

КАРБОВСКАЯ Р. В., БОРИС И. И.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ АНТОЦИАНОВ ПРИ ПОМОЩИ ВЭЖХ, КАК МЕТОД ПОДТВЕРЖДЕНИЯ АУТЕНТИЧНОСТИ ФРУКТОВО- ЯГОДНОГО СЫРЬЯ И ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ

Розроблено метод якісного визначення антоціанів методом вискоєфективної рідинної хроматографії з використанням спектрофотометричного детектора. Ідентифікацію здійснювали за часом утримання сигналів антоціанів у видимій області, а також шляхом порівняння профілів хроматограм різних видів фруктів та ягід. Проаналізовано антоціановий склад зразків соків, відтиснутих із свіжих фруктів та ягід і відновлених з концентратів. Даний метод визначення антоціанового складу забарвленної пігментами фруктово-ягідної сировини та готової продукції дає достовірні відомості про якісний склад продукту і може бути використаний для підтвердження аутентичності цієї сировини. Наведено хроматограми фальсифікованої продукції.

Разработан метод качественного определения антоцианов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием спектрофотометричного детектора. Идентификацию осуществляли по времени удерживания сигналов антоцианов в видимой области, а также путём сравнения хроматограмм разных видов фруктов и ягод. Проанализирован антоциановый состав образцов соков, выжатых со свежих фруктов и ягод, и восстановленных из концентратов. Данный метод определения антоцианового состава окрашенного пигментами фруктово-ягодного сырья и готовой продукции даёт достоверные данные о качественном составе продуктов и может быть использован для подтверждения аутентичности этого сырья. Приведены хроматограммы фальсифицированной продукции.

The method of qualitative determination of anthocyanins by HPLC has been developed. The method was implemented with the use of spectrophotometric detector. The identification was accomplished by the time of retention of anthocyanins signals in visible area, and by the comparison of chromatogram profiles for different species of fruits and berries. The anthocyanins content of juice samples squashed from fresh fruits and berries and renewed from concentrates has been analyzed. The given method of the determination of anthocyanins content of colored by pigments fruit and berry stuff and ready produce gives reliable data about qualitative content of the product. The chromatograms of adulterated produce are given.

Введение

Качество соков и фруктово-ягодной продукции – совокупность характеристик, исследуемых аналитическими и описательными методами, позволяющая отличать продукты друг от друга, устанавливать их происхождение, оценивать их потребительский уровень. Для контроля качества при исследовании соков в настоящее вре-

мя как нормативный документ используют Свод правил для оценки качества фруктовых и овощных соков Ассоциации соковой промышленности Европейского Союза (A.I.J.N) [1].

В этом документе для двадцати наиболее популярных видов соков, как обязательные требования к качеству, приведены физико-химические показатели (относительная плотность, содержание растворимых сухих веществ), показатели безопасности (содержание тяжелых металлов), требования по составу (содержание L-аскорбиновой кислоты, гидроксиметилфурфурола), а также дополнительные критерии оценки подлинности (кислотность, содержание органических кислот, аминокислотный, элементный, углеводный состав). В документе указаны диапазоны значений этих показателей, которые могут существенно изменяться в зависимости от условий и климата региона произрастания.

Однако отклонения от приведенных установленных значений не всегда свидетельствуют о нарушении подлинности продукции. С другой стороны, соответствие приведенным требованиям не гарантирует её аутентичность. Абсолютные значения обязательных показателей можно легко достичь применением технологических приемов, а проведение анализов по дополнительным критериям аутентичности может быть проведено в хорошо оснащенной лаборатории квалифицированными экспертами. Существенным недостатком Свода правил является отсутствие в перечне такого широко используемого продукта как гранатовый сок. Для окрашенного сырья недостаточно знать только значения физико-химических показателей, изменения которых обусловлены природными свойствами исходного сырья. Нередки случаи фальсификации продукции с использованием более дешевых видов сырья.

Целью нашей работы была разработка метода идентификации антоцианов в фруктово-ягодном сырье и продукции на его основе, исследование состава смешанных соков, подтверждение аутентичности сырья и готовой продукции.

Структура и биологическая ценность антоцианов

Антоцианы (от греч. *ανθος* – цветок и *κυανος* – синий, лазоревый) – натуральные растительные пигменты, придающие окраску лепесткам цветов или плодам. Обычно, это розовая, синяя, красная, коричневая и фиолетовая окраски. Нередко цвет зависит от pH клеточного содержимого, и поэтому может меняться при отцветании цветков, созревании плодов – процессах, сопровождающихся закислением клеточного содержимого.

В 1849 году Моро сделал попытку выделить антоцианы из васильков. Астры, анютины глазки, герань, мальвы, розы, петуния, хризантемы и даже мак стали объектами при изучении антоцианов. Именно поэтому многие антоцианы получили свое название от латинских наименований цветов: пеларгонин от *Pelargonium*, петунидин от *Petunia*, дельфинидин от *Delphinium* и т.п..

Всё разнообразие оттенков антоцианов зависит от строения, положения и количества функциональных групп в углеродном каркасе. Качественный состав антоцианов, как правило, специфичен для каждого окрашенного пигментами растения и довольно стабилен, что позволило считать его визитной карточкой или "отпечатками пальцев" конкретного вида растений. Данный факт обусловлен тем, что уровни концентрации отдельных антоцианов могут изменяться, но общая картина антоцианового состава для определенного вида очень характерна и практически не зависит от сорта, условий произрастания.

По химической природе антоцианы являются представителями природных полифенольных соединений класса флавоноидов (рис. 1).

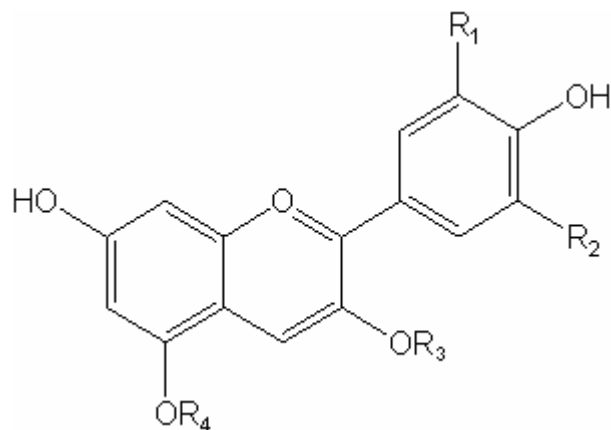


Рис. 1. Общая структурная формула антоцианов.

К настоящему времени из растений выделено несколько десятков различных антоцианов, однако для фруктов и ягод их число не превышает шести. В результате исследований антоцианов установлена структура шести основных классов их агликонов (антоцианидинов) – дельфинидина, цианидина, мальвидина, пеларгонидина, пеонидина и петунидина, отличающиеся друг от друга радикалами.

Углеводные остатки в молекулах моногликозидов антоцианов соединены с агликоном (антоцианидином) через кислород гидроксильной группы в положении 3 антоцианидина. Углеводная часть антоцианов чаще всего представлена глюкозой, но может содержать и другие моно– и дисахариды, например, арабинозу, галактозу, рамнозу. Чаще всего встречающиеся в фруктах и ягодах антоцианидины приведены в таблице 1.

Таблица 1

Антоцианидины, содержащиеся во фруктах и ягодах

Наименование	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Нахождение в природе
Пеларгонидин	Ara Glu	H	H	H	Виноград, клубника, малина
Дельфинидин	Ara Glu Gal Rut	OH	OH	H	Вишня, виноград, гранат, черная смородина, черника,
Цианидин	Soph Ara Glu Gal Xyl-rut Glu-rut Rut	OH	H	H	Арония, брусника, виноград, вишня, гранат, красная смородина, жимолость, клюква, клубника, малина, слива, черешня, черника, черная смородина, ежевика
Петунидин	Gal Glu	OMe	OH	H	Виноград, черника,
Пеонидин	Glu Ara, Gal	OMe	H	H	Черника, черешня, ежевика, клюква,
Мальвидин	Glu	OMe	OMe	H	Виноград, клубника, черника,

Благодаря наличию гидроксильных групп антоцианы фруктов и ягод могут выступать в качестве ловушек для свободных радикалов, проявляя антиоксидантные свойства. От количества гидроксильных групп зависят индивидуальные антиоксидантные свойства: чем их больше, тем мощнее антиоксидант.

Потребление полифенольных соединений естественных составов в красном вине, фруктово-ягодных соках уменьшает вред для здоровья, который несут в себе пищевые продукты с высоким содержанием жиров, пищевых добавок, токсинов. Действуя таким образом они увеличивают продолжительность жизни человека.

Экспериментальная часть

Подготовка проб свежих фруктов и ягод

Сочные плоды и ягоды. 5 г мякоти плодов или ягод помещают в ступку и тщательно разминают. Появившийся сок собирают в емкость, затем фильтруют через мембранный фильтр, отбрасывая при этом первых 2 см³ фильтрата. Остальное количество фильтрата используют для хроматографирования.

В плотно закрытой емкости для хроматографирования проба может храниться не более 12 часов при комнатной температуре.

Аналогично готовят параллельную пробу.

Малосочные виды плодов и ягод. 5 г мякоти плодов или ягод помещают в ступку и тщательно разминают. К этой смеси прибавляют 10 см³ 10 % раствора муравьиной кислоты. Через 30 мин надосадочную жидкость собирают в емкость, затем фильтруют через мембранный фильтр, отбрасывая при этом первых 2 см³ фильтрата. Остальное количество фильтрата используют для хроматографирования.

В плотно закрытой емкости для хроматографирования проба может храниться не более 12 часов при комнатной температуре.

Аналогично готовят параллельную пробу.

Подготовка проб соков и концентратов

Соки прозрачные. 10 см³ пробы сока фильтруют через мембранный фильтр, отбрасывая при этом первых 2 см³ фильтрата. Остальное количество фильтрата используют для хроматографирования.

В плотно закрытой емкости для хроматографирования проба может храниться не более 12 часов при комнатной температуре.

Аналогично готовят параллельную пробу.

Концентраты прозрачных напитков. 20 см³ пробы помещают в мерную колбу на 100 см³, прибавляют дистиллированную воду до объема примерно на 1 см³ ниже метки и выдерживают при 20 °С в течение 30 минут. Затем доводят объем до метки дистиллированной водой. Пробу тщательно перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр, отбрасывая при этом первых 2 см³ фильтрата. Остальное количество фильтрата используют для хроматографирования.

Концентраты непрозрачных напитков, пюре. 2 г пробы помещают в мерный цилиндр на 10 см³ и доводят объем дистиллированной водой до метки. Затем пробу тщательно перемешивают, переносят в емкость для центрифугирования и центрифугируют в течение 40 мин при частоте вращения ротора 4000 мин⁻¹. Надосадочную жидкость дополнительно фильтруют через мембранный фильтр, отбрасывая при этом первых 2 см³ фильтрата. Остальное количество фильтрата используют для хроматографирования.

Подготовка проб соков и концентратов, содержащих хлорид калистефина

Приготовление базового раствора хлорида калистефина.

Навеску $5,0 \pm 0,01$ мг хлорида калистефина помещают в сосуд емкостью $1,5 \text{ см}^3$, прибавляют $0,75 \text{ см}^3$ воды, $0,25 \text{ см}^3$ метанола и тщательно перемешивают.

Полученный раствор хлорида калистефина может храниться при -20°C не более 2 месяцев.

Приготовление рабочего стандартного раствора хлорида калистефина с массовой концентрацией 0,05 мг/мл.

В сосуд емкостью $1,5 \text{ см}^3$ микрошприцом приливают 10 мкл базового раствора хлорида калистефина и добавляют 1000 мкл дистиллированной воды, подкисленной разведенной ортофосфорной кислотой до рН 2.

Данный раствор можно использовать в течение одного дня.

Соки прозрачные. 2 см^3 пробы при комнатной температуре фильтруют через мембранный фильтр, отбрасывая при этом первый 1 см^3 фильтрата, затем помещают в емкость для хроматографирования и добавляют 10 мкл рабочего раствора хлорида калистефина.

Аналогично готовят параллельную пробу.

Концентраты прозрачных напитков.

$1,00 \pm 0,01$ г пробы при комнатной температуре помещают в стаканчик на 25 см^3 , прибавляют 5 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают. Пробу фильтруют через мембранный фильтр, отбрасывая при этом первый 1 см^3 фильтрата, затем 1 см^3 фильтрата помещают в емкость для хроматографирования и добавляют 10 мкл рабочего раствора хлорида калистефина.

Пюре.

К навеске $1,00 \pm 0,01$ г пробы при комнатной температуре прибавляют 5 см^3 воды, тщательно перемешивают, переносят в емкость для центрифугирования и центрифугируют в течение 40 мин при частоте вращения ротора 4000 мин^{-1} . Надосадочную жидкость дополнительно фильтруют через мембранный фильтр, отбрасывая при этом первый 1 см^3 фильтрата, затем 1 см^3 фильтрата помещают в емкость для хроматографирования, добавляют 10 мкл рабочего раствора хлорида калистефина и используют для анализа.

Приготовление элюентов для хроматографирования.

Приготовление 10% раствора муравьиной кислоты (элюент А).

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 помещают 100 см^3 муравьиной кислоты и доводят объём до метки дистиллированной водой при перемешивании. Полученный раствор фильтруют с использованием установки для фильтрования буферных растворов.

Приготовление 10% раствора муравьиной кислоты, содержащего 50% ацетонитрила (элюент В).

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 помещают 400 см^3 воды, 500 см^3 ацетонитрила, и 100 см^3 муравьиной кислоты. Полученный раствор тщательно перемешивают и фильтруют с использованием установки для фильтрования буферных растворов.

Элюенты можно хранить при комнатной температуре в стеклянной посуде на протяжении 14 суток с момента приготовления. Непосредственно перед применением элюенты А и В необходимо дополнительно профильтровать.

Условия хроматографирования антоцианов.

Для экспериментальной работы использовался высокоэффективный жидкостный хроматограф Agilent Technologies 1200, включающий 4-х канальный насос, вакуумный дегазатор, автосамплер, термостат колонок, спектрофотометрический детектор. Условия хроматографирования:

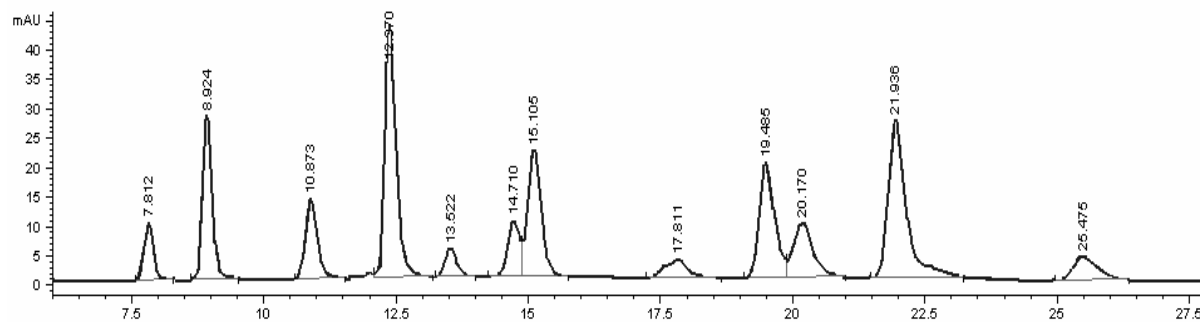
Колонка	"Hypersil ODS-C18", 5 μ m, 250 x 4,0 мм с предколоной
Элюент	А, В
Градиент	Старт 88 % А – 12 % В 26 мин 70 % А – 30 % В 35 мин 0 % А – 100 % В 38 мин 0 % А – 100 % В 43 мин 88 % А – 12 % В 46 мин 88 % А – 12 % В
Время анализа	50 минут
Поток	1 мл/мин
Объём инъекции	5 мкл
Температура термостата колонки	40 °С
Детектирование (γ)	518 нм

Обсуждение результатов.

Для исследования на аутентичность окрашенных продуктов питания исключительно важным является вопрос о наличии антоцианов в ягодах и плодах, поскольку по качественному составу антоцианов, присутствующих в готовой продукции можно определить какие плоды использовались для её производства.

С помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии проанализировано и создано базу антоциановых профилей образцов ягодного и фруктового сырья из разных зон произрастания. Для определения аутентичности соков, восстановленных из концентратов, сравнивались профили их хроматограмм с профилями хроматограмм свежевыжатых соков. Одними из наиболее широко используемых для производства соков являются плоды черники, аронии (черноплодной рябины), вишни, малины, граната и винограда.

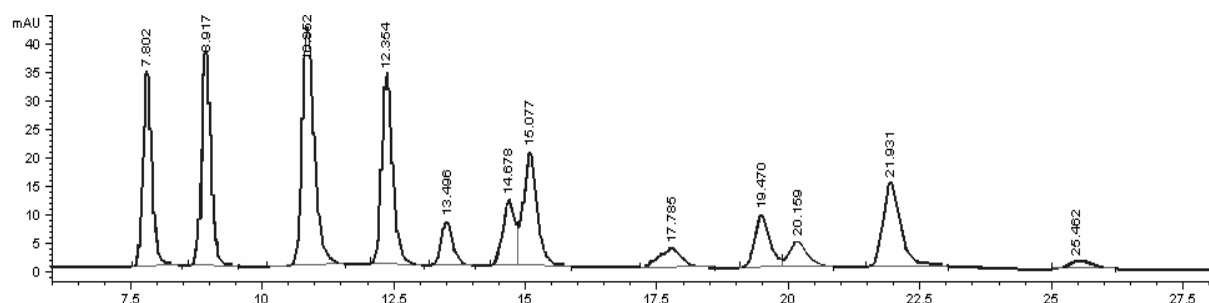
Очень богат по составу антоциановый профиль черники [2–9], что прекрасно согласуется с обширным спектром целебного действия "королевы ягод". На хроматограммах образца из черники (рис. 2, 3) присутствуют почти все известные антоцианы: дельфинидин-3,5-диглюкозид, цианидин-3,5-диглюкозид, дельфинидин-3-глюкозид, цианидин-3-глюкозид, дельфинидин-3-галактозид, цианидин-3-арабинозид, пеонидин-3-галактозид, петунидин-3-глюкозид, мальвидин– 3– глюкозид). Порядок их выхода зависит от степени гидроксирования: чем она выше, тем меньше время удерживания соединения. При одинаковом количестве полярных групп в гликозидах антоцианидинов дольше удерживаются соединения с большей молекулярной массой. Дигликозиды антоцианидинов быстрее выходят из колонки чем моногликозиды.



Время (мин)

Рис.2. Хроматограмма антоцианового состава свежееотжатого сока черники:

дельфинидин-3,5-диглюкозид (7,812мин), цианидин-3,5-диглюкозид (8.924 мин), дельфинидин-3-глюкозид (10.873 мин), цианидин-3-глюкозид (12.370 мин), дельфинидин-3-галактозид (13.522 мин), цианидин-3-арабинозид (14.710 мин), пеонидин-3-галактозид (17.811 мин), петунидин-3-глюкозид (19.485 мин), мальвидин-3-глюкозид (21.939 мин).



Время (мин)

Рис.3. Хроматограмма антоцианового состава образца пюре из черники:

дельфинидин-3,5-диглюкозид (7,802мин), цианидин-3,5-диглюкозид (8.917 мин), дельфинидин-3-глюкозид (10.852 мин), цианидин-3-глюкозид (12.354 мин), дельфинидин-3-галактозид (13.496 мин), цианидин-3-арабинозид (14.678 мин), пеонидин-3-галактозид (17.785 мин), петунидин-3-глюкозид (19.470 мин), мальвидин-3-глюкозид (21.931 мин).

В черноплодной рябине (аронии) по литературным данным содержатся такие основные антоцианы: цианидин-3,5-диглюкозид, цианидин-3-глюкозид, цианидин-3-галактозид, цианидин-3-арабинозид, цианидин-3-ксилозид. Полученные данные по качественному содержанию антоцианов в образцах (рис. 4, 5) сопоставимы с литературными данными [3].

Для вишни (рис. 6, 7) характерно наличие в профиле дельфинидин-3-глюкозида, дельфинидин-3-галактозида, цианидин-3-глюкозида, цианидин-3-глюкозил рутинозида.

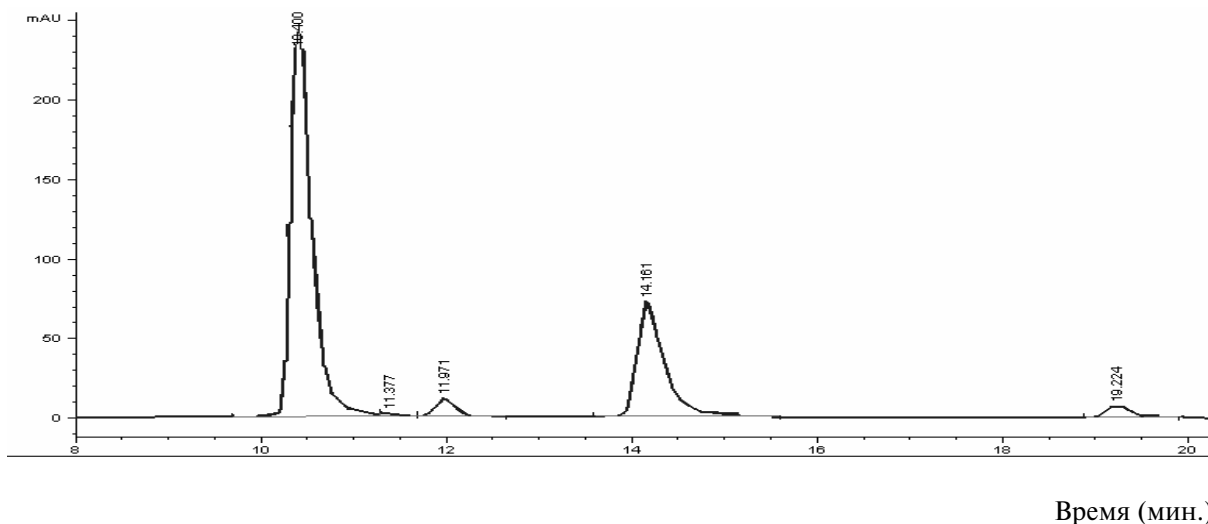


Рис.4. Хроматограмма антоцианового состава свежеотжатого сока аронии: цианидин-3,5-диглюкозид (10.4 мин), цианидин-3-глюкозид (11.377 мин), цианидин-3-галактозид (11.971 мин), цианидин-3-арабинозид (14.161 мин), цианидин-3-ксилозид (19.224 мин).

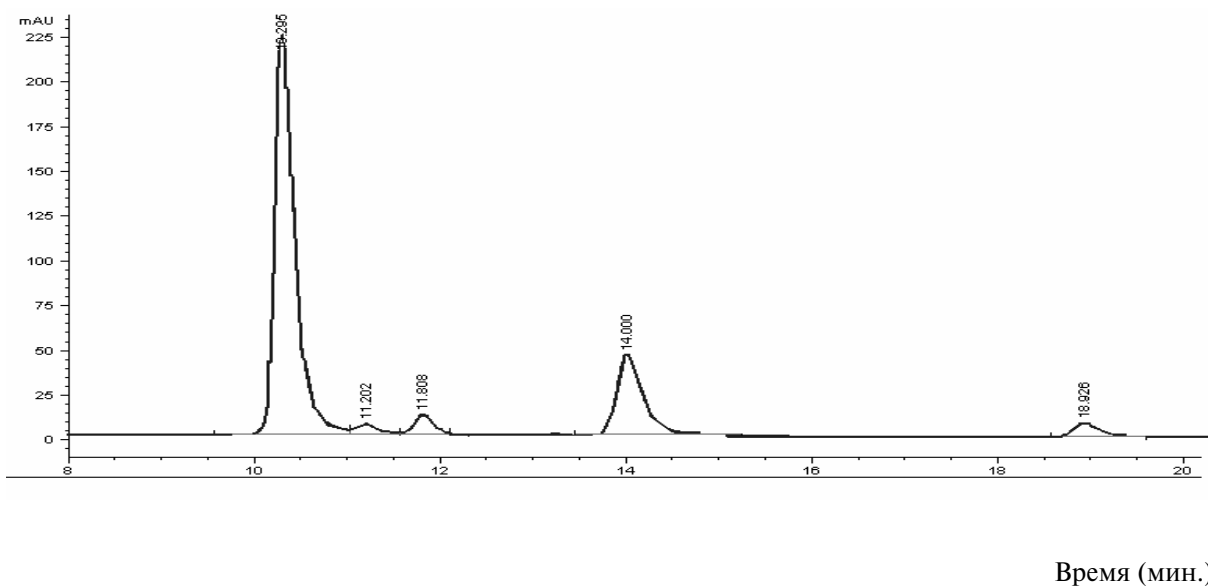


Рис.5. Хроматограмма антоцианового состава образца восстановленного концентрированного сока аронии: цианидин-3,5-диглюкозид (10.295 мин), цианидин-3-глюкозид (11.202 мин), цианидин-3-галактозид (11.808 мин), цианидин-3-арабинозид (14.000 мин), цианидин-3-ксилозид (18.926 мин).

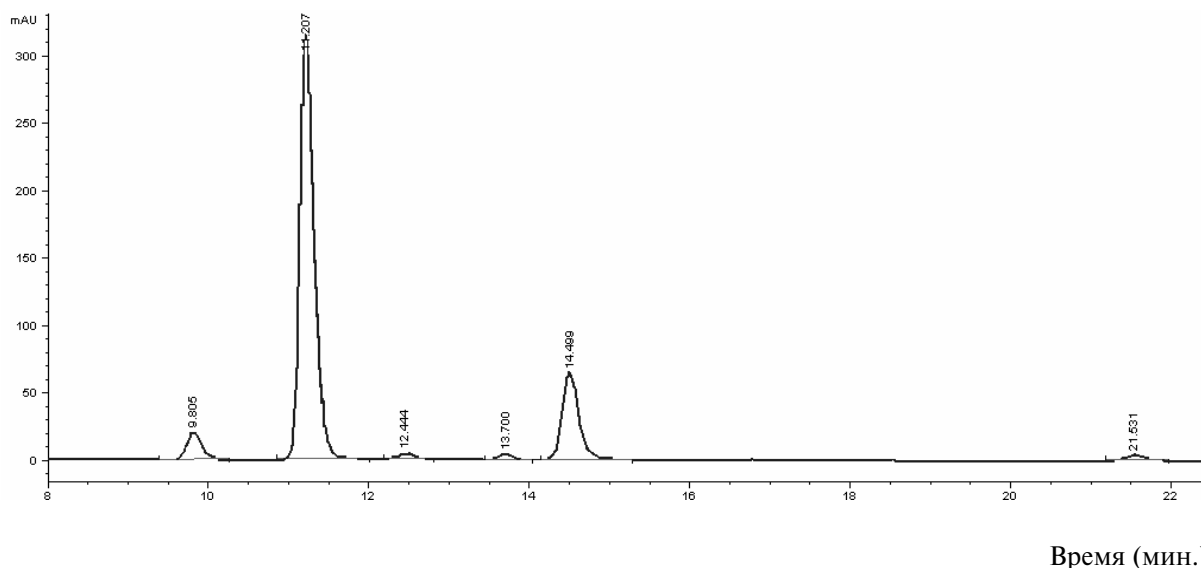


Рис. 6. Хроматограмма профиля образца свежееотжатого сока вишни: дельфинидин-3-глюкозид (9,805 мин), дельфинидин-3-галактозид (11,207 мин), цианидин-3-глюкозид (14,499 мин), цианидин-3-глюкозил рутинозид (21,531 мин)

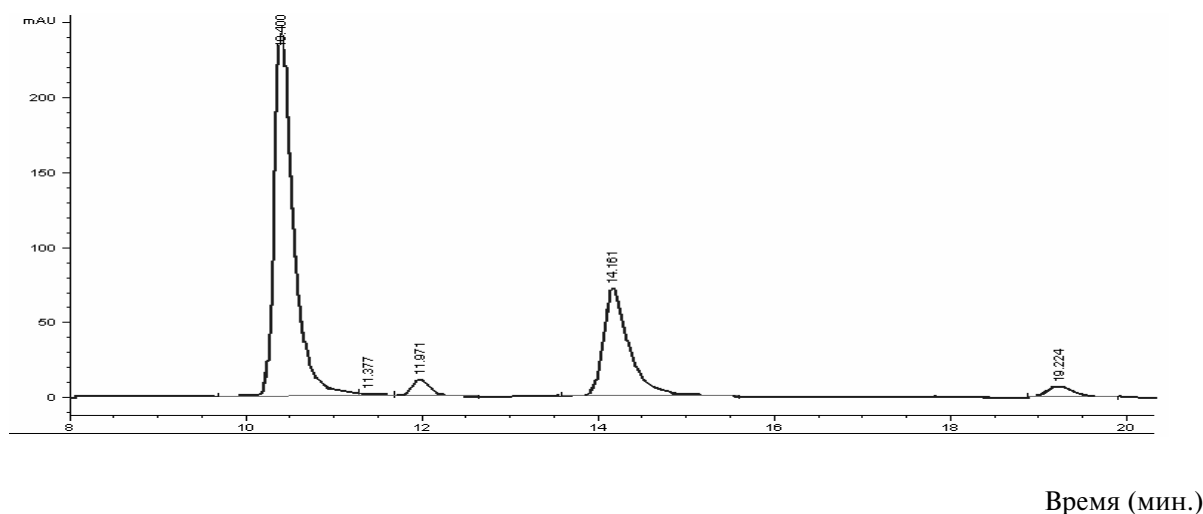
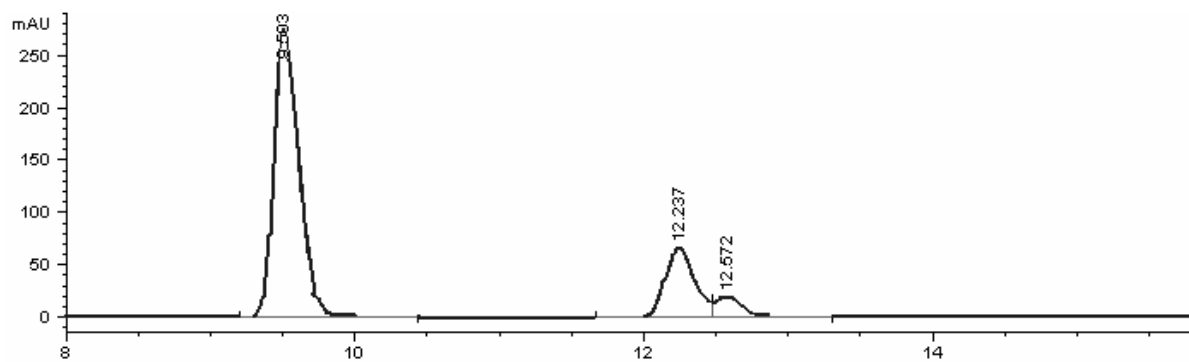


Рис. 7. Хроматограмма профиля образца восстановленного концентрированного сока вишни: дельфинидин-3-глюкозид (10,100 мин), дельфинидин-3-галактозид (11,377 мин), цианидин-3-глюкозид (14,151 мин), цианидин-3-глюкозил рутинозид (19,224 мин)

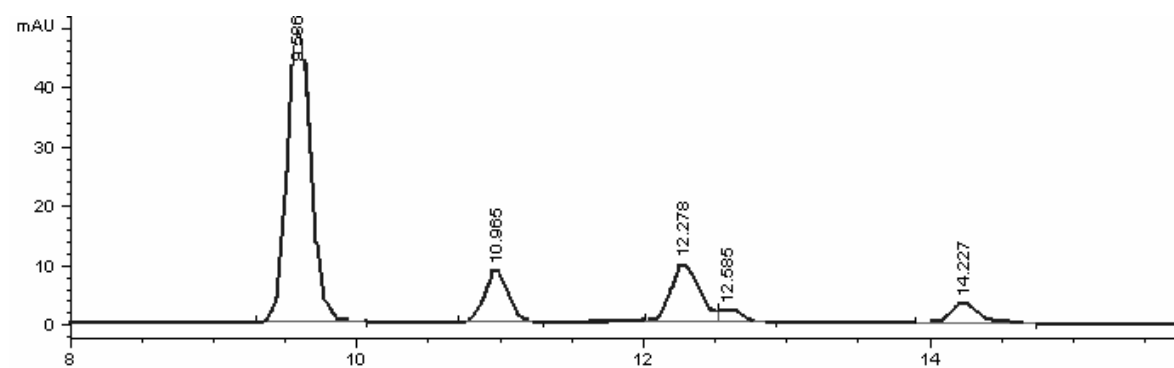
Как видно из хроматограмм, антоциановый состав концентратов представленных образцов сырья ягод в основном коррелирует с антоциановым составом соответствующих свежееотжатых соков.

У ягод малины в профиле хроматограмм представлены только гликозиды цианидина, которые могут при гидролизе образовать агликаны [10]. На представленных ниже хроматограммах (рис. 8, 9) наблюдается существенное снижение интенсивности сигналов и появление дополнительных пиков в хроматограмме образца пюре (RT около 11 мин. и 14,2 мин).



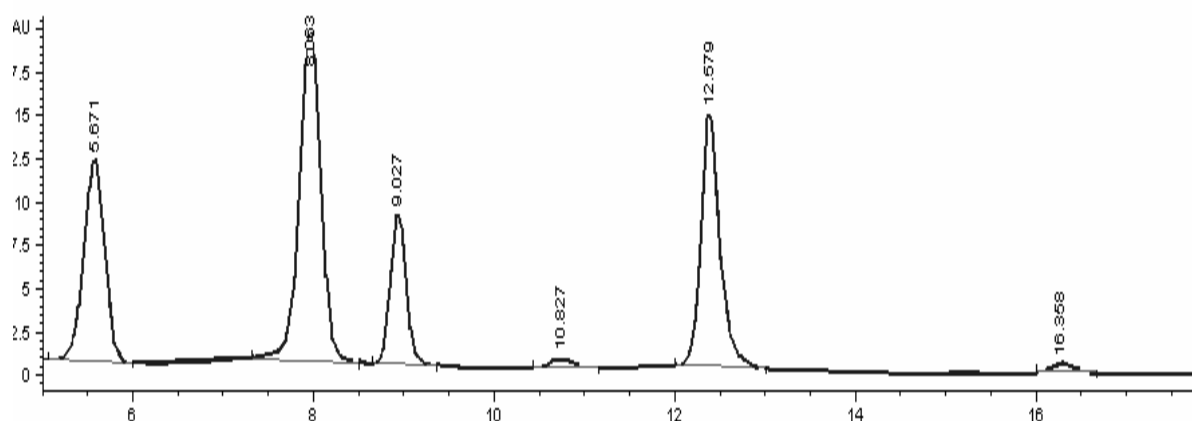
Время (мин.)

Рис. 8. Хроматограмма профиля образца свежееотжатого сока малины:
цианидин-3,5-диглюкозид (9.593 мин), цианидин-3-глюкозид (12.237 мин).



Время (мин.)

Рис. 9. Хроматограмма профиля образца пюре малины:
цианидин-3,5-диглюкозид (9.586 мин), цианидин-3-глюкозид (12.278 мин).



Время (мин.)

Рис. 10. Хроматограмма антоцианового состава образца свежееотжатого сока граната:
дельфинидин-3,5-диглюкозид (5.671), цианидин-3,5-диглюкозид (8.063), пеларгонидин-3,5-диглюкозид (9.027), а также 3 моногликозидов — дельфинидин-3-глюкозид (10.827), цианидин-3-глюкозид (12.679), пеларгонидин-3-глюкозид (16.358).

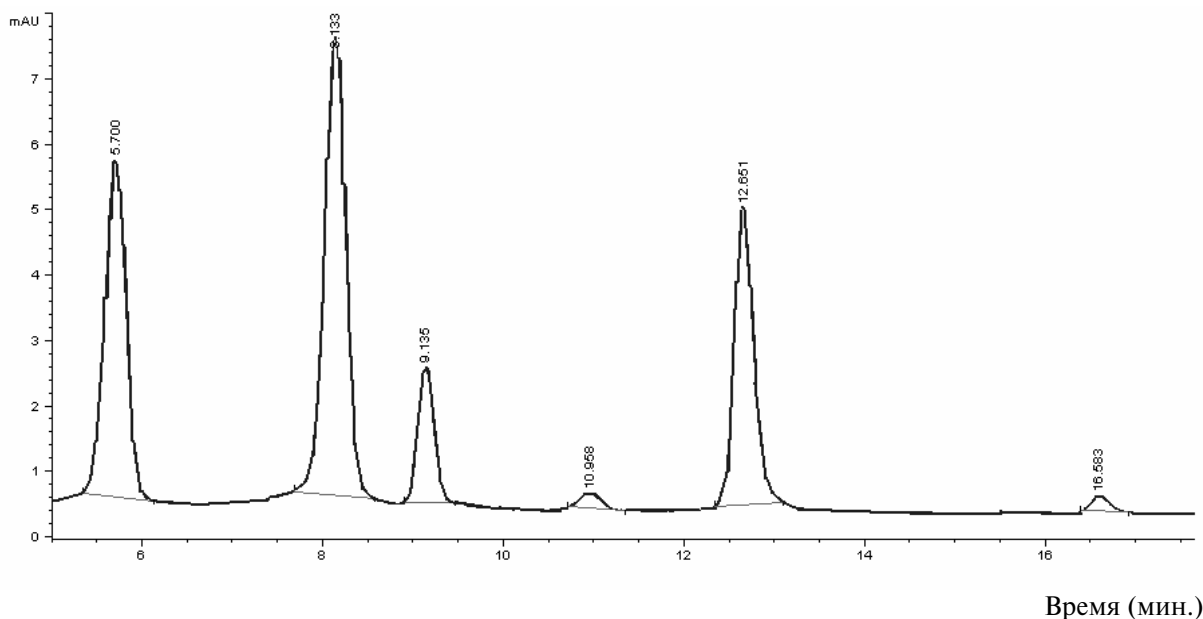


Рис. 11. Хроматограмма антоцианового состава образца восстановленного концентрированного сока граната (красный оттенок): дельфинидин-3,5-диглюкозид (5.700), цианидин-3,5-диглюкозид (8.133), пеларгонидин-3,5-диглюкозид (9.135), а также 3 моногликозидов – дельфинидин-3-глюкозид (10.958), цианидин-3-глюкозид (12.651), пеларгонидин-3-глюкозид (16.583).

Для гранатового сока, непосредственно выжатого из плодов граната на хроматограмме (рис. 10) характерно наличие пиков 3-дигликозидов: дельфинидин-3,5-диглюкозида, цианидин-3,5-диглюкозида, пеларгонидин-3,5-диглюкозида, а также 3-моногликозидов: дельфинидин-3-глюкозида, цианидин-3-глюкозида, пеларгонидин-3-глюкозида,

Антоциановый состав восстановленных из концентрата гранатовых соков, имеющих красный оттенок, совпадает с профилем хроматограммы гранатового сока, непосредственно выжатого из плодов граната, но пики имеют меньшую интенсивность (рис. 11). Из этого можно предположить, что продукт красного оттенка будет проявлять антиоксидантную активность несколько меньшую, чем свежееотжатый сок.

Большое влияние на превращение антоцианов наряду с температурой в процессе получения соков оказывает температурный режим и продолжительность хранения сырья [11]. Данный факт обусловлен тем, что антоцианы нестойки к процессам окисления, к действию ферментов, чувствительны к кислотности среды и, особенно, температуре, и при длительном хранении достаточно быстро происходит их деструкция. В образцах гранатового концентрата плохого качества с коричневым оттенком интенсивность сигналов дигликозидов с временами удерживания около 5 и 8 мин, а также цианидин-3-глюкозида (RT ок. 12,6 мин) ничтожная, а сигналы моногликозидов антоцианов дельфинидин-3-глюкозида (RT ок. 10,8 мин), пеларгонидин-3-глюкозида (RT ок. 16,4 мин) и дигликозида пеларгонидин-3,5-диглюкозида (RT ок. 9,1 мин) практически отсутствуют (рис. 12).

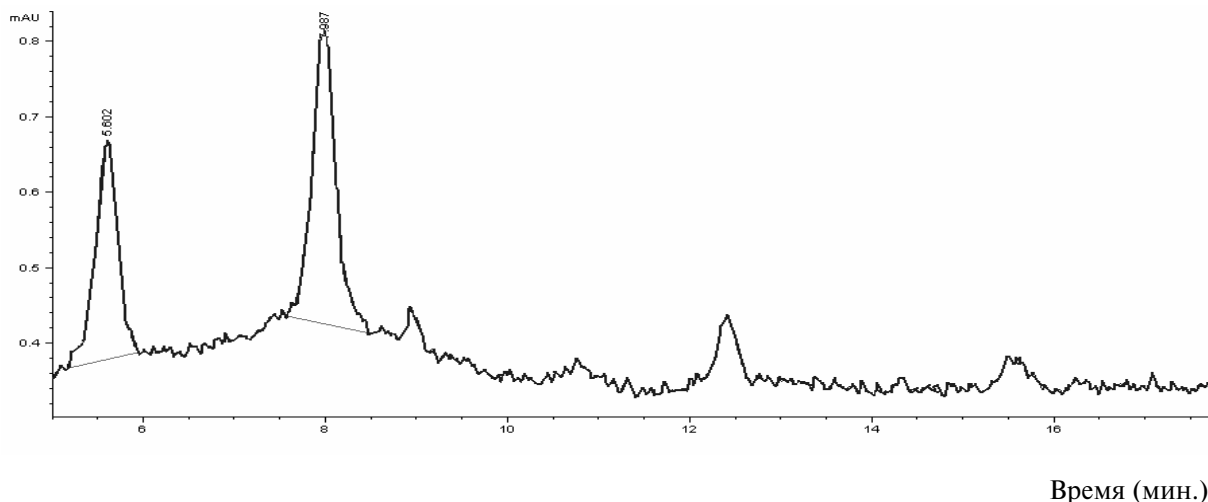


Рис. 12. Хроматограмма антоцианового состава образца восстановленного концентрата граната (коричневый оттенок): дельфинидин-3,5-диглюкозид (5.602), цианидин-3,5-диглюкозид (7.987).

Продукт, приготовленный из переваренного или окисленного фруктово-ягодного сырья, а также который долго хранился в помещении с нарушением правил хранения, хотя и не утратил питательную ценность, обладает низкой биологической активностью из-за сниженных витаминных и антиоксидантных свойств.

В зависимости от кислотности среды изменяется структура антоциановых красителей и соответственно окраска продукта. Ярко красная окраска в кислых средах с повышением рН раствора изменяется, переходя в фиолетовую и синюю в щелочных средах.

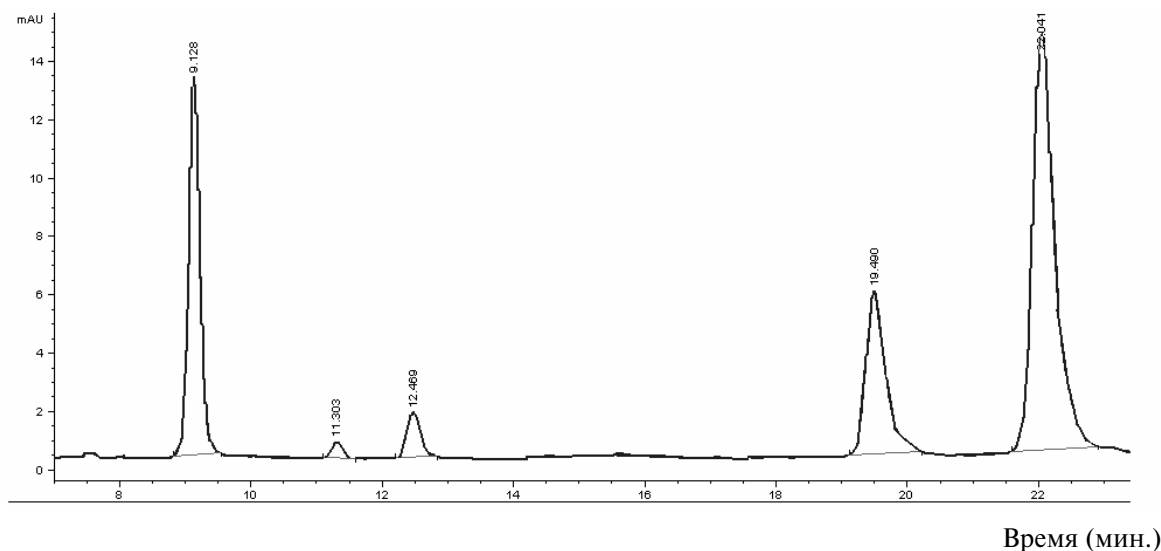


Рис. 13. Хроматограмма образца красного винограда при рН=3,7

В соках значения рН среды в основном находятся в диапазоне от 3 до 4. На примере сока из красных сортов винограда показано как изменяется величина поглощения антоциановых сигналов при изменении кислотности среды. На хроматограмме антоцианового состава образца красного винограда при рН=3,7 (рис. 13) интенсивность пиков антоцианов значительно выше, чем у образца красного ви-

нограда при pH=5,2 (рис. 14). Данный факт обусловлен переходом сопряженной системы перилиевого строения молекул антоцианов в хиноидную форму, и соответственно снижением концентрации хромофора в растворе [12].

Исследования антоцианового состава продукта играют очень важную роль и во многих случаях являются решающим аргументом в вопросе идентификации сорта, например, в виноделии. В составе пигментов европейских сортов красного винограда содержатся исключительно моногликозиды антоцианового ядра с присоединённым углеводом по 3-положению 3-гликозид дельфинидина (RT ок. 9.1) и 3-гликозид цианидина (RT ок. 12.5), 3-гликозид петунидина (RT ок. 19.5), 3-гликозид мальвидина (RT ок. 22) (см. рис.15).

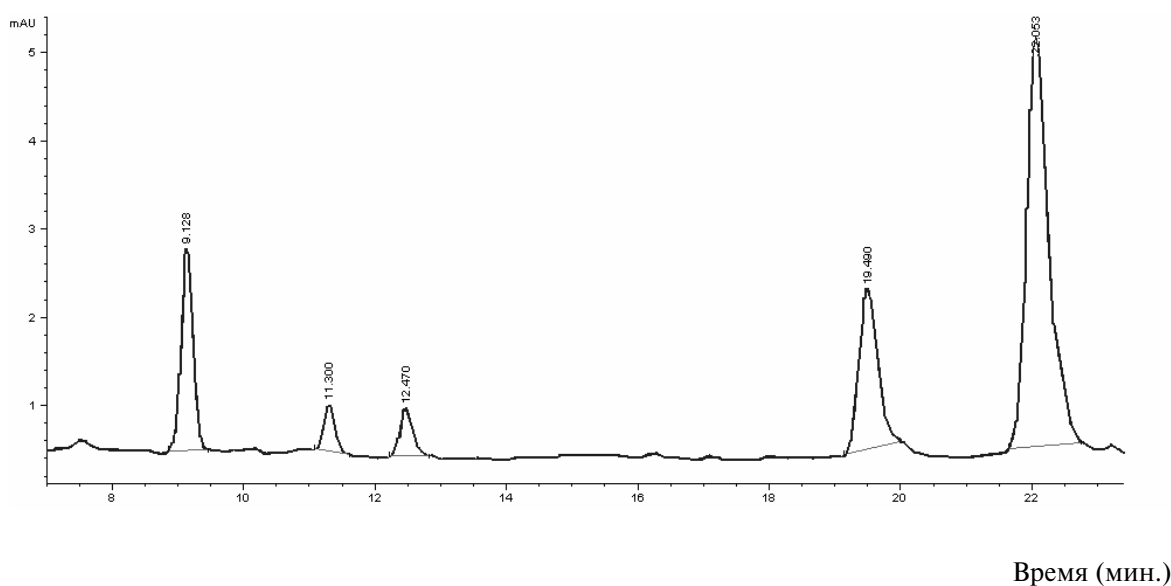


Рис. 14. Хроматограмма образца красного винограда при pH=5,2

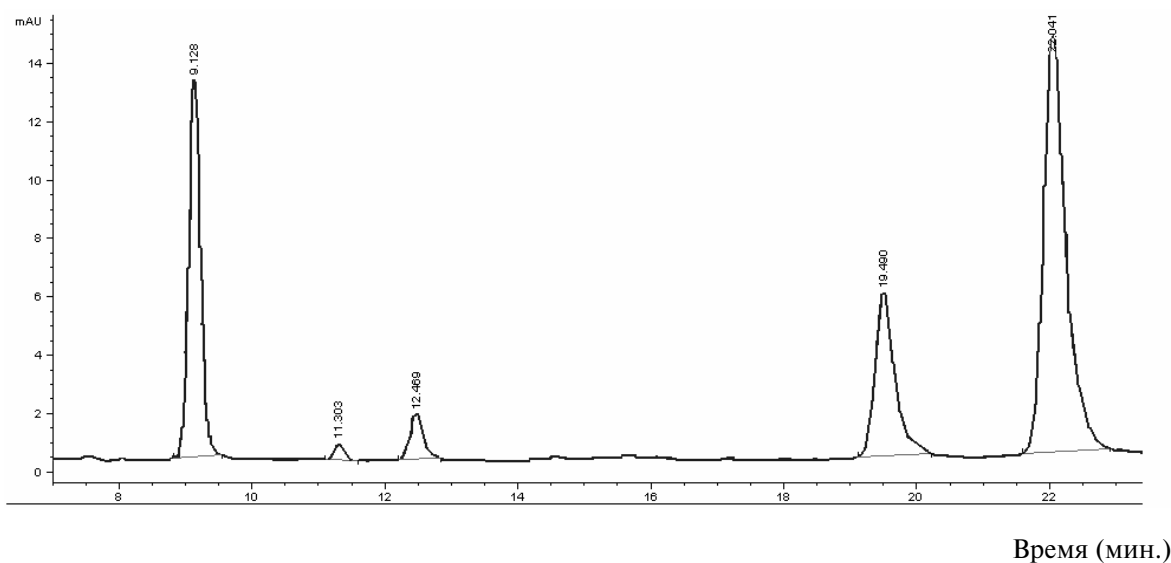


Рис. 15. Антоциановый профиль свежеотжатого сока красного винограда европейского сорта: дельфинидин-3-гликозид (9.128), цианидин-3-гликозид (12.469), петунидин-3-гликозид (19.490), мальвидин-3-гликозид (22.041).

В отличие от европейских сортов, в составе пигментов винограда американских видов и гибридов американских видов с европейскими сортами содержатся дигликозиды с углеводными заместителями 3,5-положениях антоцианового ядра [9, 13, 14]. В образцах красного винограда, проанализированных нами, в зависимости от сорта наблюдается присутствие не только моногликозидов дельфинидина, цианидина, петунидина, мальвидина, но и мальвидин-3,5-дигликозида (RT ок. 15,5) (см. рис.16).

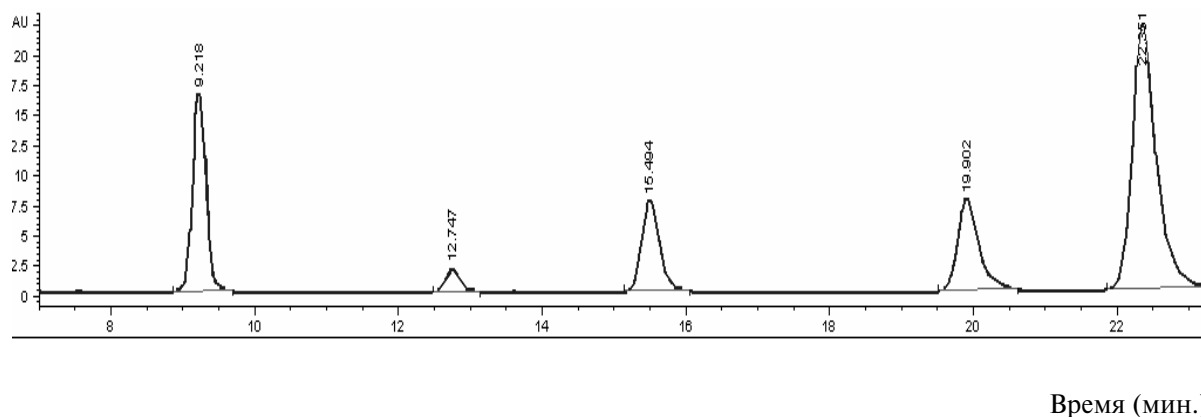


Рис.16. Антоциановый профиль свежеотжатого сока красного винограда гибридного сорта: дельфинидин-3-глюкозид (9.218), цианидин-3-глюкозид (12.747), мальвидин-3,5-дигликозид (15.494), петунидин-3-глюкозид (19.902), мальвидин-3-глюкозид (22.351).

С целью повышения достоверности идентификации и возможностью полуколичественного определения антоцианового состава окрашенного сырья применялся метод внутреннего стандарта. Этот метод основан на добавлении хлорида калистефина (рис. 17) – соединения аналогичного по структуре и физико-химическим свойствам компонентам, определяемым согласно методике, а также не присутствующего среди антоцианов в образцах из фруктов и ягод. Времена удерживания и площади сигналов антоцианов образцов сравнивались со временем удерживания и площадью внутреннего стандарта хлорида калистефина (рис. 18, 19). Такой приём даёт возможность фиксировать времена удерживания основных антоцианов образца и оценить примерно вклад каждого компонента в смеси. Количественное определение антоцианового состава, требующее наличия дорогих и нестойких стандартных образцов всех возможных антоцианов, которые необходимо обновлять не реже одного раза в месяц, является нерентабельным. А полуколичественное определение с использованием метода внутреннего стандарта относительно недорого, позволяет вычислить содержание антоцианов в образце и, пользуясь полученными данными, сравнивать виды сырья и качество готовой продукции.

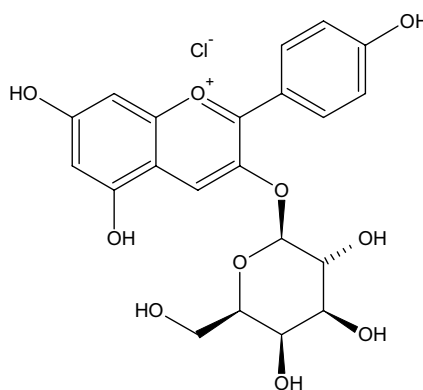


Рис. 17. Структура хлорида калистефина.

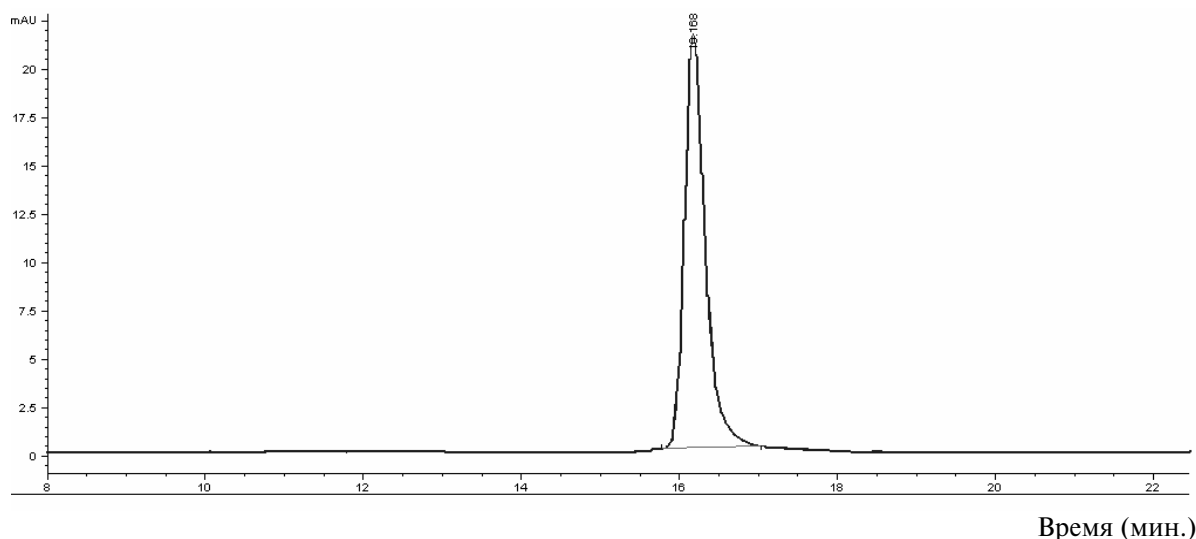


Рис. 18. Хроматограмма стандартного образца хлорида калистефина с концентрацией **0,05 мг/мл.**

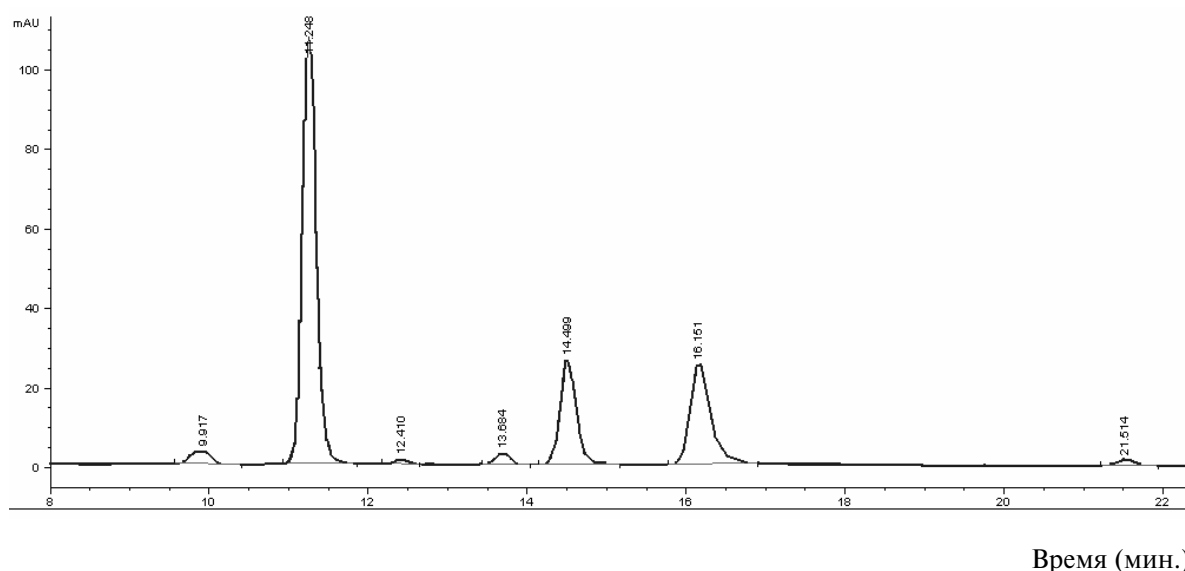


Рис. 19. Хроматограмма вишнёвого сока с добавлением внутреннего стандарта с концентрацией **0,05 мг/мл:** дельфинидин-3-глюкозид (9,917 мин), дельфинидин-3-галактозид (11,248 мин), цианидин-3-глюкозид (13,684 мин), цианидин-3-глюкозил рутинозид (14,499 мин), хлорид калистефина (16,151 мин), цианидин-3-глюкозил рутинозид (21,514 мин).

Качественное определение антоцианов в видимой области позволяет выявлять особенности профиля, порядок выхода компонентов, а также интенсивность сигналов многокомпонентной смеси и контролировать таким образом антоциановый состав окрашенного фруктово-ягодного образца.

Для экспресс-метода определения подлинности состава образцов сырья или готовой продукции, а также сохранности антоциановых компонентов на весь срок реализации продукта достаточно сравнить профили хроматограмм образцов с имеющейся базой данных для различного сырья.

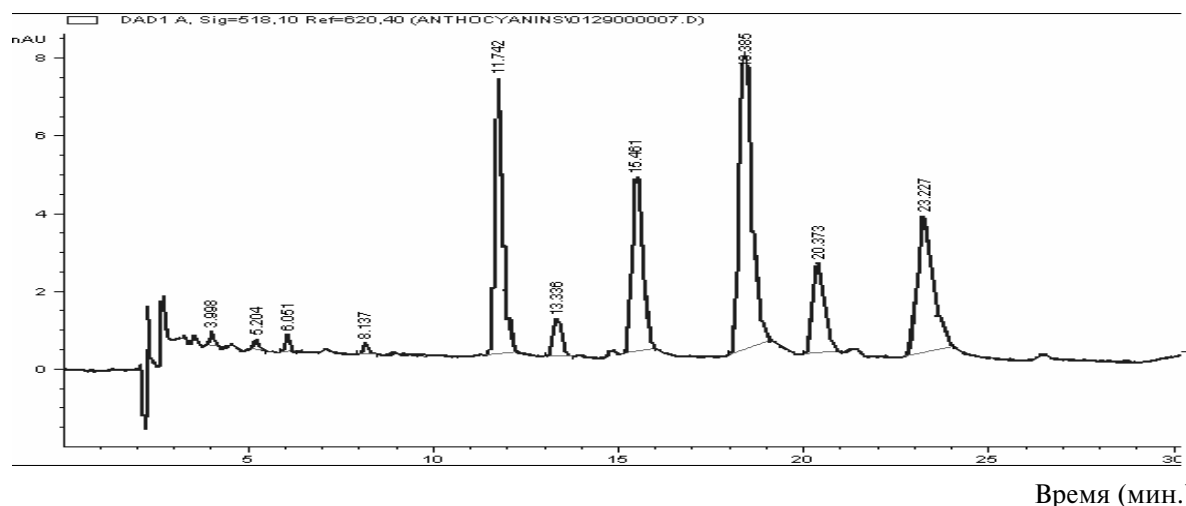


Рис. 20. Хроматографический профиль антоцианов образца клюквы: цианидин-3-галактозид (11,742 мин), цианидин-3-глюкозид (13,336 мин), цианидин-3-арабинозид (15,461 мин), пеонидин-3-галактозид (18,335 мин), пеонидин-3-глюкозид (20,373 мин), пеонидин-3-арабинозид (23,227 мин).

Из литературных данных [15] известно, что в клюкве содержится: 3-галактозиды, 3-арабинозиды, 3-глюкозиды цианидина и пеонидина (рис.20).

Анализ образца (рис. 21), в спецификации которого указывается только клюквенное сырье, и сравнение профилей проанализированных ранее образцов малины, клюквы и бузины показал, что это многокомпонентный образец, в составе которого кроме клюквы содержатся малина и бузина. Примесь малинового сырья в составе образца можно легко обнаружить по наличию цианидин-3,5-диглюкозида с временем удерживания около 10 мин. (рис.8).

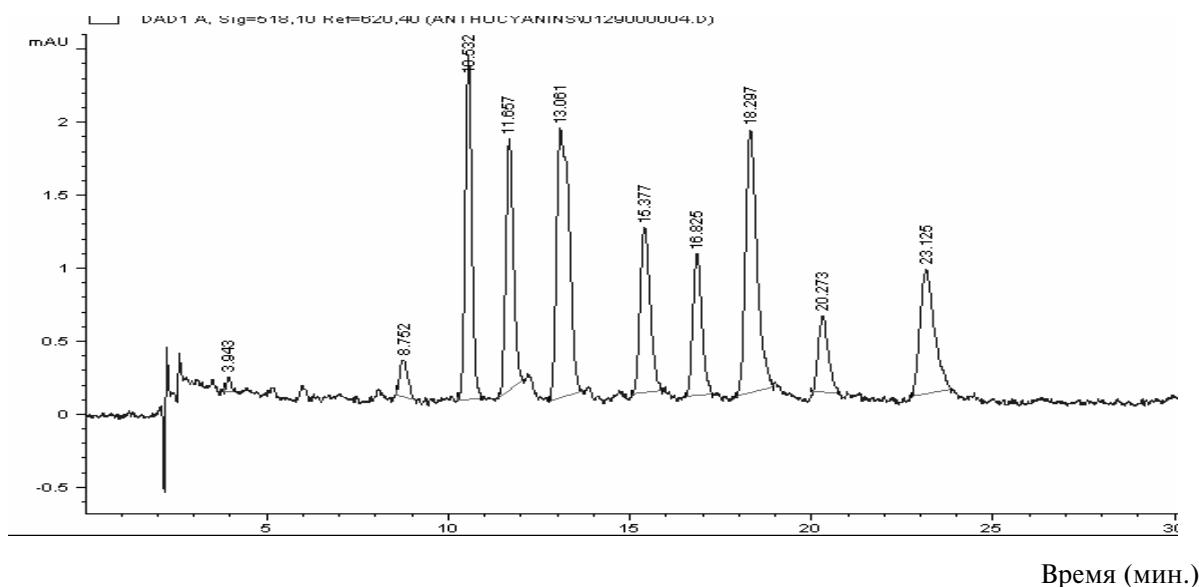


Рис. 21. Хроматографический профиль антоцианов образца смешанного состава: 3-самбубиозид цианидин (8,752 мин), цианидин-3,5-диглюкозид (10,532 мин), цианидин-3-галактозид (11,657 мин), 3-глюкозид-5-самбубиозид цианидина (12,001 мин), цианидин-3-арабинозид (15,377 мин), пеонидин-3-галактозид (18,297 мин), пеонидин-3-глюкозид (20,273 мин), пеонидин-3-арабинозид (22,125 мин).

Добавление бузинового компонента легко определить по наличию в профиле пробы 3-самбубиозид цианидина (RT ок. 8,5), который не встречается в известном ягодном сырье, а также по наличию не полностью разделённых сигналов 3-глюкозид цианидина и 3-глюкозид-5-самбубиозид цианидина (RT ок. 13,0). В хроматографическом профиле бузинового сырья при условиях хроматографирования, указанных в экспериментальной части, сигналы 3-глюкозид цианидина (RT ок. 12,8), 3-глюкозид-5-самбубиозид цианидина (RT ок. 13,0) невозможно разделить (рис.22).

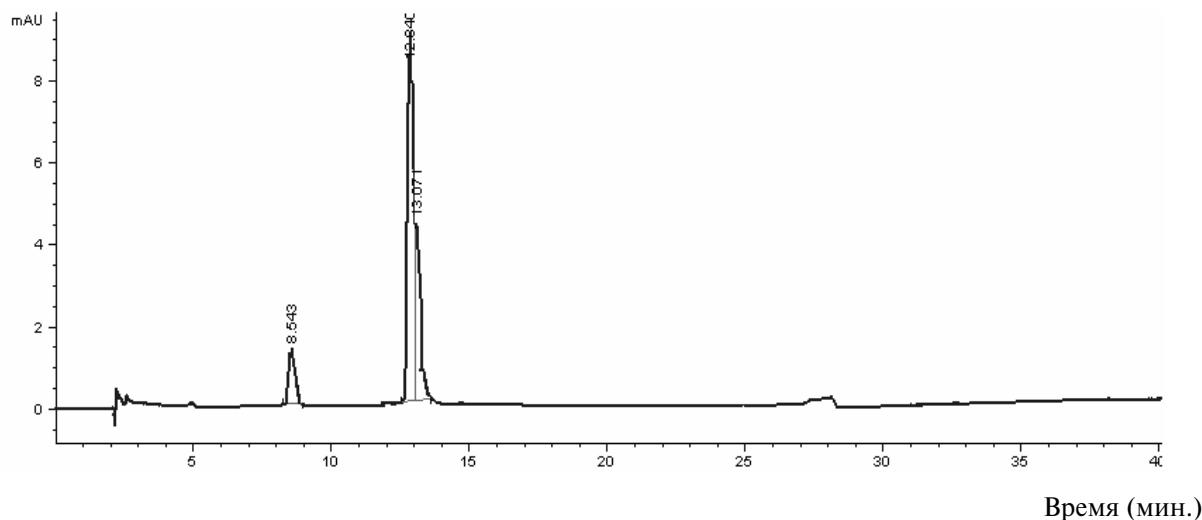


Рис.22. Хроматограмма антоцианового состава ягод бузины (разведение 1:100):

3-самбубиозид цианидин (8,543 мин), 3-глюкозид цианидин (12,840 мин), 3-глюкозид-5-самбубиозид цианидина (13,071 мин).

Наличие указанных пиков можно использовать в качестве аргумента при идентификации образцов, содержащих в составе примесь сока ягод бузины или бузинового экстракта. Так в профиле антоцианового состава сока, на этикетке которого было указано: "100% гранатовый сок", очень четко видны сигналы основных антоцианов ягод бузины (рис.23).

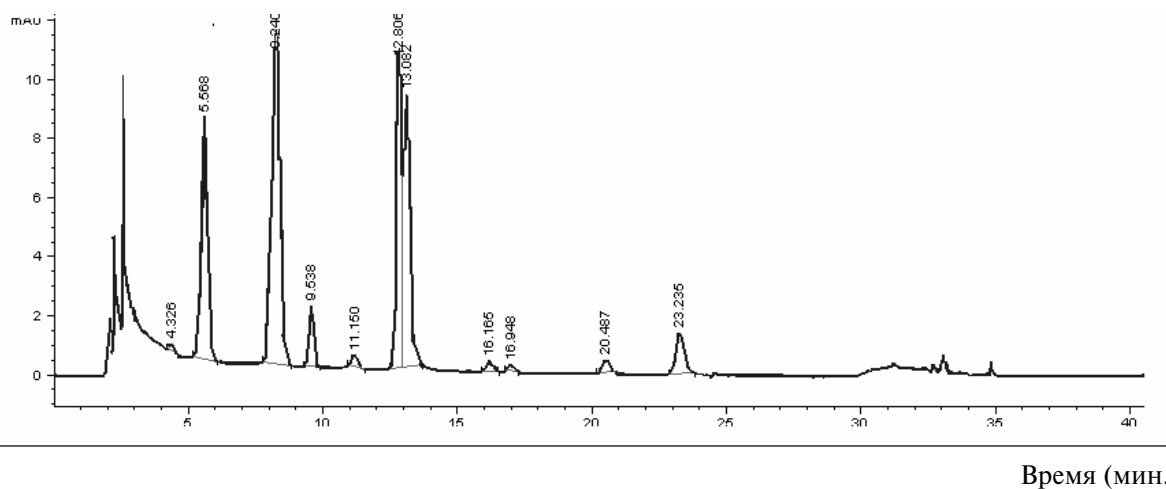


Рис.23. Хроматограмма гранатового сока с добавлением экстракта ягод бузины:

дельфинидин-3,5-диглюкозид (5,568), цианидин-3,5-диглюкозид (9,240), пеларгонидин-3,5-диглюкозид (11,150), 3-глюкозид цианидин (12,806 мин), 3-глюкозид-5-самбубиозид цианидина (13,082 мин).

Подобные нарушения имеют место также для других видов соков, сырье которых является относительно дорогим, например, вишневый сок (рис. 24).

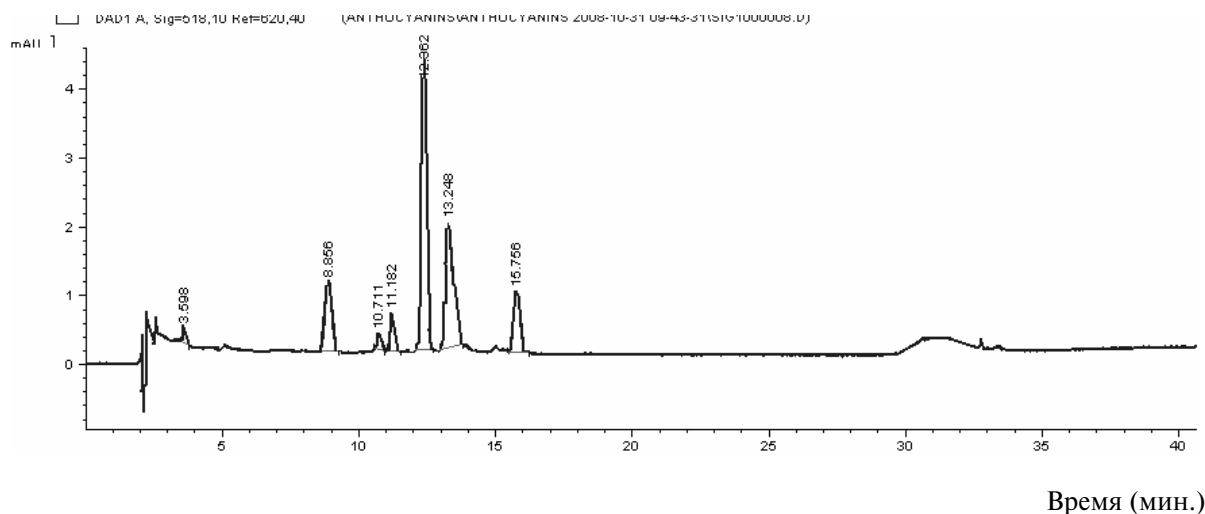


Рис.24. Хроматограмма вишневого сока с добавлением экстракта ягод бузины: дельфинидин-3-глюкозид (10,711 мин), дельфинидин-3-галактозид (12,362 мин), 3-глюкозид цианидин и 3-глюкозид-5-самбубиозид цианидина (13,248 мин), цианидин-3-глюкозил рутинозид (15,756 мин).

Наличие небольшого количества бузины очень трудно определить по органолептическим показателям, а яркую стойкую красную окраску продукта, не сильно изменяя вкусовые качества продукта, получить легко. В спецификации продукта не декларируют использование в фруктовом сырье сока ягод бузины, и на упаковке отсутствует информация о наличии бузинового компонента в составе продукта.

Не редки случаи грубой фальсификации с использованием ароматизатора и более дешевых видов сырья. Такие нарушение состава продукта часто встречаются для гранатового сока (рис.25). На хроматограмме почти отсутствуют сигналы с временами удерживания около 5,5 мин, 8,2 мин и 12,5 мин, характерные для антацианов граната, зато хорошо видны сигналы антоцианов, которые являют собой комбинацию экстракта гибискуса и сока бузины.

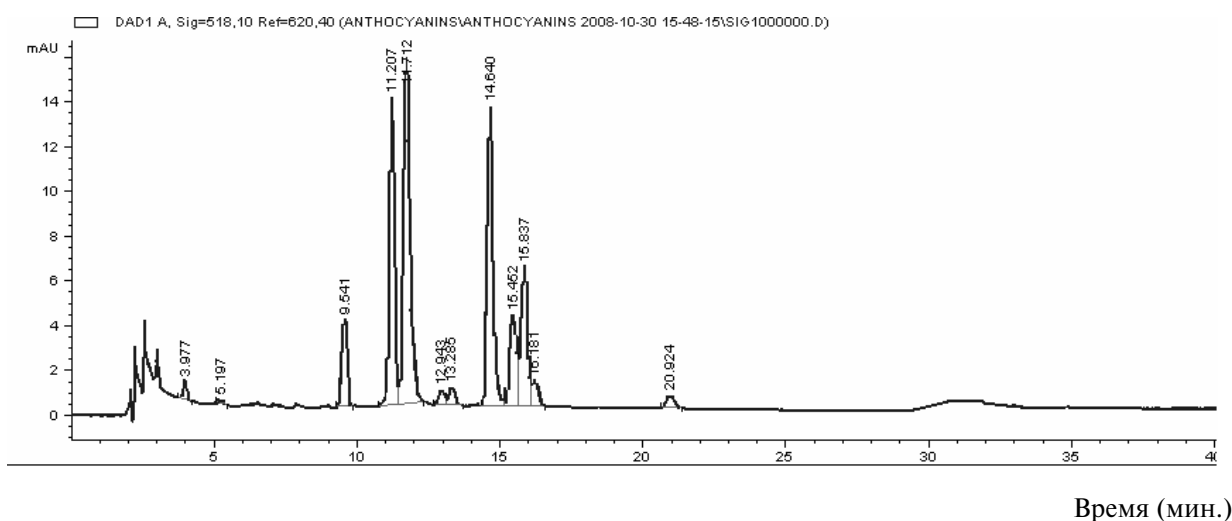


Рис.25. Хроматограмма "гранатового сока", не содержащего антоцианов граната.

Метод хорошо зарекомендовал себя также для контроля качества винной продукции из сортов красного винограда.

Антоциановый профиль хорошего вина близок к профилю, который создают антоцианы красного винограда, основной сигнал в котором принадлежит моногликозиду мальвидина с временем удерживания около 23 мин (рис.26).

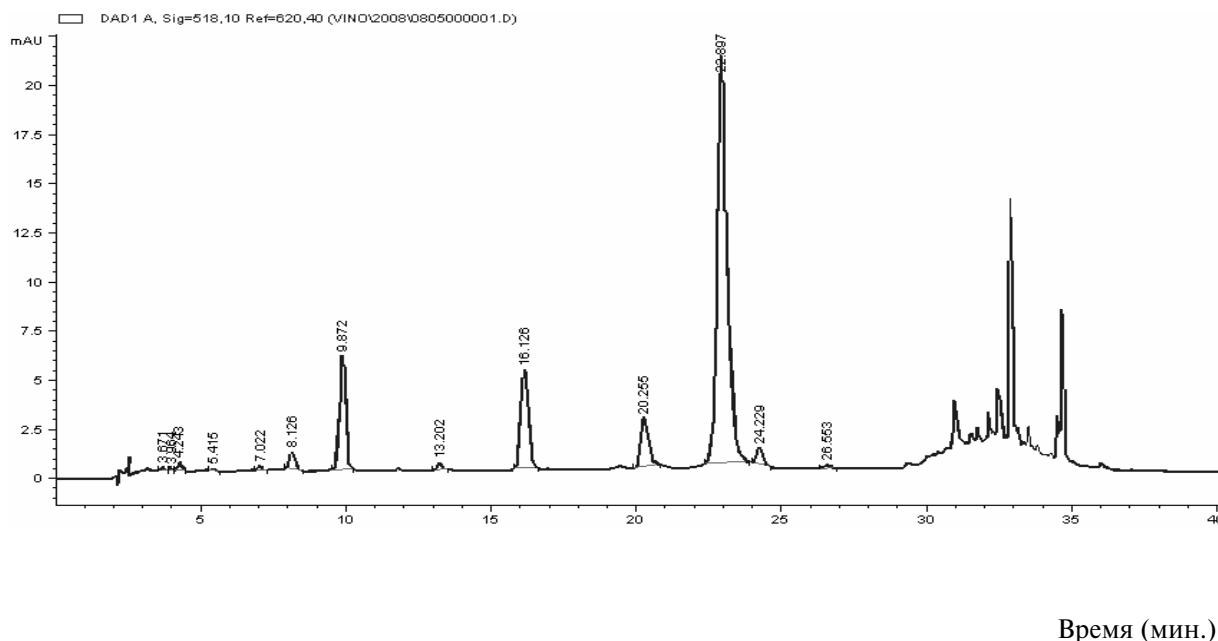


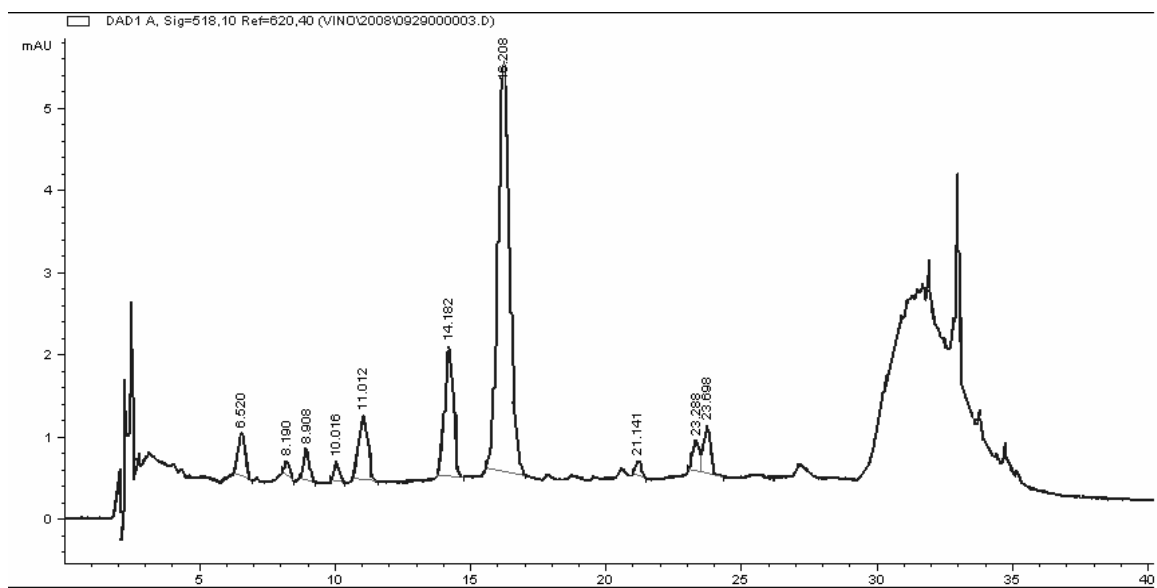
Рис. 26. Хроматограмма неокисленного образца красного вина: дельфинидин-3-глюкозид (9.872), цианидин-3 глюкозид (13.202), мальвидин-3,5-дигликозид (16.126), петунидин – 3 глюкозид (20.255), мальвидин-3-глюкозид (22.897).

В случае фальсификации имеет место снижение интенсивности сигналов в зависимости от степени окисления полифенолов винограда (рис. 27).

На хроматограмме окисленного образца вина смешанных гибридных сортов (рис. 27) моногликозиды винограда с большим трудом узнаваемы на фоне дигликозидов. Основной сигнал принадлежит мальвидин-3,5-дигликозиду со временем удерживания около 16 мин.

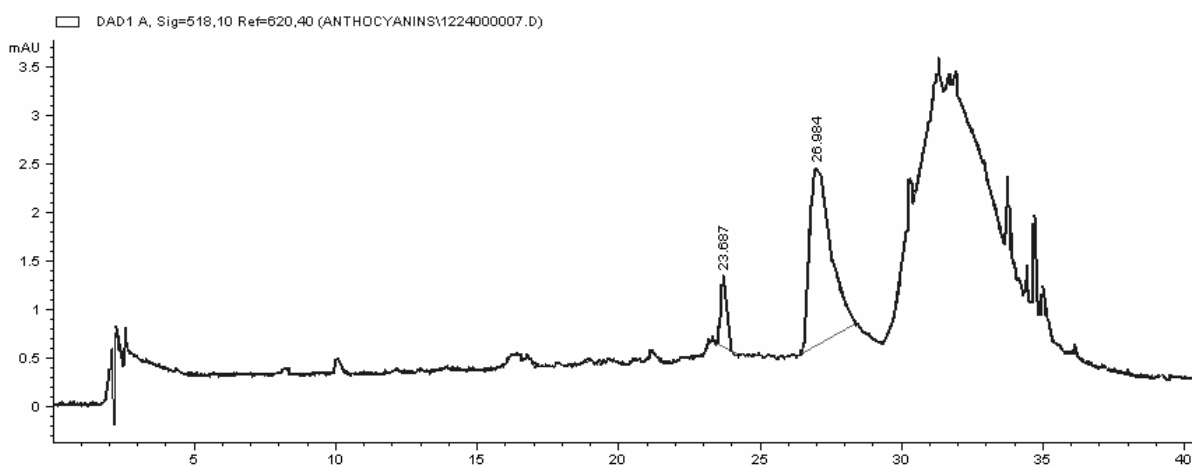
У некоторых образцов "вина" в хроматографическом профиле антоцианы отсутствуют, что свидетельствует о грубой фальсификации продукта (рис. 28).

Метод также дает возможность обнаружения в видимой области сигналов синтетических красителей, времена удерживания которых больше, чем времена удерживания антоцианов винограда. На хроматограмме "вина" (рис. 28) до 23 минуты практически отсутствуют сигналы антоцианов, характерные не только для красного винограда, но и какого-либо другого фруктово-ягодного сырья, а далее выходит сигнал небольшой интенсивности (RT 26,984), который соответствует синтетическому красителю азарубину (E122).



Время (мин.)

Рис. 27. Хроматограмма окисленного образца вина смешанных гибридных сортов: дельфинидин-3-глюкозид (11,012), цианидин-3-глюкозид (14,162), мальвидин – 3,5 – дигликозид (16,208), петунидин – 3 глюкозид (21,141), мальвидин -3– глюкозид (23,288 и 23,698).



Время (мин.)

Рис.28. Хроматограмма красного "вина" без антоцианов винограда.

Последний факт был подтверждён с помощью диодно-матричного детектора. Возможности диодно-матричного детектора также позволяют записывать спектр поглощения компонентов пробы, создавать библиотеки спектров веществ и легко идентифицировать спектры выходных сигналов, например, синтетических красителей.

Как видно из вышеизложенного, метод определения антоцианового состава с помощью жидкостной хроматографии незаменим для выявления аутентичности фруктово-ягодного сырья, продуктов из него и фальсификаций. Этот метод позволяет инструментально подтверждать соответствие содержащихся в продукте компонентов задекларированным составам, а также выявлять содержащиеся вещества и компоненты, нехарактерные для фруктового сырья – синтетические красители и натуральные красящие пигменты другого ботанического вида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Code of Practice for Evaluation of Fruit and Vegetable Juices/ European Fruit Juice Association (A.I.J.N), 2004
2. **Готтих М. Б., Ташлицкий В. Н.** Определение качественного и количественного состава антоцианиновых пигментов в составе биологически активных добавок с помощью ВЭЖХ. // Клиническая офтальмология. – 2007. – № 3. – С. 106 – 109.
3. **Рудаков О. Б., Хайрутдинова А. Д.** Фракционный состав антоциановых красителей из растительных экстрактов и контроль над ним методом ВЭЖХ. // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2004. – № 4. С. 85-93.
4. **Braun R. et al.** Standardzulassungen für Fertigarzneimittel-Text and Kommentar. // Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag. Monographien-Kommentar. – 1997.
5. **Barrette E.P.** Bilberry fruit extract for night vision. // Alternative Medicine Aler, 1999. – № 2. – P. 20-21.
6. **Cunio L.** Vaccinium myrtillus. // Aust. J. Med. Herbalism. – 1993. № 4. – P. 81-85.
7. **Buchert J., Koponen J.M.** Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices. // Journal of the science of food and agriculture. – 2005. – № 4. p.16
8. **G.Mazza.** Characterization of acetylated anthocyanins in lowbush blueberries. // Journal of Liquid Chromatography. – 1995. V.18. P 245-259
9. **Шобингер У.** Фруктовые и овощные соки: научные основы и технологии – СПб: Профессия, 2004. – 640 с.
10. **Сорокопудов В. Н., Дейнека В. И., Лукина И. П., Дейнека Л. А.** Антоцианы плодов некоторых видов рода *Rubus* L. из коллекции ботанического сада БелГУ. // Химия растительного сырья. – 2005. – № 4. С.61-65.
11. **Veliodlu S., Unal C.** Chemical Characterization of pomegranate juice, Quality Control, Scientific and Technical Research Council of Turkey; Determination of Phenolic Compounds in Pomegranate Juice by Using HPLC (N.Artik). // Quality Control., 1997. № 8. – С. 307 – 310.
12. Общая органическая химия, пер. с англ. – 1982, т. 2, М.,– 850 с
13. **Сластья Е. А., Желякова Т. А.** Новый экспресс-метод полуколичественного определения содержания мальвидин-3,5-дигликозида в винограде и вине. // Вестник Харьковского национального университета.– 2005.№ 669.
14. **Hebrero E., Garcia-Rodriguez C.** Analysis of Anthocyanins by High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Spectroscopy in Hybrid Grape Variety. // Am .J. Enol. Vitic. – 1989. 40:4. P 283-291
15. **Vorsa N., Polashock J.** Altering flavonoid glycosylation for increased bioavailability in cranberry through interspecific hybridization. // Symposium 14: Berry crop breeding. Production and utilization for a new century. 1999. P.18-20

ООО "Сандора"

Поступило в редакцию 3.09.2008