

УДК :543.421/424

## ОСОБЕННОСТИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОНОМЕРНЫХ АНТОЦИАНОВ

© 2020 г. Л. А. Дейнека<sup>а</sup>, А. Н. Сидоров<sup>а</sup>, В. И. Дейнека<sup>а, \*</sup>, Я. Ю. Кульченко<sup>а</sup>, И. П. Блинова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Белгородский государственный национальный исследовательский университет,  
Институт фармации, химии и биологии  
ул. Победы, 85, Белгород, 308015 Россия

\*e-mail: [deineka@bsu.edu.ru](mailto:deineka@bsu.edu.ru)

Поступила в редакцию 29.04.2019 г.

После доработки 01.06.2019 г.

Принята к публикации 28.12.2019 г.

Показано, что дифференциальный спектрофотометрический метод определения мономерных антоцианов (в смеси с полимерными) непригоден для измерений в случае антоцианов, ацилированных замещенными коричневыми кислотами. Это объясняется конкуренцией между реакцией нуклеофильного присоединения молекулы воды (с высвобождением  $H^+$ ) к флавилиевым ионам с образованием неокрашенной формы псевдооснования (А) и реакцией депротонирования флавилиевых ионов с образованием хиноноидных структур (Б), также имеющих окраску с некоторым батохромным сдвигом максимума абсорбции. Применимость дифференциального спектрофотометрического метода предложено оценивать путем сопоставления разностей спектров, полученных при различных рН (1, 2, 3, 4 и 4.5). Метод применим при преобладании направления А, когда указанные разности спектров неразличимы с учетом масштабирования. Метод неприменим при основном направлении Б, когда спектральные разности различаются. Во втором случае оправдан упрощенный метод определения антоцианов без учета полимерных антоцианов.

**Ключевые слова:** дифференциальный спектрофотометрический метод, определение антоцианов, реакции гидратации, реакции депротонирования, конкуренция, спектральные разности.

**DOI:** 10.31857/S0044450220060067

Антоцианы относятся к обширному классу флавоноидов, выделяясь среди них необычно высокой растворимостью в воде [1, 2], существованием в виде нескольких рН-зависимых форм [3, 4], среди которых имеются окрашенные, с присущей всем флавоноидам высокой антиоксидантной активностью [1, 4, 5]. Перечисленные выше свойства определяют большой интерес к антоцианам как к природным красителям для пищевой и медицинской промышленности [1, 6]. Антоцианы могут быть выделены в кристаллическом состоянии [2, 7], но вследствие биосинтеза в растительных источниках в виде сложного набора соединений различного строения и высокой реакционной способности получение индивидуальных антоцианов со строго определенным составом проблематично. Из-за этого, например, молярные коэффициенты поглощения, найденные различными исследователями для одних и тех же антоцианов, могут заметно различаться [8]. Так, очевидно, что непригодность использованных в работе стандартных образцов антоцианов является причиной большого различия (около 200%) результатов количественного определения антоцианов в не-

скольких растительных объектах спектрофотометрическим и хроматографическим методами [9]. Однако если при анализе методом ВЭЖХ концентрацию антоцианов в градиурочных растворах определять спектрофотометрически, то полученные результаты хорошо совпадают [10].

Решением проблемы может быть пересчет результатов спектрофотометрического метода на один из наиболее распространенных антоцианов, например на цианидин-3-глюкозид хлорид, используя наиболее достоверное значение молярного коэффициента поглощения [8]. Однако в экстрактах наряду с мономерными антоцианами (МА) могут присутствовать продукты их полимеризации – полимерные антоцианы (ПА) [8]. Абсорбцию ПА обычно стремятся исключить из конечной оптической плотности для расчета содержания МА, несмотря на то, что в экстракте могут появиться еще и пираноантоцианы [11].

Настоящая работа посвящена исследованию наиболее часто используемого для определения МА дифференциального спектрофотометрического метода (ДСФМ) [8], адаптированного в Российской Федерации в виде ГОСТ [12].

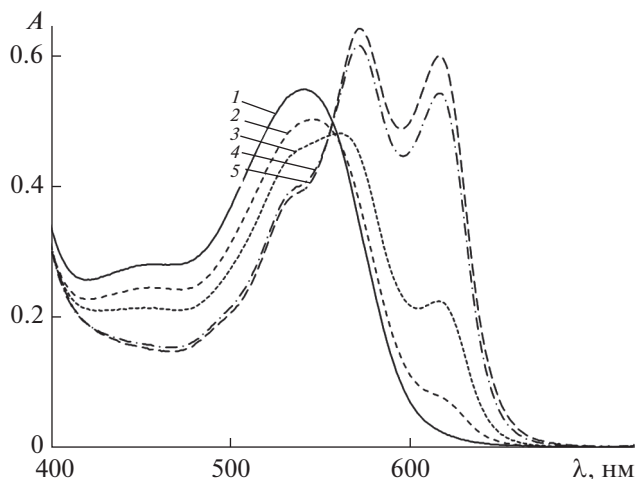


Рис. 1. Электронные спектры поглощения экстракта цветков *Clitoria ternatea* при pH 1 (1), 2 (2), 3 (3), 4 (4) и 4.5 (5).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экстракты антоцианов готовили настаиванием растительного материала в 0.1 М водном растворе соляной кислоты в течение суток и хранили в бытовом холодильнике. Для контроля видового состава экстракты очищали методом твердофазной экстракции на патронах ДИАПАК С18 (БиохимМак СТ, Москва).

При спектрофотометрическом определении аликвоту экстракта ( $V_a$ ) разбавляли до метки в колбе емк.  $V_k$ , доводя pH до 1 (1 М HCl в воде), и записывали первый спектр (относительно этанола) с максимумом абсорбции  $A_1(\lambda_1)$  при длине волны  $\lambda_1$ . К другой такой же аликвотной порции экстракта ( $V_a$ ) добавляли 1 М водный раствор NaOH, доводя pH до 4.5 и разбавляя до метки ( $V_k$ ) ацетатным буферным раствором с pH 4.5, и записывали второй спектр, определяя второе значение оптической плотности  $A_2(\lambda_1)$  при той же длине волны.

Электронные спектры поглощения записывали на спектрофотометре Shimadzu UV 2550 в кварцевых кюветках. После получения базовой линии спектры записывали при обнулении при  $\lambda = 700$  нм (для исключения влияния рассеяния на коллоидных частицах экстракта). Оптическую плотность для расчета концентрации мономерных антоцианов в пробе находили прямым вычитанием двух изменений:

$$A = A_{\lambda(\max)}(\text{pH } 1) - A_{\lambda(\max)}(\text{pH } 4.5), \quad (1)$$

$$A = \epsilon cl. \quad (2)$$

Концентрацию мономерных антоцианов в исходном экстракте рассчитывали с учетом использованных объемов:

$$c = \frac{A}{26900} \frac{V_k}{V_a}, \quad (3)$$

где  $c$  – концентрация антоцианов в образце в пересчете на цианидин-3-глюкозид, М;  $l$  – длина оптического пути, см; 26900 – молярный коэффициент поглощения, л моль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>;  $V_k$  и  $V_a$  – объемы колбы и аликвоты соответственно, мл.

При записи спектров при различных значениях pH использовали одни и те же объемы аликвот исходного раствора, pH доводили до нужного значения добавлением 0.1 или 0.01 М раствора NaOH и разбавляли растворы до метки. Численные характеристики полученных спектров с шагом 1 нм экспортировали из программы обработки УФ-спектров прибора Shimadzu в MS Excel для последующей обработки.

Для измерения pH растворов использовали pH-метр pH-150МИ с комбинированным стеклянным электродом ЭСК-10603.

Для контроля видового состава антоцианов в образцах применяли хроматографическую систему Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами; колонку (150 × 2.1 мм) Kromasil 100–5C18 при температуре термостата колонок 40°C и градиентный режим элюирования. Элюент А содержал 10 об. % муравьиной кислоты и 8 об. % ацетонитрила в воде. Элюент Б – 10 об. % муравьиной кислоты и 20 об. % ацетонитрила в воде. Режим элюирования: 0 мин – 100% А, 20 мин – 100% Б, 30 мин – 100% Б, 31 мин – 0% Б. Расход подвижной фазы 200 мкл/мин. Хроматограммы записывали при 515 нм (рис. 1). Масс-спектрометрические измерения выполняли в режиме ионизации электрораспылением со сканированием положительно заряженных ионов, задавая напряжение на фрагменторе 225 В для частичной фрагментации исходных “молекулярных” ионов.

Хроматограммы записывали, хранили и обрабатывали, используя программное обеспечение Agilent ChemStation.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Дифференциальный спектрофотометрический метод определения антоцианов основан на том, что в сильноокислых растворах (pH ≤ 1) эти соединения существуют в окрашенной флавиловой форме (схема 1, Д). Это позволяет выполнять первое измерение в максимуме оптической плотности, положение которого зависит от типа агликонов и характера их гликозилирования, включая

ацилирование некоторыми органическими кислотами. Поправки на рассеяние света на коллоидных частицах (при 700 нм) осуществляются в спектрофотометре Shimadzu UV-2550 автомати-

чески при активации соответствующей функции. В таком случае:

$$A_1 = A_{\lambda(\max)}(\text{pH } 1) - A_{700 \text{ нм}}(\text{pH } 1). \quad (4)$$

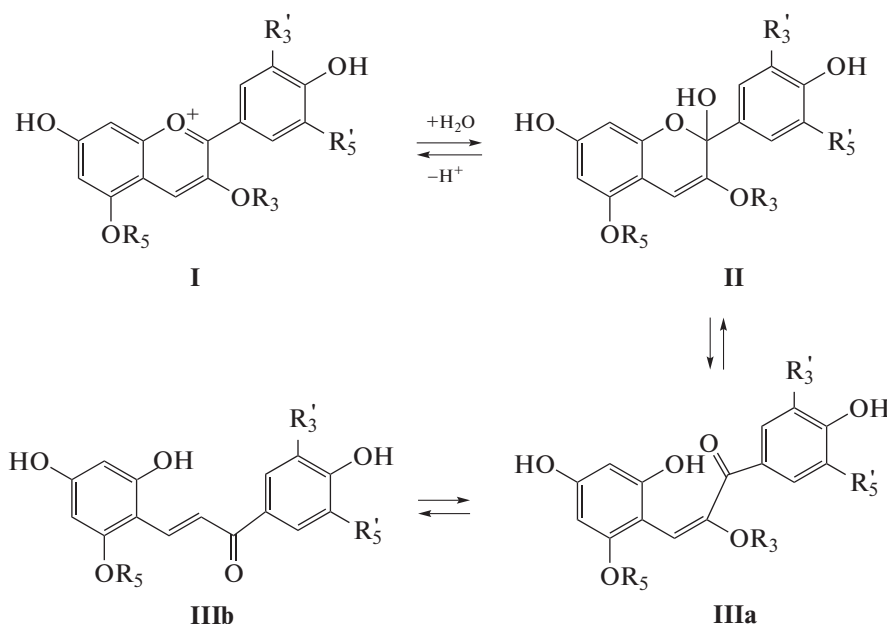


Схема 1. Схема превращения флавилиевого иона (I) в псевдооснование (II) и в халконные (IIIa и IIIb) формы.

Выполнение второго измерения основано на предположении о том, что при повышении pH окрашенная флавилиевая форма постепенно превращается в неокрашенную форму псевдооснования (схема 1, II [3]) за счет нуклеофильной атаки молекулой воды положения 2 флавилиевого иона с последующим выбросом протона (реакция гидратации, hydration reaction). Считается, что при pH 4.5 флавилиевая форма полностью исчезает. В этом случае оптическая плотность раствора определяется только концентрацией ПА, что позволяет выполнить второе измерение:

$$A_2 = A_{\lambda(\max)}(\text{pH } 4.5) - A_{700 \text{ нм}}(\text{pH } 4.5). \quad (5)$$

Предполагается, что разность результатов двух измерений (конечный показатель в ДСФМ) соответствует оптической плотности, определяемой только концентрацией МА, уравнение (2). Форма псевдооснования (или полуацетальная форма) находится в равновесии с *цис*-халконной формой (схема 1, IIIa) (слабоокрашенной в коротковолновой области), которая, в свою очередь, находится в равновесии с также слабоокрашенной *транс*-халконной формой (схема 1, IIIb). Несмотря на то, что повышение pH с 1.0 до 4.5 обычно приводит к существенной потере интенсивности окраски, описанный подход имеет несколько ограничений.

1) Равновесия (между формами II, IIIa и IIIb) не зависят от pH, поэтому изменение интенсивности окраски антоцианов можно контролировать при различных pH при заданной константе гидратации флавилиевого иона,  $K_h$ . Из данных работы [10] следует, что не существует такой  $K_h$ , при которой доля флавилиевой формы в растворе при pH 1 была бы равна 100%, а при pH 4.5 – 0%. Однако этот недостаток (потеря примерно 1.5% флавилиевой формы при вычитании оптических плотностей) можно устранить поправкой в молярном коэффициенте поглощения. Таким образом, отличие от нуля абсорбции антоцианов при pH 4.5 необязательно указывает на присутствие полимерных форм.

2) По данным [3], равновесие между формой псевдооснования и *цис*-халконной формой устанавливается быстро, а между *цис*- и *транс*-халконными формами – медленно [3]. В связи с этим перевод всех форм во флавилиевую форму требует определенного времени (в зависимости от исходного состояния). По нашим данным для достижения равновесия требуются примерно сутки. При выдержке в течение 6 ч раствора при pH 1 при комнатной температуре “потеря” антоцианов не превысит 1–2%. В этом отношении вызывает вопрос рекомендация официальной методики [8] выдерживать такой раствор перед измерением в течение от 15 мин до 1 ч, поскольку при

более длительной выдержке наблюдается увеличение оптической плотности (!?).

3) Наиболее серьезное ограничение, которое ставит под вопрос возможность применения ДСФМ, заключается в следующем. При повышении pH, кроме превращения в форму псевдооснования (А), возможно иное направление течения реакции — депротонирование флавилиевых ионов с образованием хиноноидных структур (Б) [3] (схема 2) — незаряженных форм IVa и IVb и за-

ряженной V. При этом число и устойчивость таких структур и вероятность их образования зависят от строения антоцианов [13]. Хиноноидные структуры также окрашены (с небольшим bathochromным сдвигом максимума абсорбции [14] для незаряженных форм), поэтому измерение абсорбции при pH 4.5 бессмысленно, а применение ДСФМ может привести к существенной недооценке содержания МА.

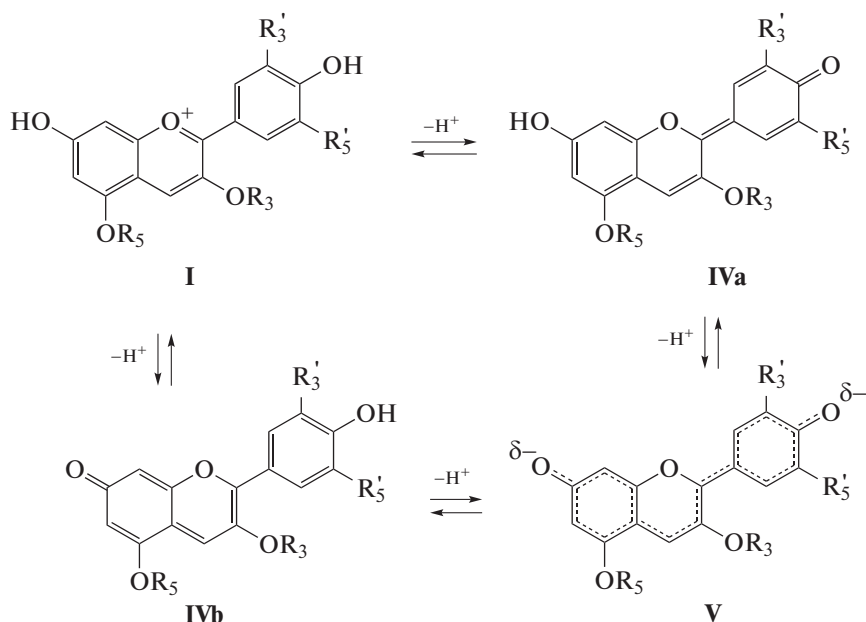


Схема 2. Схема превращения флавилиевого иона (I) в хиноноидные незаряженные (IVa и IVb) и в хиноноидную заряженную (V) формы.

Для оценки возможности применения ДСФМ можно воспользоваться предлагаемой ниже схемой: 1) записывают в численном виде электронный спектр поглощения экстракта при pH 1 с шагом 1 нм, получая функцию  $A_{pH 1}(\lambda)$ ; 2) аналогично находят функции при pH 2, 3 и 4; 3) рассчитывают разностные спектры:

$$A_{1-2}(\lambda) = A_{pH 1}(\lambda) - A_{pH 2}(\lambda), \quad (6)$$

$$A_{1-3}(\lambda) = A_{pH 1}(\lambda) - A_{pH 3}(\lambda), \quad (7)$$

$$A_{1-4}(\lambda) = A_{pH 1}(\lambda) - A_{pH 4}(\lambda). \quad (8)$$

Если при изменении pH в ряду  $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 4$  происходит только уменьшение концентрации флавилиевой формы, то полученные разности (6)–(8) могут различаться только интенсивностью — разность любой пары не отличается от нулевой линии при подборе коэффициента  $g$ , например:

$$A_{1-3}(\lambda) = gA_{pH 1-4}(\lambda). \quad (9)$$

В этом случае применение ДСФМ оправдано. В противном случае применение этого метода следует исключить.

В ряде случаев невозможность применения ДСФМ очевидна уже при визуальном анализе набора спектров, записанных при различных pH. Так, в случае экстракта лепестков цветков *Clitoria ternatea* (голубой тайский императорский чай) при pH 4.5 оптическая плотность очень велика, а в максимуме превосходит оптическую плотность раствора флавилиевой формы (рис. 1). Следует отметить, что антоцианы этого растения уникальны — они построены на дельфинидине со сложным чередующимся гликозилированием (глюкозой) и ацилированием (*para*-кумаровой кислотой) кольца В [15]. Дифференциальный спектрофотометрический метод неприменим также для определения антоцианов краснокочанной капусты (рис. 2), в антоцианах которой наблюдается двойное ацилирование цианидин-3-софорозид-5-глюкозида по гликозидному радикалу в положении 3 синаповой, феруловой или *para*-кумаровой кислотами

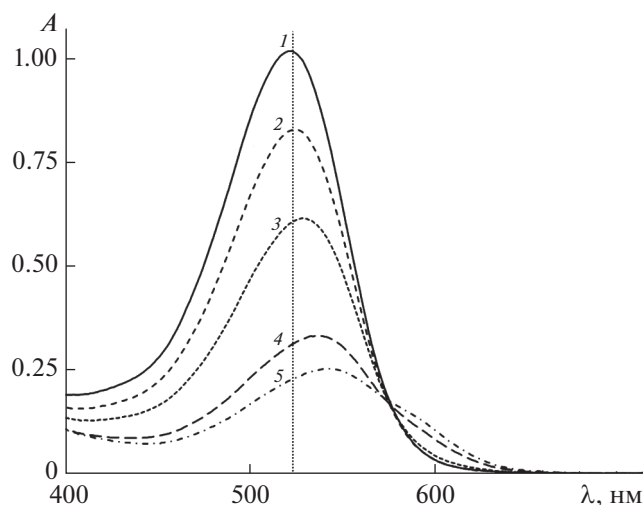


Рис. 2. Электронные спектры поглощения экстракта краснокочанной капусты при pH 1 (1), 2 (2), 3 (3), 4 (4), 4.5 (5).

[16]. Результаты некоторых измерений представлены в табл. 1 с указанием возможности применения ДСФМ, установленной по спектральным разностям.

По нашим наблюдениям ДСФМ практически неприменим к анализу экстрактов, содержащих антоцианы, ацилированные производными коричной кислоты. В таких случаях оправдано ис-

Таблица 1. Применимость дифференциального спектрофотометрического метода к определению мономерных антоцианов в некоторых растительных объектах

Растительный материал	Типы антоцианов	pH 1.0 (pH 4.5)		$\alpha^*$ , мол. %	Применимость
		$\lambda_{\text{max}}$ , нм	$A$		
Арония, плоды	Моногликозиды	510 (518)	0.914 (0.081)	91.1	Да
Боярышник, плоды	Моногликозиды	512 (511)	0.660 (0.068)	89.7	Да
Виноград, плоды	Моногликозиды + ацилиро- ванные КК**	518 (523)	0.719 (0.118)	83.6	Нет
Ирис, цветки.	Смесь, включая ацилирован- ные КК	523 (529)	0.880 (0.555)	36.9	Нет
Капуста, листья	В основном ацилированные КК	522 (537)	0.802 (0.253)	68.5	Нет
Кукуруза, обертки	Смесь, включая ацилирован- ные МК***	511 (514)	0.335 (0.054)	83.9	Да
Паслен, плоды	Ацилированные КК	526 (532)	1.056 (0.129)	87.8	Нет
Роза, цветы	Дигликозиды	514 (523)	1.405 (0.084)	94.0	Да
Черная смородина, плоды	Моно- и дигликозиды	515 (518)	0.272 (0.037)	86.4	Да
Черемуха, плоды	Моно и дигликозиды	513 (520)	0.902 (0.142)	84.3	Да

\* Доля в оптической плотности, приходящаяся на мономерные антоцианы, \*\* КК – *para*-кумаровая кислота, \*\*\* МК – малоновая кислота.

пользование упрощенной методики, не предполагающей измерение оптической плотности при рН 4.5.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bueno J.M., Ramos-Escudero F., Sáez-Plaza P., Muñoz A.M., Navas M.J., Asuero A.G.* Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part I: General considerations concerning polyphenols and flavonoids // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2012. V. 42. P. 102.
2. *Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Сидоров А.Н., Костенко М.О., Блинова И.П.* Оценка растворимости антоцианов с использованием насадок для твердофазной экстракции // *Журн. физ. химии*, 2016. Т. 90. № 4. С. 622. (*Deineka V.I., Sidorov A.N., Deineka L.A., Kostenko M.O., Blinova I.P.* Estimating the solubility of anthocyanins using cartridges for solid-phase extraction // *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2016. V. 90. № 4. P. 861.)
3. *Broiillard R., Lang J.* The hemiacetal-*cis*-chalcone equilibrium of malvin, a natural anthocyanin // *Can. J. Chem.* 1990. V. 68. P. 755.
4. *Bueno J.M., Sáez-Plaza P., Ramos-Escudero F., Jiménez A.M., Fett R., Asuero A.G.* Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part II: Chemical structure, color, and intake of anthocyanins // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2012. V. 42. P. 126.
5. *Wang H., Cao G., Prior R.L.* Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins // *J. Agric. Food Chem.* 1997. V. 45. P. 304.
6. *Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T., Lim S.M.* Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits // *Food Nutr. Res.* 2017. V. 61. Article 1361779.
7. *Lasagabaster A., Martin C., Gofii M.* Preparation of spherically agglomerated crystals of the 3,5-diglucoside of cyanidin (cyanin) // *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1994. V. 60. P. 397.
8. *Mónica Giusti M., Wrolstad R.E.* Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy // *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* 2001. F1.2.1.
9. *Lee J., Rennaker C., Wrolstad R.E.* Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods // *Food Chem.* 2008. V. 110. P. 782.
10. *Дейнека Л.А., Блинова И.П., Кульченко Я.И., Озер П.С., Саенко И.И., Дейнека В.И.* Сохранность и переход между формами антоцианов в растворах // *Успехи современного естествознания*. 2016. № 2. С. 16.
11. *Rentzsch M., Schwarz M., Winterhalter P.* Pyranoanthocyanins – an overview on structures, occurrence, and pathways of formation // *Trends Food Sci. Technol.* 2007. V. 18. P. 526.
12. ГОСТ 32709-2014 Продукция соковая. Методы определения антоцианинов. М.: Стандартинформ, 2014. 18 с.
13. *Pina F.* Thermodynamics and kinetics of flavylium salts malvin revisited // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1998. V. 94. P. 2109.
14. *Levi M.A.B., Scarminio I.S., Poppi R.J., Trevisan M.G.* Three-way chemometric method study and UV-vis absorbance for the study of simultaneous degradation of anthocyanins in flowers of the *Hibiscus rosa-sinensis* species // *Talanta*. 2004. V. 62. P. 299.
15. *Terahara N., Saito N., Honda T., Tokis K., Osajima Y.* Acylated anthocyanins of *Clitoria ternatea* flowers and their acyl moieties // *Phytochemistry*. 1990. V. 29. P. 949.
16. *Lo Scalzo R., Genna A., Branca F., Chedin M., Chassaing H.* Anthocyanin composition of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) and cabbage (*B. oleracea* L. var. capitata) and its stability in relation to thermal treatments // *Food Chem.* 2008. V. 107. P. 136.