



УДК. 544.723.2:544.726

Сопоставление сорбционной эффективности сорбентов трех типов по отношению к антоцианам

Чулков А.Н., Болдин А.Б., Дейнека В.И., Дейнека Л.А.

Белгородский государственный университет, Белгород

Поступила в редакцию 22.03.2012 г.

Аннотация

В работе сопоставлена сорбция антоцианов на гидрофобных C18 и C8 химически модифицированных силикагелях, на двух ионообменных материалах (SO_3^- -катионитах на основе химически модифицированного силикагеля и на полимерной матрице) и на композиционном, содержащем глину, сорбенте. Показана высокая эффективность обращенно-фазовых сорбентов для очистки антоцианов по сольвофобному механизму и композиционных сорбентов со слоистыми минералами, построенными из пакетов с отрицательным зарядом как следствие изоморфного замещения центральных ионов в октаэдрическом и тетраэдрическом слоях, - по ионообменному механизму. Установлено, что между катионообменной емкостью ионообменных сорбентов и их способностью сорбировать антоцианы нет прямой связи вследствие стерических факторов.

Ключевые слова: антоцианы, сорбция, обращено-фазовые, C18 и C8 сорбенты катионообменные сорбенты, глина.

Sorption of anthocyanins upon hydrophobic C18 and C8 chemically modified silicas, two ion-exchange materials (SO_3^- - cationites on the basis of chemically modified silica and on polymeric matrix) as well as upon composite sorbent on with clay minerals were compared. High effectivity of reversed-phase sorbents for solvophobic anthocyanins clean-up and ion-exchange anthocyanins sorption upon composite clay sorbents with charged layers as a consequence of isomorph substitution in octahedral and tetrahedral layers has been proved. The absence of correlation between cation-exchange capacity and anthocyanin sorption capacity is proposed to be due to steric factors.

Keywords: anthocyanins, sorption, reversed-phase C18 and C8 sorbents, cation-exchange sorbents, clay

Введение

Сорбционные методы концентрирования и очистки веществ нашли широкое применение при пробоподготовке образцов в химическом анализе на различных стадиях химических производств и т.д. Одним из важнейших способов очистки веществ является твердофазная экстракция. Это объясняет наличие на мировом рынке широкого спектра сорбентов, различающихся по свойствам и химическому строению. Выбор подходящего для решения поставленной задачи сорбента определяется сродством целевого соединения к сорбенту, определяемого доминирующим механизмом сорбции, и сорбционной емкостью. Для антоцианов, - органических соединений, присутствующих в определенном диапазоне pH в

катионной форме, процесс сорбции может быть обусловлен как остаточной гидрофобностью, так и ионообменными процессами. Соответственно, для очистки и концентрирования этих соединений используют как гидрофобные органические сорбенты, так и катионообменные материалы, причем наибольшей эффективностью обладают сорбенты с привитыми октадецилсилильными группами [1, 2], а недавно предложен и сорбент с комбинированной гидрофобно-ионообменной модификацией [3]. Альтернативой этим методам является твердофазная экстракция природными глинами [4, 5]. Этот метод предложен сравнительно недавно, поэтому неудивительно, что данных по сопоставлению эффективности всех типов сорбентов в очистке антоцианов в литературе нами не обнаружено.

Цель настоящей работы – сопоставить методы твердофазной экстракции на традиционных обращено-фазовых (C8 и C18) сорбентах, на катионообменных сорбентах и на композиционном сорбенте, содержащем природную глину [6].

Эксперимент

Для сопоставления сорбционной эффективности различных сорбентов в настоящей работе использовали метод динамической сорбции антоцианов одного и того же предварительно очищенного экстракта на патронах ДИАПАК, заполненных производителем (БиоХимМак СТ, Москва) октадецильной (C18), октильной (C8) и сульфо (RSO_3^-) фазами. Аналогичные пустые патроны были заполнены нами подготовленным стандартным методом [7] катионитом марки КУ-2-8 и комбинированным сорбентом на основе глины [6].

В качестве образца раствора антоцианов использовали предварительно очищенный (также сорбционным методом) экстракт из чая «Каркадэ» - бутонов розы суданской (розеллы, *Hibiscus sabdariffa*). Антоциановый комплекс экстракта данного материала представлен в основном двумя соединениями – 3-самбубиозидами дельфинидина и цианидина [8].

Экстракт пропускали через патроны со скоростью 0.5 мл/мин с использованием перистальтического насоса LS 301. Остаточное содержание антоцианов в порциях элюата по 5 мл определяли спектрофотометрически в кварцевых кюветах при 510 нм. Пересчет выполняли на цианидин-3-глюкозид [9].

Величины катионообменной емкости сорбентов, предварительно переведенных в H^+ -форму, рассчитывали по результатам прямого потенциометрического титрования водных суспензий материалов 0.01 М раствором гидроксида натрия.

Для идентификации антоцианов экстракта в работе использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в обращенно-фазовом варианте с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами (оборудование марки Agilent 1200 Infinity). Разделение проводили в изократическом режиме в подвижной фазе: ацетонитрил - муравьиная кислота - вода (8:10:92 об.%) при скорости 1 мл/мин. В работе использовали хроматографическую колонку 4.6×250 мм Symmetry® C18 с термостатированием (40°C) при спектрофотометрическом детектировании ($\lambda = 510$ нм).

Для записи масс-спектров разделение антоцианов осуществляли на хроматографической колонке 2.1×100 мм SB18 (3 мкм) в той же подвижной фазе, но при расходе 0.1 мл/мин. Детектор - квадрупольный масс-спектрометр Agilent 6130 Quadrupole LC/MS в режиме ESI (ионизация распылением в электрическом поле) в позитивном режиме сканирования в диапазоне M/Z 250-1200; напряжение на

фрагменторе – 200 В; давление газа-распылителя 30 psi, скорость газа осушителя 10 л/мин, температура газа осушителя 350 °С, температура испарителя 250 °С.

Обсуждение результатов

Антоциановый состав использованного в работе экстракта «Каркадэ» оказался простым, рис.1: на хроматограмме, в соответствии с литературными данными [8], обнаруживаются два основных пика.

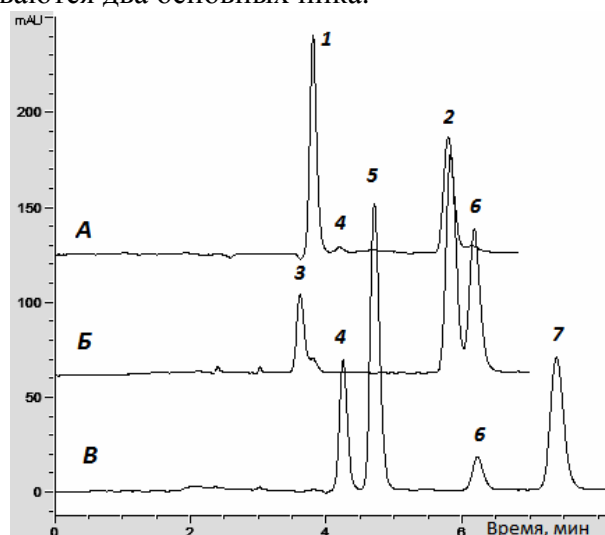


Рис. 1. Разделение антоцианов экстрактов «Каркадэ», плодов бузины черной, плодов черной смородины. Экстракты: А – «Каркадэ», Б – плодов бузины черной, В – плодов черной смородины. 1 – дельфинидин-3-самбубиозид; 2 – цианидин-3-самбубиозид; 3 – цианидин-3-глюкозид-5-самбубиозид; 4 – дельфинидин-3-глюкозид; 5 – дельфинидин-3-рутинозид; 6 – цианидин-3-глюкозид; 7 – цианидин-3-рутинозид

Принадлежность пика 2 к цианидин-3-самбубиозиду (Cy-3-Sam) установлена по совпадению времен удерживания этого компонента и Cy-3-Sam из экстракта плодов бузины черной [10] в двух составах подвижных фаз. Пентозил-гексозидный характер заместителей цианидина и дельфинидина (пики 1 и 2, рис.1) подтвержден результатами масс-спектрометрического детектирования: в масс-спектрах веществ 1 и 2, рис.1, обнаруживаются по два основных сигнала с $M/Z = 303.0$ и 597.1 для пика 1, а также 287.0 и 581.1 для пика 2, рис.2. Меньшие значения этого отношения подтверждают отнесение пиков к производным дельфинидина ($C_{15}O_7H_{11}^+$) и цианидина ($C_{15}O_6H_{11}^+$), соответственно. При этом сигналы от ионов с большей массой соответствуют веществам с двумя углеводными радикалами в структуре – пентозильного и гексозильного.

В качестве модельного раствора в настоящей работе использовали очищенный водный солянокислый концентрат с суммарной концентрацией антоцианов 0.7 ммоль/л, что соответствует выходу изотермы адсорбции на насыщение. При динамическом варианте сорбции (пропускание раствора антоцианов через сорбент до насыщения) величина избыточной адсорбция антоцианов на C18-сорбенте составила 18.4 мкмоль/г, рис.3. Примерно такой же уровень избыточной сорбции (18.1 мкмоль/г) получен и для C8-фазы, что согласуется с сольвофобным механизмом удерживания антоцианов на поверхности

обращенной фазы. По модели Хорвата и Меландера [12] велик вклад в суммарное удерживание величины поверхностного натяжения подвижной фазы, а этот параметр особенно быстро уменьшается при относительно небольших добавках ацетонитрила [13], что объясняет «крутую» зависимость удерживания антоцианов от концентрации ацетонитрила. При этом толщина привитого слоя не должна быть определяющим параметром, и при равенстве удельной поверхности двух сорбентов с С18- и С8-функциями, которое обеспечивается использованием одной и той же силикагелевой матрицы, величины избыточной сорбции антоцианов должны быть близкими.

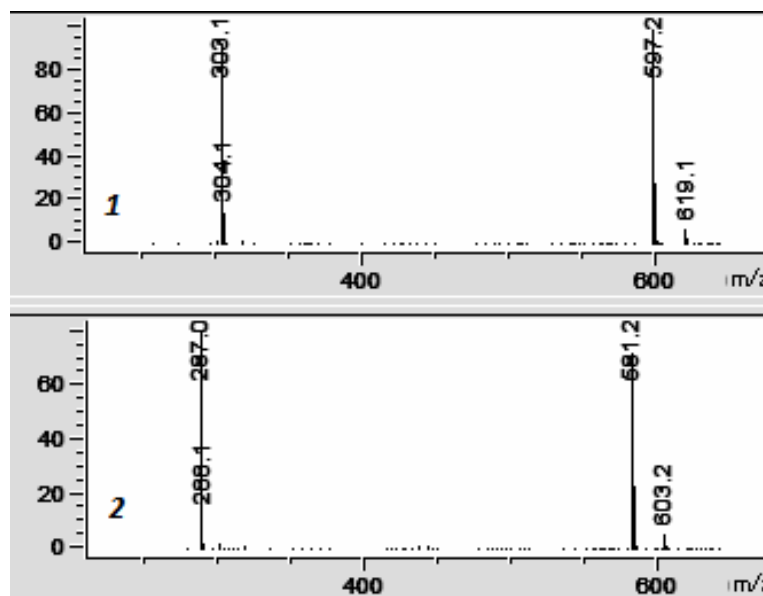


Рис. 2. Масс-спектры Dp-3-Sam (1) и Cy-3-Sam (2)

Из трех, исследованных в настоящей работе катионообменных материалов, две стандартные катионообменные фазы (сульфо-фаза патронов ДИАПАК и катионообменная смола КУ 2-8) оказались существенно менее эффективными сорбентами – избыточная сорбция составила лишь 2 – 4 мкмоль/г, рис.3.

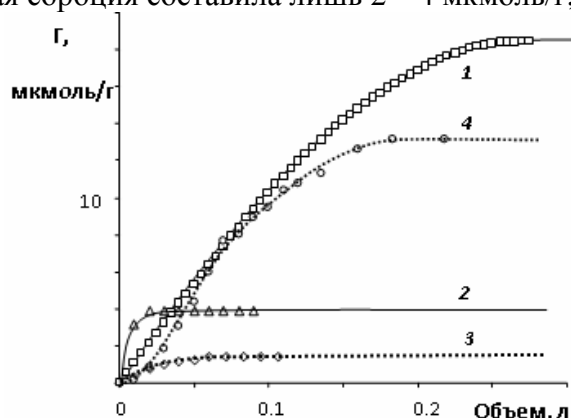


Рис. 3. Динамическая сорбция антоцианов на сорбентах
Стационарные фазы концентрирующих патронов: модифицированные силикагели - 1 – С18, 2 – катионообменник (Сульфо);
3 - катионообменная смола - КУ 2-8; 4 – композитный сорбент на основе глины.

В отличие от них композиционный сорбент, содержащий лишь около 30 % глины, оказался достаточно эффективным – избыточная сорбция достигла уровня –

около 13 мкмоль/г, что определяется высокой сорбционной активностью самих глин [4], поскольку неорганическая матрица (на основе силикагеля) в аналогичных условиях антоцианы практически не сорбирует.

Еще один недостаток традиционных катионообменных полимерных материалов определяется чрезвычайно медленными массообменными процессами – для достижения максимума сорбции необходимо значительное время (25-40 ч и более), поэтому результаты на рис.3 для катионообменной смолы нельзя считать равновесными. И, поскольку медленное установление равновесия характерно не только для сорбции, но и для десорбции (извлечь более 10 % от сорбированных антоцианов проблематично из-за больших временных затрат), такие сорбенты не технологичны в процессах очистки антоцианов.

Для использованного в работе композиционного материала на основе глин сорбционно-десорбционное равновесие достигалось за 20 - 30 минут. При этом легко достигается высокая степень возврата антоцианов в циклах «сорбция – десорбция» (до уровня 95 %) при нескольких циклах этих процессов на одном и том же сорбенте, хотя полного удаления красной окраски использованного сорбента достичь не удастся, возможно, из-за процессов интеркаляции в межпакетное пространство глин [14].

Сорбция антоцианов на глинах обусловлена их высокой катионообменной емкостью, поэтому она определяется зарядом пакетов, появляющимся из-за изоморфного замещения ионов Al^{3+} ионами Mg^{2+} в октаэдрических и Si^{4+} ионами Al^{3+} в тетраэдрических слоях слоистых минералов. Из слоистых минералов тальк образует структуры с незаряженными каркасами слоев, поэтому его сорбционная емкость должна быть близкой к нулю (если не учитывать дефекты структуры), что было подтверждено нами – образец использованного в работе талька обладал практически нулевой сорбционной активностью по отношению к антоцианам. Поэтому можно предположить, что тальк с сильно дефектной структурой и с нехарактерным для этого минерала зарядом пакетов был использован авторами патента [15] для концентрирования и очистки антоцианов.

Очевидно также и то, что к числу определяющих сорбционную емкость факторов следует отнести стерическую доступность обменных центров катионообменника. Относительно большой по размеру флавилиевый катион не может быстро диффундировать в поры полимерного сорбента, а в некоторые из них – не попасть вообще. Так кислотно-основным титрованием катионообменная емкость смолы КУ-2-8 была оценена в 4 ммоль/г, что многократно выше, чем для композиционного сорбента (порядка 100 мкмоль/г), но эти значения не коррелировали с сорбционной активностью этих сорбентов по отношению к антоцианам.

Заключение

Наиболее эффективными сорбентами для твердофазной экстракции антоцианов являются дорогостоящие химически модифицированные С18- и С8-силикагели и дешевые композитные сорбенты на основе природных глин. Поэтому для очистки антоцианов от сопутствующих экстрактивных веществ можно использовать два принципиально различающихся процесса - сольвофобный, приводящий к накоплению антоцианов на поверхности обращенно-фазового сорбента, и за счет ионообменных процессов, эффективность которых в

существенной степени зависит от стерических факторов – доступности порового пространства сорбентов.

Список литературы

1. Csiktusnadi Kiss G.A., Forgacs E., Cserhati T., Candeias M., Vilas-Boas L., Bronze R., Spranger I. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic separation of pigments of red wines // *J. Chromatogr. A.* - 2000. - V.889. - P.51-57.
2. Rodriguez-Saona L.E., Wrolstad R.E. Extraction, Isolation, and Purification of Anthocyanins / *Current Protocols in Food Analytical Chemistry.* -2001. F1.1.1-F1.1.11.
3. He J., Giusti M.M. High-purity isolation of anthocyanins mixtures from fruits and vegetables – A novel solid-phase extraction method using mixed mode cation-exchange chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2011. – V.1218. – P. 7914-7922.
4. Lopes T.J., Quadri M.G.N., Quadri M.B. Recovery of anthocyanins from red cabbage using sandy porous medium enriched with clay // *Appl. Clay Sci.* - 2007. - V.37. - P. 97–106.
5. Дейнека Л.А., Чулков А.Н., Дейнека В.И. Сорбция антоцианов природными глинами: зависимость от строения антоцианов и состава экстрагентов // *Ж. прикл. химии.* - 2009. - №5. С.742-748.
6. Дейнека Л.А., Дейнека В.И., Чулков А.Н. Способ получения композиционного сорбента для очистки и концентрирования биологически активных антоцианов из растительного сырья. Пат. № 2360733, 2009.
7. Крешков А.П. Основы аналитической химии. Т.3. М.:Химия, 1977. – С. 337-338.
8. Ojeda D., Jiménez-Ferrer E., Zamilpa A., Herrera-Arellano A., Tortoriello J., Alvarez L. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa* // *J. Ethnopharmacol.* - 2010. - V.127. – P. 7–10.
9. Giusti M., Ronald E. // *Current Protocols in Food Analytical Chemistry.* - 2001. F1.2.1-F1.2.13.
10. Andersen M. Aksnes D.W., Nerdal W., Johansen O.-P. Structure elucidation of cyanidin-3-sambubioside and assignments of the ^1H and ^{13}C NMR resonances through two-dimensional shift-correlated NMR techniques // *Phytochem. Anal.* – 1991. – V.2. – P. 175-183.
11. Чулков А.Н., Дейнека В.И., Дейнека Л.А. Особенности удерживания антоцианов *Hibiscus sabdariffa* в условиях обращенно-фазовой хроматографии» / Сборник статей II Международной научно-практической конференции, посвященной Международному году химии, Курск, 17-20 мая 2011 г. - С. 211-214.
12. Horvath Cs., Melander W. Liquid chromatography with hydrocarboneous bonded phases: theory and practice of reversed-phase chromatography // *J. Chrom. Sci.* – 1977. – V.15. – P. 393-404.
13. Рудаков О.Б., Рудакова Л.В., Подолина Е.А., Барсукова Л.Г. Изотермы проницаемости бинарных подвижных фаз для жидкостной хроматографии // *Ж. физ. химии.* – 2009. – Т.83. – С. 2165-2168.
14. Kohno Y., Kinoshita R., Ikoma S., Yoda K., Shibata M., Matsushima R., Tomita Y., Maeds Y., Kobayashi K. Stabilization of natural anthocyanin by intercalation into montmorillonite // *Appl. Clay Sci.* – 2009. – V.42. – P. 519-523.
15. Птицын А.В., Мухтаров Э.И., Каплун А.П., Мухтарова С.Э. Способ выделения биологически активных антоцианов. Патент РФ № 2302423, 2007.

Чулков Андрей Николаевич – аспирант биолого-химического факультета Белгородского государственного университета, Белгород

Болдин Александр Борисович – студент Биолого-химического факультета Белгородского государственного университета, Белгород

Дейнека Людмила Александровна – к.х.н. доцент кафедры общей химии Белгородского государственного университета, Белгород

Дейнека Виктор Иванович – д.х.н., доцент Белгородского государственного университета, Белгород

Chulkov Andrey N – postgraduate, Biological-Chemical Department, Belgorod State University, Belgorod, E-mail: Ach87@mail.ru

Boldin Alexander B. – student of Biological-Chemical Department, Belgorod State University, Belgorod

Deineka Ludmila A. - Ph.D.(Chemistry) Professor Assistant of General Chemistry Chair, Belgorod State University, Belgorod

Deineka Viktor I. - Dr.Sci.(Chemistry) Professor of General Chemistry Chair, Belgorod State University, Belgorod