

УДК 543.544

ФРАКЦИОННЫЙ СОСТАВ АНТОЦИАНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ И КОНТРОЛЬ НАД НИМ МЕТОДОМ ВЭЖХ

© 2004 г. О.Б. Рудаков, А.Д. Хайрутдинова, А.П.Один, В.М. Болотов

Воронежская государственная технологическая академия

Изучен фракционный состав концентратов антоциановых красителей из выжимок черной смородины (*Ribes nigrum*), черноплодной рябины (*Aronia melanocarpa*) и каркадэ (*Hibiscus Sabdariffa* L.). Контроль над степенью извлечения, качественным и количественным составом осуществляли с помощью микроколоночной обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Натуральные антоциановые красители (Е163i) являются широко распространенными водорастворимыми колорантами и содержат в качестве основных пигментов антоцианы, являющиеся представителями флавоноидных соединений [1,2]. Источником антоциановых красителей является растительное сырье, в том числе и отходы его переработки. Антоциановые пигменты в растениях находятся в лепестках цветов, листьях, кожце фруктов, плодов, а также непосредственно в мякоти питательной части растений. В результате классических исследований антоцианов установлена структура шести основных классов их агликонов (антоцианидинов) – пеларгонидина, цианидина, дельфинидина, мальвидина, пеонидина, и петунидина.

Антоциановые пигменты, подобно другим натуральным пищевым красителям, содержат в своем

составе полезные биологически активные компоненты: витамины, гликозиды, органические кислоты, ароматические вещества, микроэлементы и т.п., поэтому их использование позволяет не только улучшить внешний вид, но и повысить биологическую ценность изделия [1,2].

Целью настоящей работы было изучение оптимальных условий экстракции красителя и разработка экспрессных методов контроля над качественным и количественным составом антоциановых пигментов.

Из литературных данных известно [1,2,4-6], что ягоды черной смородины (*Ribes nigrum*), черноплодной рябины (*Aronia melanocarpa*) и цветки каркадэ (*Hibiscus Sabdariffa* L.) содержат в своем составе следующие антоциановые пигменты (табл. 1).

Анализ экстрактов пигментов проводили с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жид-

Таблица 1.

Качественный состав антоцианов растительного сырья

Сырье	Антоциановый и флавоноидный состав	Ссылка
Черная смородина (<i>Ribes nigrum</i>)	цианидин-3-глюкозид, дельфинидин-3-глюкозид, цианидин-3-рутинозид, дельфинидин-3-рутинозид, цианидин-3-глюкозид и диглюкозид, дельфинидин-3-глюкозид и 3-диглюкозид (ацилированные), кверцетин, изокверцетин, мирицетин, кемферол.	[2,5]
Черноплодная рябина (<i>Aronia melanocarpa</i>)	цианидин-3-галактозид и цианидин-3-арабинозид, цианидин-3-ксилозид и цианидин-3-глюкозид, цианидин-3,5-диглюкозид, рутин, кверцетин, гесперидин	[1,2]
Каркадэ (<i>Hibiscus Sabdariffa</i> L.)	3-О-самбубиозид цианидина, 3-О-самбубиозид дельфинидина (гибисцин), дельфинидин, дельфинидин-3-глюкозид, цианидин-3-глюкозид.	[1,6]

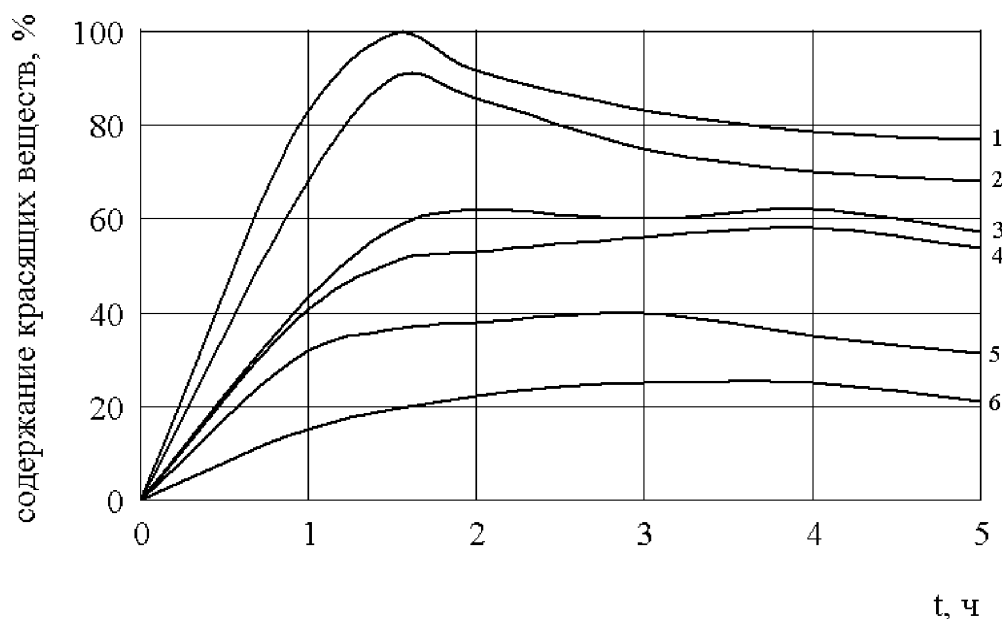


Рис. 1. Кривые выхода красящих веществ в зависимости от времени экстрагирования и концентрации экстрагента (этанола): 1 – 96 % об., 2 – 75 % об., 3 – 60 % об., 4 – 40 % об., 5 – 30 % об., 6 – 15 % об.

костной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе “Милихром-4”, колонка 2x80 мм, сорбент Силасорб S_{18} , размер частиц 7 мкм, подвижная фаза ацетонитрил – вода – уксусная кислота (2:8:0,05). Расход элюента – 80 мкл/мин, оптическая длина волны $\lambda = 280$ нм. Перед анализом подвижную фазу деаэрировали гелием в течение 10 мин. Для ее приготовления применяли ацетонитрил марки “для ВЭЖХ”, воду бидистиллированную, ледяную уксусную кислоту марки х.ч.

Нами предложен способ получения антоцианового красителя из растительного сырья, который заключается в том, что в качестве экстрагента выбран этиловый спирт с объемной долей этанола 96 %. Использование этанола способствует получению красителя с улучшенными технологическими характеристиками по сравнению с традиционными способами извлечения водными или водно-спиртовыми растворителями. На рис. 1 представлен график зависимости выхода красящих веществ в зависимости от вида экстрагента и времени извлечения антоцианового красителя [4].

Как видно из рис. 1, в первые 1,5 ч экстрагирования максимальный выход красящих веществ наблюдался при использовании 96 % этилового спирта в качестве экстрагента. Дальнейшая экстракция сопровождалась замедлением выхода спирторастворимой и увеличением экстракции водорастворимой фракции красящих веществ. Таким образом, при экстрагировании этанолом достаточным является длительность экстрагирования 1 – 2 ч.

Нами был изучен фракционный состав концентратов антоциановых красителей, полученных по

предложенному способу экстрагирования, а также состав их агликонов, полученных гидролизом по стандартной методике [2].

В табл. 2 приведены структуры компонентов экстрактов из выжимок ягод черной смородины (*Ribes nigrum*), черноплодной рябины (*Aronia melanocarpa*) и каркаде (*Hibiscus Sabdariffa* L.), молекулярная масса M и параметры, характеризующие их гидрофобно-гидрофильный баланс.

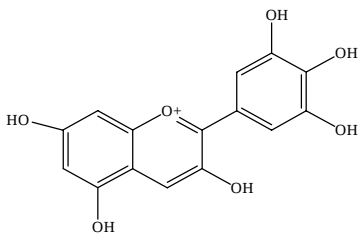
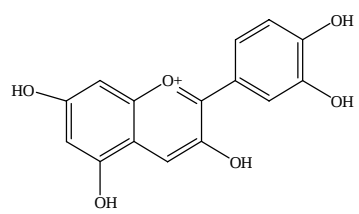
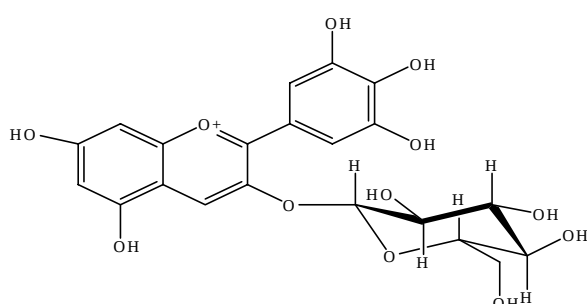
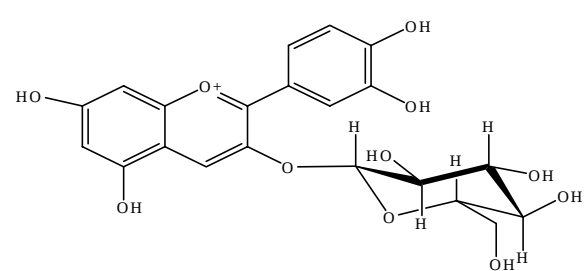
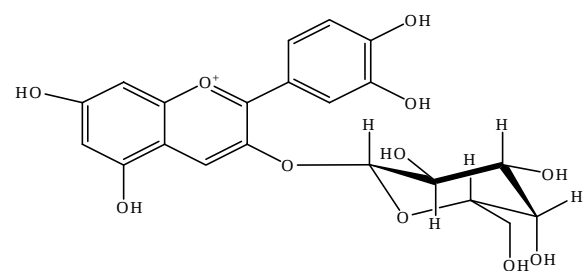
Логарифм коэффициента распределения в системе октан-1-ол – вода ClogP , рассчитанный по программе Chem Office 2002 с применением квантовохимических расчетов по алгоритму BioByte является характеристикой полярности (гидрофобности) соединений. Он активно используется в медицинской химии и биохимических исследованиях, а также применяется при прогнозе параметров удерживания аналитов в условиях ВЭЖХ [3,9]. Параметр гидрофобности H является упрощенным критерием гидрофобно-гидрофильного баланса Шатца [3]. Он не учитывает взаимного расположения полярных групп в молекуле, но для большой выборки соединений коррелирует с величиной ClogP ($R > 0,92$) и также применяется в оценке гидрофобно-гидрофильного баланса. В отличие от ClogP для его расчета не требуется сложных квантовохимических алгоритмов, он может быть рассчитан даже на калькуляторе по формуле $H = n_c - 4n_f^{1/2}$, где n_c – число гидрофобных фрагментов (число атомов С и галогенов), n_f – число полярных фрагментов (изолированных друг от друга полярных функциональных групп. Для соединений близкого строения предпочтение следует отдавать величине ClogP .

На рис. 2-7 приведены хроматограммы концентратов экстрактов красителей и продуктов их гидролиза, а в табл. 3 представлены результаты обработки полученных хроматограмм. Зная качественный

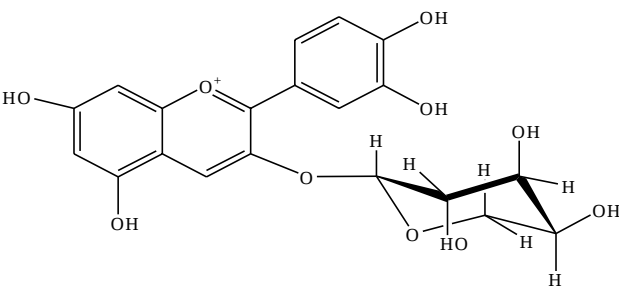
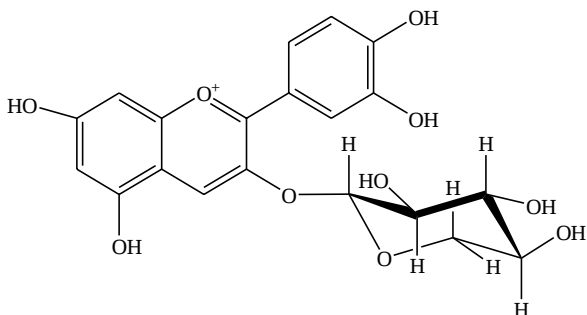
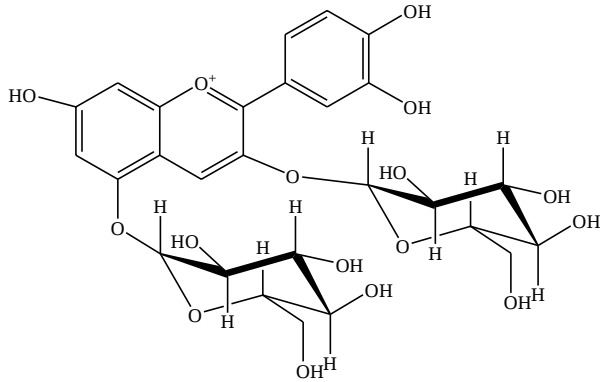
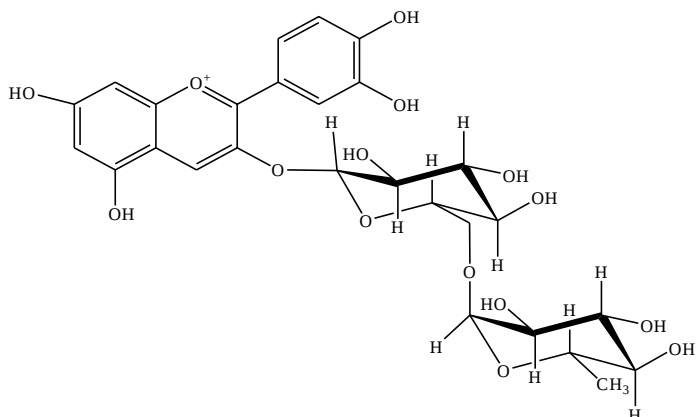
состав и зависимости удерживания сорбата от его структуры в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ (последовательность T_R), возможно провести идентификацию компонентов.

Таблица 2

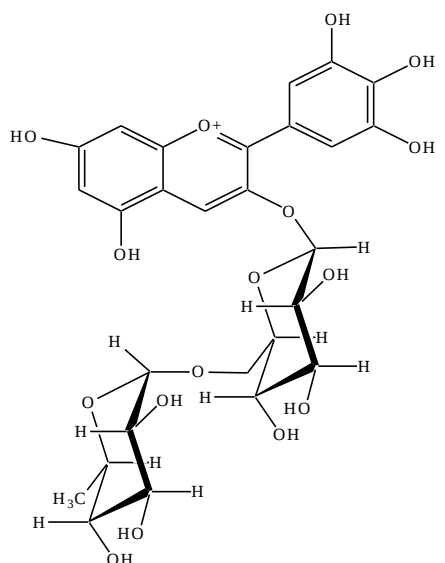
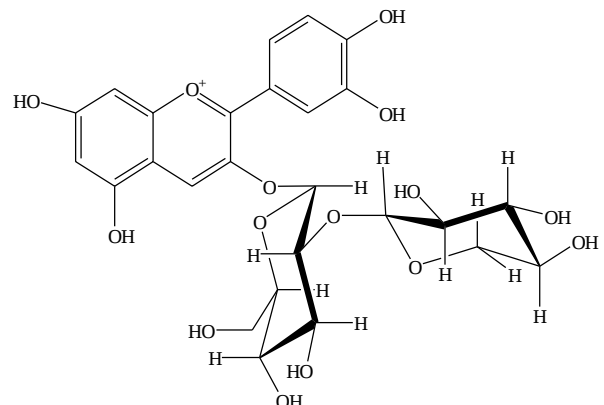
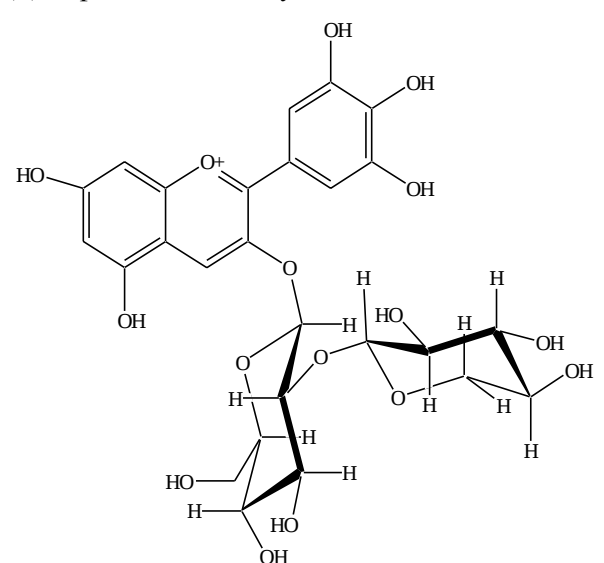
Физико-химические характеристики антоциановых соединений

Структура соединений	Clog P	M	H
Дельфинидин 	0,897	303,3	4,42
Цианидин 	1,564	287,25	5,20
Дельфинидин-3-глюкозид 	-0,67	465,393	7,14
Цианидин-3-глюкозид 	-0,005	449,393	7,73
Цианидин-3-галактозид 	-0,005	449,393	7,73

Физико-химические характеристики антоциановых соединений

Структура соединений	Clog P	М	Н
Цианидин-3-арабинозид 	0,220	419,367	7,35
Цианидин-3-ксилозид 	0,027	419,367	7,35
Цианидин-3,5-диглюкозид 	-1,604	611,5	11
Цианидин-3-рутинозид 	-1,07	595,5	11,51

Физико-химические характеристики антоциановых соединений

Структура соединений	Clog P	M	H
Дельфинидин-3-рутинозид 	-1,92	611,5	11,0
Цианидин-3-самбубиозид 	-1,30	581,5	10,51
Дельфинидин-3-самбубиозид 	-1,93	597,5	10

Фракционный состав экстрактов по данным ВЭЖХ

Образец	№ пика	t _R , мин.	содержание, %	Предполагаемые компоненты
Фракционный состав экстрактов красителей				
Краситель из каркадэ	1-2	3,5- 4,2	7	Д-3- и Ц-3-самбубио-зиды;
	3	4,7	65	Д-3- и Ц-3- глюкозиды
	4	5,8	18	Цианидин;
	5	9,3	10	не идентифицирован;
Краситель из черноплодной рябины	1	2,5	3	Ц-3,5-диглюкозид;
	2-5	3,4-4,7	70	Ц-3-глюкозид; рутин; Ц-3-галактозид;
	6	5,4	16	Ц-3-арабинозид; Ц-3-ксилозид; кверцетин;
	7	8,6	3	Цианидин;
Краситель из черной смородины	8-11	10,6-13,5	8	Гесперидин;
	1	1,7	11	не идентифицированы
	2	3,6	41	Д-3- и Ц-3-диглюкозиды;
	3	4,7	14	Д-3- и Ц-3-рутинозиды;
	4	6,4	8	Д-3- и Ц-3-глюкозиды;
	5-7	11,8 -15,1	26	Кверцетин; Дельфинидин;
				Цианидин;
				Не идентифицирован
Гидролизаты красителей				
Каркадэ	1	3,33	7,7	Не идентифицирован
	2	4,24	6,2	Дельфинидин
	3	4,70	49,2	Цианидин
	4	6,36	3,7	Ц-3- самбубиозид
	5	8,33	33,2	Не идентифицирован
Черноплодная рябина	1	2,55	37	Не идентифицирован
	2	3,76	12	Кверцетин;
	3	4,61	38	Цианидин;
	4	6,55	13	Гесперидин
Черная смородина	1	2,53	38	Не идентифицирован
	2	3,73	7,7	Мирицетин;
	3	4,10	12,3	Кверцетин;
	4	4,58	30,7	Дельфинидин;
	5	6,51	11,8	Цианидин

Примечание: Д – дельфинидин, Ц – цианидин.

Анализ данных [2,7,8] показывает, что в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ время удерживания агликонов (антоцианидинов) и гликозидов антоцианидинов зависит от степени гидроксилирования, чем она выше, тем меньше время удерживания T_R . Для полярных соединений характерны низкие или отрицательные значения ClogP и H . В первом приближении, T_R обратно пропорционально полярности антоцианов (рис. 8-9). Такой характер удерживания полностью согласуется с представлениями о его сольвофобном механизме, когда гидрофобные соединения вытесняются из свободного объема подвижной фазы к гидрофобной неподвижной привитой фазе C_{18} . Что касается M , то при одинаковом количестве полярных групп дольше удерживается соединение с большей M . Сравнивая собственные и лите-

ратурные, качественные и количественные данные о параметрах удерживания в зависимости от структуры антоцианов, авторы провели идентификацию фракционного состава экстрактов с использованием только одного метчика – рутина ($\text{ClogP}=-1,57$) (табл.1 и 2, рис.2-7). Отметим, что в настоящей работе данные получены не на стандартной колонке и не при детектировании в видимой области спектра, а при использовании микроколонки и УФ-детектора. С помощью УФ-детектора фиксируются не только окрашенные, но и бесцветные флавоноиды.

Наличие в гидролизатах пиков с низкими временами удерживания говорит скорее всего о неполном гидролизе исходных гликозидов.

Предварительное хроматографирование проводили в условиях многоволнового детектирования (210,

230, 254, 272, 280 и 330 нм). Установлено, что максимальное поглощение антоцианов наблюдается при 280 нм. В этой области как правило наблюдается максимум, характерный для соединений фенольного типа.

Как видно из хроматограмм экстрактов и их гидролизатов, они имеют индивидуальный профиль и по ним можно качественно судить о происхождении экстракта. В целом наши данные хорошо согласуются с результатами, полученными при анализе методом ВЭЖХ с применением видимого детектора с селек-

тивной аналитической волной 520 нм в градиентном режиме элюирования и другими методами идентификации. На рис. 10 представлен пример последовательности T_R антоцианов черной смородины, отнесенной к величинам ClogP предполагаемых компонентов (по данным табл.1). Совпадение в таких графиках данных о качественном составе смесей с прогнозируемым порядком удерживания служит самостоятельным подтверждением правильности выполненной идентификации. Нам не удалось выявить весь спектр антоцианов, входящих в состав экстрактов, и некоторые

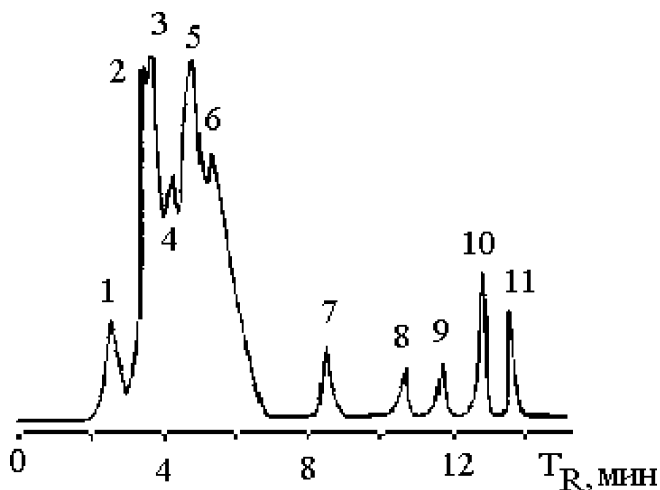


Рис. 2. Хроматограмма экстракта рябины черноплодной.

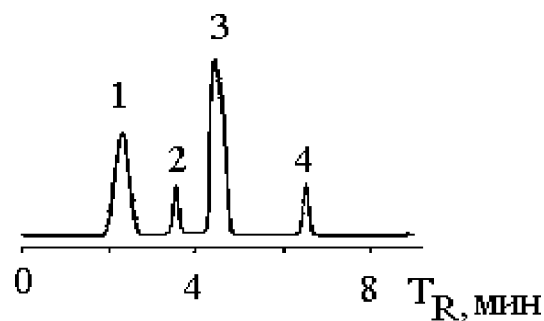


Рис. 5. Хроматограмма гидролизата рябины черноплодной.

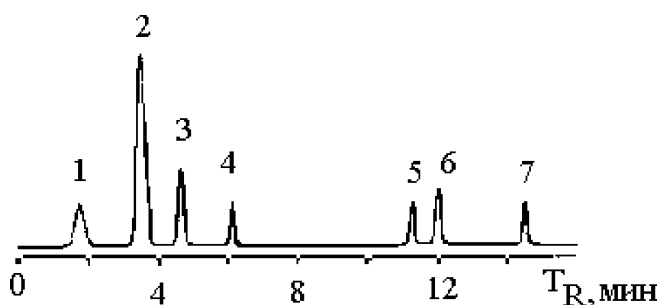


Рис. 3. Хроматограмма экстракта черной смородины.

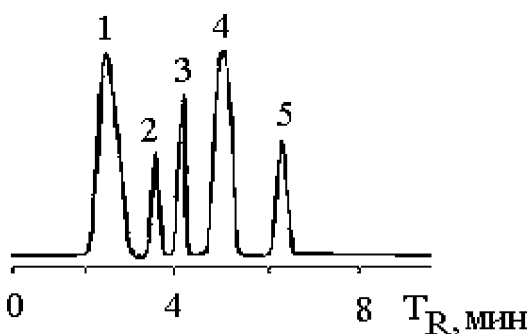


Рис. 6. Хроматограмма гидролизата смородины черной.

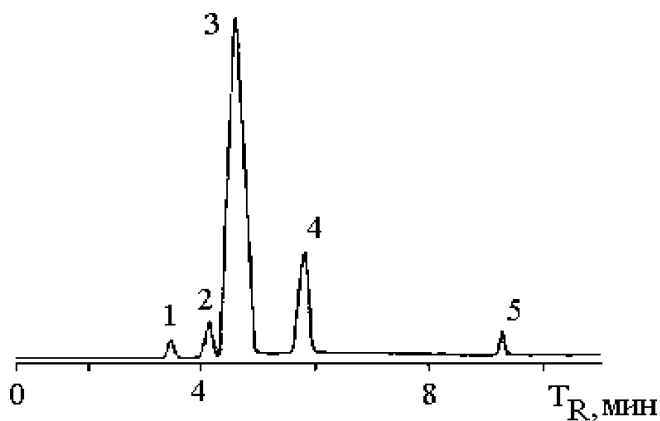


Рис. 4. Хроматограмма экстракта каркаде.

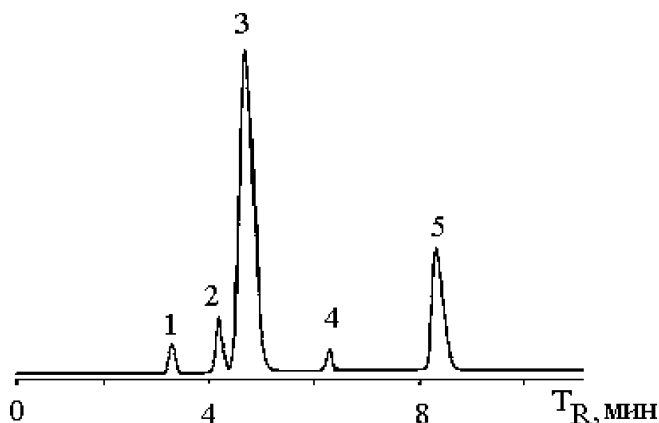


Рис. 7. Хроматограмма гидролизата каркаде.

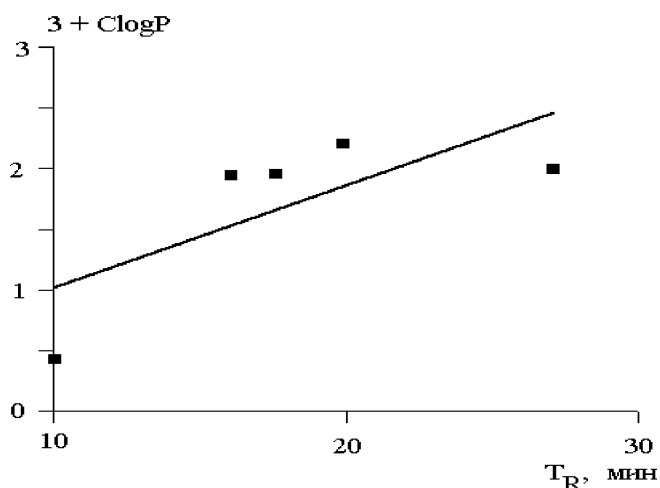


Рис.8. Корреляция между $ClogP$ и T_R гликозидов черноплодной рябины в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ на стандартных колонках [1].

хроматографические пики характеризуют смесь компонентов с близкими полярными свойствами. Это можно сделать только с использованием градиентного режима на колонках длиной 15-25 см. Тем не менее, нами показано, что микроколоночная ВЭЖХ с УФ детектором отличается экспрессностью и более информативна, чем спектрофотометрический анализ, она вполне позволяет выявлять особенности фракци-

онного состава экстрактов и контролировать динамику его изменения на разных стадиях экстракции и при контроле над сохранностью натурального красителя сложного состава.

На рис. 11 представлен график зависимости содержания суммы антоциановых пигментов X (в % от исходного) от длительности хранения их растворов в течение 45 суток. Растворы красителей находились в условиях естественного освещения (не допускалось попадания прямых солнечных лучей) при комнатной температуре. Данные по хранимостности красителей, полученные по сумме площадей хроматографических пиков основных компонентов практически полностью совпадают с интегральными данными спектрофотометрии при 520 нм.

Таким образом, при помощи обращенно-фазовой изократической микроколоночной ВЭЖХ с УФ детектированием изучен фракционный состав антоциановых красителей из трех растительных культур. Показана возможность данного метода ВЭЖХ осуществлять контроль над содержанием антоциановых красителей на разных стадиях технологического процесса – при проведении экстракции, при входном контроле (проверке аутентичности) красителя, а так же при проверке его сохранности в готовом продукте.

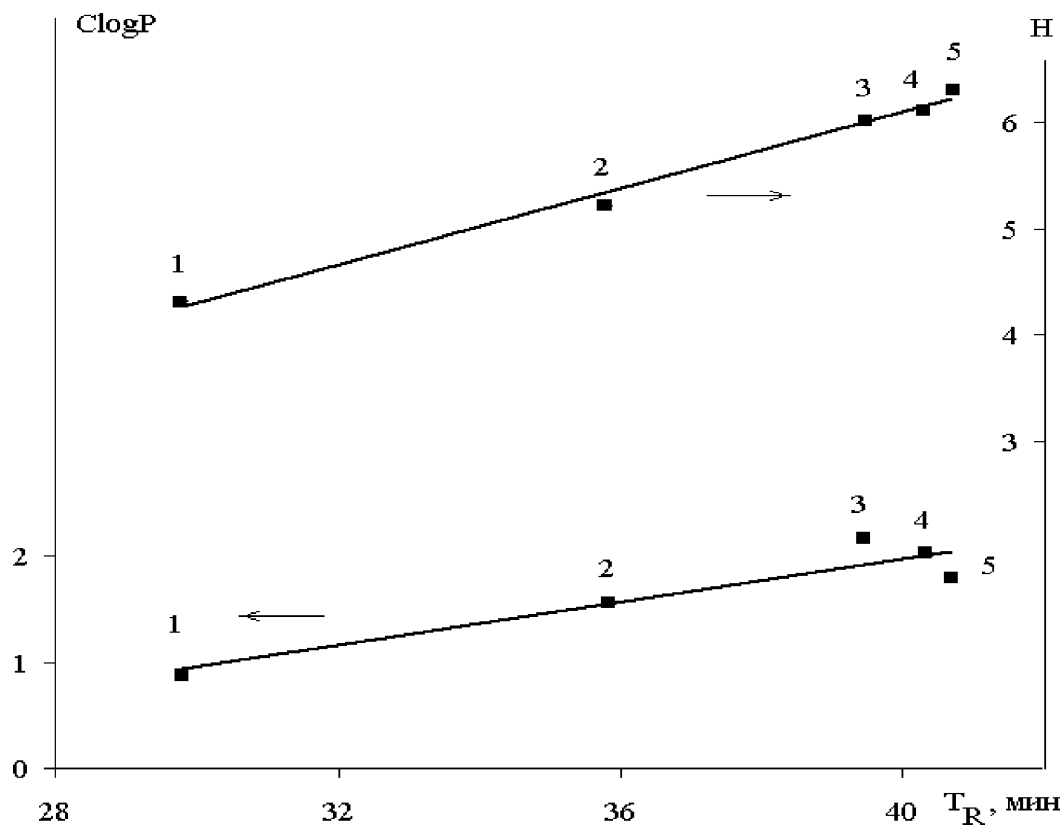


Рис.9. Корреляция между $ClogP$, H и T_R агликонов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ на стандартных колонках [7]: 1 – дельфинидин, 2 – цианидин, 3 – пеларгонидин, 4 – пеонидин, 5 – мальвидин.

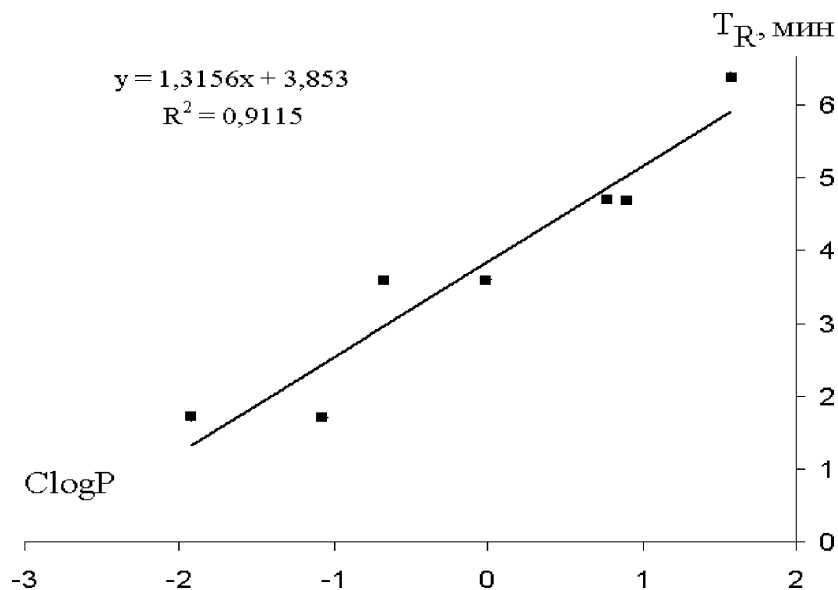


Рис. 10. Отнесение времен удерживания пиков к ClogP предполагаемых компонентов известного качественного состава антоцианов черной смородины.

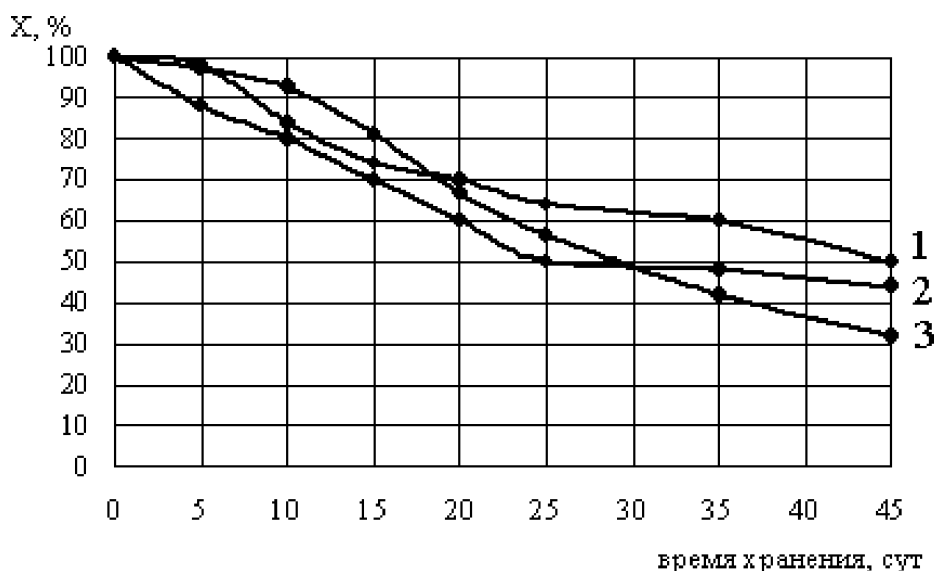


Рис. 11. Зависимость содержания основных фракций антоциановых красителей от времени хранения, 1 – краситель из рябины черноплодной, 2- краситель из каркаде, 3 – краситель из смородины черной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болотов В.М. Модифицированные пищевые красители растительного сырья: получение, состав, свойства и области применения. Дисс. ... докт. наук. Воронеж. – 2000. 380 с.
2. Танчев С.С. Антоцианы в плодах и овощах. – М.: Пищевая пром-сть, 1980. – 304 с.
3. Рудаков О.Б. Растворитель как средство управления процессом в жидкостной хроматографии. – Воронеж: ВГУ, 2003. – 300 с.
4. Патент 2220172 РФ. Способ получения антоцианового красителя из цветочного сырья/ А.П. Один, А.Д. Хайрутдинова, В.М. Болотов.
5. Харламова О.А., Кафка Б.В. Натуральные пищевые красители. – М.: Наука, 1989. – 191 с.
6. Аббас Аси Мохаммед, Бандюкова В.А., Пищков Ю.Г. и др. Растит. ресурсы. – 1993. – № 2. – С. 31.
7. Merken H. M., Beecher G.R. J. Chromatogr. A. – 2000, – V. 897. – P. 177.
8. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии / Под. ред. А. Хеншен и др. – М.: Мир, 1988. – 688 с.
9. BioByte (<http://www.biobyte.com>)