фракция была отделена от желтой бетаксантиновой методом твердофазной экстракции (п. 3.2.1.). Анализ изменения электронных спектров фракции **a** желтого цвета, содержащей слабо сорбирующиеся на концентрирующем патроне ДИАПАК С18 вещества из экстракта красной свеклы, показал, что желтая окраска постепенно изменяется на красную (рис. 3.20), причем методом ВЭЖХ было установлено, что в результате образуются бетанин и изобетанин – основные бетацианины свеклы.

Кажется логичным предположить, что основной химический процесс в данном случае – реакция 1. Из двух компонентов, вступающих в конденсацию по реакции 1 (**I** и **II**, рис. 3.19), лишь один имеет окраску, причем именно желтую, – беталамовая кислота (**II**). По литературным данным соединение **II** имеет максимум поглощения при 430 нм в водном растворе [181], 405 нм в подкисленном ортофосфорной кислотой элюенте [182] или 410 нм в слабокислом элюенте неизвестной кислотности [183].

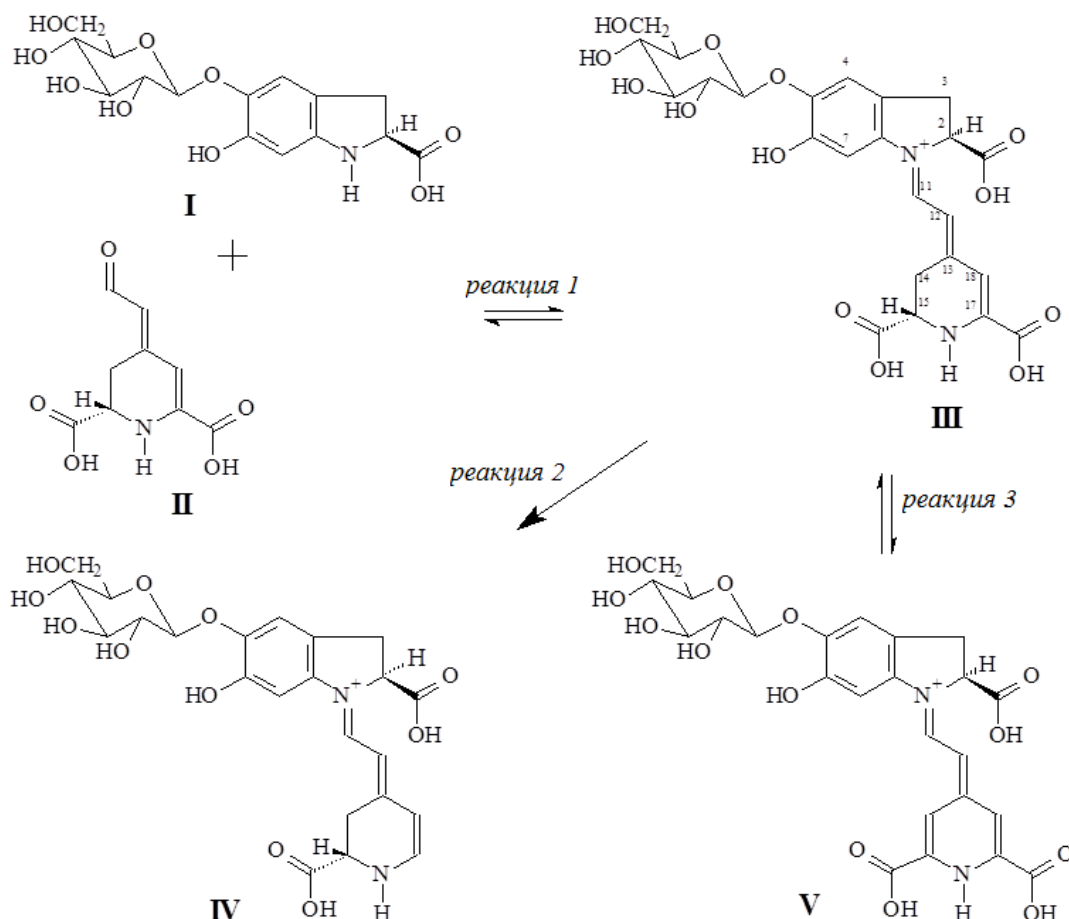


Рис. 3.19 Схема возможных превращений на примере бетанина:

I – цикло-дигидроксифенилаланин-5-β-О-глюкозид; II – беталамовая кислота, III – бетанин; IV – 17-декарбокситетанин; V – необетанин

Однако исходные вещества из фракции А имели двойной максимум в диапазоне 450 - 490 нм, характерный для бетаксантинов [184]. Поэтому изменения в спектре могут быть следствием переоконденсации беталамовой кислоты из бетаксантинов с соединением I (рис. 3.19).

Семейство спектров красной фракции б (содержащее очищенные от бетаксантинов бетацианины) (рН 1) также имеет изобестическую точку *i*, что свидетельствует об образовании одного продукта (или группы продуктов с одинаковым соотношением между компонентами), в электронном спектре которого максимум поглощения в кислой среде находится при 405 нм, поэтому гипотеза об обращении реакции 1 как основной причины изменения в спектрах кажется логичной.

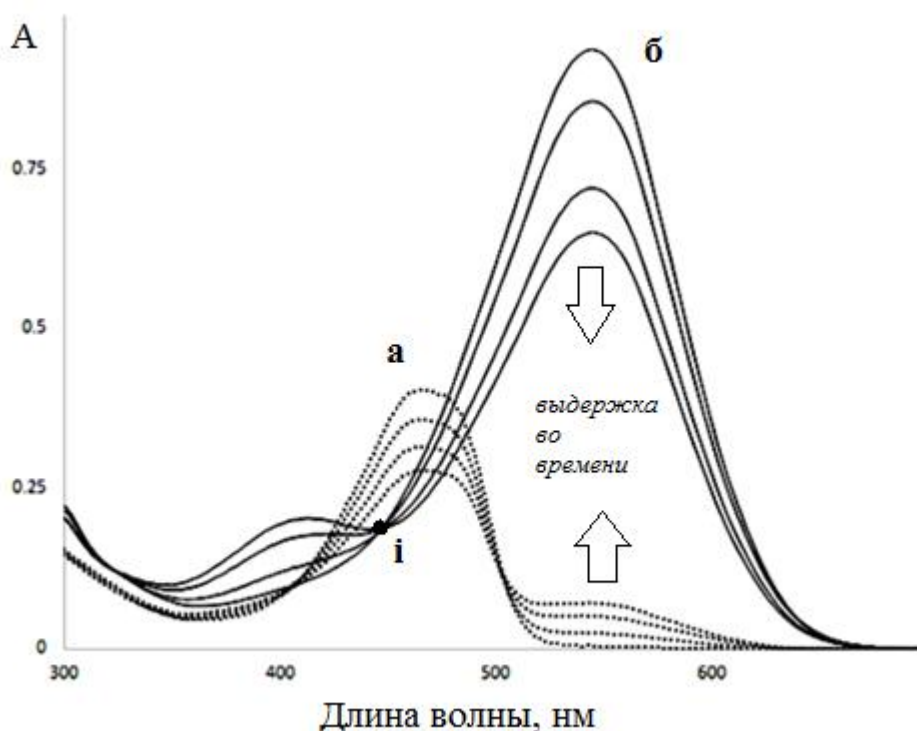


Рисунок 3.20 - Спектры поглощения экстракта бетацианинов свеклы: а – фракция экстракта, не удерживаемая на концентрирующем патроне ДИАПАК С18; б – реэкстракт бетацианинов с патрона смесью (1:1) этанол – 0.01 М HCl; i – изобестическая точка. Спектры записаны с интервалами 0.5 – 1 ч

Отметим, что оптическая плотность при 405 нм довольно быстро перестает расти, что может свидетельствовать о достижении равновесия в данной реакции, хотя реально при длительной выдержке растворов их оптическая плотность в максимуме, характерном для бетацианинов, продолжает медленно падать, вероятно, вследствие окисления бетацианинов кислородом воздуха.

Наличие изобестической точки позволяет контролировать исходную концентрацию бетацианинов, несмотря на их распад при стоянии. По нашим данным коэффициент экстинкции бетацианинов (и беталамовой кислоты) в изобестической точке (при $\lambda = 446$ нм) равен $12000 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. В таком случае начальная концентрация бетацианинов в растворе, полученном, например, после очистки на патроне, составит:

$$c(\text{исх.}) = A(446 \text{ нм})/12000, \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}. \quad (3.7)$$

При этом степень сохранности бетацианинов к моменту измерения может быть рассчитана по уравнению:

$$\alpha = \frac{A(538 \text{ нм}) \cdot 12000}{60000 \cdot A(446 \text{ нм})} \cdot 100, \% \quad (3.8)$$

Например, по данным, представленным на рис. 3.20, было установлено, что при выдерживании раствора бетацианинов красной столовой свеклы в течение 2 часов степень сохранности красителя составила 69.2 % от его исходного содержания.

По законам разбавления степень деконденсации (в равновесии) при заданных условиях (рН и температуре) должна уменьшаться с ростом концентрации бетацианинов в растворе, что находится в полном соответствии с полученными данными: в таблице 3.4 сопоставлены изменения в электронных спектрах одного и того же экстракта с различными начальными концентрациями.

Для выполнения данного эксперимента методом последовательного разбавления были приготовлены образцы в растворителе, содержащем 2 об. % муравьиной кислоты и 7 об. % ацетонитрила в воде (рН 2.0) (элюент для ВЭЖХ определения бетацианинов) так, чтобы растворы имели примерно одинаковые начальные оптические плотности при записи спектров в кюветах с длиной оптического пути 0.1, 0.2, 0.5 и 1.0 см.

Таблица 3.4 - Изменение оптической плотности растворов бетацианинов различной исходной концентрации

Концентрация бетацианинов, С, ммоль/л	Время выдержки растворов, ч								Погрешность определения через 3.5 ч	ΔС, %
	0	0.3	1	1.5	2	2.5	3	3.5		
0.307	100	98.4	97.8	97.4	96.9	96.4	95.8	96.6	97.0 ± 0.7 %	3.4
0.165	100	97.9	95.9	95.3	94.8	94.2	93.8	93.7	95.1 ± 1.1 %	6.3
0.062	100	97.5	91.6	89.0	87.7	86.6	85.9	85.3	89.1 ± 3.6 %	14.7
0.031	100	98.0	90.3	85.5	82.8	80.8	79.2	78.1	85.0 ± 6.2 %	21.9

Длина волны 538 нм; растворитель 2 об. % муравьиной кислоты и 7 об. % ацетонитрила в воде (рН 2.0).

Выполненные дополнительно исследования показали, что максимально возможная устойчивость бетацианинов в водных растворах с ацетатными буферами (0.1 М) соответствует диапазону $4.5 < \text{pH} < 7$ (табл. 3.5).

Хотя стабильность бетацианинов возрастает при росте pH до нейтрального значения [52], исследование поведения бетацианинов в кислых растворах принципиально важно, поскольку сорбционная емкость обращенно-фазовых сорбентов значительно выше именно из растворов с низким значением pH, что существенно для очистки бетацианинов от сопутствующих экстрактивных веществ в методе твердофазной экстракции.

Таблица 3.5 - Устойчивость бетацианинов при хранении при различных pH

pH среды	Сохранность бетацианинов, %, при хранении в течение времени, дней; n = 2, P = 0.95			
	0	12	44	74
1	100	$47.5 \pm 2.5\%$	$15.1 \pm 4.5\%$	$4.0 \pm 1.8\%$
4.5	100	$85.8 \pm 1.5\%$	$65.6 \pm 2.3\%$	$50.3 \pm 1.6\%$
7	100	$74.5 \pm 1.7\%$	$54.0 \pm 4.0\%$	$40.9 \pm 4.1\%$
10	100	$45.4 \pm 2.0\%$	$22.0 \pm 1.5\%$	$13.0 \pm 2.2\%$

Вторая особенность метода определения бетацианинов спектрфотометрическим методом связана с перекрыванием полос бетацианинов и бетаксантинов, часто присутствующих одновременно в растительных объектах.

Однако на аналитической длине волны для определения бетацианинов (538 нм, рис. 3.12) бетаксантины имеют нулевую абсорбцию, поэтому спектрофотометрическое определение бетацианинов может быть выполнено даже в присутствии бетаксантинов без появления систематических погрешностей.

Но если бетаксантины не мешают количественному определению бетацианинов спектрофотометрическим методом, то абсорбция бетацианинов при 469 нм не может считаться пренебрежимо низкой. Для спектрофотометрического определения бетацианинов и бетаксантинов при совместном присутствии возможно составить систему линейных уравнений:

$$\begin{cases} A(538) = \varepsilon_{11} \cdot c_1 + 0 \cdot c_2 \\ A(469) = \varepsilon_{12} \cdot c_1 + \varepsilon_{22} \cdot c_2 \end{cases} \quad (3.9)$$

При решении системы уравнений получаем выражения для определения концентраций:

$$\begin{cases} c_1 = \frac{A(538)}{\varepsilon_{11}} \\ c_2 = \frac{A(469) - \varepsilon_{12} \cdot c_1}{\varepsilon_{22}} \end{cases} \quad (3.10)$$

где $A(538)$ и $A(469)$ – оптические плотности экстрактов на соответствующих длинах волн (нм); ε_{ij} – соответствующие коэффициенты экстинкции: ε_{11} – 60000 л·моль⁻¹·см⁻¹ [185]; ε_{12} – 16427 л·моль⁻¹·см⁻¹ – рассчитан нами; ε_{22} – 48000 л·моль⁻¹·см⁻¹ [185].

Предложенный способ определения особенно актуален для растительных объектов, содержащих количество бетаксантинов, существенно превышающее количество бетацианинов, например, для шпината земляничного (*Chenopodium foliosum*), ягоды которого, в отличие от пурпурных листьев амаранта (*Amaranthus* L.), практически не содержащих бетаксантины, накапливают до двух раз больше желтого красителя по сравнению с красным (рис. 3.21).

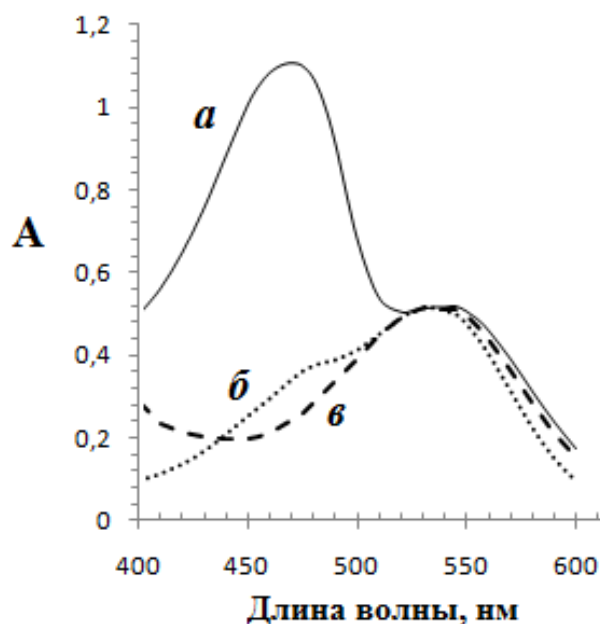


Рисунок 3.21 - Электронные спектры поглощения экстрактов ягод шпината земляничного (а), корнеплода красной столовой свеклы (б), пурпурных листьев амаранта (в).

Третья особенность метода состоит в том, что уровень накопления беталаинов различен, например, в различных частях корнеплодов.

При определении концентрации бетацианинов в корнеплодах красной столовой свеклы следует также учитывать, что уровень накопления этих веществ неодинаков в различных частях одного и того же корнеплода (рис. 3.22).

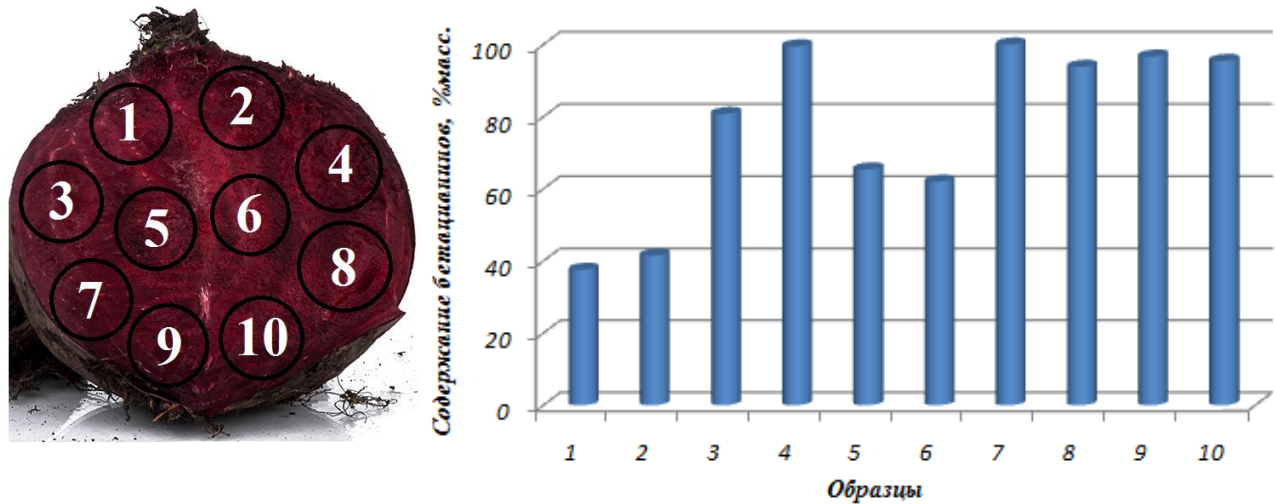


Рисунок - 3.22 - Исследование уровня накопления бетацианинов в различных частях корнеплода красной столовой свеклы

Таблица 3.6 - Определение беталаинов в корнеплодах некоторых сортов красной свеклы спектрофотометрическим методом

Сорт	Содержание беталаиновых красителей, мг/100г; n=5, P=0.95	
	Бетацианины*	Бетаксантины**
Красный шар	195 ± 18	0
Мулатка	167 ± 16	17 ± 1.9
Бордо	68 ± 6	25 ± 3.1
Цилиндра	143 ± 15	45 ± 5.2
Цыганочка	85 ± 7	19 ± 2.1
Голландская	45 ± 5	8 ± 0.6
Кубинка	33 ± 3	21 ± 2.0
Тема Потема	47 ± 5	13 ± 1.4

* - $\epsilon_{11} = 60000$ для бетанина; ** - $\epsilon_{22} = 48000$ для вульгаксантина I [185]

Таблица 3.7 - Определение бетацианинов в некоторых растительных источниках спектрофотометрическим методом

Образец	Лепестки Бугенвиллеи	Ягоды шпината земляничного
	Содержание бетацианинов, мг/100г; n=5, P=0.95	
1	4.0	13.0
2	4.5	13.7
3	4.7	14.0
4	4.1	15.5
5	4.1	14.9
	4.3 ± 8.9 %	14.2 ± 8.7 %

В таблицах 3.6-3.7 приведены результаты спектрофотометрического определения бетацианинов, экстрагированных из навесок мелкоизмельченного корнеплода красной столовой свеклы, лепестков Бугенвиллеи и ягод шпината земляничного.

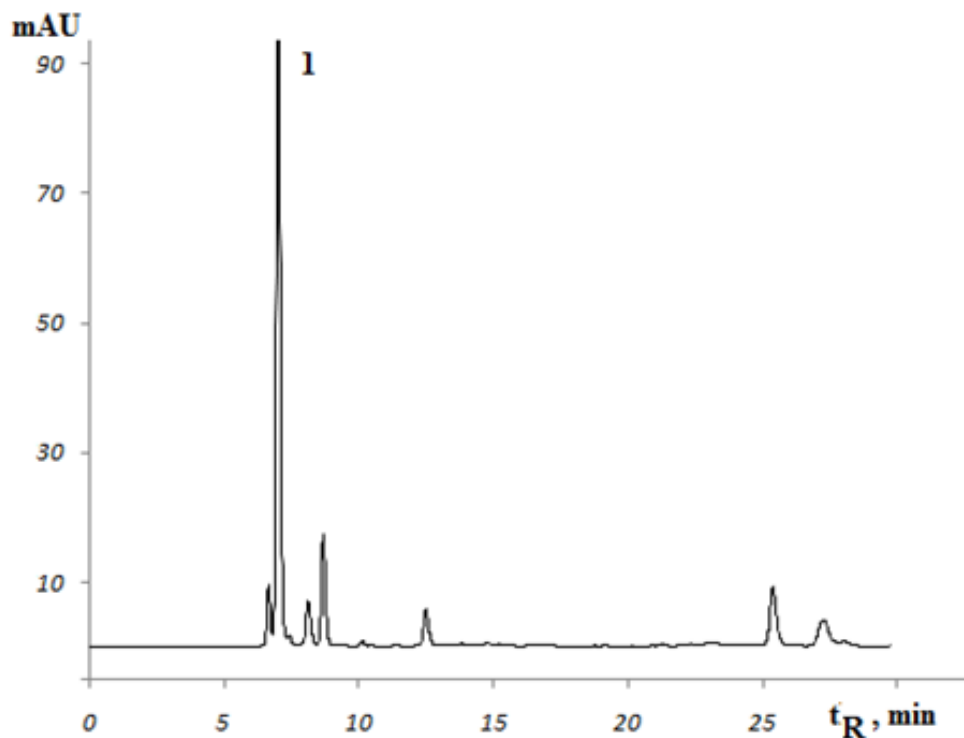


Рисунок 3.23 - Хроматограмма экстракта лепестков бугенвиллеи (*Bougainvillea*)
 Колонка Kromasil 100-5C18; ПФ: 5.5 об.% CH₃CN, 2 об.% HCOOH. Скорость потока 1 мл/мин;
 1 - бугенвиллеин

На рис. 3.23-3.24 представлены хроматограммы экстрактов, отражающие качественный состав красителей в рассматриваемых объектах.

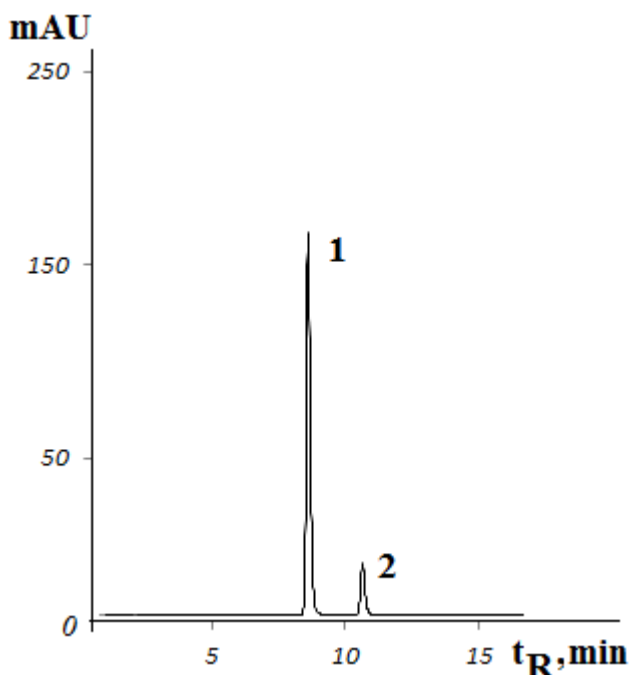


Рисунок 3.24 - Хроматограмма экстракта ягод шпината земляничного (*Chenopodium foliosum*)

Колонка Kromasil 100-5C18; ПФ: 5.5 об.% CH_3CN , 2 об.% HCOOH . Скорость потока 1 мл/мин;
1 – бетанин; 2 – изобетанин

3.2. Очистка антоцианов и бетацианинов

Для использования метода ВЭЖХ растительные экстракты должны быть обязательно предварительно очищены от множества сопутствующих экстрактивных веществ, среди которых – полимерные и олигомерные соединения, способные необратимо засорить стационарную фазу.

Из природного сырья бетацианины легко извлекаются водой или водными растворами минеральных или органических кислот. При этом получаемые экстракты имеют характерный землистый запах, а при хранении в течении нескольких недель на дне появляется осадок, что делает продукт непригодным для дальнейшего использования. Поэтому для получения высокотехнологичного красителя экстракты бетацианинов необходимо очищать от сопутствующих экстрактивных веществ. Традиционным на сегодняшний день является метод твердофазной экстракцией. Задача состоит в выборе оптимального сорбента. К

тому же не раскрытыми остаются и закономерности сорбции, необходимые для разработки технологии очистки этого класса натуральных красителей.

Очистка антоцианов хорошо исследована [149], но обширной информации по очистке бетацианинов нами в научной литературе не было найдено.

3.2.1. Очистка бетацианинов на концентрирующих патронах

Антоцианы и бетацианины даже в заряженных формах обладают «остаточной» гидрофобностью, благодаря множественным дисперсионным взаимодействиям «сорбат-сорбент», что благоприятствует сорбции и на обращенных фазах (п. 3.2). Поэтому концентрирующие патроны, заполненные химически модифицированными силикагелями оказываются приемлемы для очистки и концентрирования антоцианов и бетацианинов, как и для их определения методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Бетанин содержит три карбоксильные группы, которые вместе с зарядом на атоме азота приводят к существованию большого количества различных зарядовых форм, определяющих различие в сорбционных свойствах молекулы, которые могут быть рассчитаны интерактивно на сайте ChemAxon (табл. 3.8). Кажется очевидным, что максимальной липофильностью должна обладать молекула бетанина в изоэлектрической точке, которая для негликозилированного бетанидина находится при $pH=2.4$.

Таблица 3.8 - Расчетные зарядовые состояния бетацианидина при различных значениях pH

№	Зарядовое состояние	pH
1	+2	0
2	+1	0.6
3	0	2.4
4	-1	3.4
5	-2	6.2
6	-3	>13

Экспериментально показано, что максимальная адсорбция бетацианинов наблюдается при рН около 1 (рис. 3.25*a*), снижаясь при повышении рН экстракта (рис. 3.25*б-д*). При сравнении динамической сорбции бетацианинов на КП ДИАПАК С8 и С18 было установлено, что предельная адсорбция оказалась на одном уровне для обоих сорбентов (рис. 3.26), следовательно, для бетацианинов длина привитого слоя не имеет значения. В таком случае можно предположить, о наличии поверхностной сорбции, как наиболее вероятностного механизма. Следовательно, сорбционная емкость будет определяться удельной поверхностью сорбентов, построенных на одной и той же силикагелевой матрице.

Однако, как было установлено впоследствии, сорбенты в патронах ДИАПАК не стандартизируются, поэтому возможна работа с концентрирующими патронами, заполненными, например, С18-фазой, с существенно различающейся сорбционной емкостью.

Так, патроны, заполненные сильносшитыми полистиролом, в одной серии экспериментов обладали наивысшей сорбционной емкостью (рис. 3.27), что не удивительно вследствие высокой удельной поверхности полимерных сорбентов.

Но для одной из партий патронов, заполненных С18 фазой, их сорбционная емкость оказалась существенно более высокой, и даже сопоставимой с сорбционной емкостью полимерных сорбентов (рис. 3.28).

Но в любом случае в предложенных условиях желтые бетаксантины сорбируются значительно слабее красных бетацианинов и могут быть практически количественно разделены с использованием концентрирующих патронов ДИАПАК С18, что определяется по спектрам неударживаемых соединений при динамической сорбции смеси бетацианинов и бетаксантинов (рис. 3.29).

Фракция, обогащенная бетаксантинами, детектируется по электронным спектрам с максимумом светопоглощения при характерной длине волны 469 нм (Гл. 1, табл. 1.4). А затем при постепенном насыщении сорбента наблюдается выход и бетацианинов ($\lambda_{\max}=538$ нм).

Если при сорбции бетацианинов не выходить за пределы, за которыми начинается проскок бетацианинов, то возможно полное разделение бетацианинов и бетаксантинов.

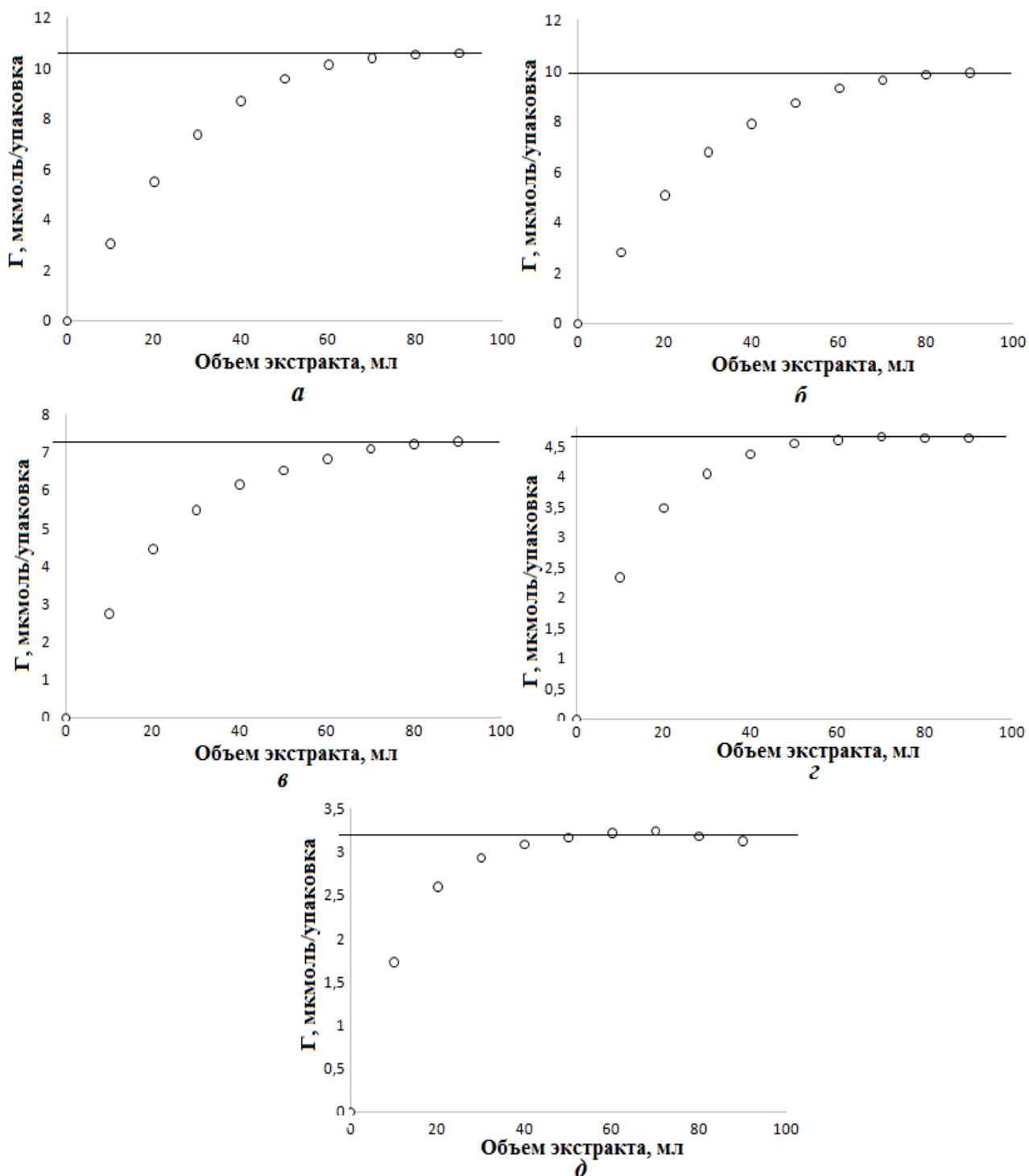


Рисунок 3.25 - Динамическая сорбция экстрактов бетацианинов красной столовой свеклы на концентрирующем патроне ДИАПАК С16М при различных рН: *a* – рН = 1.04; *б* – 2.06; *в* – 3.02; *г* – 4.03; *д* – 5.09

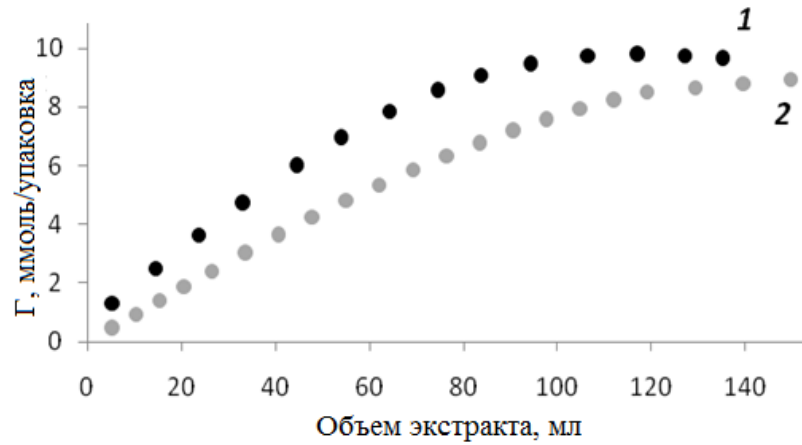


Рисунок 3.26 - Динамическая сорбция бетацианинов на КП ДИАПАК: СФ: модифицированные силикагели - 1 – С8, 2 – С18

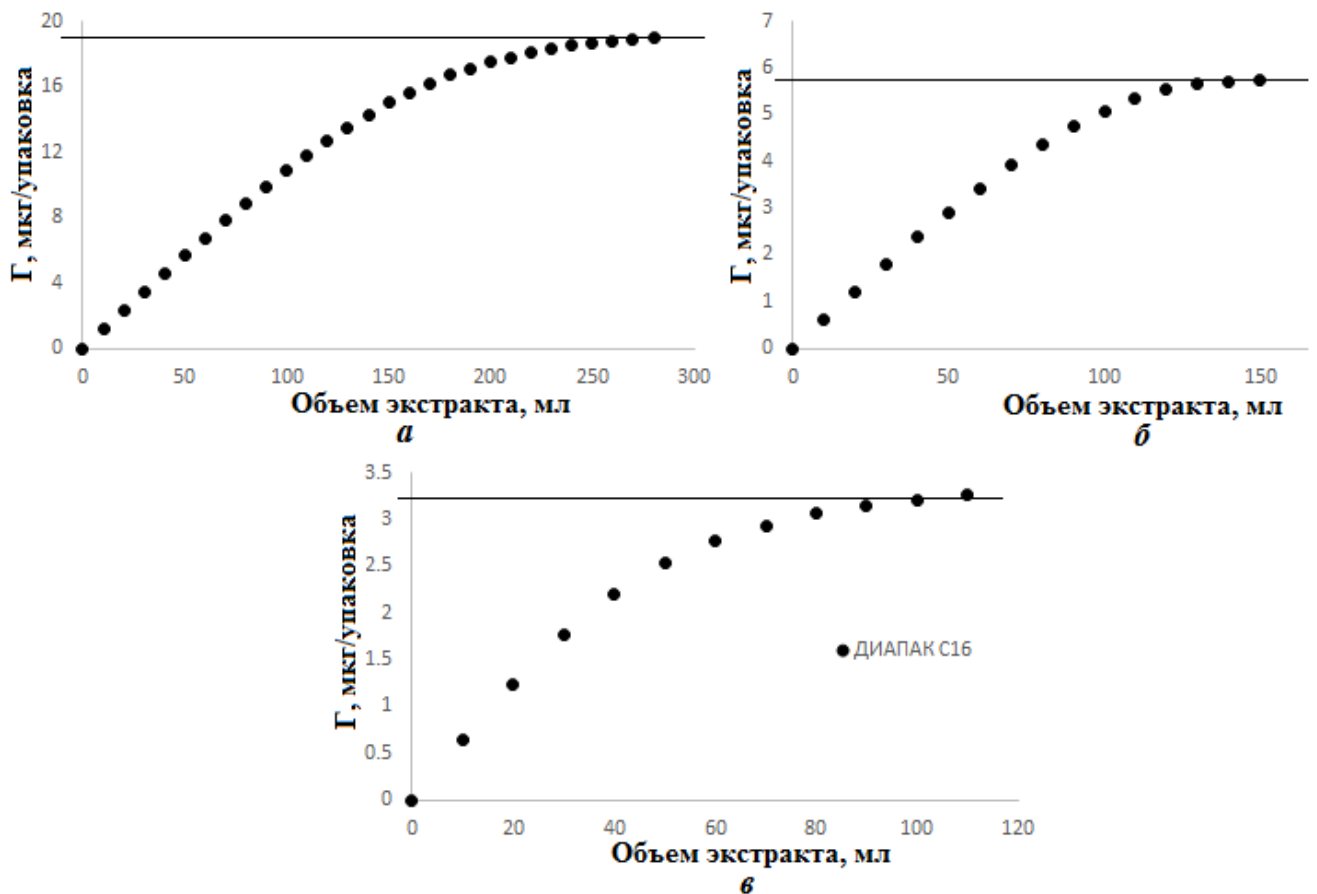


Рисунок 3.27 - Динамическая сорбция бетацианинов из экстрактов с pH = 1 на концентрирующих патронах ДИАПАК трех марок: а – ДИАПАК П; б – ДИАПАК С18; в – ДИАПАК С16

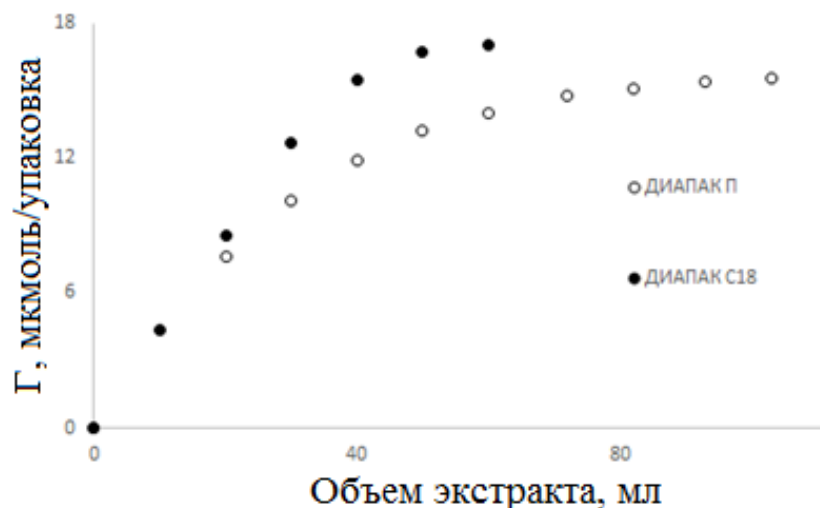


Рисунок - 3.28 - Динамическая сорбция бетацианинов на КП ДИАПАК С18 (●) и П (○). Концентрация бетацианинов в начальном экстракте $7.9 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

При этом полнота извлечения бетаксантиновой фракции при твердофазной экстракции бетацианинов подтверждается отсутствием соответствующей полосы абсорбции в спектрах реэкстрактов бетацианинов с концентрирующих патронов (рис.3.30).

Появление полосы, характерной для бетацианинов, в спектрах бетаксантинов во времени (рис. 3.20) не случайно: интенсивность этой полосы возрастает со временем, что связано как было указано ранее, с обратимостью процессов конденсации и с возможностью переконденсации бетаксантинов с цикло-ДОФА (п. 3.1.4).

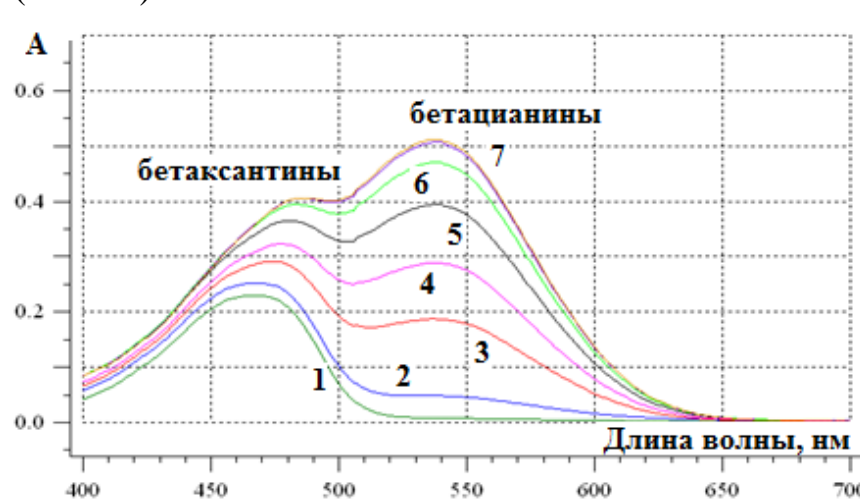


Рисунок 3.29 - Спектры последовательных элюатов (от 1 до 7) при динамической сорбции беталаиновых пигментов на стационарной фазе С18

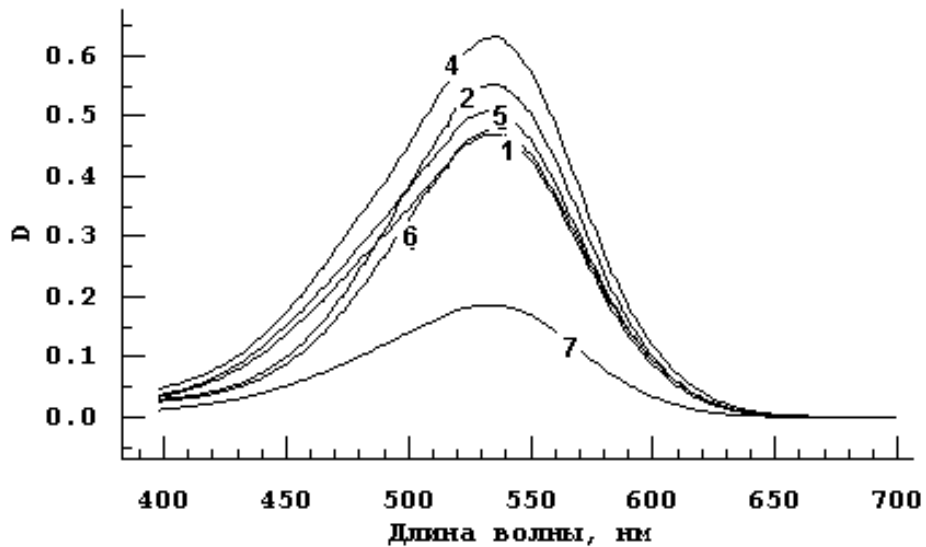


Рисунок 3.30 - Спектры растворов очищенных бетацианинов

Номера сортов см. рис. 3.13

Для подавления гидрофобной сорбции бетацианинов на обращенно-фазовых сорбентах в подвижную фазу следует добавить водорастворимый органический модификатор, что позволяет легко десорбировать (совместно с концентрированием) сорбированный краситель, получая очищенный продукт.

Для определения оптимальной концентрации органической добавки исследовали динамическую сорбцию экстракта бетацианинов с добавками этанола (рис. 3.31).

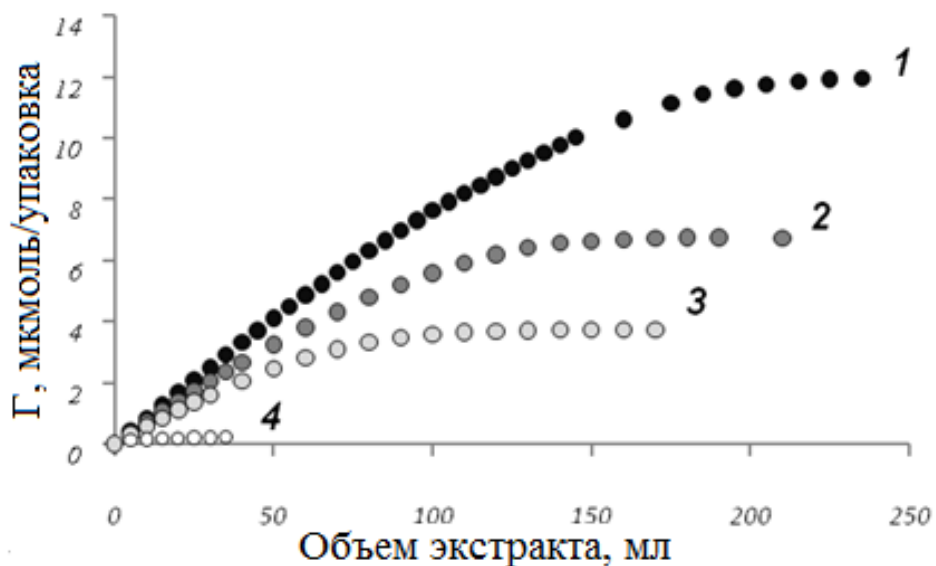


Рисунок 3.31 - Динамическая сорбция экстракта бетацианинов на C18 фазе.

Доля этанола в 0.1M водном растворе HCl: 1 – 0 %, 2 – 1 %, 3 – 2 %, 4 – 10 %.

Как следует из представленных данных, небольших (несколько процентов) добавок этанола достаточно для существенного ослабления сорбции бетацианинов. Поэтому для десорбции сорбированных на патронах красителей достаточно использовать в качестве экстрагента 0.1 М водный раствор соляной кислоты с добавкой более 10% этанола.

Таблица 3.9 - Твердофазная очистка бетацианинов на КП ДИАПАК С18

С бетацианинов ДО очистки, мкмоль/л	С бетацианинов после очистки, мкмоль/л	Потери бетацианинов В процессе очистки, %
9.3	9.1	2.2
7.8	7.5	3.8
5.5	5.2	5.5
0.12	0.11	8.3
0.08	0.07	12.5

В случае предложенного способа очистки потери бетацианинов составляют от 2 до 13 % (табл. 3.9), что связано с разрушением красителя во времени, причем степень распада тем выше, чем меньше его концентрация в растворе.

3.2.2. Очистка антоцианов и бетацианинов на бентонитовых глинах

В серии исследований, выполненных в НИУ БелГУ, было показано, что монтмориллонитовые (бентонитовые) глины, обладающие отрицательным зарядом пакетов, состоящих из октаэдрического металл-гидроксидного слоя, закрытого сверху и снизу тетраэдрическими кремний-кислородными тетраэдрическими слоями, с гетеровалентным замещением (Al^{3+} на Mg^{2+} в октаэдрическом слое), обеспечивающим появление заряда пакета, являются эффективными сорбентами для антоцианов. Можно было бы предположить, что они могут сорбировать и бетацианины, при условии, что последние переведены в катионное состояние.

На рис. 3.32 представлены результаты определения предельной сорбции бетацианинов на природной глине (ПГ) в статическом режиме при различных значениях рН растворов, содержавших одинаковую начальную концентрацию бетацианинов ($8.1 \cdot 10^{-5}$ моль/л). Поэтому можно сделать вывод о том, что сорбция BC^+ осуществляется по электростатическому механизму.

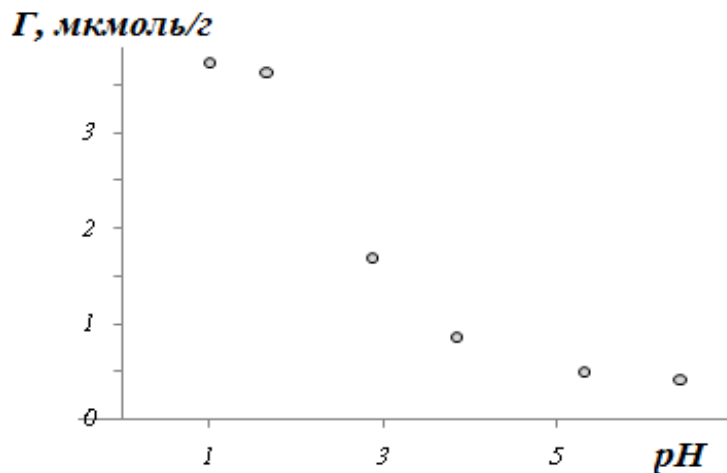


Рисунок 3.32 - Зависимость адсорбции бетацианинов на природных глинах от рН

Максимальная адсорбция бетацианинов наблюдается только из сильно подкисленных растворов ($\text{pH} \leq 1$), где диссоциация карбоксильных групп подавляется, и молекулы красителя приобретают положительный заряд (BC^+).

Десорбции бетацианинов с глин осуществляется растворами, содержащими добавки этанола (как и в случае антоцианов [163]). Десорбция объясняется сжатием двойного электрического слоя, что подтверждается снижением ξ -потенциала поверхности глины (рис. 3.33) и, как следствие, подавлением ионных взаимодействий.

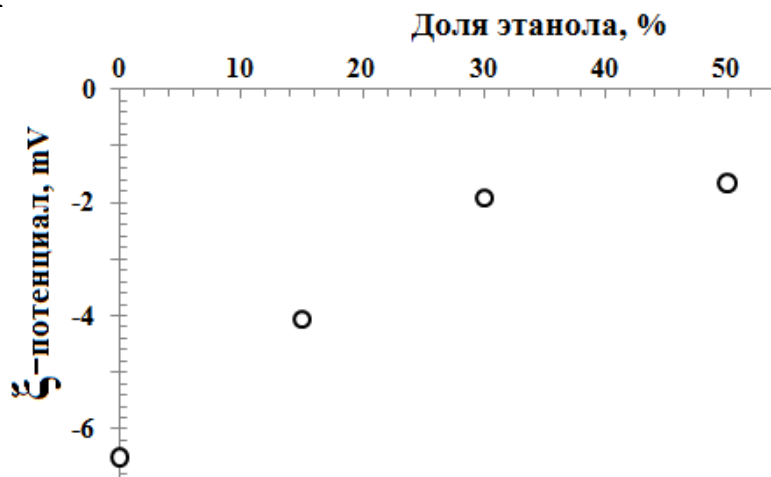


Рисунок 3.33 - Изменение ξ -потенциала поверхности глины в растворах с разным содержанием этанола

Отметим, что небольшая абсолютная величина ξ -потенциала не удивительна вследствие того, что в экспериментах использовали растворы с высокой ионной силой (растворы с рН около 1), сжимающей диффузный слой.

3.3. Определение антоцианов и бетацианинов с использованием ВЭЖХ

3.3.1. Особенности ОФ ВЭЖХ антоцианов

3.3.1.1. Влияние состава элюента на качество хроматограмм при разделении антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ

Для разделения антоцианов водно-органические подвижные фазы (ацетонитрилл-вода, метанол-вода) подкисляют для создания среды, благоприятствующей существованию флавилиевой формы антоцианов. Обычные подвижные фазы включают смеси воды и ацетонитрила, подкисленные различными кислотами или их смесями: муравьиной, уксусной, трифторуксусной, хлорной и орто-фосфорной (п. 1.4.5). При удалении или замене одного из компонентов в такой элюентной системе возможно изменение селективности при хроматографическом разделении антоцианов, но выбор кислоты обычно никак не объясняется в известных нам публикациях.

В настоящей работе проведено сопоставление двух элюентных систем:

- система 1, в которой подвижная фаза подкислена фосфорной кислотой,
- система 2 подкислена муравьиной кислотой.

В обоих случаях элюент подкисляли кислотами (0.5 об.% по ортофосфорной кислоте и 10 об.% по муравьиной кислоте) до достижения близких рН (порядка 1.5), обеспечивающих существование антоцианов преимущественно во флавилиевой форме. Разделение проводили на одной и той же стационарной фазе (Symmetry C18) при одной и той же температуре (40°C); в качестве метчика мертвого времени использовали урацил.

Для обеих систем выявлена прямолинейная зависимость логарифма фактора удерживания для цианидин-3-гликозида от объемной доли органического модификатора (рис. 3.34) в соответствии с уравнением Снайдера:

$$\log k_{\varphi}(i) = \log k_{\omega}(i) - S(i) \cdot \varphi, \quad (3.10)$$

где $k_{\varphi}(i)$ – фактор удерживания цианидин-3-гликозида при определенной объемной доли ацетонитрила (φ); $\log k_{\omega}(i)$ и $S(i)$ – константы.

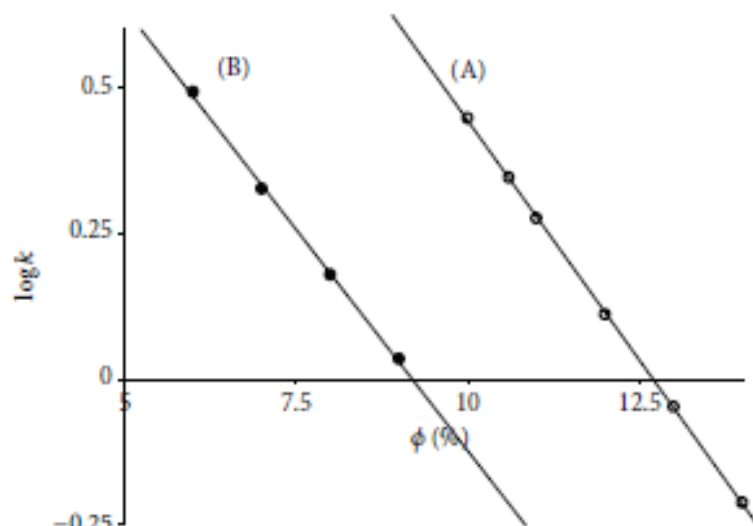


Рисунок 3.34 - Графики Снайдера для двух элюентных систем с различными подкислителями для водно-ацетонитрильных смесей: А - 0.5 об.% H_3PO_4 ; В – 10 об.% HCOOH

По представленным данным замена муравьиной кислоты на фосфорную приводит к резкому увеличению удерживания цианидин-3-глюкозида. Компенсировать рост удерживания возможно уменьшением объемной доли ацетонитрила на $\sim 3.5\%$. Отсюда следует, что элюирующая способность муравьиной кислоты в почти три раза ниже, чем у ацетонитрила.

Параметр $S(i)$ для элюентов 1 и 2 равен 0.162 и 0.150, соответственно. Относительно небольшие различия тангенсов углов наклона прямых для двух рассмотренных подвижных фаз становятся значимыми при переходе к модели, связывающей логарифм фактора удерживания с мольной долей органического модификатора (ацетонитрила) и описываемой соотношением:

$$\log k_c(i) = a - b \cdot \log c(\text{CH}_3\text{CN}), \quad (3.11)$$

где коэффициент b , имеющий смысл числа моль ацетонитрила, высвобождаемого при сорбции сорбата, уже существенно различается для двух вышеприведенных систем (4.50 и 2.60). На основании полученных данных можно сделать вывод о значительной роли муравьиной кислоты в процессах сорбции-десорбции; о наличии гидрофильных взаимодействий между ПФ и анализом и/или сорбентом, что оказывает существенное влияние на селективность разделения.

Сопоставление удерживания анализов в различных хроматографических системах в каком-то случайно выбранном (или в каких-то случайно выбранных) составе подвижной фазы мало информативно, поскольку в других составах подвижных фаз возможно даже изменение порядка элюирования отдельных компонентов смеси. От этого недостатка свободен метод относительного анализа удерживания, в котором удерживание всех компонентов смеси строится относительно из них, выбранного в качестве реперного соединения (Cy-3-Glu) (рис. 3.35):

$$\lg k(i) = a \cdot \lg k(\text{Cy3Glu}) + b. \quad (3.12)$$

Иными словами, в уравнении относительного удерживания используется двухпараметрическая индексация, существенно более общая по сравнению с точечной параметризацией типа индексов Ковача [186]. Отметим, что необходимость учета независимых друг от друга полярных и неполярных взаимодействий предлагается в модели удерживания Долгополова А.М. [187-188].

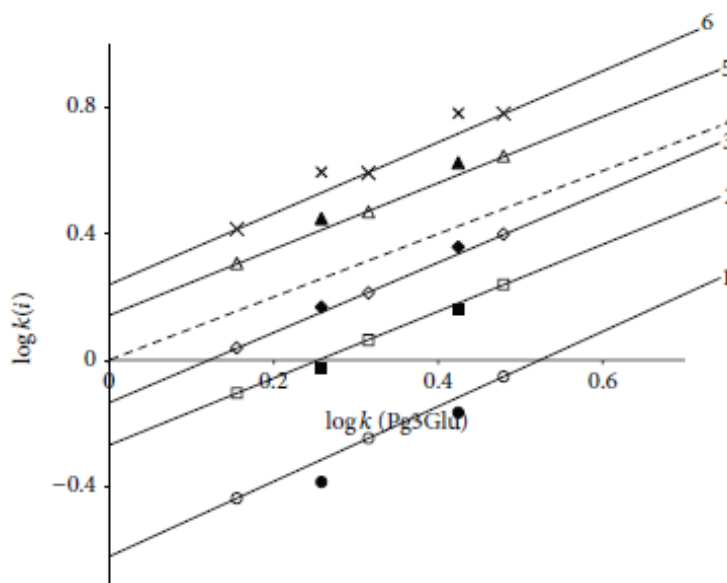


Рисунок 3.35 - Сопоставление карт разделения для шести 3-глюкозидов антоцианидинов в двух элюентных системах

Антоцианы: Dp3Glu (1), Cy3Glu (2), Pt3Glu (3), Pg3Glu (4), Pn3Glu (5) и Mv3Glu(6)

Система 1 - незаполненные значки; система 2 - заполненные значки

Так при замене 0.5% ортофосфорной кислоты на 10% муравьиную происходит уменьшение относительного (вещество сравнения – Pg3Glu) удерживания гидроксипроизводных антоцианидинов и увеличение – для

соответствующих метоксипроизводных: точки, соответствующие логарифму фактора удерживания мальвидин-3-глюкозида и пеонидин-3-глюкозида в случае муравьиной кислоты ложатся выше прямой для тех же компонентов, что в присутствии ортофосфорной кислоты. Обратная зависимость наблюдается для глюкозидов дельфинидина и цианидина. В связи с этим ПФ, приготовленная на основе муравьиной кислоты, обладает несколько большей селективностью в случае разделения компонентов различной гидрофильности (гидрофобности).

В случае разделения антоцианидинов различной степени гликозирования при использовании ортофосфорной кислоты параметр a из уравнения относительного удерживания может быть использован для предварительной оценки структуры углеводного фрагмента (табл. 3.10), увеличиваясь в ряду «моно-, ди-, триглюкозиды».

Таблица 3.10 - Параметры относительного удерживания 3-гликозидов цианидина

Антоцианы	Система 1			Система 2	
	a	b	R ²	a	b
Цианидин-3-моноголикозиды					
3-галактозид, Cy3Gala	0.983 ± 0.012	-0.122	0.9998	0.976	-0.135
3-глюкозид, Cy2Glu	1	0	-	1	0
3-арабинозид, Cy3Ara	0.941 ± 0.011	0.140	0.9998	0.932	0.141
Цианидин-3-дигликозиды					
3-софорозид, Cy3Sopho	1.130 ± 0.012	-0.251	0,9997	-	-
3-самбубиозид, Cy3Sam	1.112 ± 0.008	-0.063	0,99997	1.148	-0.066
3-рутинозид, Cy3Rut	1.133 ± 0.007	0.084	0,99999	1.131	0.099
3-арабинозилглюкозид, Cy3AGlu	1.126 ± 0.010	-0,137	0,99995	1.138	-0.110
Цианидин-3-тригликозиды					
3-глюкозилрутинозид, Cy3GRut	1.313 ± 0.013	-0.221	0.9997	1.308	-0.235
3-ксилозилрутинозид, Cy3XRut	1.273 ± 0.008	-0.036	0.99996	1.285	-0.057

3.3.1.2. Специфические особенности разделения антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ

При исследовании удерживания антоцианов в условиях обращенно-фазовой хроматографии нами были обнаружены закономерности, характерные как для

распределительного, так и для адсорбционных механизмов, что стало основанием предложения нового гибридного механизма удерживания, названного «поплавочным».

Обычная черта обращенно-фазовой хроматографии – независимость (или слабая зависимость) удерживания сорбатов от положения функциональных групп в молекуле. Поэтому для разделения изомеров обычно рекомендуется использовать нормально-фазовую хроматографию, удерживание в которой благодаря локализованности взаимодействий «сорбат – сорбент» зависит от расположения функциональных групп в молекуле и сорбционно-активных центров на поверхности сорбента.

Если рассмотреть ряд одготипных гликозидов наиболее распространенных антоцианидинов [189-191], как и самих антоцианидинов (рис. 3.36) то порядок их элюирования в условиях обращенно-фазовой хроматографии вне зависимости от состава подвижной фазы или марки стационарной фазы оказывается одним и тем же:

$$t_R(\text{DpGly}) < t_R(\text{CyGly}) < t_R(\text{PtGly}) < t_R(\text{PgGly}) < t_R(\text{PnGly}) < t_R(\text{MvGly}),$$

где Gly – одготипные производные дельфинидина (Dp), цианидина (Cy), петунидина (Pt), пеларгонидина (Pg), пеонидина (Pn) и мальвидина (Mv), соответственно. Изменение строения этих соединений связано с изменением состава кольца Б (Гл. 1, рис.1.5).

Уменьшение удерживания в ряду PgGly – CyGly – DpGly может быть объяснено увеличением гидрофильности сорбатов по мере добавления ОН-групп в кольцо В, а рост в ряду PgGly – PnGly – MvGly, - наоборот, увеличением липофильности по мере добавления СН₃О-групп. При этом вклады этих функциональных групп близки к аддитивным, что характерно именно для распределительного механизма. Гипотеза о распределительном механизме подтверждается и тем, что по нашим данным, сорбция антоцианов ослабевает в ряду С18 – С8 – С4 обращенных фаз (марки Reprosil, рис. 3.37), т.к. при поверхностной сорбции толщина привитого слоя не должна иметь определяющего значения [192].

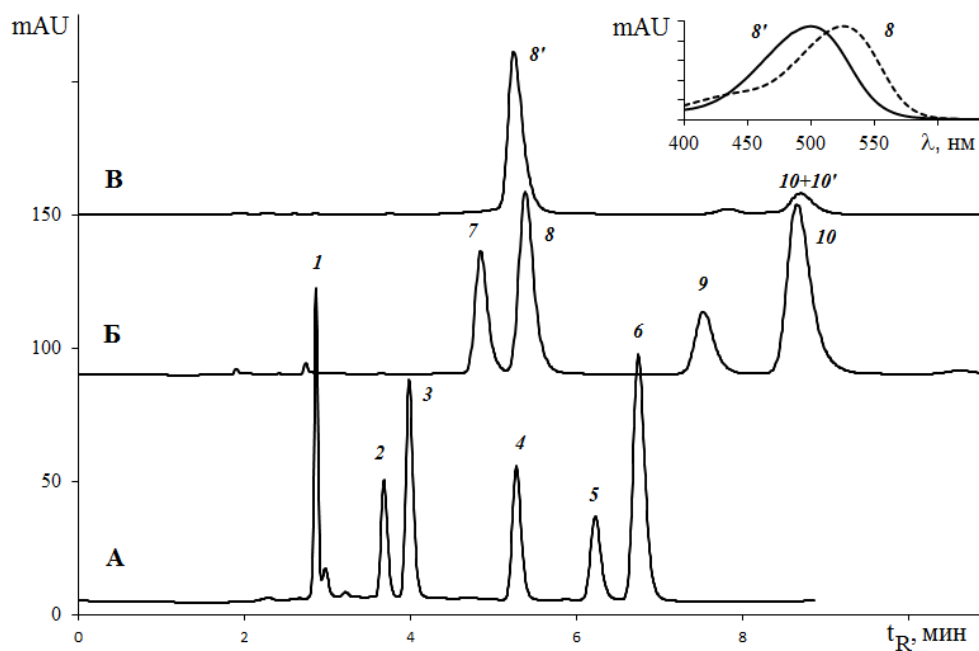


Рисунок 3.36 - Хроматограммы смеси шести антоцианидинов (а), антоцианов черной смородины (б) и цветков альстромерии (в).

Вставка – электронные спектры

Колонка: 4.6 × 250 мм Symmetry C18, 5 мкм. Элюент 17% CH₃CN, 10% HCOOH в воде (а) и 8% CH₃CN, 10% HCOOH в воде (б и в). Вещества: 1 – дельфинидин, 2 – цианидин, 3 – петунидин, 4 – пеларгонидин, 5 – пеонидин, 6 – мальвидин, 7 – дельфинидин-3-глюкозид, 8 – дельфинидин-3-рутинозид, 9 – цианидин-3-глюкозид, 10 – цианидин-3-рутинозид, 8' – 6-гидроксицианидин-3-рутинозид, 10' – 6-гидроксипеларгонидин-3-рутинозид. Колонка: 4.6×250 мм Symmetry C18. 5 мкм. Элюент 17% CH₃CN. 10% HCOOH в воде (А) и 8% CH₃CN. 10% HCOOH в воде (Б и В). Вещества: 1 – дельфинидин; 2 – цианидин; 3 – петунидин; 4 – пеларгонидин; 5 – пеонидин; 6 – мальвидин; 7 – дельфинидин-3-глюкозид; 8 – дельфинидин-3-рутинозид; 9 – цианидин-3-глюкозид; 10 – цианидин-3-рутинозид; 8' – 6-гидроксицианидин-3-рутинозид; 10' – 6-гидроксипеларгонидин-3-рутинозид.

Найденная закономерность справедлива не только при добавлении ОН- и ОСН₃-групп в кольцо В, но может быть распространена и на изменение строения кольца А: введение ОН-группы в положение 6 приводит к примерно такому же изменению удерживания, что и при введении в кольцо В. Поэтому редкие в природе 6-гидроксипроизводные обычных антоцианидинов, синтезирующиеся в популярных в настоящее время цветках *Alstroemeria*, можно обнаружить на хроматограммах экстрактов только по электронным спектрам, поскольку

разделение пар «дельфинидин-3-рутинозид и 6-гидроксицианидин-3-рутинозид», «цианидин-3-рутинозид и 6-гидроксицеларгонидин-3-рутинозид», и т.д. весьма проблематично (рис. 3.36).

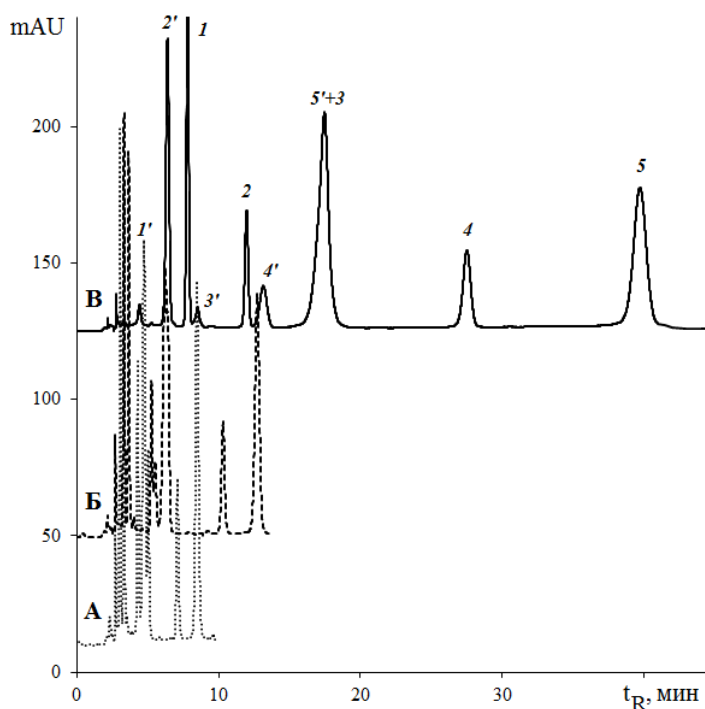


Рисунок 3.37 - Разделение антоцианов плодов винограда гибридного сорта Колонки: 4×250 мм Reprosil-Pur C4 (а), C8 (б) и C18-AQ (в). ПФ 10% CH_3CN , 10% HCOOH в воде. 3-Глюкозиды антоцианидинов: 1 – дельфинидина, 2 – цианидина, 3 – петунидина, 4 – пеонидина, 5 – мальвидина, 3.5-диглюкозиды тех же антоцианидинов обозначены цифрой со штрихом.

Принципиально иной характер изменения удерживания связан с заменой углеводных радикалов. Для двух обычных моногексоз, гликозилирующих природные флавоноиды, - глюкозы и галактозы, - удерживание 3-глюкозидов всегда существенно выше, чем 3-галактозидов любых антоцианидинов. Аналогично, 3-ксилозиды удерживаются существенно сильнее по сравнению с 3-арабинозидами тех же агликонов, что соответствует уже поверхностной сорбции. Следовательно, относительно гликозидной части антоцианов гидрофобное выталкивание ее на поверхность сорбента представляется наиболее вероятным вариантом.

На основании найденных закономерностей удерживания антоцианов можно предположить «поплавочный» механизм: «поплавок» из углеводных радикалов

располагается на поверхности, а связанная с ним флавилиевая часть проникает вглубь привитой фазы (рис. 3.38).

В таком случае для десорбции антоцианов необходимо не только вытеснение флавилиевой части из слоя сорбента, но и снятие гликозидного радикала с его поверхности, что объясняет необычно высокую прочность сорбции хорошо растворимых в воде ионных структур в условиях обращенно-фазовой хроматографии.

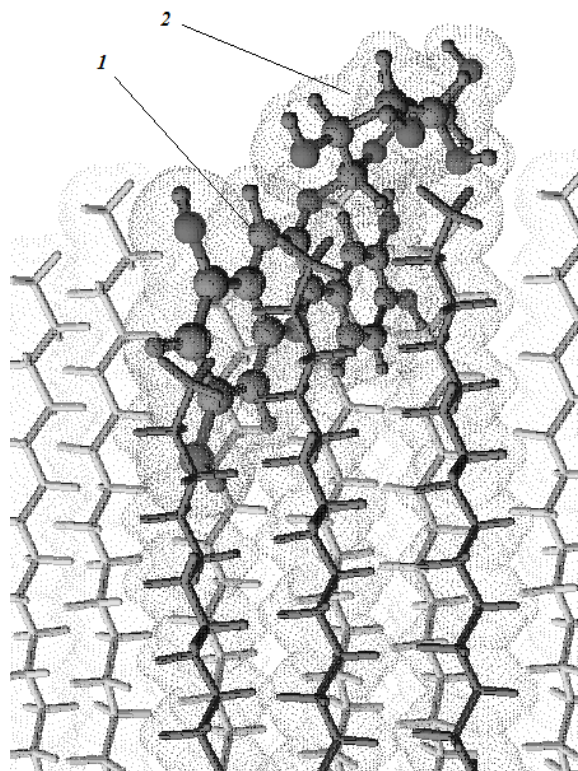


Рис. 3.38 «Поплавочный» механизм удерживания антоцианов: 1 – флавилиевый каркас, 2 – углеводный радикал

Если предложенная модель не лишена основания, то уширение пиков антоцианов не должно зависеть от числа моноз, связанных между собой в одном гликозидном радикале, поскольку непосредственный контакт с гидрофобной поверхностью будет иметь только ближайший к флавилиевой основе углеводный фрагмент. Экспериментально установлено, что число теоретических тарелок для пиков 3-моно-, 3-ди- и 3-тригликозидов цианидина оказывается действительно близким (табл. 3.11). То же справедливо и по отношению к одготипным гликозидам различных антоцианидинов.

Если в структуре молекулы появляются два гликозидных заместителя (например, в положениях 3 и 5), то вероятность десорбции должна существенно измениться (необходимо удалить с поверхности сорбента два «поплавка»), что должно привести к дополнительному снижению эффективности пиков (табл. 3.10). Это значит, что 3,5-диглюкозиды антоцианидинов, могут быть обнаружены на хроматограмме по пикам, существенно более уширенным по сравнению с пиками соответствующих 3-гликозидов.

Таблица 3.10 - Параметры пиков некоторых антоцианов

N	Антоциан*	Время удерживания, t_R , мин	Полуширина пика, мин	Число теоретических тарелок пика, N	Высота эквивалентной теоретической тарелки, H, мкм
1	Dp3G	3.640	0.098	7625	32.8
2	Cy3G	5.036	0.135	7758	32.2
3	Pt3G	6.424	0.169	8048	31.1
4	Pn3G	9.902	0.251	8624	29.0
5	Mv3G	12.861	0.383	6265	39.9
Среднее значение:					33.0
6	Dp3.5diG	2.745	0.136	2254	111
7	Cy3.5diG	3.301	0.122	4063	61.5
8	Pt3.5diG	3.779	0.156	3278	76.3
9	Pn3.5diG	5.374	0.206	3770	66.3
10	Mv3.5diG	6.338	0.339	1935	129.2
Среднее значение:					88.8
11	Cy3Sopho	5.946	0.163	7349	34.0
12	Cy3GRut	7.001	0.202	6660	37.5
13	Cy3XRut	9.343	0.269	6700	37.3
14	Cy3Glu	8.065	0.221	7378	33.9
15	Cy3Rut	10.209	0.287	7047	35.5
Среднее значение:					35.6

* - 3G – глюкозиды; 3,5diG – 3,5-диглюкозиды

3.3.1.3. Исследование качественного состава комплекса антоцианов некоторых растений в условиях ОФ ВЭЖХ

Антоцианы цветков растений семейства Malvaceae. Многие растения семейства мальвовые (Malvaceae) широко используются в качестве декоративных растений благодаря яркой окраске цветков. При этом окраска цветков от красных

до черных определяется биосинтезом в них антоцианов, поэтому цветки некоторых из них можно отнести к нетрадиционным (несъедобным) источникам антоцианов. Отметим, что бутоны одного из видов гибискуса – гибискуса суданского, *Hibiscus sabdariffa*, - используются для получения растительного чая, известного под названием каркаде, с менее известным названием - напиток Клеопатры. Для исследования антоцианов цветков были выбраны традиционные для нашего региона

- двухлетние растения штокроза, *Alcea rosea* L., высокий уровень накопления антоцианов в цветках которых подтверждается существованием сортов этого растений с почти черными цветками (сорта «Шоколад», «черный вихрь» и др.);
- комнатное растений известное под названием роза китайская, к розе на самом деле не имеющее отношения, - гибискус китайский *Hibiscus rosa-sinensis* L.;
- растение гибискус сирийский *Hibiscus syriacus* L. (цветы привезены из Сочи);
- растение гибискус болотный *Hibiscus moscheutos* L. (цветы привезены из Сочи).

При проведенном исследовании оказалось, что все четыре растения накапливают различный набор антоцианов, не совпадающий также и с антоцианами бутонов гибискуса суданского, образованного в основном дельфинидин-3-самбубиозидом и цианидин-3-самбубиозидом [193]. На рисунке 3.39 совмещены хроматограммы экстрактов цветков трех видов растений семейства мальвовые – гибискуса розы китайской, гибискуса травянистого и гибискуса сирийского, записанных в условиях обращенно-фазовой хроматографии. Вследствие указанного различия имеет смысл антоцианы каждого вида рассмотреть отдельно.

Антоцианы цветков гибискуса розы китайской. На хроматограмме обнаруживается только один основной пик. Его электронный спектр ($\lambda_{\max} = 517$ нм, рис. 3.40) практически полностью совпадает со спектром цианидин-3-глюкозида, записанного в тех же условиях. При этом удерживание его существенно меньше, чем цианидин-3-глюкозида из экстракта плодов черной смородины, который предлагался в качестве своеобразного надежного и дешевого

объекта для получения смеси антоцианов, которые могут быть использованы в качестве стандартной смеси [194].

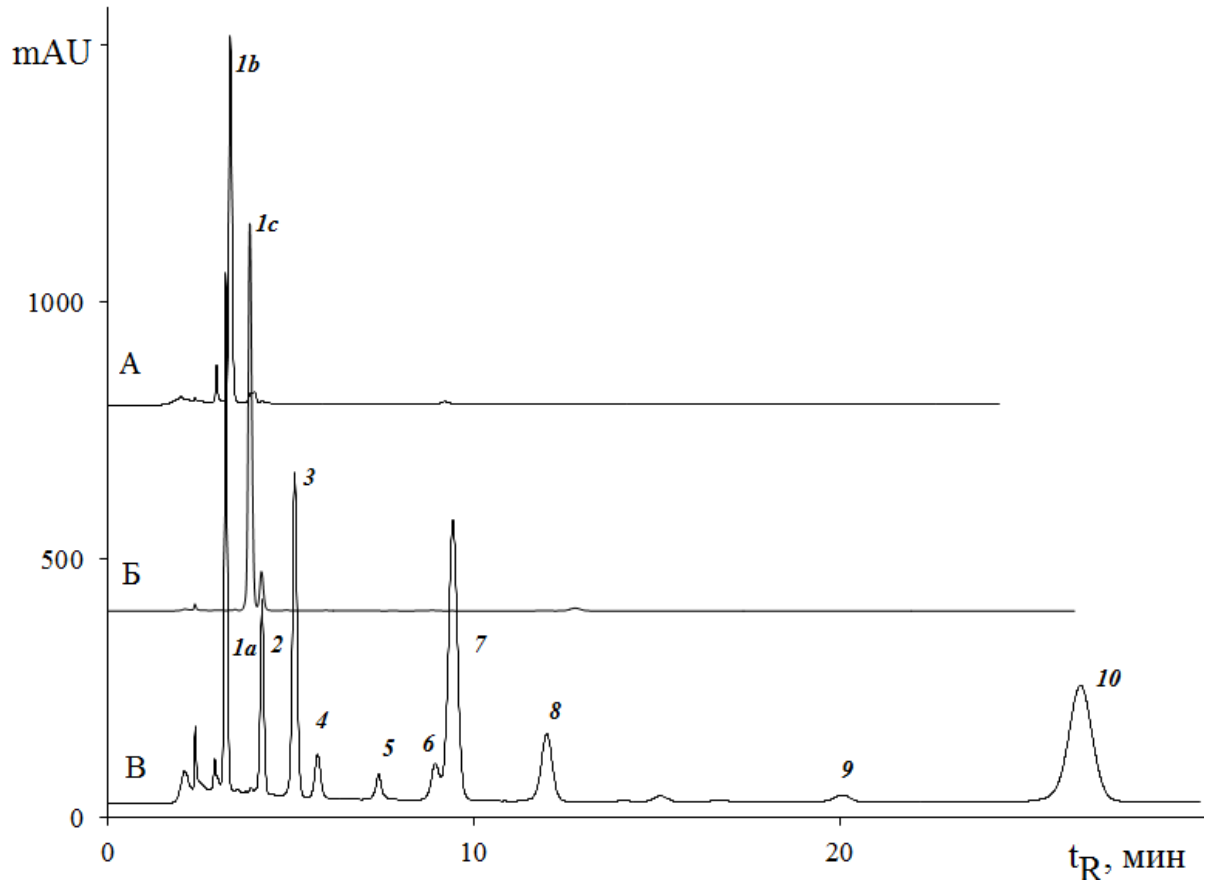


Рисунок – 3.39 Хроматограммы антоцианов цветков трех видов растений семейства мальвовые

Колонка 4.6×250 мм Symmetry C18, 5 мкм. Подвижная фаза 10 об.% CH₃CN, 10 об.% HCOOH в воде, 1 мл/мин; детектор 515 нм. Соединения: 1a – Dp3G; 1b – Cy-3Sopho; 1c – Cy3Sam; 2 – Cy3G; 3 – Pt3G; 4 – Dp3MalG; 5 – Pn3G; 6 – Cy3MalG; 7 – Mal3G; 8 – Pt3MalG; 9 – Cy3MalG; 10 – Mv3MalG.

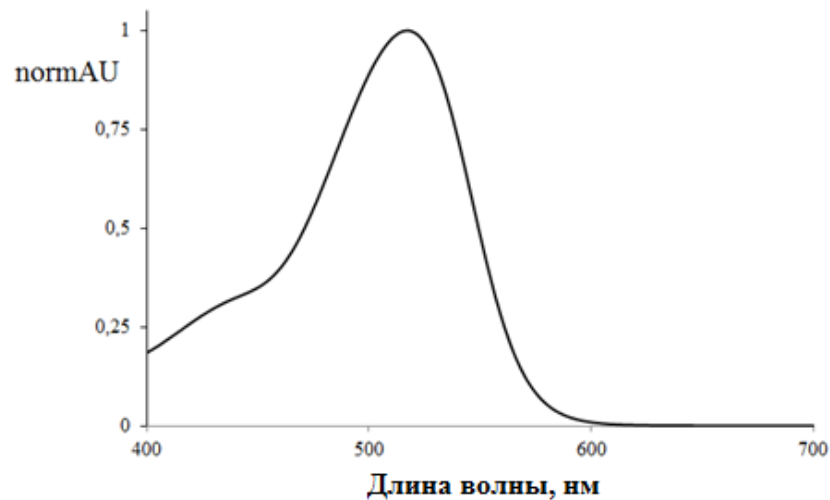


Рисунок 3.40 - Спектр цианидин-3-софроза (условия см. рис. 3.39)

По совпадению удерживания этого вещества с основным антоцианом малины красной [195] можно предположить, что это цианидин-3-софорозид, поскольку для этого соединения добавление глюкозидного радикала в положение 2'' (глюкозидного радикала) цианидин-3-глюкозида мало сказывается на положении максимума абсорбции. Для подтверждения такой гипотезы был записан масс-спектр соединения, записанный в режиме ионизации электрораспылением, представленный на рисунке 3.41.

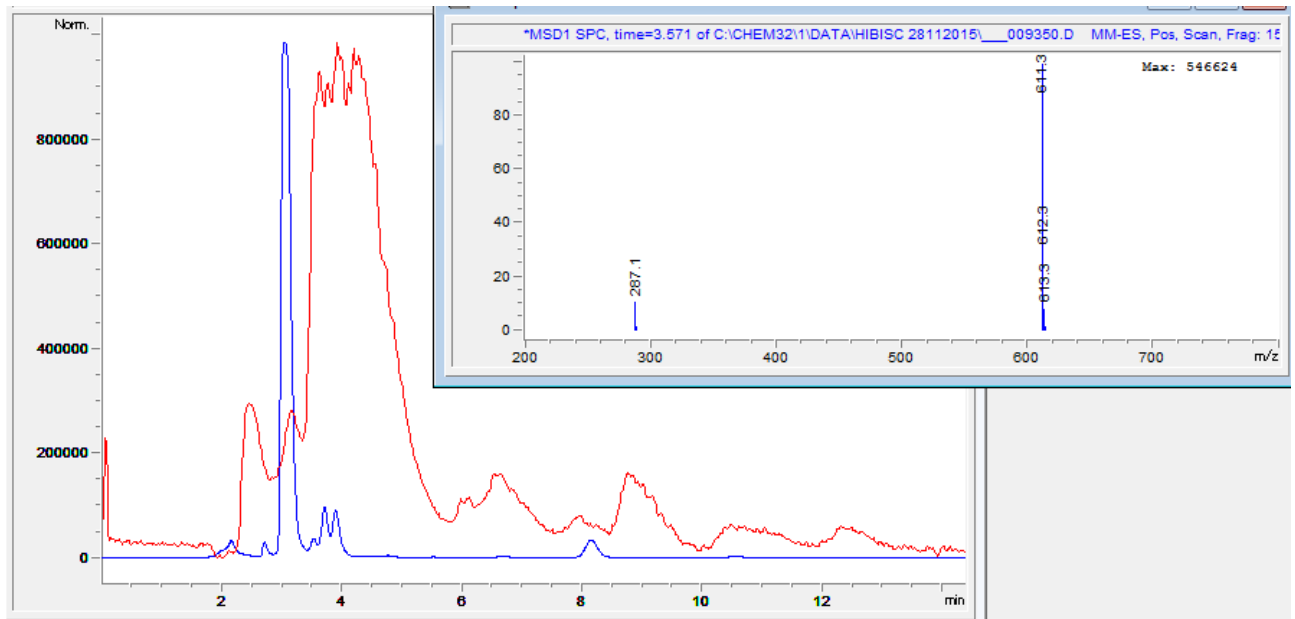


Рисунок 3.41 - Хроматограмма и масс-спектр основного пика экстракта цветков гибискуса розы китайской

И действительно, отношения масса-заряд, равное 611.3 соответствует цианидин-3-дигексозиду, при этом при напряжении на фрагменторе, равном 150 В, обнаруживается и сигнал агликона – цианидина ($M/z = 287.1$).

Таким образом, основной компонент антоцианового комплекса цветков гибискуса розы китайской – цианидин-3-софорозид, что согласуется с известными литературными данными, полученными для растений, выращенных в других регионах мира на других сортах растений [196].

Антоцианы цветков гибискуса травянистого. На хроматограмме экстракта цветков этого растения, отличающихся очень большим размером (при выращивании в Краснодарском крае) обнаруживается также только один

основной пик, но с иным спектром ($\lambda_{\max} = 518$ нм, рис. 3.42), максимум абсорбции в котором смещен батохромено на 1 нм, что согласуется с присоединения по положению 2'' цианидин-3-глюкозида ксилозильного радикала с образованием цианидин-3-самбубиозида.

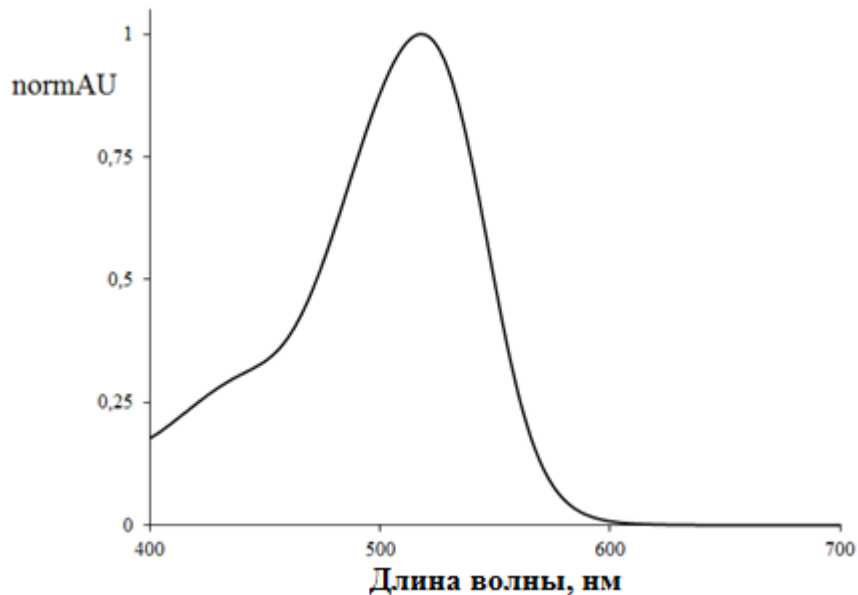


Рисунок 3.42 - Спектр цианидин-3-софроза (условия см. рис.1)

Это подтверждается совпадением пика этого вещества с одним из пиков антоцианового комплекса гибискуса суданского и масс-спектром, записанным при использовании соответствующего детектора (рис. 3.43), на что указывает найденное отношение масса/заряд, равное 581.3.

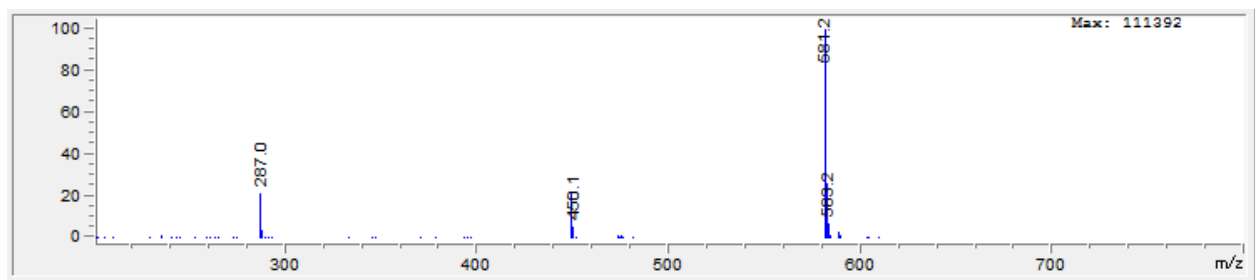


Рисунок 3.43 - Масс-спектр основного пика антоцианов цветков гибискуса болотного

Таким образом, основной пик комплекса в данном случае – цианидин-3-самбубиозид, а меньший пик по удерживанию и по спектральным параметрам совпадает с цианидин-3-глюкозидом.

Антоцианы цветков гибискуса сирийского. На хроматограмме экстракта цветков гибискуса сирийского присутствует уже значительно больше компонентов (рис. 3.39). Пять из них по совпадению пиков с компонентами экстрактов виноградов можно отнести к 3-глюкозидам: 1а – дельфинидин-3-глюкозид; 2 – цианидин-3-глюкозид; 3 – петунидин-3-глюкозид; 5 – пеонидин-3-глюкозид и 7 – мальвидин-3-глюкозид, что подтверждается изменением параметров спектров в этом ряду (рис. 3.44).

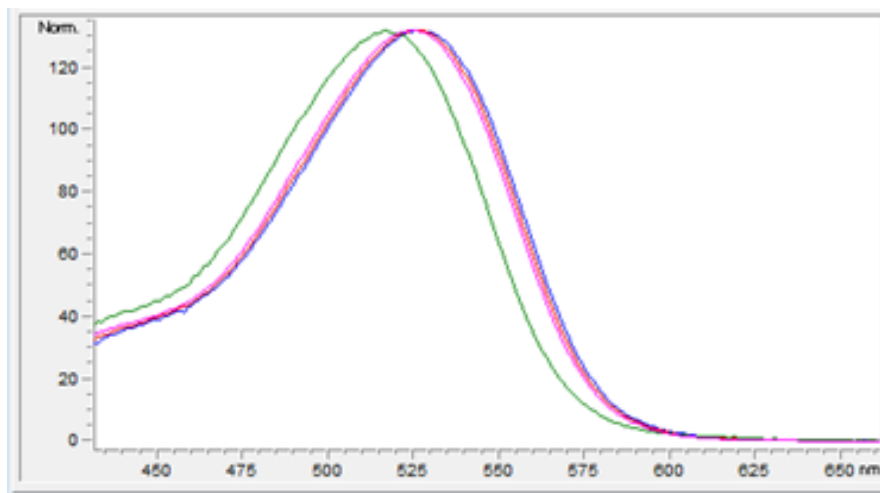


Рисунок 3.44 - Электронные спектры пяти 3-глюкозидов из экстракта цветков гибискуса суданского

На спектрах присутствуют тройка спектров с последовательным батохромным сдвигом вследствие последовательного метилирования ОН-групп кольца В в ряду;

3-глюкозиды дельфинидина – петунидина – мальвидина, и еще один двойной - не различающихся по электронным спектрам 3-глюкозидов цианидина и пеонидина. В этой паре по непонятным причина метилирование гидроксильной группы кольца В не приводит к сдвигу спектра. Полученные данные находятся в соответствии с результатами исследования [197].

Присутствующие на хроматограмме еще 5 компонентов по результатам масс-спектрометрического детектирования определены как метилированные производные тех же антоцианов, т.е. 3-глюкозидов. Масс-спектры некоторых из этих веществ приведены на рисунке 3.45.

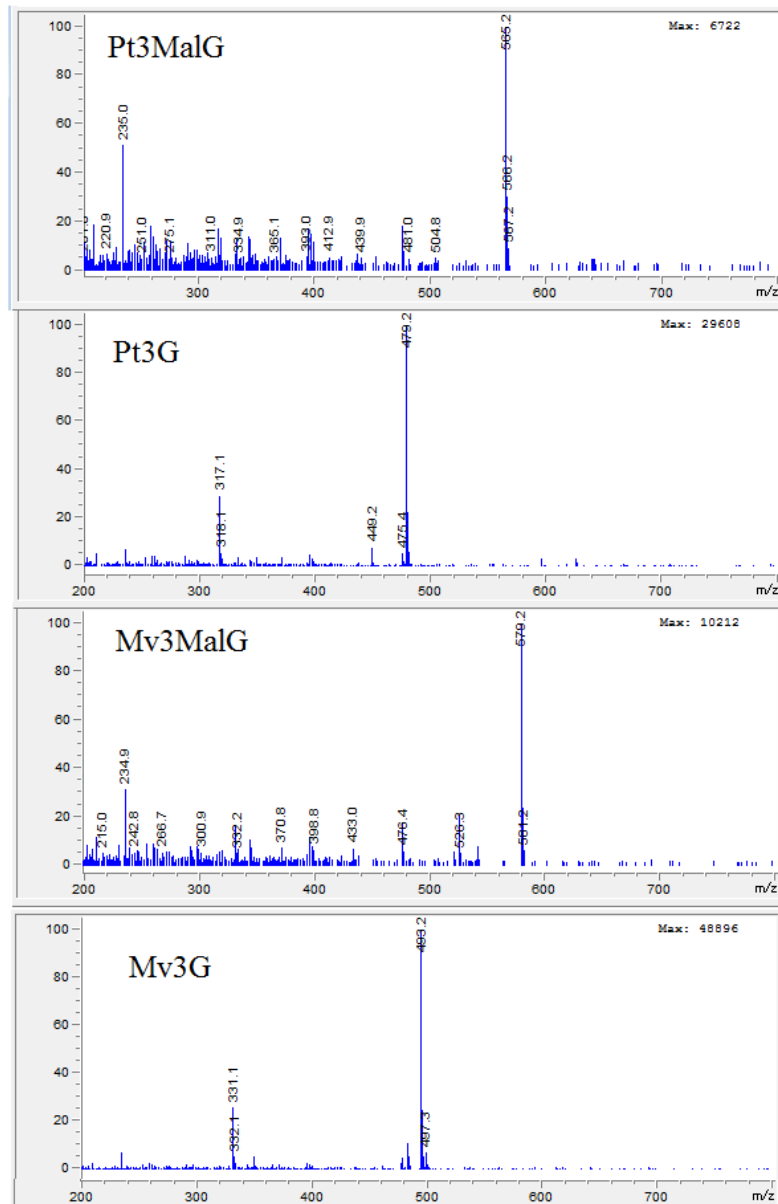


Рисунок 3.45 - Масс-спектры 3-глюкозидов мальвидина и петунидина и продуктов их малонирования

Положение малонирования доступными нам методами определит невозможно, но как следует из последующего материала, наиболее вероятно малонирование 3-глюкозидов б”.

Антоцианы цветков мальвы розовой (штокрозы). На хроматограмме экстракта цветков этого растения найден самый богатый спектр антоцианов, (рис. 3.46), который на самом деле легко поддается идентификации с учетом выполненных выше исследований.

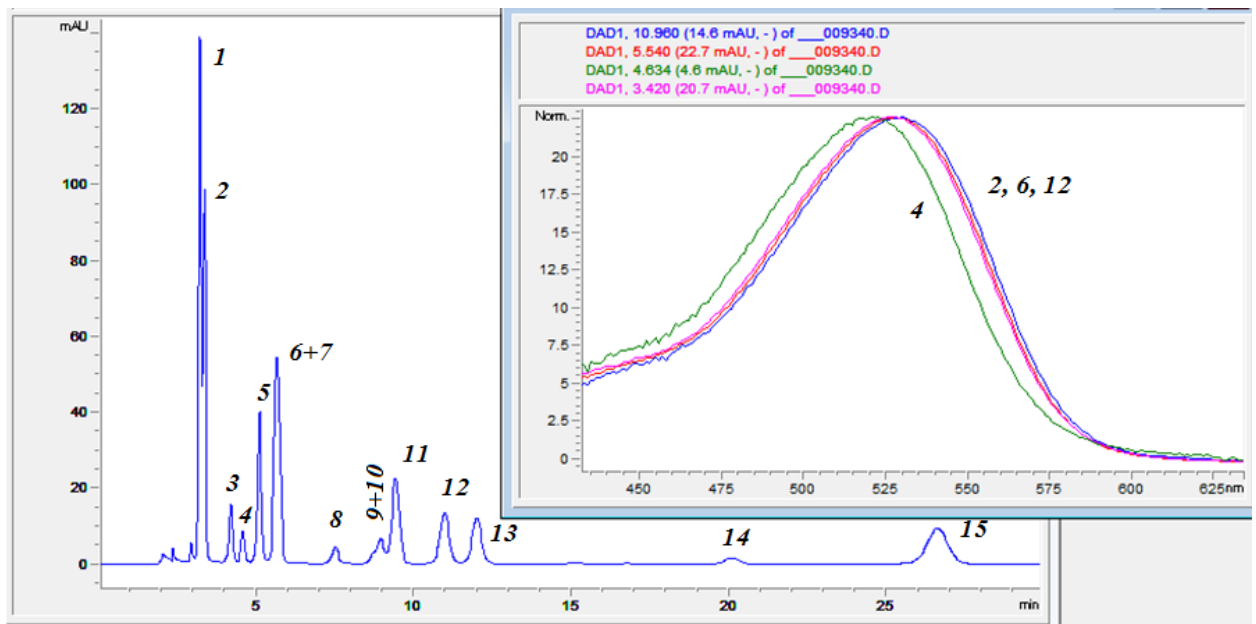


Рисунок 3.46 - Разделение антоцианов цветков штокрозы

Условия как на рис.1. Вещества: 1 – Dp3G; 2 – Dp3R; 3 – Cy3G; 4 – Cy3R; 5 – Pt3G; 6 – Pt3R; 7 – Dp3MalG; 8 – Pn3G; 9 – Pn3G; 10 – Cy3MalG; 11 – Mv3G; 12 – Mv3R; 13 – Pt3MalG; 14 – Pn3MalG; 15 – Mv3MalG.

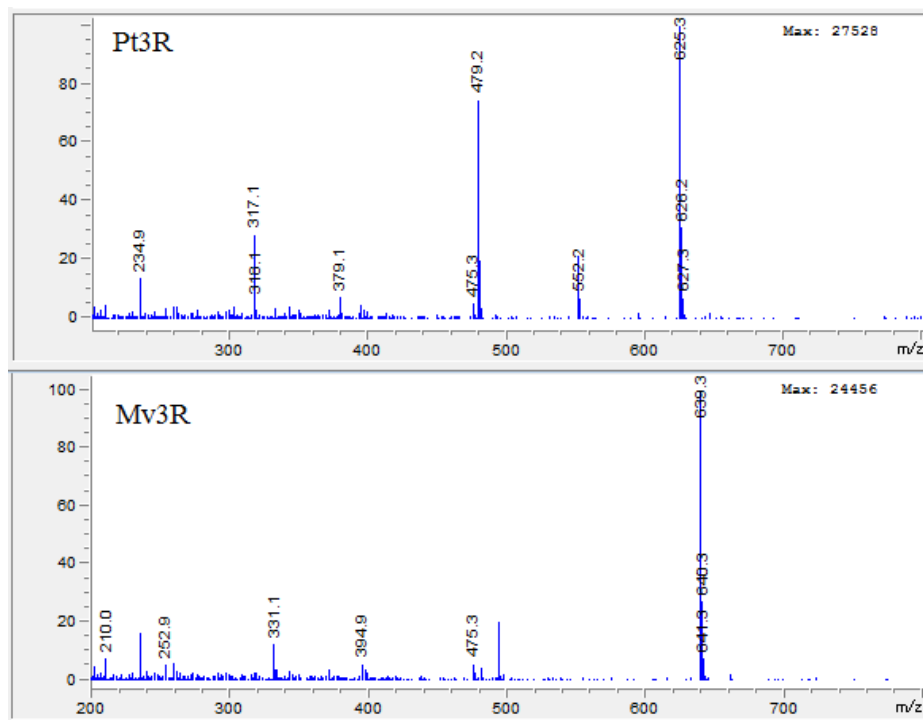


Рисунок 3.47 - Масс-спектры 3-рутинозидов мальвидина и петунидина

Так, во-первых, сопоставление с антоцианами плодов черной смородины позволяет определить 3-рутинозиды дельфинидина и цианидина, что подтверждается батохромным смещением электронных спектров при добавлении

рамнозильного радикала в положение 6'' соответствующего 3-глюкозида, при этом такое же смещение наблюдается и для остальных пар «глюкозид-рутинозид». Во-вторых, такое отнесение подтверждается анализом масс-спектров – для 3 рутинозидов мальвидина и петунидина масс-спектры представлены на рисунке 3.47. В третьих, с учетом того, что переход глюкозид – рутинозид сопряжен с занятием положения 6'' , то становится понятным, почему нет малонированных рутинозидов.

Таким образом, антоцианы штокрозы образованы 3-глюкозидами, 3-рутинозидами и 3-глюкозидами, ацилированными малоновой кислотой пяти антоцианидинов – дельфинидина, цианидина, петунидина, меонидина и мальвидина, что более строго описывает антоциановый комплекс по сравнению с известными данными [198].

3.3.2. Особенности ОФ ВЭЖХ бетацанинов

В молекуле бетацанидина имеется три карбоксильные группы, одна вторичная аминогруппа и заряженный аммониевый фрагмент (Гл. 1, рис. 1.3).

Это приводит к возможности существования 18-ти различных заряженных и незаряженных структур, найденных при интерактивном расчете в текстовом режиме на сайте ChemAxon (рис. 3.39, 3.41).

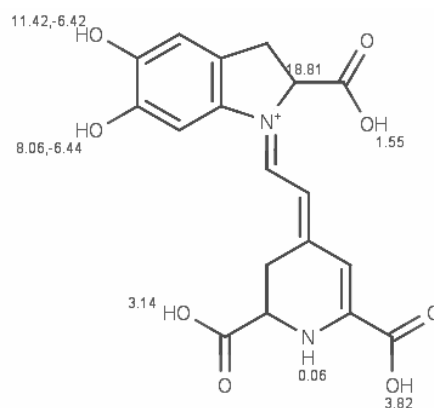


Рисунок 3.39 - Расчетные данные по константам диссоциации функциональных групп бетацанидина

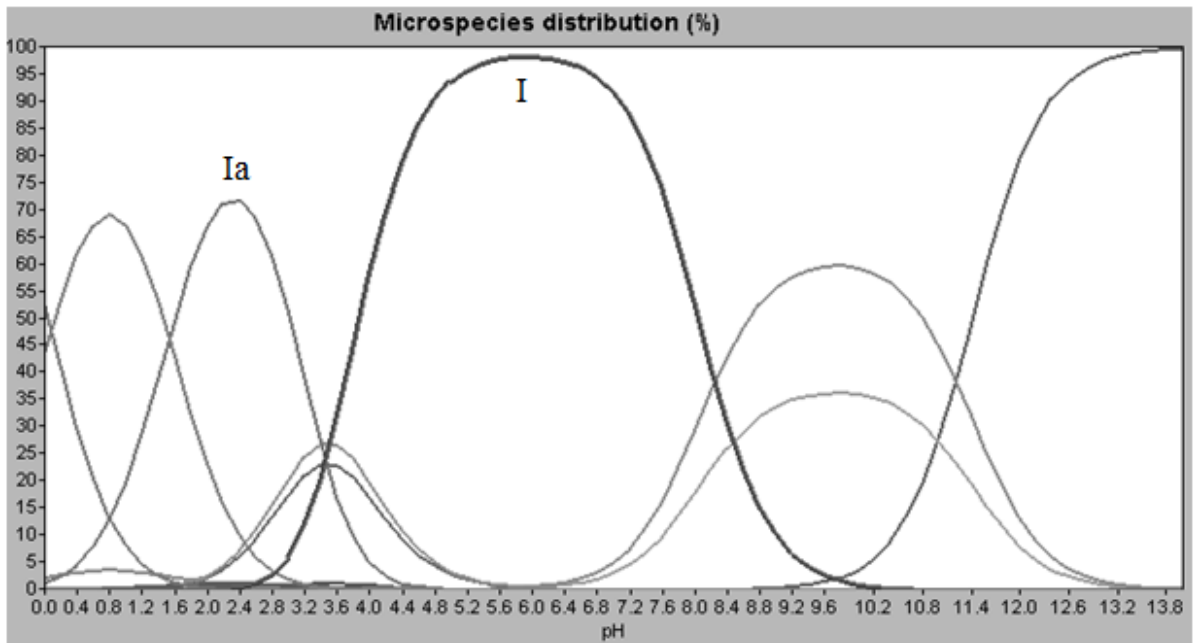


Рисунок 3.40 - Распределение микросостояний бетацианидина при различных рН

Теоретический расчет вклада каждой из возможных форм (выполнен там же) (рис. 3.40) показывает, что при $\text{pH} = 6.0$ доминирующей в растворе является отрицательно двухзарядная форма (рис. 3.41 I), а одна из трех возможных суммарно нейтральных бетацианидиновых форм (рис. 3.41 Ia), оказывается главной в растворе при $\text{pH} = 2.4$. Положительный заряд в молекуле возникает при сильном подкислении до $\text{pH} \sim 0$.

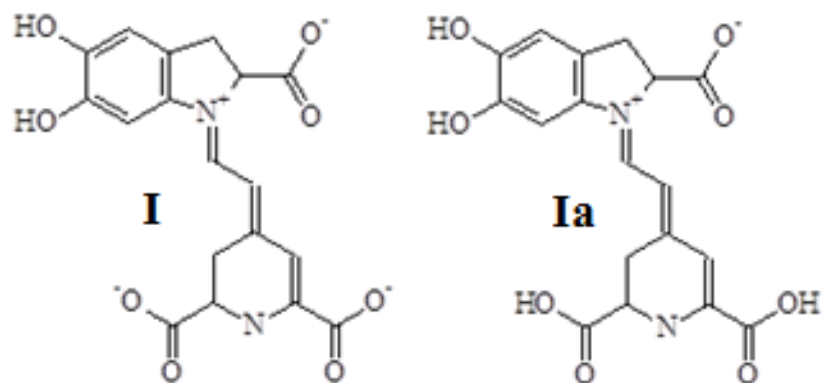


Рисунок 3.41 - Две из 18-ти форм состояния бетацианидина

Знак и величина заряда молекул бетацианинов в растворах с различным значением pH , полученные расчетным путем, подтверждены нами экспериментально методом горизонтального электрофореза (рис. 3.42). Так, при

введении экстракта бетацианинов в ячейку агарозного геля, приготовленного на основе фосфатного буфера с рН 2.4, после подачи соответствующего напряжения образец остается на месте. При повышении рН буферного раствора окрашенное пятно движется в сторону положительно заряженного электрода – анода. Приготовить плотный агарозный гель на основе буфера с более низким значением рН не удалось.

Максимальное расстояние от линии старта соответствует эксперименту с рН 6.2, при котором заряд молекулы -3.

Удерживание аналитов, частицы которых находятся в заряженной форме, в условиях ОФ ВЭЖХ может обеспечиваться их остаточной гидрофобностью, но в любом случае без введения ион-парных добавок максимальное удерживание при прочих равных условиях должно соответствовать подвижным фазам с рН, соответствующим существованию незаряженных форм аналита.

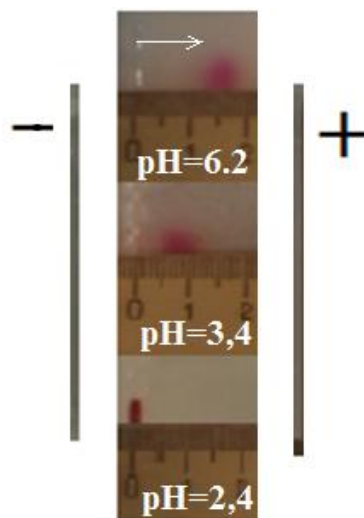


Рисунок 3.42 - Электрофоретическая миграция бетацианинов в агарозных гелях при различных рН (100 мА, 150 В, время миграции 40 мин)

И действительно, в серии экспериментов по исследованию удерживания бетацианинов красной столовой свеклы в элюентах с постоянным содержанием ацетонитрила (7 %), но с различным рН (при одинаковой суммарной концентрации ацетат-ионов и уксусной кислоты – 0.01 М) установлено, что удерживание закономерно снижается с ростом рН (рис. 3.43).

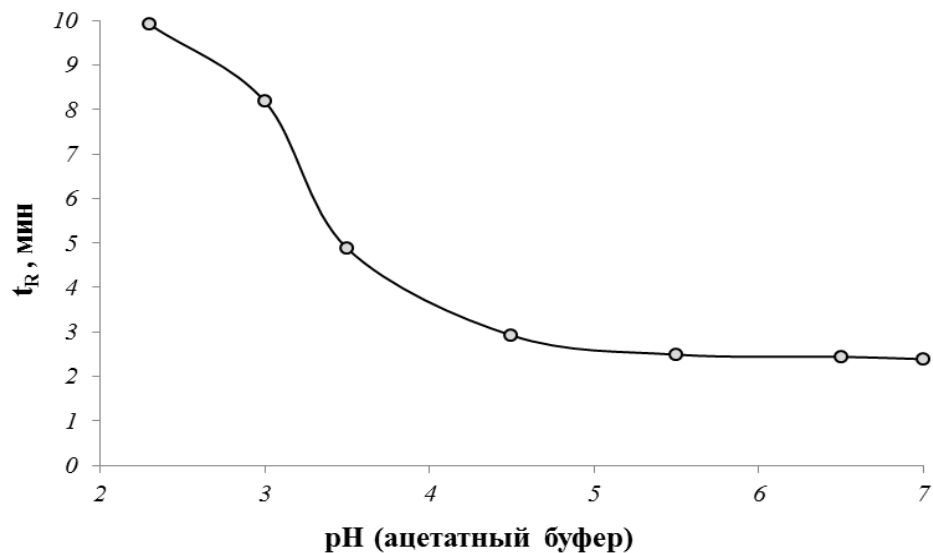


Рисунок 3.43 - Зависимость удерживания бетанина от pH

Колонка: 250×4.0 мм Reprosil-Pur C18-AQ, ПФ: 7 об.% ацетонитрила в 0.01 М ацетатном буфере, 1 мл/мин.

Ход кривой идеально воспроизводит соответствующий участок для соединения Ia (рис. 3.41). Следовательно, для стабильного элюирования производных бетацианидинов необходимы подвижные фазы с достаточно низким значением pH, позволяющим сохранить стабильность стационарной фазы. Поэтому в дальнейших исследованиях в подвижную фазу вводили 2 об. % муравьиной кислоты, обеспечивающей $\text{pH} = 2.1$.

Зависимость удерживания бетанина от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе на ОФ оказывается столь же крутой, как и для антоцианов [199] (рис. 3.44а). При этом удерживание на стационарной фазе Reprosil-Pur C18 оказывается существенно более высоким, чем на стационарной фазе Kromasil 100-5C18 (рис. 3.45).

На всех хроматограммах очищенного экстракта свеклы (рис. 3.45), наблюдается два пика аналитов с идентичными спектрами, которые по литературным данным соответствуют бетанину (1) и изобетанину (2). Но, несмотря на большое различие в абсолютном удерживании бетанина и изобетанина, на двух рассмотренных выше стационарных фазах, удерживание изобетанина относительно бетанина (в единицах логарифма фактора

удерживания) в пределах ошибки эксперимента (± 0.002) описывается одной и той же прямой линией (рис. 3.44б).

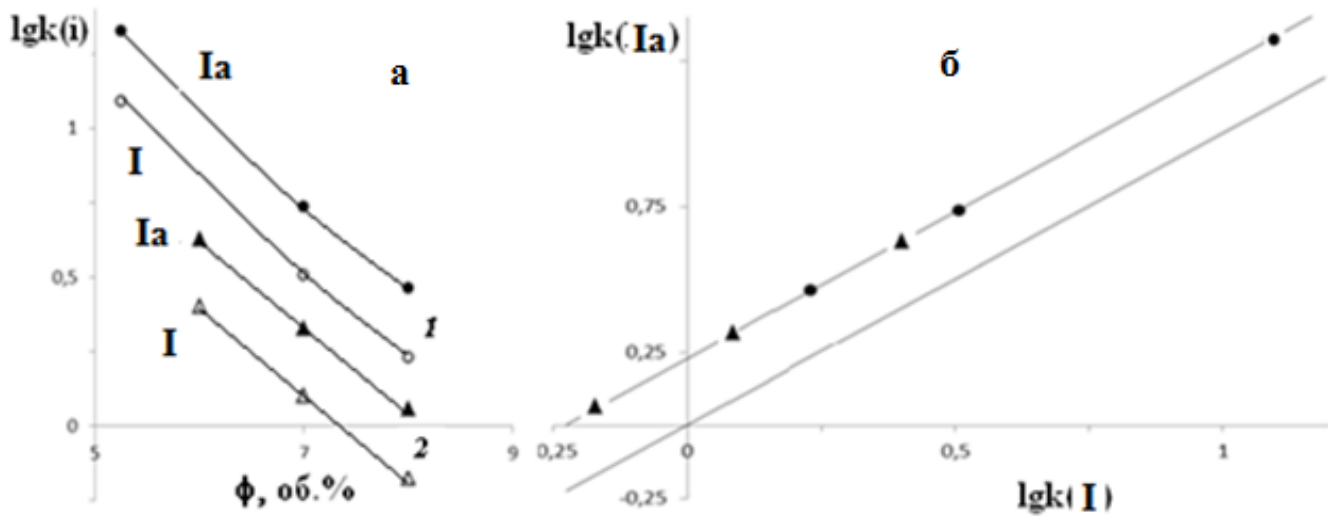


Рисунок 3.44 - Сопоставление параметров удерживания бетанина и изобетанина
СФ: 1 – Reprosil-Pure C18-AQ; 2 – Kromasil 110 5C18

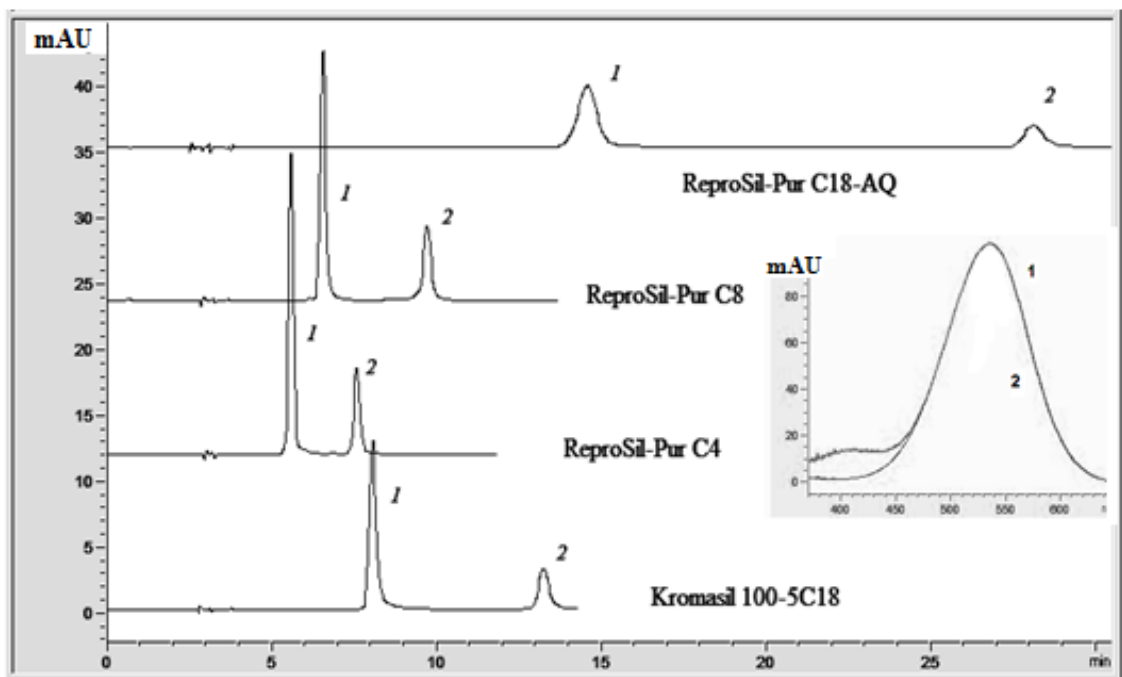


Рисунок 3.45 - Удерживание бетанина и изобетанина на различных обращенных фазах

ПФ: 5.5 об.% CH_3CN 2 об.% HCOOH , 1 мл/мин. 1 – бетанин; 2 – изобетанин.

То, что изобетанин элюируется заметно позже бетанина, представляет особый интерес. Дело в том, что обычно в обращенно-фазовой хроматографии

положение заместителей в молекуле не столь критично, как в нормально-фазовом варианте. Но, строго говоря, это утверждение справедливо тогда, когда в первом случае удерживание обусловлено в основном распределительным механизмом, а во втором - адсорбционным механизмом. Для высокополярных и, тем более, заряженных органических структур проникновение вглубь обращенной фазы маловероятно, поэтому для их удерживания должен быть характерен напоминающий нормально-фазовую хроматографию сольвофобный вариант, предложенный еще в работах Horvath et al [200].

В таком случае возможность упаковки молекулы на поверхности обращенной фазы так, чтобы гидрофильная часть была обращена в сторону элюента, а гидрофобная – в сторону привитых алкильных групп, будет оптимальной для удерживания аналитов. В случае бетанина карбоксильные группы в положении 2 и в положении 15 направлены в различные стороны плоской структуры молекулы, тогда как для изобетанина – в одну (рис. 3.46), что и обеспечивает большее удерживание *изо*-форме. Такое объяснение различия в удерживании полностью согласуется с известными литературными данными по удерживанию продуктов декарбоксилирования бетацианинов [169]: удаление COOH-группы из положения 17 не влияет на порядок элюирования продукта, полученного из бетанина или изобетанина, тогда как после декарбоксилирования в положении 2 различие в удерживании продуктов реакции практически исчезает.

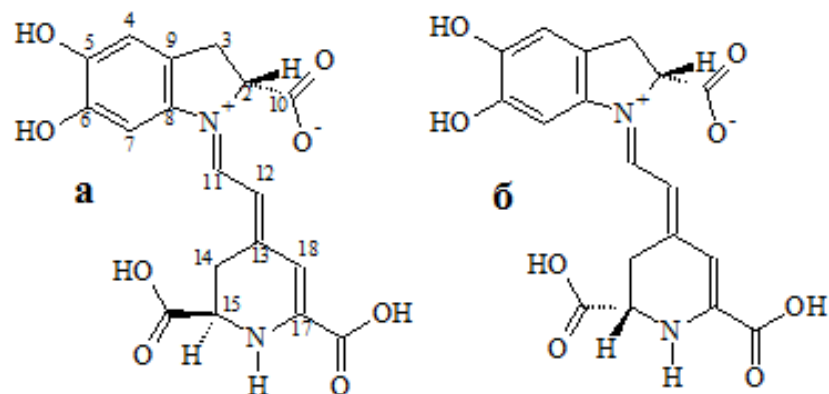


Рисунок 3.46 - Строение эпимеров бетанидина: 1 – бетанидин; 2 - изобетанидин

Необычное соотношение в факторах удерживания бетацианинов на различных марках обращенных стационарных фаз может быть объяснено эффектом коллапса фаз [201].

Действительно, только одна из исследованных нами четырех стационарных фаз (Reprosil-Pur C18-AQ) разработана специально для элюентов с низким содержанием органического модификатора. А существенные проблемы с остальными фазами при низком содержании ацетонитрила могут быть проиллюстрированы, например, необычно длительным дрейфом удерживания бетацианинов на C4-фазе (рис. 3.47).

Кстати, именно по этой причине удерживание бетацианинов на стационарной фазе Reprosil-Pur C18-AQ существенно выше, чем на фазе Kromasil-100 5C18, известной как одной из наиболее гидрофобных коммерческих стационарных фаз при разделении неполярных соединений.

Несмотря на значительное разрушение бетацианинов в растворах с низким значением pH, использование кислых элюентов для их определения в условиях ОФ ВЭЖХ необходимо для получения качественных хроматограмм.

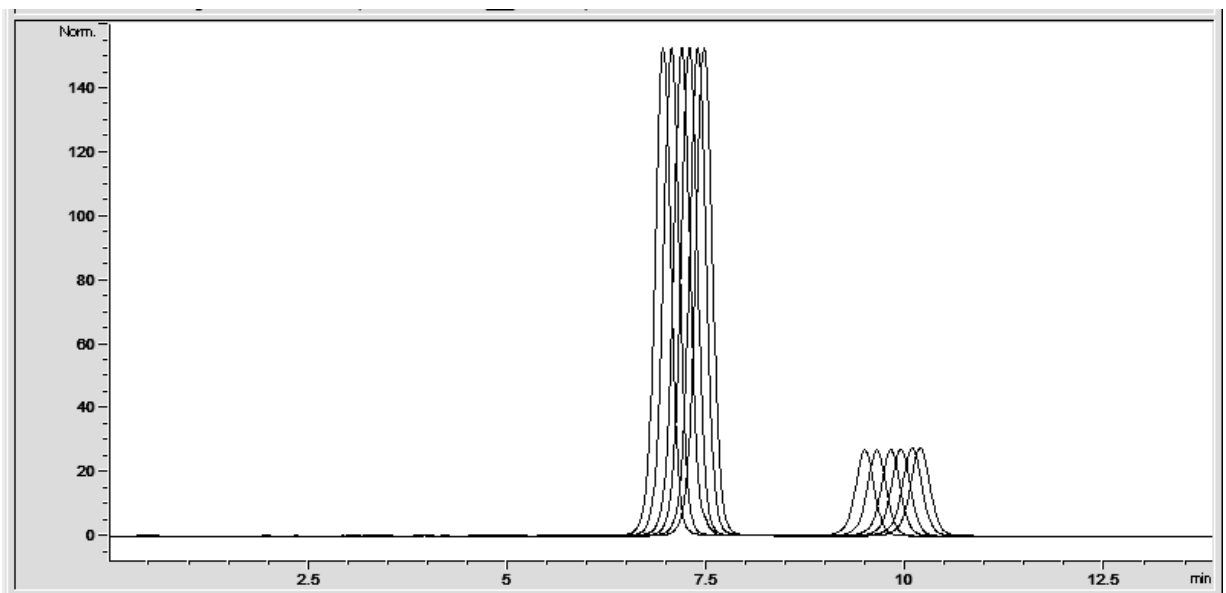


Рисунок 3.47 - Дрейф удерживания бетацианинов на стационарной фазе Reprosil-Pur C4

Подвижная фаза: 4 об.% CH_3CN и 2 об.% HCOOH в воде, 1 мл/мин. Температура термостата колонок 30°C (хроматограммы записаны с интервалом в 30 мин).

Рост рН элюента при определении бетацианинов сопровождается усилением диссоциации карбоксильных групп аналита, а следовательно, появлением отрицательного заряда бетанина, что неизбежно приведет к уменьшению удерживания. Для увеличения удерживания необходимо уменьшить содержание ацетонитрила в подвижной фазе. Но в таком случае для избежания проявления эффекта «коллапса фаз» можно использовать только те стационарные фазы, которые специально разработаны для хроматографирования в подвижных фазах с низкой концентрацией органического модификатора [202]. Отметим, что при рН 5.0 и выше при последовательном вводе одной и той же пробы форма пиков постепенно ухудшается – наблюдаются быстрое уширение и рост затянутости тыла, чего не наблюдается при регистрации хроматограммы при рН 4.0.

Предложенный механизм сорбции бетацианинов подтверждается и тем, что рост рН приводит также к существенному увеличению различия времен удерживания бетанина и изобетанина, поскольку ионизация карбоксильных групп не имеет значения при сорбции изобетанина, а удерживание бетанина будет существенно уменьшаться вследствие уменьшения остаточной гидрофобности.

Для снижения продолжительности времени разделения бетацианинов при рН 4.0 мы использовали градиентный режим элюирования, в котором удалось не только приблизить пик изобетанина к пику бетанина, но и контролировать образование продукта декарбоксилирования бетацианинов (рис. 3.48).

При исследовании бетацианинов методом ВЭЖХ в кислом элюенте быстрая деконденсация бетанина наблюдается и на хроматограммах, что не было обнаружено в известных нам публикациях по данной теме. Так, при детектировании при 538 нм получается обычная хроматографическая картина разделения бетанина и изобетанина (рис. 3.49а). Но тот же образец при детектировании при 405 нм показывает характерный для разрушения одного из компонентов сигнал, начинающийся от пика бетанина, проходящий через минимум и заканчивающийся пиком беталамовой кислоты (рис. 3.49б).

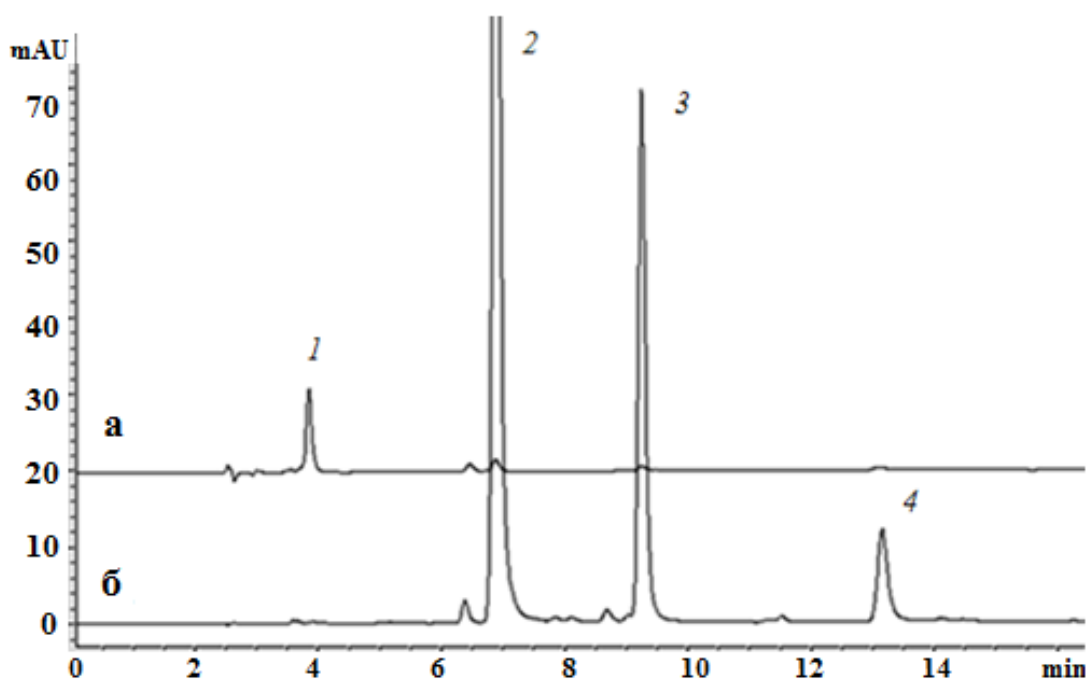


Рисунок 3.48 - Разделение компонентов экстракта на колонке (250×4.0 мм) Reprosil-Pur C18-AQ в условиях градиентного элюирования, записанные при 538 нм (а) и 405 нм (б): 1 – беталамовая кислота; 2 – бетанин; 3 – изобетанин; 4 – продукт декарбоксилирования

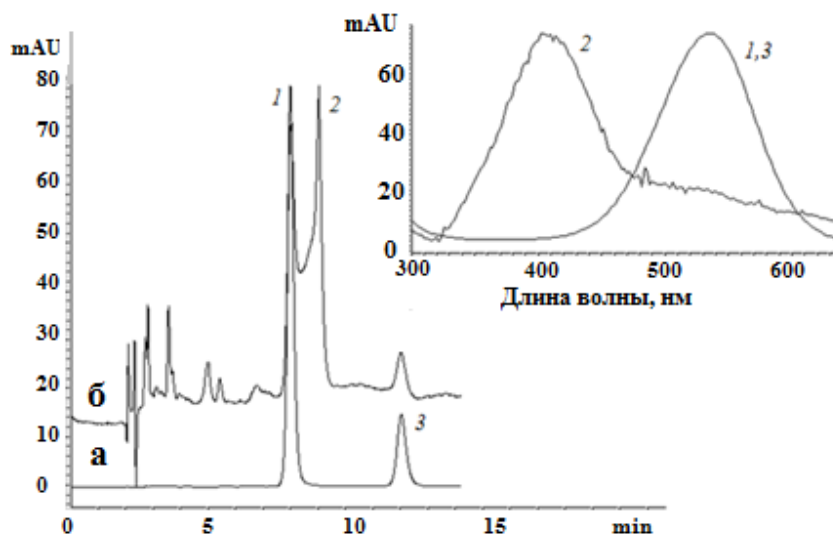


Рисунок 3.49 - Хроматограммы очищенных экстрактов красной свеклы Колонка (250×4.0 мм) Reprosil-Pur C18-AQ с элюентом 2 об % муравьиной кислоты и 7 об.% ацетонитрила в воде (1 мл/мин), записанные при 538 нм (а) и 405 нм (б), и электронные спектры (вставка), записанные в ячейке детектора. 1 – бетанин, 2 – беталамовая кислота, 3 – изобетанин.

Площади пиков довольно быстро уменьшаются при последовательном хроматографировании одного и того же образца, находившегося в закрытом крышечкой флаконе в автодозаторе (табл. 3.11). Это уменьшение не было приборным артефактом, поскольку для антоцианов такого падения не наблюдалось. Это является ещё одним фактом (в дополнение к спектрофотометрическому исследованию продуктов распада бетацианинов (п. 3.1.7), подтверждающему, что причиной уменьшения площадей пиков могло быть только разрушение бетацианинов.

Таблица 3.12 - Изменение площадей пиков бетанина и цианидин-3-глюкозида (%) при последовательном хроматографировании одной и той же пробы с различными значениями рН*

Соединения	рН	Номер вводимой пробы								Погрешности определения
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Бетанин	3.05	100.0	100.2	99.8	99.4	99.0	98.6	97.9	96.7	98.9 ± 0.8%
	4.01	100.0	99.9	99.6	99.3	99.2	98.8	98.7	98.5	99.3 ± 0.4%
	4.95	100.0	101.2	101.1	101.0	101.2	100.5	100.6	100.0	100.7 ± 0.3%
Цианидин-3-глюкозид	2.04	100.0	100.1	100.0	100.1	100.1	100.3	100.4	100.5	100.2 ± 0.1%

*Интервал между вводами пробы 20-25 мин

Для оптимизации условий хроматографирования (которое желательно осуществлять в кислой среде (рис. 3.43) нами рекомендуется образец растворять в элюенте с рН 4 ÷ 5, что улучшает стабильность детектирования. Суммарная погрешность определения не превышает 0.4 %, если за результат определения концентрации бетацианинов в каждом образце брать среднее арифметическое нескольких параллельных измерений (табл. 3.12).

3.3.3. Разделение антоцианов и бетацианинов в условиях гидрофильной хроматографии на диольной стационарной фазе

Отличительной чертой гидрофильной хроматографии является использование полярной стационарной фазы и подвижных фаз, совпадающих по набору компонентов с подвижными фазами для обращенно-фазовой

хроматографии, но с существенно большей долей органического модификатора [203-205]. В настоящей работе использовали диольную стационарную фазу, по характеристикам производителей устойчивую к гидролизу в кислых подвижных фазах. Основная проблема в этом случае состояла в выборе подходящей подвижной фазы.

Первой из хорошо зарекомендовавших себя типов подвижных фаз, широко используемых для определения антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ, нами была исследована система «ацетонитрил – 10 об. % муравьиной кислоты – вода». Но она оказалась малоэффективной – удерживание антоцианов даже при отсутствии воды в подвижной фазе было относительно невелико (рис. 3.50).

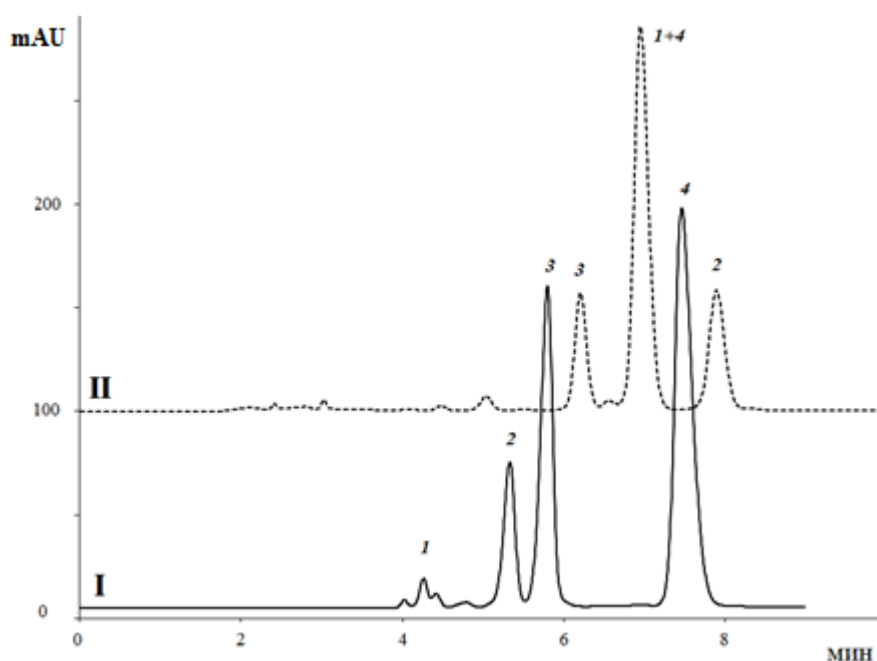


Рисунок 3.50 - Разделение антоцианов плодов красной смородины

I - Колонка: 250×4.6 мм, Kromasil 60-5DIOL, подвижная фаза 90 об. % CH_3CN и 10 об. % HCOOH , 1 мл/мин. II - Колонка: 250×4.6 мм, Symmetry® C18, 5 мкм, подвижная фаза 7 об. % CH_3CN . 10 об. % HCOOH в воде, 1 мл/мин. Антоцианы: 1 – цианидин-3-глюкозид; 2 - цианидин-3-рутинозид; 3 – цианидин-3-самбубиозид; 4 – цианидин-3-(2''-ксилозилрутинозид). Детектор: 515 нм.

Это свидетельствовало о том, что при использовании подвижных фаз данного типа нельзя пренебречь гидрофильными взаимодействиями HCOOH со стационарной фазой и/или с антоцианами (п. 3.2.2.1): оба взаимодействия,

приводят к ослаблению удерживания антоцианов. Отметим, что, тем не менее, в данном случае на хроматограмме обнаруживаются узкие симметричные пики с иным порядком элюирования и с лучшей эффективностью разделения четырех основных антоцианов плодов красной смородины по сравнению с разделением аналогичной смеси в условиях традиционной обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Для увеличения времени удерживания антоцианов можно воспользоваться альтернативным типом подвижной фазы, в которой для достижения необходимого уровня подкисления вместо 10 об. % муравьиной кислоты достаточно добавки лишь 0.5 об. % ортофосфорной кислоты (п. 3.2.2.) И действительно, в элюентах этой системы (ацетонитрил – ортофосфорная кислота – вода) удерживание можно регулировать в больших пределах: при росте концентрации ацетонитрила выше 80 об. % удерживание круто возрастает (рис. 3.51) так что функционально удобными оказываются элюенты, содержащие 80 ± 5 об. % ацетонитрила.

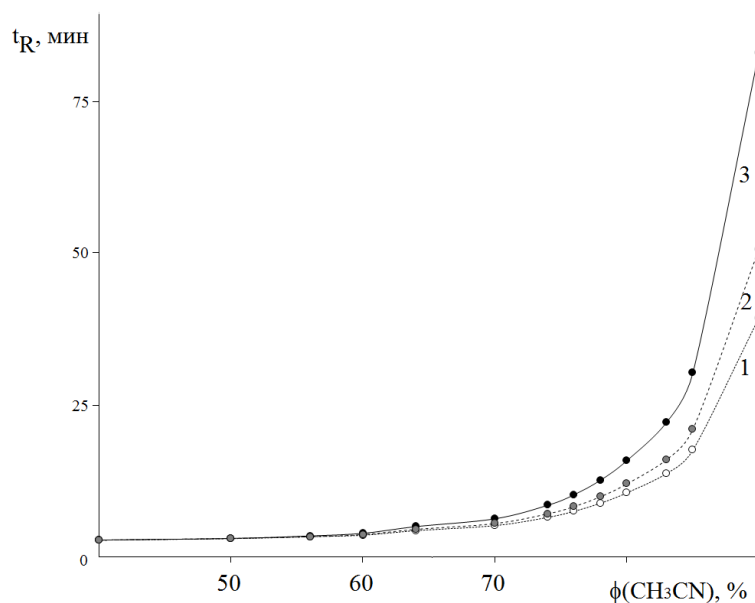


Рисунок 3.51 - Зависимость удерживания трех антоцианов от концентрации CH₃CN (об.%) в подвижной фазе

Колонка: 250×4.6 мм, Kromasil 60-5DIOL, подвижные фазы - системы «CH₃CN – 0.5 об. % H₃PO₄ – вода», 1 мл/мин. Антоцианы: 1 – цианидин-3-рутинозид; 2 – цианидин-3-самбубиозид; 3 – цианидин-3-(2''-ксилозилрутинозид).

Анализ пиков антоцианов в предложенных условиях показал, что эффективность, выраженная числом теоретических тарелок, оказывается сопоставимой и даже несколько более высокой, чем в случае традиционной ОФ ВЭЖХ [206].

Судя по данным, представленным не в виде традиционной кривой Ван Деемтера, а в виде более удобно читаемых табличных данных (табл. 3.13) эффективность хроматографической системы существенно возрастает с уменьшением скорости потока подвижной фазы вплоть до практически неприемлемой (из-за длительности единичного хроматографирования) скорости – 0.25 мл/мин. Это указывает на медленные массообменные процессы внутри пор сорбента. Отметим, что аналогичным свойством (по нашим данным) обладают и обычные для определения антоцианов обращенно-фазовые хроматографические системы.

Для обобщенного анализа хроматографического поведения производных цианидина в условиях ГФХ была проверена линейность относительного удерживания антоцианов в широком спектре составов подвижных фаз «CH₃CN – 0.5 об. % H₃PO₄ - H₂O» (рис. 3.52). Из представленных данных следует, что линейность относительного удерживания сохраняется и для варианта ГФХ, по крайней мере, для использованной хроматографической системы.

Таблица 3.13 - Изменение эффективности пиков антоцианов красной смородины при изменении скорости потока подвижной фазы

№	Вещество	k, фактор удерживания	N, чисто теоретических тарелок пиков веществ при скорости подвижной фазы, мл/мин:			
			1.00	0.75	0.50	0.25
1	Cy-3-Glu	2.16	11878	13698	16043	19455
2	Cy-3-Sam	3.00	12496	14290	16599	20600
3	Cy-3-Rut	3.52	12900	15022	17801	20180
4	Cy-3-(2''XulRut)	4.90	13191	15246	18288	20624

Элюент: «80 об. % CH₃CN, 0.5 об. % H₃PO₄, вода» в условиях ХГФВ

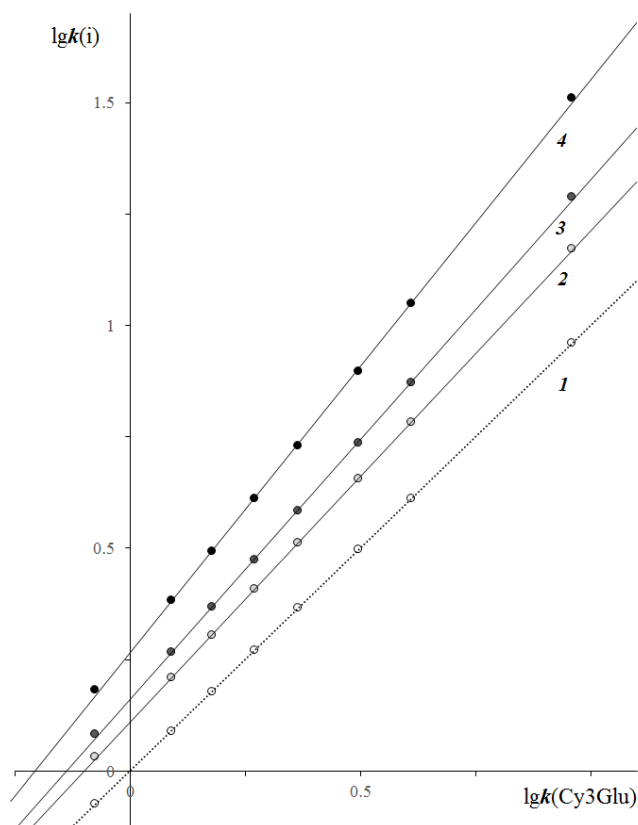


Рисунок 3.52 - Удерживание антоцианов плодов красной смородины относительно Cy3Glu

Условия – см. рис. 3.49. Антоцианы: 1 – цианидин-3-глюкозид; 2 – цианидин-3-рутинозид; 3 – цианидин-3-самбубиозид; 4 – цианидин-3-(2''-ксилозилрутинозид).

Это позволяет определить основные закономерности элюирования антоцианов в широком диапазоне использованной системы подвижных фаз в виде коэффициентов относительного удерживания, где за реперное соединение принят цианидин-3-глюкозид (табл. 3.13):

$$\lg k(i) = a_0 + a_1 \cdot \lg k(\text{Cy3Glu}), \quad (3.13)$$

где $\lg k(i)$ – логарифм фактора удерживания i -го компонента.

На основании проведенных исследований можно утверждать, что для предложенной хроматографической системы:

1) удерживание 3-моноголикозидов цианидина всегда меньше удерживания 3-дигликозидов, и оно еще более увеличивается при переходе к 3-тригликозидам. Это полностью соответствует увеличению числа полярных (гидроксильных) групп во флавилиевом ионе и полярного характера взаимодействия «сорбат – стационарная фаза». В ОФ ВЭЖХ соотношение между удерживанием этих

компонентов зависит от состава подвижной фазы даже для одной конкретной стационарной фазы [207], что неудобно и может привести к погрешностям даже в оценке числа типов антоцианов. Тогда метод ГФХ может служить хорошей альтернативой ОФ ВЭЖХ для предварительного отнесения пиков по типам гликозилирования антоцианидинов.

Таблица 3.14 - Параметры относительного удерживания некоторых производных цианидина в условиях гидрофильной хроматографии

№	Антоциан	Параметры уравнения	
		a_0	a_1
Моногликозид			
1	Цианидин-3-глюкозид	0	1
Дигликозиды			
2	Цианидин-3-рамнозилглюкозид (3-рутинозид)	0.113	1.095
3	Цианидин-3-ксилозилглюкозид (3-самбубиозид)	0.165	1.156
4	Цианидин-3-глюкозилглюкозид (3-софорозид)	0.218	1.278
Тригликозиды			
5	Цианидин-3-ксилозилрутинозид	0.270	1.273
6	Цианидин-3-глюкозилрутинозид	0.320	1.409

Элюенты системы ацетонитрил – 0.5 об.% H_3PO_4 – вода.

2) удерживание увеличивается в ряду однотипных соединений, в которых осуществляется замена радикалов:

рамнозильный → пентозильный → гексозильный.

3) удерживание антоцианов почти не зависит от изомерных различий в строении углеводного радикала:

- 3-глюкозид имеет такое же удерживание, как и 3-галактозид, что было установлено по сопоставлению основных антоцианов плодов черноплодной смородины и брусники,
- а 3-самбубиозид (ксилозилглюкозид) – такое же, как и 3-арабинозилглюкозид, что было найдено при сопоставлении антоцианов плодов красной смородины и калины обыкновенной.

Это удивительно, поскольку способность дифференцировать изомеры присуща именно нормально-фазовой хроматографии с локализованными

полярными взаимодействиями в адсорбционном слое. Следовательно, гидрофильные взаимодействия аналитов со стационарной фазой в ГФХ не имеют столь же локализованный характер, как при сорбции, например, на силикагеле. Если флавилиевый ион не связан жестко с ОН-группами поверхности диольной фазы, то возможно его вращение в сорбционном слое, тогда удерживание определяется не столько ориентацией гидроксильных групп в ионе, сколько их количеством. Вероятно, по этой причине, по нашим данным, 6-гидроксипеларгонидин-3-рутинозид (из экстракта цветков альстромерии) имеет удерживание такое же, как его изомер – цианидин-3-рутинозид. Более того, бетанин и изобетанин, чье легкое разделение в условиях ОФ ВЭЖХ связано с дифференциацией липофильности одной из плоскостей изобетанина (но не бетанина, рис. 3.46), вследствие нежесткой связи с сорбентом в условиях ГФХ уже не разделяются. При этом бетанины имеют меньшие времена удерживания по сравнению с содержащими большее количество ОН-групп амарантинами (рис. 3.53).

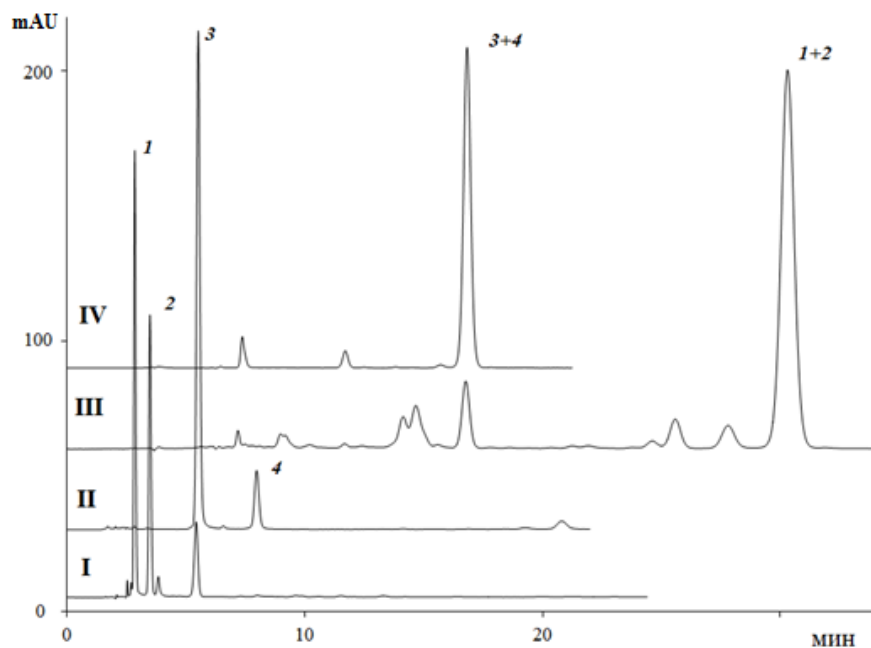


Рисунок 3.53 - Разделение бетацианинов корнеплодов свеклы и листьев амаранта
Колонка: 250×4.6 мм, Reprosil-Pur AQ-C18, 5 мкм, подвижная фаза 6 об. % CH_3CN и 2 об. % HCOOH , 1 мл/мин: I – экстракт листьев амаранта, II – экстракт корнеплодов свеклы. Колонка: 250×4.6 мм, Kromasil 60-5DIOL, подвижная фаза 85 об. % CH_3CN и 0.5 об. % H_3PO_4 в воде, 1 мл/мин: III – экстракт листьев амаранта, IV – экстракт корнеплодов свеклы. 1 – амарантин, 2 – изоамарантин, 3 – бетанин, 4 – изобетанин. Детектор: 538 нм.

Таким образом, предложенный в работе метод удобен в том случае, когда антоциановый комплекс содержит смесь производных цианидина с различным типом гликозилирования, трудно разделяемую методом ОФ ВЭЖХ. К таким объектам относятся антоциановые комплексы плодов красной смородины, черноплодной малины [86], вишни [87], некоторых видов калин [207] и ряда других объектов (рис. 3.54). Для исключения ошибок определения состава экстрактов данный метод удобнее использовать для определения компонентов антоцианового комплекса плодов бузины черной.

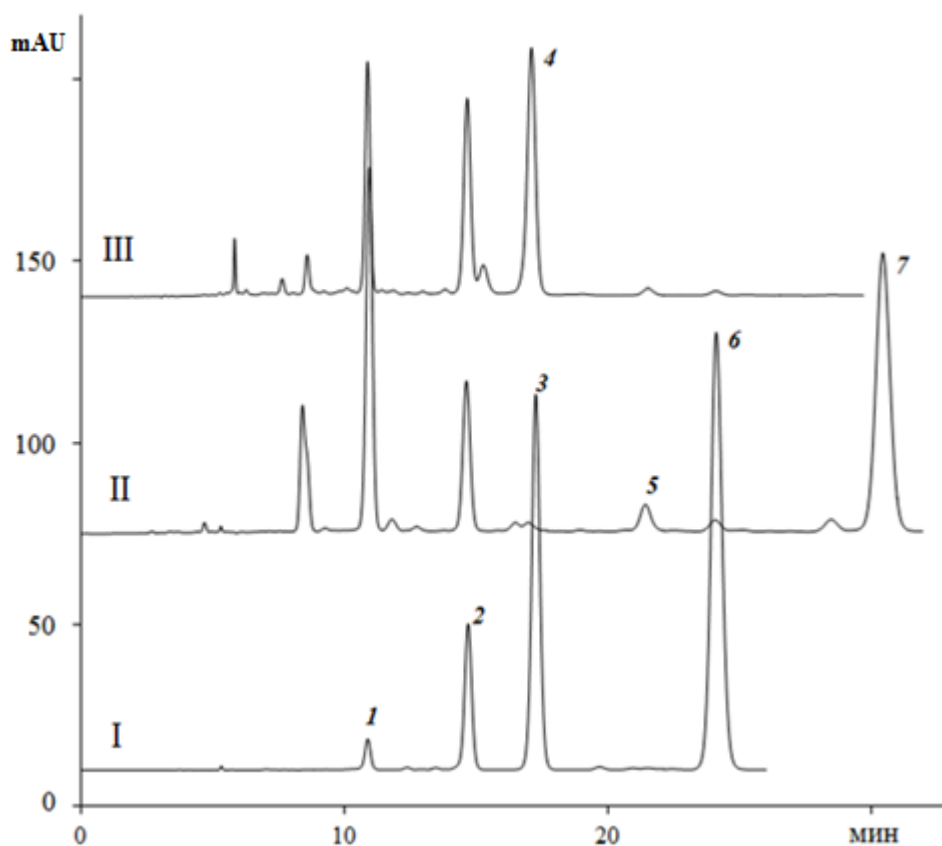


Рисунок 3.54 - Разделение антоцианов плодов некоторых растений

Экстракты плодов: I – красной смородины; II – вишни; III – калины обыкновенной. Колонка: 250×4.6 мм, Kromasil 60-5DIOL, подвижная фаза 83.5 об. % CH₃CN, 0.5 об. % H₃PO₄ в воде, 1 мл/мин. Антоцианы: 1 – цианидин-3-глюкозид, 2 – цианидин-3-рутинозид; 3 – цианидин-3-самбубиозид; 4 – цианидин-3-арабинозилглюкозид; 5 – цианидин-3-софорозид; 6 – цианидин-3-(2''-ксилозилрутинозид), 7 – цианидин-3-(2''-глюкозилрутинозид). Детектор: 515 нм.

Наконец, необходимо подчеркнуть, что состав растворителя, в котором образец вводится в хроматографическую систему, также имеет большое значение. Если растворитель образца в пробе окажется более сильным элюентом по

сравнению с используемой подвижной фазой, то возможны различные искажения пиков вплоть до появления ложных пиков вследствие выноса аналитов растворителем пробы.

Для ГФХ недопустимо введение в хроматографическую систему проб, растворенных в растворе, содержащем больше воды по сравнению с составом подвижной фазы. При этом такие пробы неприемлемы для анализа методом традиционной ВЭЖХ по той же причине – необходимо, наоборот, соответствующее разбавление водой. Невыполнение этих требований может быть одной из причин ухудшения качества хроматограммы.

3.4. Приготовление готовых форм на основе бетацианинов и контроль их сохранности

Использование технологий получения сухих форм натуральных пищевых красителей позволяет повышать их стабильность [208-209]. В настоящей работе была приготовлена серия композиций, содержащих малоустойчивые в растворах бетацианины, в которых в качестве наполнителя выбраны полисахариды растительного происхождения: агар-агар (Биотехновация, г. Москва, РФ) и каррагинан (Aromarti, г. Москва, РФ). Оба полимера получают из морских водорослей (*Gracilaria*, *Gelidium* и *Ahnfeltia*) [210-214]. Применение этих полисахаридов разрешено в рецептурах продуктов питания, удобно, поскольку они не имеют цвета, вкуса и запаха, а, следовательно, не влияют на органолептические показатели основного продукта.

Для получения сухих форм инкапсулированных бетацианинов к раствору красителя заданной концентрации (0.5 ÷ 3.5 мг/мл) добавляли полисахарид в сухом виде (0.05 ÷ 1.0 г), перемешивали до растворения и замораживали в морозильной камере бытового холодильника. Замороженный образец лиофилизировали на установке Free Zone 2.5. Полученные образцы переносили в пластиковые чашечки Петри и оставляли на хранение в камере бытового холодильника при температуре 4°C.

Для определения содержания бетацианинов в полученных сухих формах навеску образца растворяли в ацетатном буферном растворе с pH 5 ÷ 6 и спектрофотометрировали без дополнительных обработок, поскольку во всех случаях были получены абсолютно прозрачные растворы без осадка.

Полученные образцы контролировали на сохранность красителя и на гигроскопичность. При этом было установлено, что в предложенных условиях образцы имели низкий уровень гигроскопичности (табл. 3.15).

Стабильность бетацианинов в сухих формах оказалась существенно более высокой, чем в жидких концентратах.

Таблица 3.15 - Контроль гигроскопичности сухих форм бетацианинов, содержащих в качестве наполнителя каррагинан

Время хранения, сутки	2	7	28	49	105
Прирост массы сухой формы, %, (n=2, P=0.95)	0.4 ± 1.4%	1.3 ± 0.2%	2.4 ± 0.3%	3.3 ± 0.3%	3.7 ± 0.6%

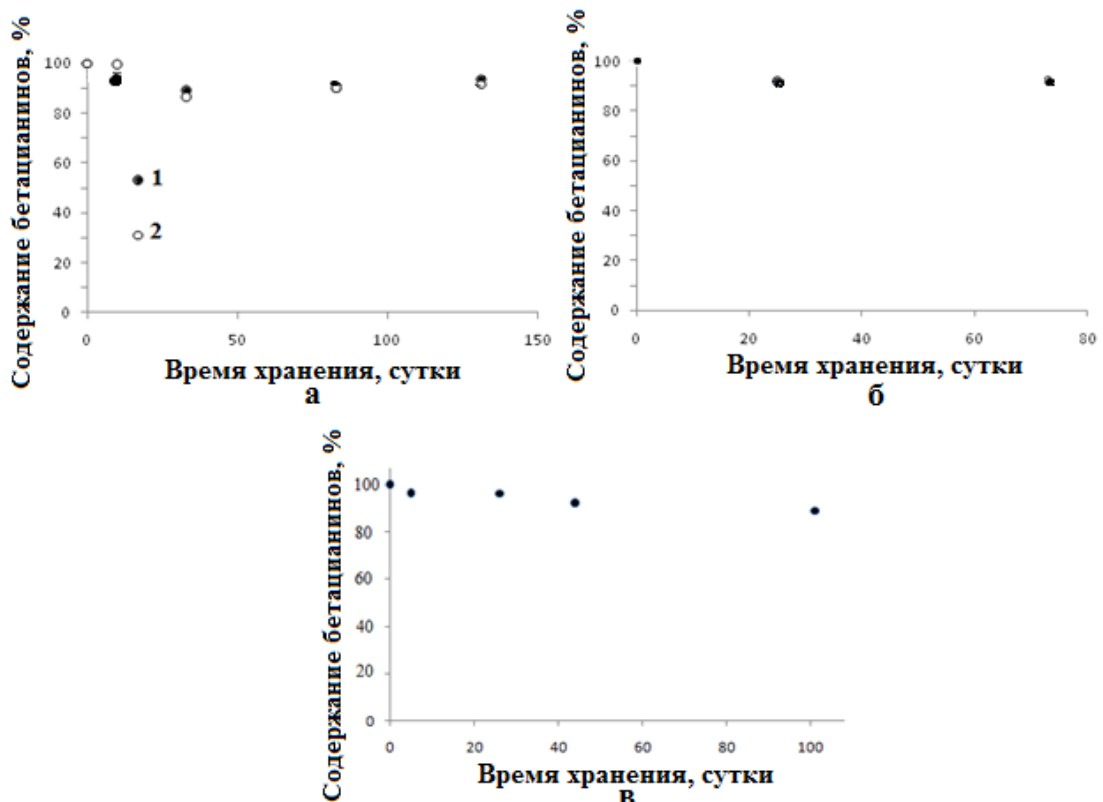


Рисунок 3.55 - Изменение концентрации бетацианинов в сухих композициях с добавками агар-агара (а) (1 – 0.1% масс. Бц; 2 – 0.2% масс. Бц) и каррагинана (б) (0.2% масс. Бц) (в) – 0.4 масс.% Бц).

Так, в композициях с добавками агар-агара для снижения содержания красителя на 11–13% потребовалось более 4 месяцев (рис. 3.55а), при этом вид спектра не изменялся во времени. Это свидетельствует о том, что основным процессом распада является не гидролиз, а необратимое окисление. Для форм с каррагинаном получены подобные результаты (рис. 3.55б,в).

В работе исследовано также несколько доступных коммерческих образцов сухих форм, содержащих бетацианины (рис. 3.56).

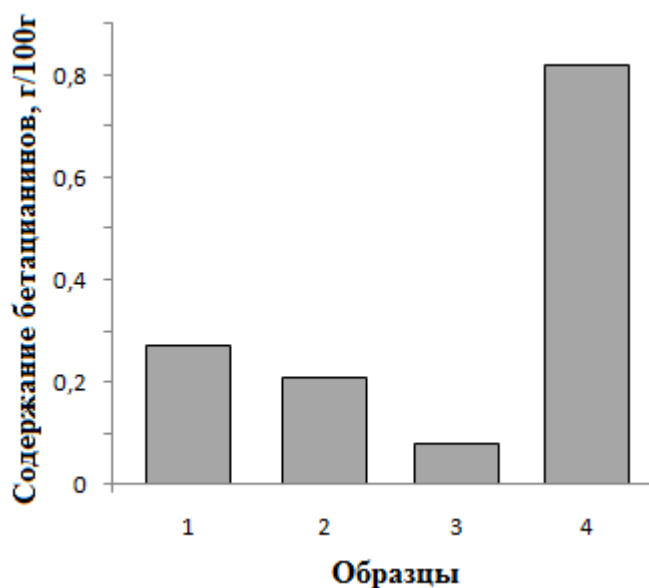


Рисунок 3.56 - Определение содержания образцов в сухих формах:

1 - Краситель натуральный сухой красный (концентрат свекольного сока).

Интернет магазин "Вкусный магазин". Состав: экстракт свеклы 100%.

2 - Порошок из свеклы столовой (г. Старый Оскол). Произведен на порошковой установке ЮВЭТ005 методом активационного обезвоживания по технологии ЮВЭТ.

3 - «Свекла с топинамбуром».

ООО "ГРАНДЭ". Криопорошок: 1табл - 0,5 кг свежих овощей.

4 – Лиофилизированная форма мелкоизмельченного корнеплода красной свеклы. Порошок, приготовленный по предложенному в работе способу.

Образец 1 (Интернет магазин «Вкусный магазин») легко и полностью растворяется в воде. Порошок (образец № 2) высушенного свекольного сока (г. Старый Оскол) также быстро и легко экстрагируется водой, но при этом остается нерастворимый остаток, причем оба названных образца имели приятный «сладковатый запах». Образец № 3 «Свекла с топинамбуром» (ООО «ГРАНДЭ»)

также полностью не растворяется, имеет «землистый» запах. Электронные спектры всех вышеперечисленных образцов имели характерный для бетацианинов вид. Однако по содержанию бетацианинов все они значительно уступали образцу № 4, полученному по предложенному нами способу (п. 2.17).

Погрешность определения бетацианинов в сухих формах составляет $0.3 \div 1.5$ % (табл. 3.16).

Таблица 3.16 - Спектрофотометрическое определение бетацианинов в сухих формах

Образец	Содержание бетацианинов, г/100г; n=3, P=0.95
1	0.27 ± 1.5 %
2	0.21 ± 0.4 %
3	0.08 ± 0.7 %
4	0.82 ± 0.3 %

Таким образом, лиофилизация оказалась эффективным методом получения сухих форм бетацианинов. Скорость разрушения колоранта существенно снижается, и такие композиции могут храниться в бытовом холодильнике до использования в течение не менее 5-ти месяцев.

ВЫВОДЫ

1. Разработан способ определения антоцианов в экстрактах спектрофотометрическим методом. Показано, что для уменьшения систематических погрешностей необходимо выдерживание растворов в течение времени, достаточного для достижения равновесия между различными формами антоцианов. Использование органических растворителей возможно при учете их влияния на спектральные характеристики раствора.

2. Установлено, что основная причина неустойчивости бетацианинов - быстрый распад по обратимой реакции конденсации беталамовой кислоты с *цикло*-ДОФА. Содержание бетацианинов в смеси с бетаксантинами может быть определено по методу Фирордта.

3. Определено удерживание антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ с подвижными фазами, содержащими кроме ацетонитрила и воды муравьиную или ортофосфорную кислоты. Установлено, что селективность разделения ряда пар антоцианов незначительно снижается при замене муравьиной кислоты на ортофосфорную. При этом сохраняется возможность использования параметров относительного удерживания для предварительной дифференциации структур углеводных фрагментов - увеличиваясь в ряду «моно-, ди-, тригликозиды».

4. Показано, что особенности удерживания антоцианов при изменении строения углеводного радикала и флавилиевой основы обусловлены гибридным «поплавочным» механизмом, а различия в удерживании изомерных форм бетацианинов объяснены поверхностной сорбцией.

5. Показано, что при использовании гидрофильной хроматографии, как альтернативы ОФ ВЭЖХ для качественного анализа многокомпонентных смесей антоцианов, различающихся по типу гликозилирования, удастся избежать множественных инверсии времен удерживания при изменении состава подвижных фаз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Степанов Б. И. Введение в современную оптику: Фотометрия. О возможном и невозможном в оптике / Б. И. Степанов. – Москва : Наука и техника, 1989. – 254 с.
2. Марченко З. Методы спектрофотометрии в УФ и видимой областях в неорганическом анализе / З. Марченко [и др.]; пер. с польск. – Москва : БИНОМ, 2012. – 711 с.
3. Харламова О. К. Натуральные пищевые красители / О. К. Харламова, Б. В. Кафка. – Москва : «Пищевые красители», 1979. - 185 с.
4. Болотов В.М. Пищевые красители: классификация, свойства, анализ, применение / В.М. Болотов [и др.] – СПб : ГИОРД, 2007. – 240 с.
5. Chlorophylls in foods / Steven J. [et al.] // Food Science and Nutrition. – 1990. – Vol. 29. – № 1. – P. 1-17.
6. The effect of light, temperature, pH on stability of betacyanin pigments in *Basella alba* fruit / Reshmi S. K. [et al.] // Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. – 2012. – Vol. 5. – № 4. – P. 107-110.
7. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods / Boon C. S. [et al.] // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2010. – Vol. 50. – P. 515-532.
8. Stability and contribution of beta carotene added to whole wheat bread and crackers / G.S. Ranhotra [et al.] // Cereal Chemistry Journal. – 1995. – Vol. 72. – № 2. – P. 139-141.
9. Stability of betacyanin pigments from red purple pitaya fruit (*Hylocereus polyrhizus*): influence of pH, temperature, metal ions and ascorbic acid / C.S. Tang [et al.] // Indonesian Journal of Chemistry. – 2007. – Vol. 7. – P. 327-331.
10. Spectrophotometric study on betanin photodegradation / A. Skopinska [et al.] // Natural Sciences. – P. 34-38.

11. Болотов В. М. Химические пути расширения эксплуатационных свойств природных красителей из растительного сырья России / В. М. Болотов [и др.] // Химия растительного сырья. – 1999. – № 4. – С. 35-40.
12. Carcinogenic and anticarcinogenic food components / Baer-Dubowska W. [et al.] // International Journal of Dairy Technology. – 2008. – Vol. 61. – P. 316.
13. Coloring Foods and Beverages / J. C. Griffiths // Food Technology. – 2005. - Vol. 59. - № 5. – P. 38-44.
14. Toxic effects of the synthetic food dye brilliant blue on liver, kidney and testes functions in rats / H. M. Neveen // Journal of the Egyptian Society of Toxicology. – 2006. - Vol. 34. - 77-84.
15. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae / Cai Y. [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2003. – Vol. 51. – P. 2288-2294.
16. Antioxidant activity of β -carotene compounds in different in vitro assays / L. Mueller [et al.] // Molecules. – 2011. – Vol. 23. – № 16. – P. 1055-1069.
17. Anthocyanins and heart health / Mazza G. // Ann Ist Super Sanita. – 2007. – Vol. 43. – № 4. – P. 369-374.
18. Free radical scavenging activity and anthocyanin profile of cabernet sauvignon wines from the Balkan region / Radovanovic B. [et al.] // Molecules. – 2010. - Vol. 15. – P. 4213-4226.
19. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties / He J. [et al.] // Annual review of food science and technology. – 2010. – Vol. 1. – P. 163-187.
20. Окуневич И.В. Антиоксиданты: эффективность природных и синтетических соединений в комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний / И.В. Окуневич [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2004. – Т. 3. – № 3. – С. 2-17.
21. Effect of black currant anthocyanins intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans / Nakaishi H. [et al.] // Alternative Medicine Review. – 2000. – Vol. 5. – P. 553-562.

22. Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses / Delgado-Vargas F., Paredes - Lopez O. // CRC Press LLC. – 2003. – Boca Raton
23. Лысак В.В. Микробиология : учеб. пособие / В.В. Лысак. – Минск : БГУ, 2007. – 426 с.
24. Food Coloring: The Natural Way / C. Lakshmi // Research Journal of Chemical Sciences. – 2014. - Vol. 4. – P. 87-96.
25. Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts / Nemzer B. [et al.] // Food Chemistry. – 2011. – Vol. 127. – P. 42-53.
26. Enzymes and genes involved in the betalain biosynthesis in higher plants / Han X. H. [et al.] // African Journal of Biotechnology. – 2009. – Vol. 8. – P. 6735-6744.
27. Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health / Moreno D. A. [et al.] // Phytochemistry Reviews. – 2008. – № 7. – P. 261-280.
28. Contributions to Betalain Biochemistry: New structures, condensation reactions, and vacuolar transport // Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. - 2002.
29. САНПИН 2.3.2.1293-03 «Продовольственное сырье и пищевые продукты. Гигиенические требования по применению пищевых добавок.
30. Яшин Я.И. Природные антиоксиданты – надежная защита человека от опасных болезней и старения. / Я.И. Яшин [и др.] - М., 2008. – 122 с.
31. Хасанов В.В. Методы исследования антиоксидантов / В.В. Хасанов [и др.] // Химия растительного сырья. – 2004. – №3. – С. 63-75.
32. Анисимович И.П. Параметры антиоксидантной активности соединений: относительная антиоксидантная активность чая / И.П. Анисимович [и др.] // Научные ведомости. – 2010. – Т. 9. – № 80. – С. 104-110.
33. Chemiluminescence detection of peroxy radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds / Krasovska A. [et al.] // Current Topics in Biophysics. – 2000. – Vol. 24. – P. 89–95.
34. А.В. Алексеев Определение антиоксидантов методом активированной хемилюминесценции с использованием 2,2'-азо-бис(2-амидинопропана / А.В.

Алексеев [и др.] // Вестник Московского университета. – 2012. - Т. 53. - № 3. – С. 187-193.

35. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins / Wayner D.D. [et al.] // FEBS Letters. – 1985. – Vol. 187. – P. 33–37.

36. Antioxidant determination by the use of a stable free radical / Blois M.S. // Nature. – 1958. – Vol. 26. – P. 1198–1200.

37. Evaluation of total antioxidant activity of several popular vegetables and chinese herbs: a fast approach with ABTS/H₂O₂/HRP system in microplates / Chen I.C. [et al.] // Journal of Food and Drug Analysis. – 2004. – V. 12. – №1. – P. 29–33.

38. Федина П.А. Определение антиоксидантов в продуктах растительного происхождения амперометрическим методом / П.А. Федина [и др.] // Химия растительного сырья. - 2010. - №2. - С. 91–97.

39. Дейнека В.И. Исследование антоцианов черники в плодах и препаратах на её основе / В.И. Дейнека [и др.] // Заводская лаборатория. – 2006. - № 3. – С. 16-20.

40. Государственный реестр лекарственных средств. Официальное издание по состоянию на 1 апреля 2009 года: в 2-х т. Т.1. – М.: «Медицинский совет», 2009. 1359 с.

41. Куркин В.А. Новые подходы в области стандартизации сырья и препаратов черники обыкновенной / В.А. Куркин [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. - 2011. - Т. 13. - № 1. - С. 2010-2015.

42. Степанян Р.В. Получение лекарственных форм из плодов черники кавказской и изучение их влияния на сетчатку глаза / Р.В. Степанян [и др.] // Новый армянский медицинский журнал. – 2007. – Т. 1.

43. Antioxidant activities of total pigment extract from blackberries / J. Zhonggao [et. al.] // Food Technology and Biotechnology. - 2005. - №43. - P. 97–102.

44. Anthocyanin antioxidants from edible fruits / S. Linda [et. al.] // Food Chemistry. - 2004. – Vol. 84. - P. 23–28.

45. Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars grown in the Mediterranean region of Turkey / O. Mustafa [et. al.] // Food Chemistry. -2008. – Vol. 111. - P. 703–706.

46. Clinical and capillaroscopic evaluation of chronic uncomplicated venous insufficiency with procyanidins extracted from *Vitis vinifera* / A. Costantini [et. al.] // Minerva Cardioangiologica. - 1999. - Vol. 47. - N. 1-2. - P. 39-46.

47. Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and mechanisms involved. Int. / X. Hou [et. al.] // Journal of Oncology. - 2003. - Vol. 23. - N. 3. - P.705-712.

48. Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach. / M.A. Lila // Journal of Biomedicine and Biotechnology. - 2004. - P. 306–313.

49. Betacyanin stability during processing and storage of a microencapsulated red beetroot extract / Azeredo M.C. [et al.] // American Journal of Food Technology. – 2007. – № 2. – P. 307-312.

50. Isolation and identification of betacyanin from fruits of *Opuntia boldinghii* Br. et. R. by HPTLC / Victoria-Matos A. [et al.] // Ciencia e Tecnologia de Alimentos. – 2001. – Vol. 3. – № 3. – P. 140-143.

51. Antioxidant and antimicrobial activities of beet root pomace extracts / J.M. Canadanovic-Brunet [et al.] // Czech Journal of Food Sciences. – 2011. - Vol. 29. - № 6. – P. 575–585.

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

53. Betalainss a new class of dietary cationized antioxidants / Kanner J. [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2001. – Vol. 49. – P. 5178-5185.

54. Betalains, phase II enzyme-inducing components from red beetroot (*Beta vulgaris* L.) extracts / Lee C.H. [et al.] // Nutrition and Cancer. – 2005. – Vol. 53. - № 1. – P. 91–103.

55. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans / Tesoriere L. [et al.] // *American Journal of Clinical Nutrition*. – 2004. – Vol. 80. – P. 941–945.

56. Simple indole alkaloids and those with a nonrearranged monoterpene unit / Hibino S. [et al.] // *Natural Product Reports*. – 2002. – Vol. 19. – P. 148–180.

57. Biosynthesis and radical scavenging activity of betalains during the cultivation of red beet (*Beta vulgaris*) hairy root cultures / Pavlova A. [et al.] // *Zeitschrift für Naturforschung*. – 2002. – Vol. 57. – P. 640–644.

58. *Plant Pigments and their Manipulation* / K. M. Davies // CRC Press. – 2003.

59. Identification and distribution of simple and acylated betacyanins in the amaranthaceae / Cai Y. [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2001. – Vol. 49. – P. 1971–1978.

60. Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican Prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry / Castellanos-Santiago E. [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2008. – Vol. 56. – P. 5758–5764.

61. HPLC characterization of betalains from plants in the Amaranthaceae / Cai Y. [et al.] // *Journal of Chromatographic Science*. – 2005. – Vol. 43.

62. Heat stability of betacyanins / Havlikova L. [et al.] // *Z Lebensm Unters Forsch*. – 1983. – Vol. 177. – P. 247–250.

63. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids / Tanaka Y. [et al.] // *The Plant Journal*. – 2008. – Vol. 54. – P. 733–749.

64. Дейнека Л.А. Антоцианы: Природные антиоксиданты и не только // Дейнека Л.А. [и др.] // *Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина и фармация*. – 2006. – №3. – Вып. 4. – С. 92–100.

65. *The anthocyanins* / O. M. Andersen [et al.] // *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. London, CRC Press. 2006. – P. 471–552.

66. Anthocyanins – more than nature's colours / Konczak I. [et al.] // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. – 2004. – Vol. 5. – P. 239–240.

67. Food colorants: anthocyanins / F. J. Francis // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. - 1989. – Vol. 28. - P. 273-314.

68. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants / J. Bruneton // *Tec & Doc - Lavoisier, Paris*. – 1995. – P. 199-388.

69. Analysis and stability of anthocyanins/ L.Cabrita // *University of Bergen, Department of Chemistry. Bergen*. – 1999.

70. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes / F. He [et al.] // *Molecules*. – 2010. – Vol. 15. - P. 9057-9091.

71. Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae* / S. Coghe [et. al.] // *Journal of Agriculture Food Chemistry*. - 2004. – Vol. 52. -P. 602-608.

72. Structure of new anthocyanin-derived wine pigments / H. Fulcrand [et. al.] // *Journal of the Chemical Society*. - 1996. - P. 735-739.

73. Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Relationship with vitisin A and B formation in red wines / A. Morata [et. al.] // *Journal of Agriculture Food*. - 2003. – Vol. 51. - P.7402 - 7409.

74. Anthocyanin from strawberry (*Fragaria ananassa*) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelargonidin / M. Iyvind [et. al.] // *Phytochemistry*. 2004. - Vol. 65 - P. 405–410.

75. Крешков А.П. Основы аналитической химии. Теоретические основы. Количественный анализ / А.П. Крешков. – Москва : «Химия», 1976. – 480 с.

76. Барковский Ф. Ф Физико-химические методы анализа / Ф. Ф. Барковский, С. М. Гарелин, Г. Б. Городенцева. – Москва : Высшая школа, 1972.

77. The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits / P. Aramwit [et al.] // *Food Research International*. – 2010. – P. 1093-1097.

78. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study / J. Lee // *Journal of AOAC International*. – 2005. – Vol. 88 - № 5. - P. 1235-1241.

79. Improved method for the stabilization of anthocyanidins / L.T. Dao [et. al.] // *Journal of Agriculture Food Chemistry*. – 1998. – Vol. 46. - P. 3564-3569.
80. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions / L. Cabrita [et. al.] // *Food Chemistry*. - 2000. – Vol. 68. - P. 101-107.
81. The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins and related flavylum salts / G. A. Iacobucci [et. al.] // *Tetrahedron*. - 1983. - P. 3005-3038.
82. Colorants. In: *Food Chemistry* / J. H. Elbe [et. al.] // Marcel Dekker Inc. - New York. - 1996. - P.651-723.
83. Anthocyanin pigments: comparison of extract stability / A. Baublis [et. al.] // *Journal of Food Science*. - 1994. - P. 1219-1221.
84. The pH and solvent effects on the copigmentation reaction of malvin with polyphenols, purine and pyrimidine derivatives/ R. Brouillard [et. al.] // *Journal of the Chemical Society*. - 1991. - P. 1235-1241.
85. Color and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region / T. Fossen [et. al.] // *Food Chemistry*. - 1998. – Vol. 63. - P. 435-440.
86. Variation of anthocyanins and total phenolics in black raspberry populations / Dossett M. [et al.] // *Journal of Functional Foods*. - 2010. - Vol. 2. - P. 292-297.
87. Дейнека Л.А. Антоцианы плодов вишни и родственных растений / Л.А. Дейнека [и др.] // *Научные ведомости БелГУ*. - 2011. - №9. - Вып. 15/1. - С.364.
88. Molecular structure of cyanidin metal complexes: Al(III) versus Mg(II). Theoretical chemistry accounts / L. Estévez [et al.] // *Theory, Computation, and Modeling (Theoretica Chimica Acta)*. – 1995. –Vol. 128. – P. 485-495.
89. Cactus Pear: A fruit of nutraceutical and functional importance / Piga A. // *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. – 2004. – P. 9-22.
90. Betanin, the main pigment of red beet - molecular origin of its exceptionally high free radical scavenging activity / Swiglo A. G. [et al.] // *Journal of Food Additives and Contaminants*. – 2006. – Vol. 23. - № 11. - P. 1079-1087.

91. Distribution and origins of members of the Family Portulacaceae (Centrospermae) / Nyananyo B.L. [et al.] // Journal of Applied Sciences and Environmental Management. – 2004. – Vol. 8. – № 2. – P. 59-62.

92. Comparison of red beet (*Beta vulgaris* var *conditiva*) varieties on the basis of their pigment components / Gasztonyi M. N. [et al.] // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2001. – Vol. 81. – P. 932-933.

93. Amaranthus betacyanin pigments applied in model food systems / Cai. Y. [et al.] // Journal of Food Science. – 1999. – Vol. 64. – № 5. – P. 869-873.

94. Betacyanins and phenolic compounds from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhavia erecta* L. / Stintzinga F. C. [et al.] // Zeitschrift fur Naturforschung. – 2004. – Vol. 59. – P. 1-8.

95. Bioactive components of leafy vegetable edible amaranth (*Amaranthus mangostanus* L.) as affected by home cooking manners / S. Han [et. al.] // American Journal of Food Science and Technology. – 2014. – Vol. 2. – № 4. – P. 122-127.

96. Effect of culinary process on beet roots quality / Czarniecka-Skubina E. [et al.] // Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. – 2003. – Vol. 6.

97. Study of optimal temperature, pH and stability of Dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel for use as potential natural colorant / Harivaindaran K.V. [et al.] // Pakistan Journal of Biological Sciences. – 2008. – Vol. 11. – № 18. – P. 2259-2263.

98. Colour inheritance in cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruits / Felker P. [et al.] // Annals of Applied Biology. – 2008. – Vol. 152. – P. 307-318.

99. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin rich extracts from blueberry and blackcurrant juice / Z. Diaconeasa [et. al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2015. – Vol. 16. –P. 2352-2365.

100. Anthocyanins from Black Currants (*Ribes nigrum* L.) / R. Slimestad, H. Solheim // Journal of Agriculture Food Chemistry. - 2002. – Vol. 50. – P. 3228-3231.

101. Nutritional Potential of the Leaves and Seeds of Black Nightshade *Solanum nigrum* L. Var *virginicum* from Afikpo-Nigeria / I.E. Akubugwo [et. al.] // Journal of Nutrition.- 2007. – Vol. 6. – P. 323-326.

102. Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars / J. Lee [et. al.] // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2007. – Vol. 87. – P. 2665–2675.

103. Studies on antioxidant properties of polyphenol-rich extract from berries of *aronia melanocarpa* in blood platelets / B. Olas [et. al.] // *Journal of physiology and pharmacology*. - 2008. – Vol. 59. 4. - P.823–835.

104. Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions / C. Do [et. al.] // *Plant Cell Reports*. - 1990. – Vol. 9. - P. 143–146.

105. Induction of anthocyanin synthesis in nonpigmented grape cell suspensions by acting on DFR substrate availability or precursors level / F. Dedaldechamp [et. al.] // *Enzyme and Microbial Technology*. - 1999. - Vol. 25. - P. 316–321.

106. Anthocyanin production in callus cultures of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) / H. Mizukami [et. al.] // *Plant Cell Reports*. - 1988. – Vol. 7. - P. 553–556.

107. Рудаков О.Б. Фракционный состав антоциановых красителей из растительных экстрактов и контроль над ним методом ВЭЖХ / О.Б. Рудаков [и др.] // *Вестник ВГУ*. – 2004. – №1. – С. 85-93.

108. Танчев С.С. Антоцианы в плодах и овощах / С.С. Танчев. - М. : Пищевая пром-сть, 1980. – 304 с.

109. Сорокопудов В.Н. Антоцианы плодов некоторых видов рода *Rubus* L. из коллекции ботанического сада БелГУ / В.Н. Сорокопудов [и др.] // *Химия растительного сырья*. – 2005. – №4. – С. 61-65.

110. Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis / T.A. Holton [et. al.] // *The Plant Cell*. – 1995. – Vol. 7. – P. 1071-1083.

111. Дейнека Л.А. Критерии для классификации винограда по антоциановому комплексу плодов / Л.А. Дейнека [и др.] // *Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки*. - 2008. - №7. - Вып. 7. - С. 71-78.

112. A rapid determination method for anthocyanin profiling in the grape genetic resources / M. Shiraishi [et. al.] // *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. - 2007. - V.76 - P. 28-35.

113. pH and thermal stability of anthocyanin-based optimised extracts of romanian red onion cultivars / S. Oancea [et. al.] // Czech Journal of Food Sciences. – 2013. - Vol. 31. - № 3. – P. 283–291.

114. Characterization and quantification of health beneficial anthocyanins in leaf chicory (*Cichorium intybus*) varieties / V. Mulabagal [et. al.] // European Food Research and Technology. - 2009. – Vol. 230 - № 1. – P. 47-53.

115. pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants / T. Lapidot [et. al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 1999. - Vol. 47. – P. 67-70.

116. Effect of sugar treatment on stability of anthocyanin pigments in berries / E. Nikkhah [et. al.] // Journal of Biological Sciences. - 2007. – P. 1412-1417.

117. Anthocyanin degradation of blueberry-aronia nectar in glass compared with carton during storage / K. Trost [et. al.] // Journal of Food Science. - 2008. – Vol. 73. – P. 405-11.

118. Betalain stability and degradation - structural and chromatic aspects / Kirsten M. H. [et al.] // Journal of Food Science. – 2006. – Vol. 71. - № 4. – P. 41-50.

119. Generation of decarboxylated and dehydrogenated betacyanins in thermally treated purified fruit extract from purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) monitored by LC-MS/MS / Wybraniec S. [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2005. – Vol. 53. – P. 6704-6712.

120. Physico-chemical properties of spray-dried red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel powder during storage / S.C. Jamilah [et al.] // International Food Research Journal. – 2014. – Vol. 21. – P. 155-160.

121. Functional properties, color and betalain content in beetroot orange juice powder obtained by spray drying / L.A. Ochoa-Martinez [et al.] // Research and Reviews: Journal of Food and Dairy Technology. – 2015. - Vol. 3. - № 2. – P. 30-36.

122. Study on efficiency of betacyanin extraction from red beetroots / Azeredo H. M. [et al.] // International Journal of Food Science and Technology. – 2009. – Vol. 44. – P. 2464–2469.

123. Лубсандоржиева П.Б. Антиоксидантная активность экстрактов из *bergenia crassifolia fritsch.* и *vaccinium vitis-idaeae* in vitro. / П.Б Лубсандоржиева // Химия растительного сырья. - 2006. - №4. – С. 45 – 48.

124. Рубчевская Л.П. Способ получения полифенолов / Л.П. Рубчевская [и др.] // Патент 2174011.

125. Лубсандоржиева П.Б. Биологически активные вещества антиязвенного растительного средства «ВЕНТРОФИТ» / П.Б. Лубсандоржиева [и др.] // Химия растительного сырья. 2006. №1. С. 59–64.

126. Карцова Л.А. Хроматографические и электрофоретические методы определения полифенольных соединений / Л.А. Карцова [и др.] // Журнал аналитической химии. – 2008. – Т. 3. - № 11. – С. 1126-1136.

127. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability / Delgado-Vargas F. [et al.] // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2000. – Vol. 40. – № 3. – P. 173–289.

128. Colorant extraction from red prickly pear (*Opuntia Lasiacantha*) for food application / Sanchez F. D. [et al.] // Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. – 2006. – Vol. 5. – № 2. – P. 1330-1337.

129. Extraction of Red Beet Pigments // В.К. Tiwari [et. al.] // Red Beet Biotechnology. – 2012. – P. 373–391.

130. Spectral methods of characterizing anthocyanins / J.B. Harborne // Journal of Biochemistry. – 1958. – Vol. 70. – P.22–28.

131. Betalains / Elbe von J. H. // Current Protocols in Food Analytical Chemistry. – 2001. - F3.1.1-F3.1.7.

132. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy / Giusti M.M. [et al.] // Current Protocols in Food Analytical Chemistry. - 2001. – Unit F1.2.1 – F1.2.13.

133. Red-fleshed pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) fruit colour and betacyanin content depend on maturity / D. Phebe [et al.] // International Food Research Journal. – 2009. – Vol. 16. – P. 233-242.

134. Betalain extraction from *Hylocereus polyrhizus* for natural food coloring purposes / N. Naderi [et al.] // *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. – 2010. – Vol. 12. – P. 143-154.

135. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties / M. Joseph [et al.] // *Food Chemistry*. – 2004. – Vol. 90. – P. 293–301.

136. Antioxidant activity and phenolic composition of sumac (*Rhus coriaria* L.) extracts / M. Kosar [et. al.] // *Food Chemistry*. - 2007. – Vol. 103. - P. 952-959.

137. Сорокопудов В Н. Антоцианы плодов некоторых видов рода *Rubus* L. из коллекции ботанического сада белгу / В Н. Сорокопудов [и др.] // *Химия растительного сырья*. - 2005. - №4. - С. 61–65.

138. Methods for analysis of musts and wines / M.A. Amerine [et. al.] // *New York, NY*. - 1980. - P. 187–189.

139. Comparison of Spectrophotometric and HPLC Methods to Quantify Betacyanins / S. J. Schwartz [et. al.] // *Journal of Food Science*. - 1981. – Vol. 46. - P. 296–297.

140. Retention of anthocyanins in purple corn kernel during processing / K. Youngmok [et. al.] // *Sensu*. - 2009. - P. 1-3.

141. Methyl jasmonate inhibits anthocyanin synthesis in seedlings of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) / M. Hordowicz [et. al.] // *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. - 2008. – Vol. 50. - P. 71–78.

142. Antioxidant capacity and phenolic phytochemicals in black raspberries / G. Heidemarie [et. al.] // *New York State Horticultural Society*. - 2009. - Vol. 17. - P. 20-23.

143. Isolation and free-radical-scavenging properties of cyanidin3-O-glycosides from the fruits of *Ribes biebersteinii* Berl. / A.L. Delazar [et. al.] // *Acta Pharmaceutica*. - 2010. – Vol. 60. - P. 1–11.

144. Genotypic environmental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content among blueberry cultivars / A.M. Connor [et. al] // *Journal American Society Horticultural Science*. - 2002. – Vol. 127. - P. 89-97.

145. Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweeties and white grapefruits / S. Gorinstein [et. al.] // *Food Chemistry*. - 2004. – Vol. 84. - P. 503–510.

146. Preventive effects of diets supplemented with sweetie fruits in hypercholesterolemic patients suffering from coronary artery disease / A. Gorinstein [et. al.] // *Preventive Medicine*. - 2004. – Vol. 38. - P. 841–847.

147. Fruit quality, antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries / Y. Shiow [et. al.] // *Food Chemistry*. - 2008. – Vol. 56. - P. 5788–5794.

148. Antocianinas, polifenoles, actividad anti-oxidantede sachapapa morada (*Dioscorea trifida* L.) Y evaluacion de lipoperoxidacion en suero humabo // F. Ramos-Escudero [et. al.] // *Sociedad Química del Perú*. - 2010. – Vol. 76. - P. 61-72.

149. Чулков А.Н. Равновесная сорбция антоцианов на бентонитовых глинах и на обращенных фазах : автореф. дис. ...канд. хим. наук / А.Н. Чулков. – Белгород; Белг. гос. техн. ун-т им. В.Г. Шухова. – 2013. – 18 с.

150. Analysis of anthocyanins in food colorants: chemical and functional properties / M.M. Giusti [et al.] // *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. – 2008. – P. 479–506.

151. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography – mass spectrometry and capillary electrophoresis / C.T. Costa [et al.] // *Journal of Chromatography*. – 2000. – Vol. 881. – № 1-2. – P. 403–410.

152. Identification of anthocyanin in bayberry (*Myrica rubra* Siebet Zucc.) by HPLC-DAD-ESIMS and GC. / F. Zhong-Xiang [et al.] // *Journal of Food and Drug Analysis*. – 2006. – Vol. 14. – P. 368-372.

153. A new acetonitrile-free mobile phase for HPLC-DAD determination of individual anthocyanins in blackcurrant and strawberry fruits: a comparison and validation study / J. Giné Bordonabaa [et al.] // *Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 129. – P. 1265–1273.

154. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods / L. Jungmin R. [et al.] // *Food Chemistry*. – 2008. – Vol. 110. –P. 782–786.

155. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries / W. Xianli [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2005. – Vol. 53. – P. 2589–2599.

156. Anthocyanins in wild blueberries of quebec: extraction and identification / E. Ä. Eugeäne [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2007. – Vol. 55. – P. 5626–5635.

157. Hydrophilic interaction chromatographic analysis of anthocyanins / C.M. Willemse // *Journal of Chromatography A*. - 2013. - Vol. 1319. - P. 127.

158. Effect of tetraalkylammonium salts on retention of betacyanins and decarboxylated betacyanins in ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography / S. Wybraniec // *Journal of Chromatography A*. – 2006. – P. 70–75.

159. Influence of perfluorinated carboxylic acids on separation of polar betacyanins in ion-pair high-speed countercurrent chromatography / S. Wybraniec [et al.] // *Journal of Chromatography*. – 2009. – P. 6890–6899.

160. Separations of polar betalains from berries of *Phytolacca americana* by ion-pair high speed countercurrent chromatography / G. Jerz [et al.] // *Journal of Chromatography*. – 2008. – P. 63–73.

161. Solid phase extraction technique – trends, opportunities and applications / Żwir-Ferenc A. [et al.] // *Polish Journal of Environmental Studies*. – 2006. – Vol. 15. – P. 677.

162. Чулков А.Н. Сопоставление сорбционной эффективности сорбентов трех типов по отношению к антоцианам / А.Н. Чулков [и др.] // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2012. – Т. 12. – Вып. 6. – С. 922-928.

163. Дейнека Л.А. Закономерности сорбции антоцианов природными глинами: зависимость от строения антоцианов и состава экстрагентов / Л.А. Дейнека [и др.] // *Журнал прикладной химии*. – 2009. – №5. – С.742-748.

164. A comparative study of the purification of betanin / L. C. Pires [et. all] // *Food Chemistry*. – 2012. – Vol. 131. – P. 231-238.

165. Characterization and Quantification of Betacyanin Pigments from Diverse *Amaranthus* Species / Y. Cai [et. al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 1998. - Vol. 46. - N.6. – P. 2065-2070.

166 . Stability and Color Changes of Thermally Treated Betanin, Phyllocactin, and Hylocerenin Solutions // M.H. Kirsten [et. al.] // J. Agric. Food Chem. - 2006. - V. 54.-P. 390-398.

167. Wine tannins - isolated of condensed flavonoid pigments by gel-filtration / T. C. Somers // Nature. - 1966. - Vol. 209. - P.368-370.

168. Extraction and purification of anthocyanins from the fruit residues of *vaccinium uliginosum* Linn / Z. Hua [et. al.] // Chromatography Separation Techniques. – Vol. 4. - № 2. – P. 2-5.

169. Formation of decarboxylated betacyanins in heated purified betacyanin fractions from red beet root (*Beta vulgaris* L.) monitored by LC-MS/MSJ / Wybraniec S. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2005. - Vol. 53. – P. 3483-3487.

170. Preparative HPLC for the purification of major anthocyanins from *ficus padana* Burm L. / D. Syukri [et. al.] // Research Journal of Chemical Sciences. – 2013. - Vol. 3. - № 12. – P. 60-64.

171. Программное обеспечение ChemSkech (<http://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>)

172. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments / F. Gandí'a-Herrero [et al.] // Trends in Plant Science. – 2013. – P. 10.

173. Куликов Ю.И. Перспективы использования натурального красителя «Лаконос Американский» при производстве колбасных изделий / Ю. И. Куликов [и др.] // Вестник Северо-Кавказского государственного технического университета. – 2008. – № 4. – С. 1997-9541.

174. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth / P. Pasko [et al.] // Food Chemistry. – 2009. - P. 994–998.

175. Anthocyanins in red beet juice act as scavengers for heavy metals ions such as lead and cadmium / J.K. Ahmed [et al.] // International Journal of Science and Technology. - 2013. – Vol. 2. – № 3. – P. 269-274.

176. Study on isolation and purification of anthocyanins and its application as pH indicator / S. Bondre [et al.] // International Journal of Advanced Biotechnology and Research. – 2012. – Vol. 3. – P. 698-702.

177. Analytical applications of plant extract as natural pH indicator: a review / P.M. Khan [et al.] // *Journal of Advanced Scientific Research*. – 2011. – Vol. 2. – № 4. – P. 20-27.

178. Quantitative analysis of the anthocyanin content in grape juices and wines / G. Niketic-Aleksic [et al.] // *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. - 1972. - Vol. 5. - P.163-165.

179. Grape phenolics: the anthocyanins of *Vitis vinifera*, var. Shiraz / T.C. Somers // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1966. -Vol. 17. – P. 215-219.

180. The anthocyanin pigments of Barlinka grapes / B.H. Koeppen [et al.] // *Phytochemistry*. - 1966. - Vol. 5. – P. 183-187.

181. Identification of betanin degradation products / S.J. Schwartz [et al.] // *Z Lebensm Unters Forsch*. - 1983. - Vol. 176. - P. 448.

182. Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins / N. Kobayashi [et al.] // *Phytochemistry*. - 2001. - Vol. 56. - P.429.

183. Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations / K.M. Herbach [et al.] // *Journal of Food Scienc*. – 2004. - Vol. 69. - P. 491.

184. Characterization of red pigments extracted from red beet (*Beta Vulgaris* L.) and its potential uses as antioxidant and natural food colorants / G.Y. Attia // *Egyptian Journal of Agricultural Research*. – 2013. - Vol. 91. – P. 1095–1110.

185. Betalain, acid ascorbic, phenolic contents and antioxidant properties of purple, red, yellow and white cactus pears / M.T. Sumaya-Martínez [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2011. – Vol. 12. – P. – 6452-6468.

186. Долгоносов А.М. Связь энергии адсорбции с индексом Ковача, вытекающая из теории обобщенных зарядов / А.М. Долгоносов // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2015. – Т. 15. – Вып. 2. – С. 168-178.

187. Долгоносов А.М. Полярность и гидрофильность– фундаментальные независимые характеристики хроматографических неподвижных фаз / А.М. Долгоносов // *Сорбционные и хроматографические процессы*. - 2015. - Т. 15. - Вып. 3. - С. 312-320.

188. Долгоносов А.М. Характеристика полярности неподвижной фазы в газовой хроматографии на основе теоретического описания межмолекулярных взаимодействий. I. Случай отсутствия водородных связей / А.М. Долгоносов // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2014. - Т. 14. - Вып. 4. - С. 578-590.

189. High-performance liquid chromatography of red fruit anthocyanins / Goiffon J.P. [et al.] // Journal of Chromatography. - 1991. - Vol. 537. - P. 101-121.

190. Structural dependence of HPLC separation pattern of anthocyanins from bilberry / Ichiyanagi T. [et al.] // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. - 2004. - Vol. 52. - P. 628.

191. Дейнека В.И. Определение антоцианов методом ВЭЖХ. Некоторые закономерности удерживания / В.И. Дейнека [и др.] // Журнал аналитической химии. - 2004. - Т. 59. - № 3. - С. 305.

192. Дейнека В.И. Распределение или адсорбция как основная дилемма ОФ ВЭЖХ / В.И. Дейнека // Журнал физической химии. - 2008. - Т. 82. - №6. - С. 1028.

193. Плоды *Rosa spinosissima* – ценный материал для получения напитков с высоким антиоксидантным потенциалом / С.Л. Макаревич и др. // Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. - 2011. - № 22 (117). - Выпуск 16/2. - С. 188-192.

194. ВЭЖХ в контроле антоцианового состава плодов черной смородины / Л.А. Дейнека и др. // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. – Т. 9. - Вып. 4. – С. 529-536.

195. Исследование антоцианов 11 сортов ремонтантной малины / В.И. Дейнека и др. // Научные ведомости БелГУ. Серия Естественные науки. - 2012. - № 21 (140). - Выпуск 21/1. - С. 149-153.

196. Major anthocyanin of the flowers of hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) / Y. Nakamura // Agricultural and Biological Chemistry. - 1990. - Vol. 54. - P. 3345-3346.

197. Anthocyanidin 3-glucosides and in vitro unstable anthocyanins from *Hibiscus syriacus* / J.H. Kim // J. Fat. Agr., Kyushu Univ. - 1989. - Vol. 33. - P. 243-251.

198. Flavonoid pigments and color expression in the flowers of black hollyhock (*Alcea rosea* 'Nigra') / H. Hosaka // Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B. - 2012. - Vol. - 38. - P. 69-75.

199. Дейнека В.И. Относительный анализ удерживания гликозидов цианидина / В.И. Дейнека [и др.] // Журнал физической химии. - 2004. - Т.78. - № 5. - С. 923-926.

200. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases / Horváth C. [et al.] // Journal of Chromatography. - 1976. - Vol. 125. - P. 129-156.

201. Phase collapse in reversed-phase LC / Przybyciel M. [et al.] // LC GC Europe. - 2002. - Vol. 20. - № 10. - P. 2-5.

202. Анисимович И.П. Сорбционное разделение фенольных кислот в условиях ион-парной ОФ ВЭЖХ / И.П. Анисимович [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2010. - Т. 10. - Вып. 4. - С. 572-577.

203. HILIC methods in pharmaceutical analysis / B. Dejaegher [et. al.] // Journal of Separation Science. - 2010. - Vol. 33. - P. 698-715.

204. Method development for HILIC assays / B. Dejaegher [et. al.] // Journal of Separation Science. - 2008. - Vol. 31. - P. 1438-1448.

205. A updated review on hydrophilic interaction liquid chromatography HILIC / A.M. Raja. [et. al.] // International Journal of Innovative Pharmaceutical Sciences and Research. - 2014. - Vol. 2. - P. 1507-1520.

206. Дейнека В.И. Исследование удерживания антоцианов в элюентах системы ацетонитрил-муравьиная кислота-вода / В.И. Дейнека [и др.] // Журнал физической химии. - 2005. - Т. 79. - С. 900-903.

207. Дейнека В.И. Определение антоцианов плодов некоторых видов калины методом ВЭЖХ / В.И. Дейнека [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2014. - Т. 14. - С. 434-442.

208. Microencapsulation of natural food colourants / G. Ozkan [et al.] // International Journal of Nutrition and Food Sciences. – 2014. – Vol. 3. - № 3. – P. 145-156.
209. Microencapsulation in the food industry / L. S. Jackson [et al.] // Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie. - 1991. – Vol. 24. – P. 289-297.
210. Carrageenan: a review / J. Necas [et al.] // Veterinarni Medicina. – 2013. – Vol. 58. – P. 187–205.
211. Effects of carrageenan on the gelatinization of salt-based surimi gels // E. Sung-Hwan [et. al.] // Fisheries and Aquatic Sciences. – 2013. – Vol. 16. – P. 143-147.
212. Physical and chemical characterization of agar polysaccharides extracted from the thai and japanese species of gracilaria / J. Praiboon [et. al.] Science Asia. – 2006. – Vol. 32. – P. 11-17.
213. Physicochemical properties of agar and its utilization in food and related industry / Y. Uzuhashia [et. al.] // Foods and Food Ingredients Journal of Japan. – 2003. - Vol. 208. - №. 10.
214. A preliminary study on the agar content and agar gel strength of gracilaria manilaensis using different agar extraction processes / R. Ahmad [et. al.] // World Applied Sciences Journal. – 2011. – Vol. – 15. – P. 184-188.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

ООО "ФЛОРА-БАВ"

2010

РФ 308015 Белгород, ул. Победы 85, 13 к. 624, ИНН 3123223429, ОГРН 1103123015820



УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора ООО «Флора БАВ»

Чулков А.Н.


10» сентября 2014 г

АКТ ВНЕДРЕНИЯ


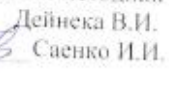
результатов научно-исследовательской работы

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: от ГОУ ВПО НИУ «БелГУ» профессор кафедры общей химии д.х.н. В.И. Дейнека и аспирант И.И. Саенко, от предприятия ООО «Флора БАВ» зам.директора А.Н. Чулков составили настоящий акт в том, что результаты научной исследовательской работы «Изучение состава, антиоксидантной активности и сохранности сухих форм бетацианинов» позволяют контролировать качество получаемой продукции. Методика позволяет определять все необходимые параметры.

Ответственный за апробацию
и внедрение от предприятия
ООО «Флора БАВ»

 И.П. Блинова

Авторы разработки методики

 Дейнека В.И.
 Саенко И.И.

УТВЕРЖДАЮ:
 Директор ИИТ и ЕН НИУ «БелГУ»
 д.т.н., профессор
 И.С. Константинов
 2015 г.



АКТ

о внедрении результатов исследования,
 полученных в диссертации Саенко Ирины Ивановны
 «Усовершенствование
 спектрофотометрического и хроматографического
 способов определения антоцианов и бетацианинов»

Комиссия в составе:

зам. директора ИИТ и ЕН по учебной работе к.т.н. доцента Е.М. Маматова, зав. кафедрой общей химии проф. д.т.н. А.И. Везенцева, доц. кафедры общей химии к.х.н. Дейнека Л.А. составила настоящий акт о том, что результаты исследований диссертационной работы Саенко Ирины Ивановны на тему «Усовершенствование спектрофотометрического и хроматографического способов определения антоцианов и бетацианинов» внедрены в учебный процесс в виде лабораторной работы «рН-дифференциальная спектрофотометрия в определении антоцианов и бетацианинов в различных растительных объектах» и «Особенности хроматографического поведения веществ различной гидрофильности в условиях ОФ ВЭЖХ» по дисциплинам «Современные методы определения БАВ» и «Хроматографические и ионообменные методы», соответственно, для магистрантов, обучающихся по направлению 04.04.01 «Химия».

Зам. директора ИИТ и ЕН по учебной работе
 к.т.н., доцент

Е.М. Маматов

Зав. кафедрой общей химии ИИТ и ЕН
 д.т.н., проф.

А.И. Везенцев

Доц. кафедры общей химии ИИТ и ЕН
 к.х.н., доцент

Л.А. Дейнека



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "БЕЛГОРОДСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА"**

308001, г. Белгород,
ул. Октябрьская, 58
тел. (4722) 27-64-76
факс (4722) 27-64-75
E-mail: zemledef2006@yandex.ru

19.10.2015 г. № 168/03

на № _____ от _____

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научно-исследовательской работы

Я, нижеподписавшийся, заведующий аналитической лаборатории к.б.н. Третьяков М.Ю., составил настоящий акт в том, что способ определения бетацианинов спектрофотометрическим методом, разработанный в работе «Усовершенствование спектрофотометрического и хроматографического способов определения антоцианов и бетацианинов» (автор Саенко И.И.), используется в аналитической лаборатории ФГБНУ «Белгородский НИИСХ» для контроля качества получаемой продукции.

Зав. аналит. лаб.



*Подпись Третьякова М.Ю. завершено:
специалист ОИ [подпись] [подпись]*

Третьяков М.Ю.



БелГУ
1876

СВИДЕТЕЛЬСТВО

№ 48

**о регистрации в качестве ноу-хау
результата интеллектуальной деятельности**

«Состав и способ получения масляного крема»

Зарегистрировано в Депозитарии «ноу-хау» «15» сентября 2011г.
на основании решения НТС НИУ «БелГУ» от 15.09.2011г.
Дата подачи заявления: 22 августа 2011г.

Правообладатель:
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Автор(ы): Дейнека Л.А., Мячикова Н.И.,
Дейнека В.И., Саенко И.И., Стрелецкая И.В.

РЕКТОР  Л.Я. Дятченко



Срок действия свидетельства на ноу-хау прекращается в результате:

- прекращения действия мер, предпринимаемых правообладателем по сохранению информации в конфиденциальном режиме;
- в момент раскрытия информации третьим лицам независимо от способа получения им этой информации



СВИДЕТЕЛЬСТВО

№ 49

**о регистрации в качестве ноу-хау
результата интеллектуальной деятельности**

**«Технология выделения, очистки,
концентрирования, получения готовых форм и
установления качественного и
количественного состава биологически
активных веществ: антоцианов»**

Зарегистрировано в Депозитарии «ноу-хау» «15» сентября 2011г.
на основании решения НТС НИУ «БелГУ» от 15.09.2011г.
Дата подачи заявления: 22 августа 2011г.


Правообладатель:
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Автор(ы): Дейнека Л.А., Дейнека В.И., Чулков А.Н.,
Саенко И.И., Шапошник Е.И., Анисимович И.П.

РЕКТОР **Л.Я. Дятченко**



Эрок действия свидетельства на ноу-хау прекращается в результате прекращения действия мер, предпринимаемых правообладателем по сохранению информации в конфиденциальном режиме, в момент раскрытия информации третьим лицом независимо от способа получения им этой информации.



СВИДЕТЕЛЬСТВО

№ 51

о регистрации в качестве ноу-хау результата интеллектуальной деятельности


«Технология выделения, очистки,
концентрирования и установления
качественного и количественного состава
биологически активных веществ:
бетацианинов»

Зарегистрировано в Депозитарии «ноу-хау» «15» сентября 2011г.
на основании решения НТС НИУ «БелГУ» от 15.09.2011г.
Дата подачи заявления: 22 августа 2011г.

Правообладатель:
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Автор(ы): Дейнека Л.А., Сасенко И.И., Дейнека В.И.

РЕКТОР Л.Я. Дятченко



Срок действия свидетельства на ноу-хау прекращается в результате:

- прекращения действия мер, предпринятых правообладателем по сохранению информации в конфиденциальном режиме;
- в момент раскрытия информации третьим лицом независимо от способа получения им этой информации.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2381245

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЦЕНТРИРОВАННОГО
КРАСИТЕЛЯ

Патентообладатель(ли): *Государственное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
"Белгородский государственный университет" (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2008128186

Приоритет изобретения 10 июля 2008 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений Российской Федерации 10 февраля 2010 г.

Срок действия патента истекает 10 июля 2028 г.

*Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной
собственности, патентам и товарным знакам*

Б.П. Симонов