

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

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Воронеж 2015

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»)

**Научный руководитель:** доктор химических наук, профессор  
Дейнека Виктор Иванович

**Официальные оппоненты:** Карцова Людмила Алексеевна,  
доктор химических наук, профессор,  
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский  
государственный университет», институт  
химии, кафедра органической химии,  
профессор

Нифталиев Сабухи Илич-Оглы,  
доктор химических наук, профессор,  
ФГБОУ ВО «Воронежский  
государственный университет  
инженерных технологий», факультет  
экологии и химической технологии,  
кафедра неорганической химии и  
химической технологии, заведующий

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Ордена Ленина и  
Ордена Октябрьской Революции  
Институт геохимии и аналитической  
химии им. В.И. Вернадского Российской  
академии наук

Защита состоится «16» марта 2016 г. в 14 часов 00 мин. на заседании диссертационного совета Д 212.038.19 при Воронежском государственном университете по адресу: 394006, Воронеж, Университетская площадь, 1, ауд. № 439.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Воронежского государственного университета и на сайте <http://www.science.vsu.ru>.

Автореферат разослан «15» января 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

 Крысин М.Ю.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**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 диссертационной работы** является разработка способов выделения из растительного сырья и готовой продукции антоцианов и

бетацианинов, их идентификации и количественный анализ 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 в экстрактах спектрофотометрическим методом позволяет уменьшить систематическую погрешность их 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 в зарубежном издании, входящем в базу Scopus и 5 тезисов и материалов конференций; 1 патент РФ.

**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.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обозначены актуальность темы, цель и задачи диссертационной работы, научная новизна, практическая значимость исследований, сведения об апробации работы и основные положения, выносимые на защиту.

В **Главе 1** Сопоставлены свойства натуральных и синтетических красителей, используемых в пищевой промышленности, приведен литературный обзор по антоцианам (Ац) и бетацианинам (Бц): рассмотрены строение, физико-химические характеристики, природные источники, факторы, влияющие на стабильность, а также методы качественного и количественного определения.

В **главе 2** приводится описание методов выделения и определения Ац и Бц, использованных в работе. Ац и Бц выделяли статической экстракцией из растительного сырья и из приобретенных в розничной торговле соков (чай каркаде (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», корнеплоды красной столовой свеклы (*Beta Vulgaris* L.), лепестки бугенвиллеи (*Bougainvillea*), плоды шпината земляничного (*Chenopodium foliosum*), листья амаранта (*Amaranthus* L.). Качественный и количественный состав экстрактов Ац и Бц определяли следующими физико-химическими методами аналитической химии: спектрофотометрия, ОФ и гидрофильная хроматография с диодноматричным и масс-спектрометрическим детектированием, горизонтальный электрофорез, твердофазная экстракция (ТФЭ).

В **главе 3** представлены результаты исследований и обсуждение полученных результатов:

Желтая окраска беталамовой кислоты (структура *a*, рис. 1) заменяется при конденсации *a* с *б* на красную вследствие увеличения цепи сопряжения в Бц

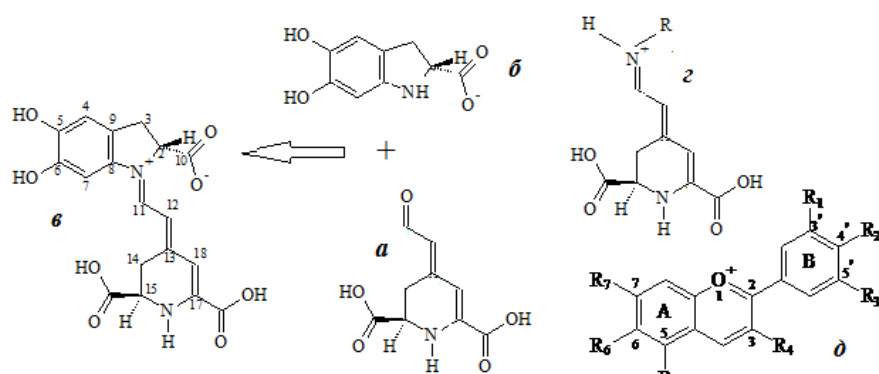


Рисунок 1 - Структура беталамовой кислоты (*a*), цикло-ДОФА (*б*), Бц (*в*), и антоцианидинов (*г*)

(структура *в*, рис. 1).

Если беталамовая кислота вступает в конденсацию с другими аминами (при отсутствии сопряжения с бензольным кольцом, то образуются желтоокрашенные Бк (структура *г*, рис. 1).

По литературным данным беталаины (общее название для Бц и Бк)

синтезируются в различных частях растений только одного порядка гвоздичноцветные - *Caryophyllales*. При этом ряд растений этого семейства и всех остальных семейств может иметь красную окраску,

обусловленную биосинтезом иных красителей – антоцианов Ац (структура  $\delta$ , рис. 1), встречающихся в природе значительно чаще<sup>1</sup>.

**Особенности определения антоцианов и бетацианинов спектрофотометрическим методом.** В общепринятом в мировой практике спектрофотометрическом методе количественного определения Ац (МО)<sup>2</sup> предлагается измерять оптическую плотность

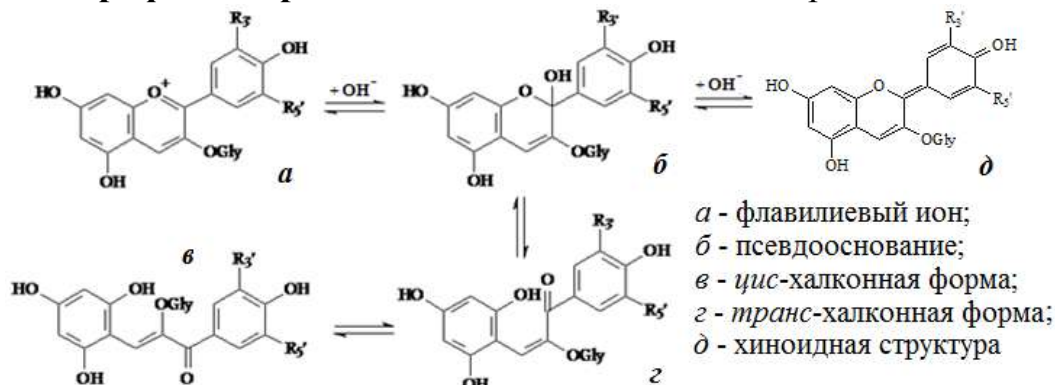


Рисунок 2 - Равновесия в растворах антоцианов

растворов при рН 1.0 и при рН 4.5. Действительно, в сильно кислых средах ниже рН 1.0 Ац присутствуют в окрашенной флавилиевой форме (рис. 2а). При повышении рН до 4.5 флавилиевая форма переходит в бесцветную полуацетальную форму (рис. 2б), находящуюся в равновесии с двумя (*цис*- и *транс*-) слабо окрашенными халконными формами (рис. 2в, 2з). При дальнейшем подщелачивании появляются новые структуры – хиноидные (рис. 2д), также окрашенные, но уже в сине-серо-зеленые тона.

При этом переход между всеми формами антоцианов не является мгновенным, что определяет особенность, не отмеченную в МО. Погрешность определения может достигать 23% (табл. 1). Более того, если рассмотреть равновесие между флавилиевой формой  $A^+$  и псевдооснованием В с константой равновесия К:

$$A^+ + H_2O = B + H^+, \quad K = \frac{[B] \cdot [H^+]}{[A^+]} = \frac{[C] - [A^+]}{[A^+]} \cdot [H^+], \quad \frac{[A^+]}{[C]} = \frac{[H^+]}{K + [H^+]},$$

то для серии растворов с одинаковой суммарной концентрацией всех форм Ац возможно, задавая значение К, построить теоретическую кривую, предсказывающую изменение интенсивности окраски растворов Ац (рис. 3). Тогда при определении оптической плотности раствора при рН 1.0 возможно либо недоопределение окрашенной флавилиевой формы, либо (в случае измерения интенсивности абсорбции при рН 4.5) рост недоопределения

Таблица 1 Спектрофотометрическое определение антоцианов

Время выдерживания, ч	Образцы соков с исходным значением рН ~ 3.5					
	Спектрофотометрическое определение с использованием МО					
	Сады Придонья	Лента	Золотая Русь	Rich	Я	Су-3-Glu
	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

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> 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.



концентрации Ац из-за неполного обесцвечивания экстракта (кроме внесения поправки на содержание полимерных соединений).

Расчет показывает, что при  $K > 0.003$ , что соответствует смещению кривой влево (рис. 3), будет возрастать степень недоопределения антоцианов из-за

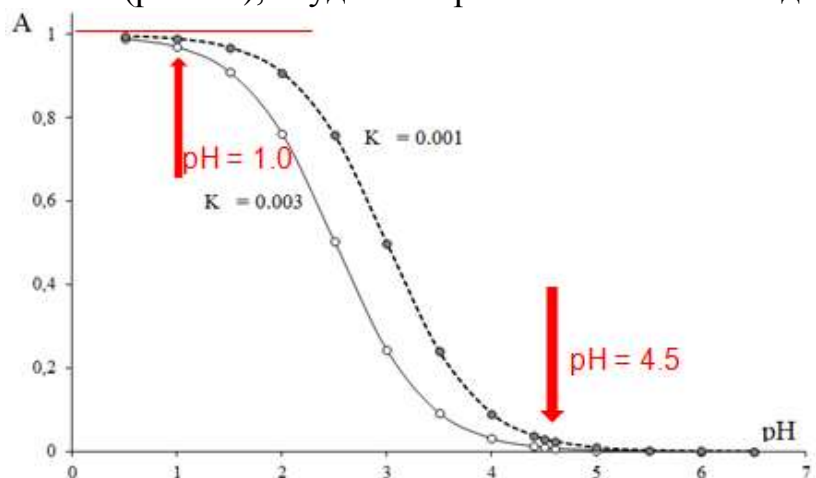


Рисунок 3 - Изменение интенсивности окраски растворов антоцианов при изменении pH за счет образования псевдооснования

неполного перехода антоцианов во флавилиевую форму, а при  $K < 0.001$  недоопределение будет связано с неполным переходом флавилиевой формы в псевдооснование. Нами показано, что при приготовлении растворов Ац с  $\text{pH } 4.5 \pm 0.3$  наблюдается тенденция уменьшения оптической плотности (рис. 4), что свидетельствует о том, что

минимум светопоглощения находится за пределами pH 4.5. Впрочем, при росте

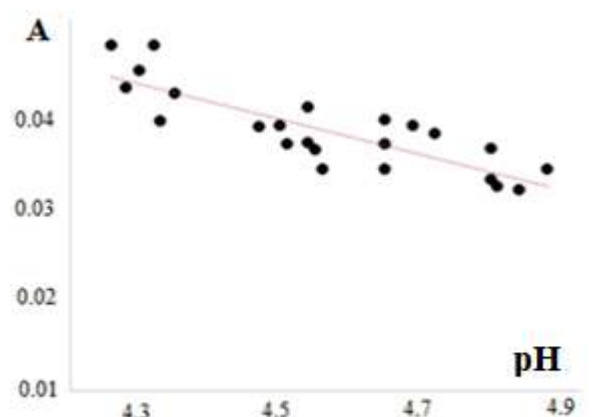


Рисунок 4 - Изменение интенсивности окраски растворов антоцианов в диапазоне pH 4.5 ± 0.3

pH может вырасти доля хиноидных структур, что также приведет к недооценке содержания Ац. Следовательно, выбирать второе значение pH лучше экспериментально для каждого конкретного образца. Наконец, следует учесть, что образец не должен содержать органические растворители, которые могут привести к смещению максимума абсорбции.

После введения всех выше перечисленных поправок удастся проводить спектрофотометрическое определение Ац в растительных объектах с погрешностью до 1.5%.

В растениях кроме Бц синтезируются и Бк, характеризующиеся гипсохромным смещением полос абсорбции. Поэтому в исходном экстракте обычно обнаруживается наличие двух перекрывающихся полос (рис. 5). При аналитической длине волны для определения Бц (538 нм) абсорбцией Бк можно пренебречь (рис. 5б), поэтому определение Бц может быть выполнено даже в присутствии Бк без систематических погрешностей с использованием коэффициента экстинкции  $60000 \text{ л}\cdot\text{см}\cdot\text{моль}^{-1}$  (табл. 2). Абсорбцией Бц (при определении Бк) при 469 нм (рис. 5в) пренебречь нельзя. Решение может быть найдено по методу Фирордта:

$$\begin{cases} A(535) = \varepsilon_{11} \cdot c_1 + 0 \cdot c_2 \\ A(469) = \varepsilon_{12} \cdot c_1 + \varepsilon_{22} \cdot c_2 \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} c_1 = \frac{A(535)}{\varepsilon_{11}} \\ c_2 = \frac{A(469) - \varepsilon_{12} \cdot c_1}{\varepsilon_{22}} \end{cases}$$



Таблица 2 Спектрофотометрическое определение бетацианинов красной свеклы

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 Шотема	47 ± 5	13 ± 1.4

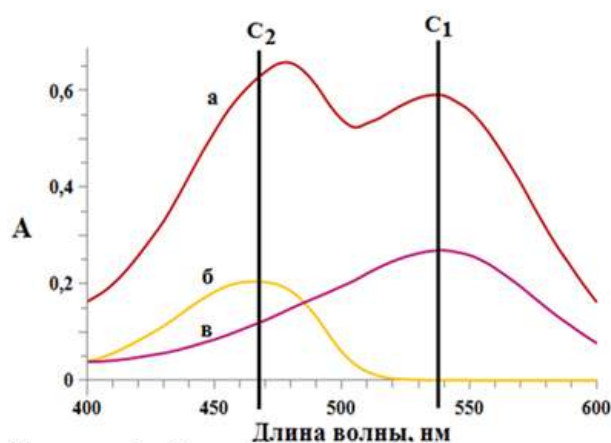


Рисунок 5 - Спектры комплекса беталаиновых красителей красной свеклы:

а - исходный экстракт беталаинов; б - Бк; в - Бц

где  $\varepsilon_{11} = 60000 \text{ л}\cdot\text{см}\cdot\text{моль}^{-1}$ ;  $\varepsilon_{22} = 48000 \text{ л}\cdot\text{см}\cdot\text{моль}^{-1}$ ;  $\varepsilon_{12} = 16427 \text{ л}\cdot\text{см}\cdot\text{моль}^{-1}$ ;  $c_1$  и  $c_2$  – концентрация бетацианинов и бетаксантинов, моль/л;  $A(535)$  – оптическая плотность бетацианинов при  $\lambda = 535 \text{ нм}$ ;  $A(469)$  – оптическая плотность бетаксантинов при  $\lambda = 469 \text{ нм}$ .

**Исследование устойчивости бетацианинов в водных растворах.** Для Бц одним из основных источников ошибок в количественном определении является их неустойчивость. Исследования показали, что наименьшая скорость разрушения Бц в водных растворах с ацетатными буферами наблюдается в диапазоне рН 4.5 ÷ 7. При этом при исследовании Бц методом ВЭЖХ с элюентом с рН 3.05 площади пиков довольно быстро уменьшаются при последовательном введении пробы одного и того же образца (табл. 3). Это уменьшение не является приборным

Таблица 3 Изменение площадей пиков бетанина и цианидин-3-глюкозида (%)

при последовательном хроматографировании одной и той же пробы с различными значениями рН (t = 30 °C)

Соединения	рН	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%

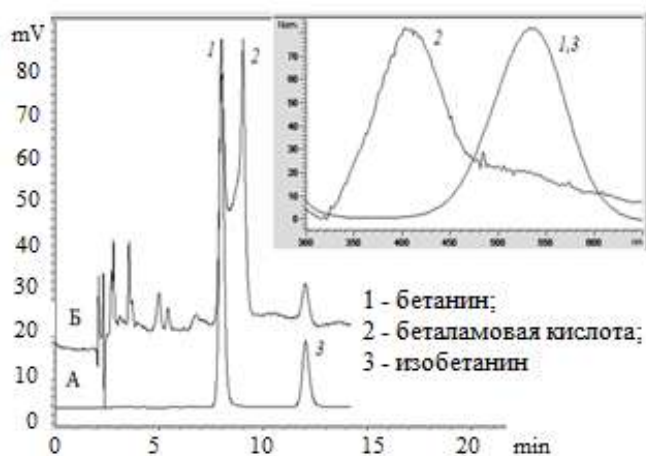


Рисунок 6 - Хроматограммы очищенных экстрактов красной свеклы на колонке (250×4.0 мм) Reprosil-Pur C18-AQ с элюентом 2 об % HCOOH и 7 об.% CH<sub>3</sub>CN в воде, записанные при 538 нм (А) и 405 нм (Б), и электронные спектры (вставка), записанные в ячейке детектора.

артефактом, поскольку для Ац такого падения не наблюдалось. Основным процессом распада Бц является обратимая деконденсация на окрашенную в желтый цвет беталамовую кислоту (рис. 1а) и бесцветный цикло-ДОФА (рис. 1б), что впервые подтверждено нами методом ВЭЖХ (рис. 6).

На хроматограмме проявляется картина, характерная для образования одного соединения при разрушении другого: пик начинается в максимуме, характерном для

выхода бетанина (рис. 6(1)), проходит через минимум и заканчивается в пике беталамовой кислоты (рис. 6(2)). Согласно закону разбавления, процесс деконденсации должен замедляться при работе с более концентрированными

Таблица 4 Изменение оптической плотности растворов бетацианинов с различной исходной концентрацией

Концентрация бетацианинов, ммоль/л	Время выдержки растворов, ч								Погрешность определения через 3.5 ч	$\Delta C, \%$
	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	$97.0 \pm 0.7 \%$	3.4
0.165	100	97.9	95.9	95.3	94.8	94.2	93.8	93.7	$95.1 \pm 1.1 \%$	6.3
0.062	100	97.5	91.6	89.0	87.7	86.6	85.9	85.3	$89.1 \pm 3.6 \%$	14.7
0.031	100	98.0	90.3	85.5	82.8	80.8	79.2	78.1	$85.0 \pm 6.2 \%$	21.9

растворами, что подтверждено нами экспериментально (табл. 4). Степень (и скорость) распада

Бц максимальна в самом разбавленном образце.

**Закономерности поведения антоцианов и бетацианинов в условиях ОФ ВЭЖХ.** Для определения Ац способом ВЭЖХ используют кислые среды для перевода Ац в заряженную флавилиевую форму, являющуюся окрашенной. Но выбор кислоты обычно никак не обоснован. В настоящей работе рассмотрено две элюентные системы: первая – подкислена фосфорной кислотой, вторая – муравьиной, но до достижения близкого значения  $pH = 1.5$ . Для сопоставления селективности разделения антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ в предложенных системах использовали метод относительного анализа удерживания. Оказалось, что подвижная фаза, приготовленная на основе муравьиной кислоты (при одной и той же концентрации ацетонитрила), обладает несколько большей элюирующей способностью и селективностью в случае разделения компонентов различной

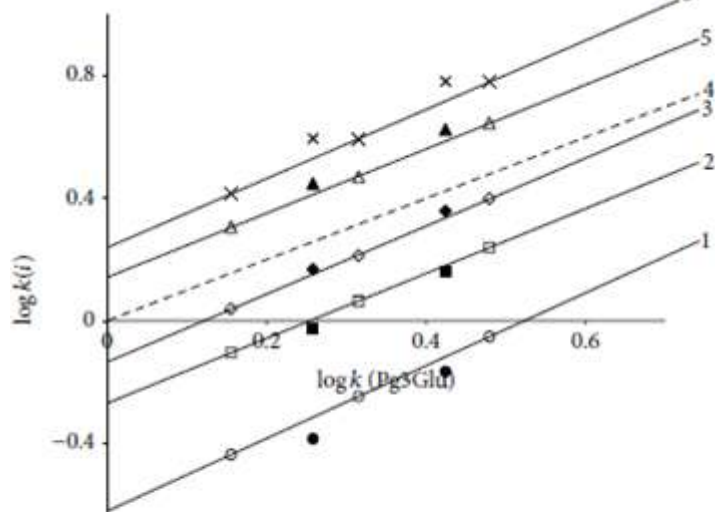


Рисунок 7 - Сопоставление карт разделения для шести 3-глюкозидов антоцианидинов в двух элюентных системах: 1 - 0.5 об.%  $H_3PO_4$ ; 2 - 10 об.%  $HCOOH$   
 Антоцианы: Dp3Glu (1), Cy3Glu (2), P3Glu (3), Pg3Glu (4), Pn3Glu (5) и Mv3Glu(6)

гидрофильности (рис. 7). В случае разделения антоцианов с различными углеводными радикалами при использовании ортофосфорной кислоты, как и в случае муравьиной кислоты, параметр  $a$ , в уравнении относительного анализа удерживания может быть использован для предварительной оценки структуры углеводного фрагмента, увеличиваясь в ряду «моно-, ди-, триглюкозиды» (табл. 5).

Уменьшение удерживание Ац при росте числа гидроксильных групп в структуре (независимо от положения

заместителя в агликоне), характерно для распределительного механизма. При этом толщина привитого слоя обращенной фазы имеет определяющее значение.

Принципиально иной характер изменения удерживания связан с заменой углеводных радикалов. Здесь удерживание определяется структурой изомерных фрагментов заместителей, что характерно для адсорбционного механизма.

На основании найденных закономерностей удерживания Ац в работе предположен «поплавочный» механизм: «поплавок» из углеводных радикалов

Таблица 5 Параметры относительного удерживания 3-гликозидов цианидина

Антоцианы	Система 1			Система 2	
	a	b	R <sup>2</sup>	a	b
Цианидин-3-моногозиды					
галактозид, Cy3Gala	0.983 ± 0.012	- 0.122	0.9998	0.976	-0.135
глюкозид, Cy2Glu	1	0	-	1	0
арабинозид, Cy3Ara	0.941 ± 0.011	0.140	0.9998	0.932	0.141
Цианидин-3-дигликозиды					
софорозид, Cy3Sopho	1.130 ± 0.012	- 0.251	0.9997	-	-
самбузиозид, Cy3Sam	1.112 ± 0.008	- 0.063	0.99997	1.148	- 0.066
рутинозид, Cy3Rut	1.133 ± 0.007	0.084	0.99999	1.131	0.099
арабинозилглюкозид, Cy3AGlu	1.126 ± 0.010	- 0.137	0.99995	1.138	-0.110
Цианидин-3-тригликозиды					
глюкозилрутинозид, Cy3GRut	1.313 ± 0.013	- 0.221	0.9997	1.308	- 0.235
ксилозилрутинозид, Cy3XRut	1.273 ± 0.008	- 0.036	0.99996	1.285	- 0.057

располагается на поверхности, а связанная с ним флавилиевая часть проникает вглубь привитой фазы. В таком случае уширение пиков Ац 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 (табл. 6), что число теоретических тарелок хроматографической системы для пиков 3-моно-, 3-ди и 3-тригликозидов цианидина оказывается действительно близким. То же справедливо и по отношению к одноптипным гликозидам различных антоцианидинов.

Если же в структуре молекулы появляются два гликозидных заместителя

Таблица 6 Параметры пиков некоторых антоцианов

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

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

(например, в положениях 3 и 5), то вероятность десорбции уменьшается (необходимо удалить с поверхности сорбента два «поплавка»), что должно привести к дополнительному уширению пиков.

И действительно, нами показано, 3,5-диглюкозиды антоцианидинов характеризуются на хроматограмме существенно более уширенными пиками (табл. 6).

Бц, также как и Ац, в кислой среде находятся в катионной форме. Но в отличие от антоцианов, при изменении рН меняют лишь зарядовое состояние не связанных (или почти не



связанных) с хромофором карбоксильных групп. При интерактивном расчете в тестовом режиме на сайте ChemAxon нами было найдено 18 различных заряженных и незаряженных структур.

Знак и величина заряда молекул Бц в растворах с различным значением pH подтверждены нами методом горизонтального электрофореза. Таким образом, в условиях ОФ ВЭЖХ удерживание Бц должно определяться остаточной гидрофобностью. В связи с этим нами показано, что в серии экспериментов в элюентах с постоянным содержанием ацетонитрила, но различным pH удерживание закономерно изменяется, воспроизводя схему смены зарядовых состояний (рис. 8).

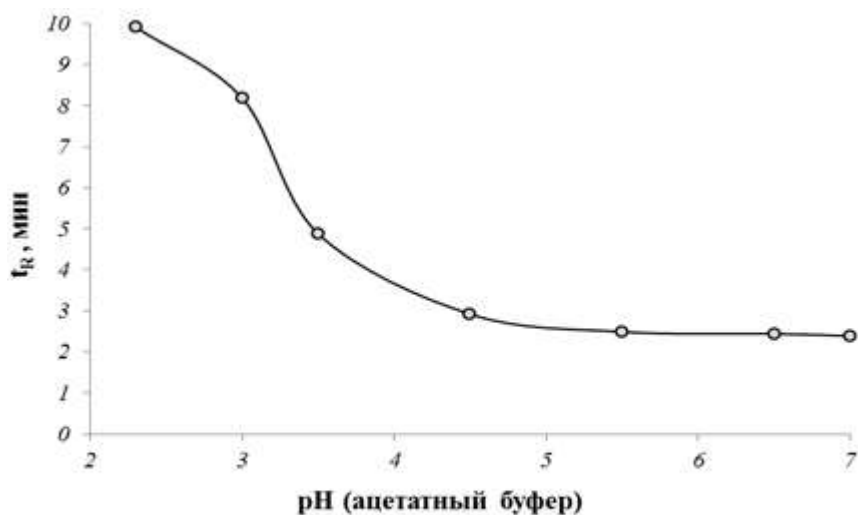


Рисунок 8 - Зависимость удерживания бетанина от pH  
Колонка: 250×4.0 мм Reprosil-Pur C18-AQ, подвижные фазы: 7 об.% ацетонитрила в 0.01 М ацетатном буфере, 1 мл/мин.

Следовательно, для стабильного элюирования производных бетацианидинов необходимы подвижные фазы с достаточно низким значением pH, позволяющим сохранить стабильность стационарной фазы. Например, 2 % (об.) муравьиная кислота, обеспечивающая pH 2.1.

В работе показано, что удерживание Бц на стационарной фазе Reprosil-Pur C18 оказывается существенно более высоким, чем на стационарной фазе Kromasil 100-5C18, обладающей существенно большей гидрофобностью, например по отношению к каротиноидам. Но, несмотря на большое различие в абсолютном удерживании изомеров – бетанина и изобетанина, на двух рассмотренных выше стационарных фазах, удерживание изобетанина относительно бетанина (в единицах логарифма фактора удерживания) в пределах ошибки эксперимента ( $\pm 0.002$ ) описывается одной и той же прямой линией. Различие в удерживании объяснено нами спецификой строения бетацианинов. В случае бетанина две карбоксильные группы в положении 2 и 15 ориентированы в разные стороны от плоскости агликона, тогда как в *изо*-форме – в одну. Т.е. в случае плоской сорбции изобетанина существует преимущественная ориентация, обеспечивающая высокое удерживание.

Необычное соотношение в факторах удерживания Бц на различных обращенных стационарных фазах объяснено нами эффектом коллапса фаз. Устойчивой к коллапсу оказалась лишь колонка Reprosil-Pur C18 с маркировкой AQ. Альтернативой ОФ ВЭЖХ является хроматография гидрофильных взаимодействий. Но традиционные для обращенных фаз элюенты, состоящие из водных растворов ацетонитрила и муравьиной кислоты, оказываются малоэффективными из-за присутствия гидрофильных взаимодействий муравьиной кислоты со стационарной фазой и/или аналитом.

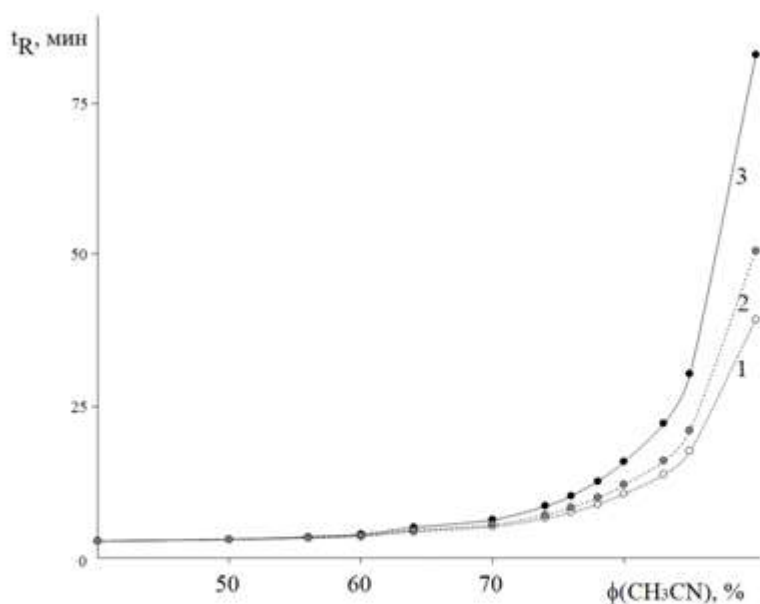


Рисунок 9 - Зависимость удерживания трех антоцианов от концентрации  $\text{CH}_3\text{CN}$   
 Колонка:  $250 \times 4.6$  мм, Kromasil 60-5DIOL, подвижные фазы системы « $\text{CH}_3\text{CN} - 0.5$  об. %  $\text{H}_2\text{PO}_4 - \text{вода}$ », 1 мл/мин. Антоцианы: 1 – цианидин-3-рутинозид; 2 – цианидин-3-самбубиозид; 3 – цианидин-3-(2''-ксилозилрутинозид).

А это приводит к ослаблению удерживания антоцианов.

При замене муравьиной кислоты на ортофосфорную времена удерживания антоцианов можно регулировать в больших пределах, за счет изменения состава подвижной фазы (рис. 9).

Из анализа относительного удерживания (рис.

10) видно, что основные закономерности элюирования антоцианов сохраняются: удерживание возрастает в ряду моно-, ди- и три-гликозиды. Это полностью

соответствует увеличению числа полярных (гидроксильных) групп во флавилиевом ионе и полярного характера взаимодействия «сорбат – стационарная фаза».

В случае изомерных форм Бц эффективность разделения теряется, поскольку определяющими сорбционными свойствами являются углеводородные радикалы, имеющие одинаковое число полярных гидроксильных групп. По этой же причине амарантины, являясь дигликозидами, удерживаются сильнее бетацианинов – моногликозидов.

### 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.

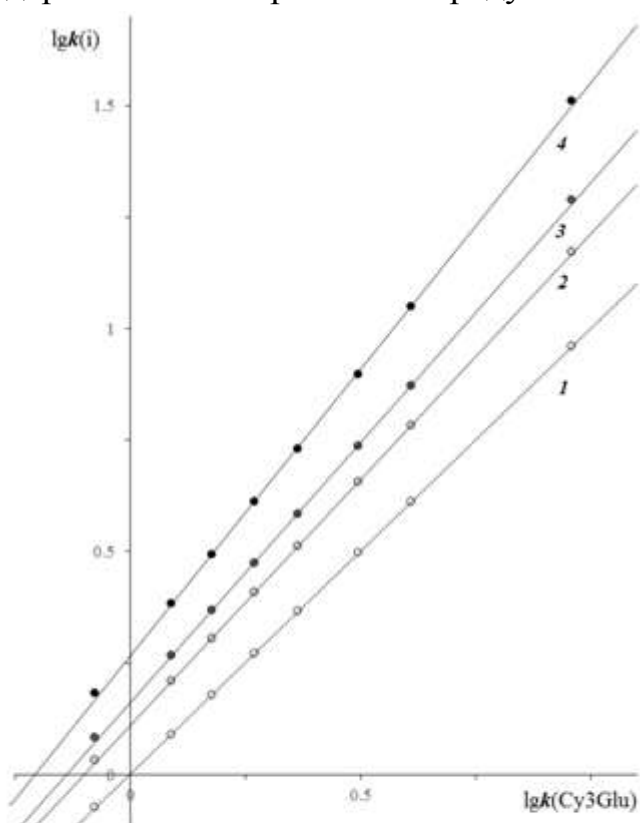


Рисунок 10 - Удерживание антоцианов плодов красной смородины относительно  $\text{Cy}_3\text{Glu}$   
 Колонка:  $250 \times 4.6$  мм, Kromasil 60-5DIOL, ПФ « $\text{CH}_3\text{CN} - 0.5$  об. %  $\text{H}_2\text{PO}_4 - \text{вода}$ »  
 1 – цианидин-3-глюкозид; 2 – цианидин-3-рутинозид;  
 3 – цианидин-3-самбубиозид;  
 4 – цианидин-3-(2''-ксилозилрутинозид).

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.

#### **Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:**

1. Особенности определения бетацианинов методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии / И.И. Саенко (Тыняная), В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека // Журнал аналитической химии. – 2015. – Т. 70. - №7. – С. 777-781.

2. Regularities of Anthocyanins Retention in RP HPLC for «Water–Acetonitrile–Phosphoric Acid» Mobile Phases / V.I. Deineka, L.A. Deineka, I.I. Saenko (Tynyanaya) // Journal of Analytical Methods in Chemistry. – 2015. – Article ID 732918.

3. Закономерности сорбции антоцианов природными глинами / Л.А. Дейнека, А.Н. Чулков, И.И. Саенко (Тыняная), В.И. Дейнека // Журнал прикладной химии. - 2009. - Т. 82. - Вып. 5. - С. 742-748.

4. Получение сухих форм бетацианинов свеклы / И.И. Саенко (Тыняная), Л.А. Дейнека, В.И. Дейнека // Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология. – 2012. - №2(3). – С. 177-179.

5. Закономерности хроматографического поведения бетацианинов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ / И.И. Саенко (Тыняная), В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, И.Э. Карпеева // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2013. – Т.13. – Вып. 4. – С. 492-499.

6. «Поплавочный» механизм удерживания в условиях обращенно-фазовой хроматографии / В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, И.И. Саенко (Тыняная), А.Н. Чулков // Журнал физической химии. – 2015. – Т. 89. - №7. – С. 1172-1177.

7. Бетацанины корнеплодов красной столовой свеклы / И.И. Саенко (Тыняная), О.В. Тарасенко, В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека // Научные ведомости БелГУ. - 2012. - №3(122). - Вып. 8. – С. 194-199.
8. Сопоставление двух классов водорастворимых антиоксидантов: антоцианов и бетацанинов / И.И. Саенко (Тыняная), В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека // Научные ведомости БелГУ. - 2012. - №10(129). - Вып. 8/14. – С. 131-136.
9. Метод экстракции и очистки антоцианов из плодов аронии черноплодной / Л.А. Дейнека, И.П. Блинова, А.Н. Чулков, И.И. Саенко (Тыняная), В.И. Дейнека, В.Н. Сорокопудов // Научные ведомости БелГУ. - 2012. - №10(129). - Вып. 18/2. – С. 60-64.
10. Патент 2381245 РФ. Способ получения концентрированного красителя / Л.А. Дейнека, В.И. Дейнека, А.Н. Чулков, Е.И. Шапошник, И.И. Саенко (Тыняная); патентообладатель: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный университет». - Опубл. 10.02.2010, Бюл. № 4. – С. 6.
11. Сорбционно-десорбционная очистка и концентрирование антоцианов / И.И. Саенко (Тыняная)// Материалы Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Нано- и супрамолекулярная химия в сорбционных и ионообменных процессах». – г. Белгород. – 2010. – С.131.
12. Сорбционная очистка и концентрирование бетацанинов / И.И. Саенко (Тыняная), В.И. Дейнека // Физико-химические основы ионообменных и хроматографических процессов (ИОНИТЫ-2011): сборник материалов XIII Международной конференции. - г. Воронеж. - 2011 г. - С. 408-411.
13. Карта разделения в аналитической хроматографии / В.И. Дейнека, А.Н. Чулков, И.И. Саенко (Тыняная), М.С. Лапшова, Л.А. Дейнека // Материалы II Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». - г. Краснодар. - 2013 г. - С.11.
14. Особенности твердофазной очистки биологически активных бетацанинов / И.И. Саенко (Тыняная), Л.А. Дейнека, В.И. Дейнека // 1-ая Зимняя молодежная школа-конференция с международным участием «Новые методы аналитической химии». Сборник тезисов. – СПб.: Соло, 2013 г. - С. 98.
15. Некоторые артефакты в хроматографии / В.И. Дейнека, И.И. Саенко (Тыняная), С.Л. Макаревич, Л.А. Дейнека // Физико-химические основы ионообменных и хроматографических процессов (ИОНИТЫ-2014): сборник материалов XIV Конференции и Третьего Всероссийского симпозиума с международным участием. - г. Воронеж. - 2014 г. - С. 380.

Работы 1 – 9 опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных результатов диссертации.