Для цитирования: Аналитика и контроль. 2025. Т. 29, № 2. С. 149-156
УДК 543.544.5.068.7:543-1 DOI: 10.15826/analitica.2025.29.2.004

Зависимость хроматографических параметров антоцианов в обращенно-фазовой ВЭЖХ от кислотности подвижной фазы

И.П. Блинова, В.И. Дейнека, Д.Н. Блинов, Л.А. Дейнека

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»)
Российская Федерация, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

**Адрес для переписки: Блинова Ирина Петровна. E-mail: blinova@bsuedu.ru*

Поступила в редакцию 21 апреля 2025 г., после доработки – 15 мая 2025 г.

Методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на стационарной фазе Symmetry™ C18 определены параметры пиков 3-глюкозидов пяти антоцианидинов экстракта листьев *Cercis canadensis* в элюентах систем ацетонитрил–муравьиная кислота–вода и ацетонитрил–ортофосфорная кислота–вода при различных объемных концентрациях кислот. Установлено, что уменьшение концентрации кислот сопровождается ростом высоты эквивалентной теоретической тарелки пиков и уменьшением их площади в зависимости от строения антоцианов. Лучшими подвижными фазами можно считать смеси с возможно более высокой концентрацией кислоты (с pH 1 и менее), но вследствие неустойчивости обычных «мономерных» C18 стационарных фаз при pH менее 2, используют менее кислые подвижные фазы, например, содержащие 10 об. % муравьиной кислоты (pH около 1.3) или 2 об. % ортофосфорной кислоты (pH около 1.2). Снижение концентрации кислот до 6 и 1 об. % для муравьиной и ортофосфорной кислот обычно приемлемо, хотя при этом pH (около 1.5) также остается за пределами устойчивости традиционных обращенных фаз.

***Ключевые слова**:* антоцианы, обращенно-фазовая ВЭЖХ, pH подвижных фаз, уширение пиков, площадь пиков.

For citation: Analitika i kontrol' [Analytics and Control], 2025, vol. 29, no. 2, pp. 149-156
DOI: 10.15826/analitica.2025.29.2.004

Dependence of chromatographic parameters of anthocyanins in reverse-phase HPLC on acidity of the mobile phase

I.P. Blinova, V.I. Deineka, D.N. Blinov, L.A. Deineka

Belgorod State University
85 Pobeda St., Belgorod, 308015, Russian Federation

**Corresponding author: Irina P. Blinova, E-mail: blinova@bsuedu.ru*

Submitted 21 April 2025/ received in revised form 15 May 2025

Parameters of peaks of 3-glucosides of five anthocyanidins of Cercis canadensis leaf extract in the eluents of acetonitrile–formic acid–water and acetonitrile–orthophosphoric acid–water systems at various volume concentrations of acids were determined by the method of reverse–phase HPLC on SymmetryTM C18 stationary phase. It was found that a decrease in the acid concentration was accompanied by an increase in the height of the equivalent theoretical plate of peaks and a decrease in their areas, depending on the structure of anthocyanins. Mixtures with the highest possible acid concentration (ideally with the pH value of 1 or less) can be considered the best mobile phases; however due to the instability of the usual "monomeric" C18 stationary phases at pH of below 2, less acidic mobile phases are used, for example, containing 10 vol. % formic acid (pH of about 1.3) or 2 vol. % orthophosphoric acid (pH of about 1.2). Reduction of acid concentration to 6 and 1 vol. % for formic and orthophosphoric acids, respectively, is usually acceptable, although the pH value (about 1.5) also remains outside the stability limits of traditional reversed phases.

Keywords: anthocyanins, reverse-phase HPLC, pH of mobile phases, peak broadening, peaks area

ВВЕДЕНИЕ

Для разделения антоцианов изначально использовали тонкослойную (чаще всего бумажную) хроматографию [1, 2]. К настоящему времени известно использование для этих целей капиллярного электрофореза [3] и противоточной хроматографии [4], но основным способом разделения антоцианов является высокоэффективная обращенно-фазовая жидкостная хроматография [5] и потенциально эффективная гидрофильная хроматография с принципиально иной селективностью разделения индивидуальных антоцианов [6, 7].

Для определения антоцианов используют чаще всего «мономерную» обращенно-фазовую ВЭЖХ [5]. Среди остальных флавоноидов антоцианы отличаются существованием нескольких pH-зависимых форм [8], из которых флавилиевая форма (I, схема 1) наиболее удобна, поскольку обладает окраской, позволяющей детектировать антоцианы в видимой области электромагнитного спектра на фоне сопутствующих экстрактивных веществ, обычно присутствующих в исследуемых образцах экстрактов. Но флавилиевая форма становится доминирующей только в сильнокислых подвижных фазах (при pH < 1), хотя такая кислотность подвижной фазы находится за пределами устойчивости традиционных обращенных стационарных фаз, для которых обычно декларируется диапазон pH от 2 до 7. Следовательно, приходится использовать составы, при которых антоцианы не на 100 % находятся во флавилиевой форме. Однако на вытекающие из этого следствия (уменьшение площади пиков и уменьшение времени удерживания по сравнению с подвижными фазами с pH 1) в литературе практически не обращается внимание.

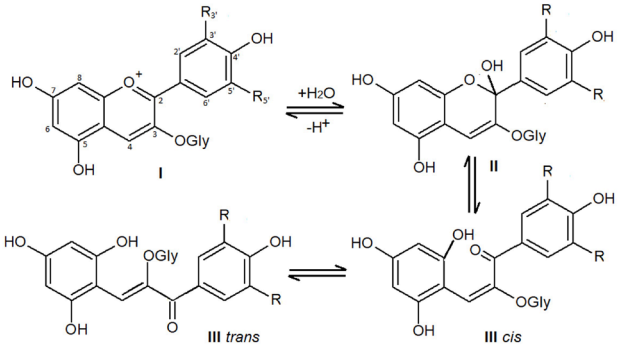

Схема 1. Формы антоцианов в кислых средах: **I** – флавилиевая, **II** – псевдооснование, **III *cis*** и **III *trans*** халконные формы

Scheme 1. Forms of anthocyanins in acidic media: **I** – flavylium, **II** – pseudobase; **III *cis*** and **III *trans*** chalkones

Флавилиевая форма (**I**) в кислых средах (с pH от 1 до 3) может находиться в равновесии с псевдоосновaнием (полукеталем, **II**), *цис*- и *транс*-халконными формами (**III**), схема 1.

Первое и второе равновесия являются быстро устанавливающимся, тогда как переход от *цис*-халкона к *транс*-халкону относится к медленным процессам [9], требующим значительного времени для достижения равновесия (более 6 ч – смесь оставляют на ночь). Поскольку в природе антоцианы могут существовать не только во флавилиевой форме, то, строго говоря, определение антоцианов сразу после экстракции (без выдержки в течение суток) может привести к заниженной оценке их содержания. Но этот факт игнорируется не только в руководствах по спектрофотометрическому определению [10, 11], но и в известных нам публикациях с использованием метода ВЭЖХ, хотя несовпадение полученных двумя различными методами (хроматографическим и спектрофотометрическим) результатов было установлено в работе [12].

Для разделения антоцианов в обращенно-фазовой хроматографии используют обычные для метода органические модификаторы (ацетонитрил и метанол), подкисленные различными кислотами [5], среди которых важное место занимает муравьиная кислота. В наших работах было показано, что для стабильной работы хроматографической системы при применении спирта в качестве органических модификаторов подвижных фаз муравьиную кислоту следует заменить ортофосфорной [13]. Но решение вопроса о концентрации кислот и вытекающих из этого следствиях в литературе нами не найдено.

Поэтому цель настоящего исследования – исследование влияния концентрации кислоты в подвижной фазе на такие параметры пиков, как времена удерживания и их площадь.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и материалы.

В работе использовали ацетонитрил (для ВЭЖХ, neoFroxx, Германия), муравьиную кислоту (ч., Химреактив, Россия), ортофосфорную кислоту (ч.д.а., Химреактив, Россия), дигидрат щавелевой кислоты (ч., Китай) и дистиллированную воду (ГОСТ Р 58144-2018, ООО «Титан-СМ», Россия).

Экстракт антоцианов получали настаиванием в 0.1 М водном растворе соляной кислоты сушеных листьев багрянника канадского (*Cercis canadensis*) из коллекции ботанического сада НИУ БелГУ.

Частичную очистку осуществляли методом твердофазной экстракции на концентрирующих патронах ДИАПАК С18 (БиоХимМак СТ, Москва). Для этого вначале патрон активировали пропусканием 3 мл ацетона, затем кондиционировали пропусканием 9 мл экстрагента. Наконец пропускали экстракт до появления окрашенного элюата. Антоцианы реэкстрагировали с патрона 3 мл раствора, содержавшего 24 об % ацетонитрила и 30 об. % муравьиной кислоты в воде. Полученный реэкстракт сразу разбавляли водой в 3 раза. Проба содержала набор 3-глюкозидов пяти антоцианидинов: дельфинидина (Dp3Glu), цианидина (Cy3Glu), петунидина (Pt3Glu), пеонидина (Pn3Glu) и мальвидина (Mv3Glu) [14], растворенных

в смеси ацетонитрила, муравьиной кислоты и воды в объемном соотношении 8 : 10 : 72.

Хроматографическое оборудование.

Разделение осуществляли на хроматографе Agilent Infinity 1260 (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным детектором. Хроматографическая колонка 150×4.6 мм Symmetry™ C18, 3.5 мкм; температура термостата колонки 40 °C, запись хроматограммы при 515 нм. Хроматограммы записывали, хранили и обрабатывали ПО ChemStation (ChemStation, США), определяя времена удерживания, $t_R(i)$, площадь и ширину пиков на половине высоты, $\Delta_{1/2}$. Метчик мертвого времени – раствор щавелевой кислоты в подвижной фазе (детектирование при 240 нм).

Расчетные методы. Число теоретических тарелок хроматографической системы рассчитывали по времени удерживания вещества t_R и ширине пика $\Delta_{0.5}$ на половине высоты по формуле:

$$N(i) = 8 \cdot ln2 \cdot \left(\frac{t_R(i)}{\Delta_{0.5}(i)}\right)^2.$$

Высоту теоретической тарелки определяли по формуле:

$$H(i) = 150 \cdot \frac{1000}{N(i)}, \quad \text{мкм}.$$

Разрешение двух последовательных пиков *i* и *j*, если $t_R(j) > t_R(i)$, рассчитывали по формуле:

$$R_s(i,j) = \frac{t_R(j) - t_R(i)}{\Delta_{0.5}(j) + \Delta_{0.5}(i)}.$$

График зависимости степени существования антоцианов во флавилиевой форме от pH растворов строили по заданному значению составной константы равновесия в программе MSExcel.

Хроматограммы антоцианов строили, экспортируя CSV-файл хроматограммы в программу MSExcel с последующей доработкой в MSPaint.

Определение pH. Водородный показатель раствора при заданной объемной концентрации кислоты без органического модификатора определяли потенциометрическим способом, используя стеклянный комбинированный электрод (ЭСК-10614) и pH-метр («Эксперт-pH», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Зависимость доли флавилиевой формы антоцианов от pH растворов. Рассмотрим только два быстрых равновесия в схеме 1, исключая хиноноидные структуры, образуемые отщеплением протона от флавилиевого иона, которые наблюдаются при pH более 4.

Равновесие гидратации с константой K_h с преобразованием флавилиевой формы (**I**) в форму псевдооснования (**II**) (см. схему 1) при пренебрежении коэффициентами активности может быть выражено уравнением:

$$\mathbf{I} + H_2O \leftrightarrow \mathbf{II} + H^+,$$

$$K_h = \frac{[II]\cdot[H^+]}{[I]\cdot[H_2O]},$$

откуда концентрация **II** может быть выражена через концентрацию **I**:

$$[\mathbf{II}] = [\mathbf{I}]\frac{K_h\cdot[H_2O]}{[H^+]}.$$

Концентрация псевдооснования (**II**) связана с концентрацией *цис*-халконной формы (**III *cis***) через константу изомеризации K_i простым не зависящим от pH уравнением:

$$\mathbf{II} \leftrightarrow \mathbf{III}\ \boldsymbol{cis},$$

$$K_i = \frac{[\mathbf{III}\ \boldsymbol{cis}]}{[\mathbf{II}]},$$

откуда концентрация **IIIcis** может быть также выражена через концентрацию **I**:

$$[\mathbf{III}\ \boldsymbol{cis}] = [\mathbf{I}]\frac{K_h\cdot[H_2O]\cdot K_i}{[H^+]}.$$

Полная концентрация всех форм антоцианов [**An**] и доля флавилиевой формы α(*i*) при различных pH могут быть представлены уравнениями:

$$[\mathbf{An}] = [\mathbf{I}] + [\mathbf{II}] + [\mathbf{III}\ \boldsymbol{cis}],$$

$$\alpha(i) = \frac{1}{1+\frac{K_h\cdot[H_2O]}{[H^+]}+K_i\cdot\frac{K_h\cdot[H_2O]}{[H^+]}} = \frac{1}{1+(K_i+1)\frac{K_h\cdot[H_2O]}{[H^+]}}.$$

Это уравнение может быть упрощено введением составной константы равновесия, ***K***(*i*), характеристической для *i*-го антоциана, позволяющей связать долю флавилиевой формы с концентрацией протонов:

$$\alpha(i) = \frac{1}{1+\frac{K(i)}{[h^+]}},$$

где в числителе числителя выше представленного уравнения концентрация ионов водорода обозначена маленькой, а не большой буквой H.

$$K(i) = (K_i + 1)\cdot K_h\cdot[H_2O].$$

На рис. 1 показана зависимость доли флавилиевой формы α(*i*) от pH для нескольких значений *K*(*i*).

Из представленных данных следует, что не существует такого значения составной константы, для которого бы выполнялось требование [10] о том, что при pH 1 антоцианы находились бы исключительно во флавилиевой форме, а при pH 4.5 – исключительно в форме псевдооснования (в равновесии с халконными формами). Поскольку α(*i*) зависит от этой константы, то при спектрофотометрическом детектировании использование подвижных фаз с pH далеком от 1 не гарантирует корректного опре-

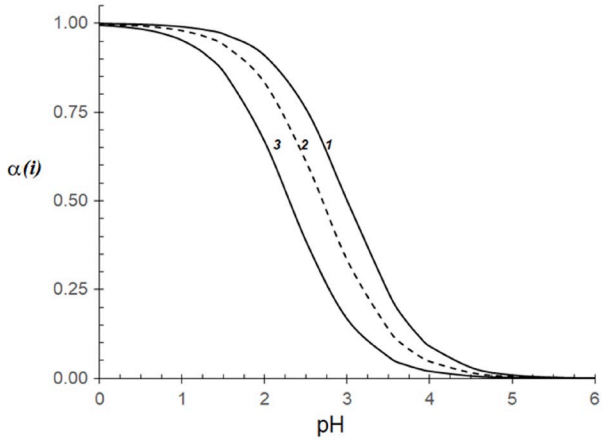

Рис. 1. Теоретическая зависимость доли флавилиевой формы антоцианов, a(*i*), от pH растворов при составной константе равновесий, *K*(*i*), равной *1* – 0.001; *2* – 0.002; *3* – 0.005

Fig. 1. Theoretical dependence of fraction of flavylium form of anthocyanins, a(*i*), *vs* pH of solutions for the composite equilibrium constant, *K*(*i*), values of 0.001 (*1*); 0.002 (*2*) and 0.005 (*3*)

деления соотношения концентрации различных антоцианов по площади пиков.

В целом существование нескольких форм антоцианов в неизвестных пропорциях может привести к:

а) неопределенной погрешности в определении площади пиков антоцианов из-за неконтролируемого соотношения между окрашенной и неокрашенными формами;

б) погрешностям в определении времени удерживания антоцианов, которое может зависеть не только от состава подвижной фазы для избранной стационарной фазы, поскольку удерживание псевдооснования меньше, чем флавилиевой формы, но и от времени от начала приготовления пробы до ее ввода в хроматограф, так как для полного перехода нефлавилиевых форм в флавилиевую требуется около суток [15].

Зависимость параметров хроматографических пиков от объемной доли муравьиной кислоты в подвижной фазе. Вначале рассмотрим хроматографическую систему ацетонитрил – муравьиная кислота – вода, как наиболее часто используемую для разделения антоцианов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. На рис. 2 представлены три хроматограммы с различной концентрацией муравьиной кислоты (и ацетонитрила), из которых очевидно, что с уменьшением концентрации муравьиной кислоты действительно происходит уширение пиков.

Учтем, что при этом изменение площади пика может зависеть не только от pH, но и от сольватохромного эффекта. В работе [16] нами был предложен вариант оценки сольватохромного эффекта для

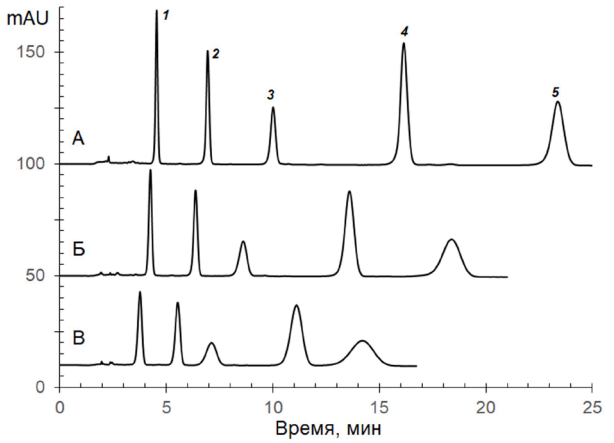

Рис. 2. Разделение 3-глюкозидов пяти антоцианидинов; дельфинидина (*1*), цианидина (*2*), петунидина (*3*), пеонидина (*4*) и мальвидина (*5*) в подвижных фазах системы CH_3CN – HCOOH – H_2O при составах: А – 7:10:83; Б – 11.5:3.25:85.25; В –13:1:85 об. % Колонка: 150×4.6 мм Symmetry™ C18, 3.5 мкм; 40 °C; 0.8 мл/мин; 515 нм

Fig. 2. Separation of 3-glucosides of five anthocyanidins, delphinidin (*1*), cyaniding (*2*), petunidine (*3*), peonidin (*4*) and malvidin (*5*), in mobile phases of CH_3CN–HCOOH–H_2O system with the composition of 7:10:83 vol. % (A); 11.5:3.25:85.25 vol. % (Б) and 13:1:85 vol. % (B) Column: 150×4.6 mm Symmetry™ C18, 3.5 mm; 40 °C; 0.8 ml/min; 515 nm

антоцианов спектрофотометрическим методом, определяющий и тип изменения абсорбции (гипер- или гипохромный эффекты), но его использование в ВЭЖХ не возможно. В данной работе мы сопоставляли площадь пиков антоцианов в хроматографических условиях, при которых рост концентрации муравьиной кислоты (как растворителя с сольватохромным

Таблица 1

Относительные площади пиков антоцианов, записанные при 515 нм, для пяти различных составов подвижных фаз системы ацетонитрил – муравьиная кислота – вода

Table 1

Relative peaks area of anthocyanins recorded at 515 nm for five different compositions of mobile phases of the acetonitrile – formic acid – water system

Содержание CH_3CN и HCOOH в элюентах, об. %					
CH_3CN	7	8.5	10	11.5	13
HCOOH	10	7.75	5.5	3.25	1
Антоциан	Относительная площадь пиков, %				
Dp3G	100	98.7	96.8	94.2	84.9
Cy3G	100	98.7	96.7	94.1	85.9
Pt3G	100	97.8	95.3	91.6	79.2
Pn3G	100	98.6	96.2	91.2	81.9
Mv3G	100	97.1	94.2	88.1	73.7
Среднее:	100	98.2	95.8	91.8	81.1

эффектом) в подвижной фазе комбинировали со снижением концентрации ацетонитрила (также с сольватохромным эффектом) для достижения более близких времен удерживания. Это связано с тем, что для корректного сопоставления эффективности (по числу теоретических тарелок) хроматографической системы измерения следует проводить при близких временах удерживания соответствующих веществ [17].

В табл. 1 представлено относительное изменение площади пиков пяти антоцианов при изменении состава подвижной фазы.

Среднее уменьшение площади пиков при уменьшении концентрации муравьиной кислоты от 10 до 1 об. % составило около 19 %. Но уменьшение площади пиков не одинаково для исследованных пяти компонентов - наибольшее относительное падение площади пика приходится на Mv3Glu – 26.3 %, а наименьшее – для Cy3Glu (13.1 %). Следовательно, при применении метода внутренней нормировки результаты будут зависеть от содержания муравьиной кислоты в подвижной фазе.

В табл. 2 представлено изменение высоты эквивалентной теоретической тарелки (*H*) этих же антоцианов при аналогичных изменениях состава подвижной фазы. В этом случае среднее значение *H* при 10 об. % муравьиной кислоты в подвижной фазе для всех антоцианов составляет 20.1 мкм (от 16.5 мкм для Pn3Glu до 23.7 мкм Mv3Glu). При уменьшении содержания муравьиной кислоты от 10 до 1 об. % *H* в среднем возрастает в 6.6 раза, а для Mv3Glu – в 9.6 раза, а разрешение (R_s) пиков Pn3Glu и Mv3Glu уменьшается от 6.63 до 1.57, вследствие чего разделяющая способность хроматографической системы резко снижается, но применение градиентного элюирования частично скрывает это уширение.

Таблица 2

Высоты эквивалентных теоретических тарелок (мкм) и их относительное изменение при уменьшении концентрации HCOOH в элюенте

Table 2

Heights of equivalent theoretical plates (μm) and their relative change with decreasing HCOOH concentration in the eluent

Содержание CH_3CN и HCOOH в элюентах, об. %					
CH_3CN	7	8.5	10	11.5	13
HCOOH	10	7.75	5.5	3.25	1
Высоты теоретических тарелок, мкм, и их относительное изменение, %					
Dp3G	21.7 (1.0)	24.1 (1.1)	30.6 (1.4)	46.3 (2.1)	100.9 (4.6)
Cy3G	17.0 (1.0)	18.8 (1.1)	22.6 (1.3)	31.6 (1.9)	65.5 (3.9)
Pt3G	21.6 (1.0)	27.1 (1.3)	39 (1.8)	67.1 (3.1)	171.6 (7.9)
Pn3G	16.5 (1.0)	19.7 (1.2)	25.9 (1.6)	39.8 (2.4)	95.7 (5.8)
Mv3G	23.7 (1.0)	31.7 (1.3)	48.4 (2.0)	81.8 (3.5)	227.2 (9.6)
Среднее:	20.1 (1.0)	24.3 (1.2)	33.3 (1.7)	53.3 (2.7)	132.2 (6.6)

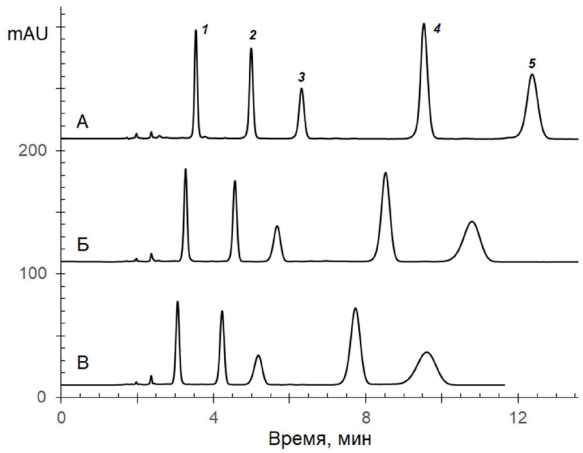

Рис. 3. Разделение 3-глюкозидов пяти антоцианидинов; дельфинидина (*1*), цианидина (*2*), петунидина (*3*), пеонидина (*4*) и мальвидина (*5*) в подвижных фазах системы $CH_3CN – H_3PO_4 – H_2O$ при составах: А – 12:2:86; Б – 12:0.5:87.5; В – 12:0.25:87.75 об. % Колонка: 150×4.6 мм Symmetry™ C18, 3.5 мкм; 40°C; 0.8 мл/мин; 515 нм

Fig. 3. Separation of 3-glucosides of five anthocyanidins, delphinidin (*1*), cyaniding (*2*), petunidine (*3*), peonidin (*4*) and malvidin (*5*), in mobile phases of $CH_3CN–H_3PO_4–H_2O$ system with the composition of 12:2:86 vol. % (A); 12:0.5:87.5 vol. % (Б) and 12:0.25:87.75 vol. % (B) Column: 150×4.6 mm Symmetry™ C18, 3.5 mm; 40 °C; 0.8 ml/min; 515 nm

Анализируя полученные результаты по эффективности хроматографической системы, можно сделать вывод о том, что уменьшение концентрации муравьиной кислоты ниже 6 об. % нежелательно, хотя pH элюента остается довольно низким (около 1.5), выходя за пределы стабильности обычных мономерных С18-фаз.

Зависимость параметров хроматографических пиков от объемной доли ортофосфорной кислоты в подвижной фазе. Замена муравьиной кислоты на ортофосфорную (рис. 3) также приводит к зависимости площади пиков и высоты эквивалентных теоретических тарелок от концентрации кислоты, как показано в табл. 3 и табл. 4. В этом случае снижение концентрации фосфорной кислоты ниже 1 об. % также нежелательно.

Сопоставление зависимости высот эквивалентных теоретических тарелок от объемной доли муравьиной и ортофосфорной кислоты представлено на рис. 4.

Из экспериментальных данных следует, что одинаковые результаты получаются при содержании ортофосфорной кислоты в 5–6 раз меньшем по сравнению с муравьиной кислотой. Следовательно, едкая летучая муравьиная кислота может быть

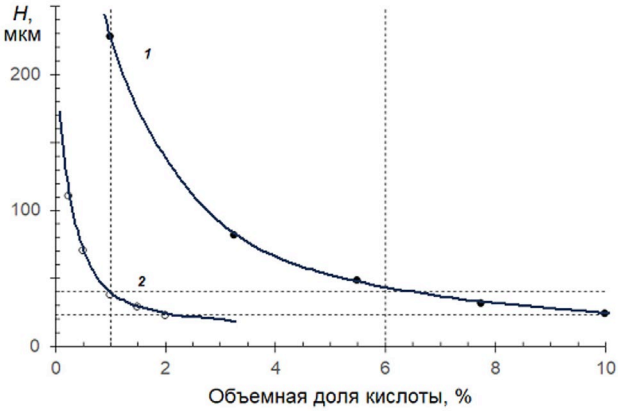

Рис. 4. Сопоставление зависимости высоты эквивалентной теоретической тарелки от объемной доли кислоты в элюентах на основе муравьиной (*1*) и ортофосфорной (*2*) кислот для цианидин-3-глюкозида

Fig. 4. Comparison of dependence of hight of the equivalent theoretical plate on the volume fraction of acid in mobile phases based on formic (*1*) and orthophosphoric (*2*) acids for cyanindin-3-glucoside

заменена ортофосфорной без потери разделяющей способности по отношению к последовательно элюирующимся антоцианам. При этом, как показывает анализ pH водных растворов этих кислот, использование подвижных фаз при pH около 1.5 (при содержании около 1 об. % ортофосфорной кислоты и около 6 об. % муравьиной кислоты) приводит к относительно небольшой потере разделяющей способности, которая может частично быть компенсирована, например, снижением скорости подачи подвижной фазы вдвое.

Таблица 4

Высоты эквивалентных теоретических тарелок (мкм) и их относительное изменение при уменьшении концентрации H_3PO_4 в элюенте

Table 4

Heights of equivalent theoretical plates (μm) and their relative change with decreasing H_3PO_4 concentration in the eluent

Содержание CH_3CN и H_3PO_4 в элюентах, об. %					
CH_3CN	12	12	12	12	12
H_3PO_4	2	1.5	1	0.5	0.25
Высоты теоретических тарелок, мкм, и их относительное изменение*					
Dp3G	33.7 (1.0*)	38.2 (1.1)	43.3 (1.3)	60.1 (1.8)	87.2 (2.6)
Cy3G	21.7 (1.0)	24.0 (1.1)	26.3 (1.2)	32.8 (1.5)	46.2 (2.1)
Pt3G	23.2 (1.0)	27.3 (1.2)	33.5 (1.4)	53.3 (2.3)	88.7 (3.8)
Pn3G	16.6 (1.0)	18.8 (1.1)	22.0 (1.3)	32.3 (1.9)	50.6 (3.0)
Mv3G	22.4 (1.0)	28.9 (1.3)	37.8 (1.7)	70.1 (3.1)	110.2 (4.9)
Среднее:	23.5 (1.0)	27.5 (1.2)	32.6 (1.4)	49.7 (2.1)	76.6 (3.3)

Таблица 3

Относительные площади пиков антоцианов, записанные при 515 нм, для пяти различных составов подвижных фаз системы 12.0 об. % ацетонитрил – H_3PO_4–вода

Table 3

Relative peaks area of anthocyanins recorded at 515 nm for five different compositions of mobile phases of acetonitrile (12.0 vol. %) – H_3PO_4 – water system

Содержание CH_3CN и H_3PO_4 в элюентах, об. %					
CH_3CN	12	12	12	12	12
H_3PO_4	2	1.5	1.0	0.5	0.25
Антоциан	Относительная площадь пиков, %				
Dp3G	100	99.2	98.4	98.5	94.9
Cy3G	100	99.1	98.9	94.7	93.5
Pt3G	100	99.5	98.3	94.1	89.8
Pn3G	100	99.2	98.1	94.5	91.3
Mv3G	100	99.4	96.4	92.2	85.5
Среднее:	100	99.3	98.0	94.8	91.0

Поправочные коэффициенты для площади пиков вследствие заметного уменьшения доли флавилиевой формы могут быть получены кратковременным повышением содержания кислот до 10 об. % или до 1 об. % для муравьиной и ортофосфорной кислот, соответственно, для записи соответствующих хроматограмм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вследствие нестабильности традиционных С18-обращенных фаз при pH < 2 приходится снижать концентрацию кислоты в подвижных фазах, что приводит к дополнительному уширению пиков на хроматограмме и к уменьшению площади пиков, причем в различной степени для 3-глюкозидов различных антоцианидинов. В случае использования муравьиной кислоты хорошие результаты можно получить при её концентрациив подвижной фазе 10 об. %, а при замене кислоты на ортофосфорную - при концентрации 2 об. %. Но при снижении концентрации кислоты до 6 об. % в первом случае и 1 об. % во втором качество хроматограмм остается приемлемым и эффективность системы может быть повышена снижением скорости подачи подвижной фазы, хотя при этом pH подвижной фазы (около 1.5) остается за пределами устойчивости традиционных обращенных фаз.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность сотрудникам Ботанического сада НИУ БелГУ д.б.н. Тохтарю

В.К. и к.б.н. Третьякову М.Ю. за предоставленные листья багрянника канадского.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to express our gratitude to the staff of Botanical Garden of the Belgorod National Research University, Doctor of Biological Sciences V.K. Tokhtar and Cand. of Biological Sciences M.Yu. Tretyakov for providing the leaves of the Cercis canadensis.

Литература

1. Welch C.R., Wu Q., Simon J.E. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization // Curr. Anal. Chem. 2008. V.4. P. 75–101.
2. Andersen Ø.M., Francis G.W. Simultaneous analysis of anthocyanins and anthocyanidins on cellulose thin layers // J. Chromatogr. 1985. V. 318. P. 450-454.
3. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins / M. Schwarz [et al.] // Biochem. Engineer. J. 2003. V. 14. P. 179-189.
4. da Costa C.T., Horton D., Margolis S.A. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis // J. Chromatogr. A. 2000. V. 881. P. 403–410.
5. HPLC-MS(n) Applications in the Analysis of Anthocyanins in Fruits / In “High Performance Liquid Chromatography - Recent Advances and Applications” S. Yuzuak [etal.]; Ed. Nunes O., Sentellas S., Grandos M., Saurina J.: IntechOpen (May 24, 2023).
6. Willemse C.M., Stander M.A., de Villiers A. Hydrophilic interaction chromatographic analysis of anthocyanins // J. Chromatogr. A. 2013. V. 1319. P. 127-140.
7. Гидрофильная хроматография как альтернатива обращенно-фазовой ВЭЖХ для определения антоцианов и бетацианинов / Дейнека В.И. [и др.] // Ж. аналит. химии. 2016. Т. 71. № 3. С. 310-314.
8. Chemical studies of anthocyanins: A review / A. Castaneda-Ovando [et al.] // Food Chem. 2009. V. 113. P. 859–871.
9. Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment / P. Trouillas [et al.] // Chem. Rev. 2016. V. 116. P. 4937−4982.
10. Mónica Giusti M., Wrolstad R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy // Current Protocols in Food Analyt. Chem. 2001. F1.2.1-F1.2.13.
11. ГОСТ 32709-2014. Продукция соковая. Методы определения антоцианинов. М. 2014. 18 с.
12. Lee J., Rennaker C., Wrolstad R.E. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods // Food Chem. 2008. V. 110. P. 782–786.
13. Управление селективностью разделения антоцианов. Замена ацетонитрила на метанол в подвижной фазе / В.И. Дейнека [и др.] // Ж. аналит. химии. 2021. Т. 76. № 8. С. 701–707.
14. Peculiarities of Use of Bentonite Clay at Solid-Phase Purification of Anthocyanins and Flavonoids from Leaves of Plants / A. Doronin [et al.] / Proceedings of the 1st International Symposium Innovations in Life Sciences (ISILS 2019). AdvancesinBiologicalSciencesResearch. 2019. V. 7. P. 90-93.
15. Сохранность и переход между формами антоцианов в растворах / Дейнека Л.А. [и др.] // Успехи современного естествознания, 2016. № 2. С. 16-20.
16. Некоторые закономерности экстракции антоцианов из растительных источников / Я.Ю. Саласина [и др.] // Известия Вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10, № 4. С. 691-699.
17. Дейнека В.И. Блинова И.П. Карты эффективности для сопоставления свойств различных хроматографических систем // Ж. физ. химии, 2023. Т. 97, № 11. С. 1665–1669.

References

1. Welch C.R., Wu Q., Simon J.E. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Curr. Anal. Chem*., 2008, vol. 4, pp. 75–101. doi:10.2174/157341108784587795.
2. Andersen Ø.M., Francis G.W. Simultaneous analysis of anthocyanins and anthocyanidins on cellulose thin layers. *J. Chromatogr.*, 1985, vol. 318, pp. 450-454. doi:10.1016/S0021-9673(01)90714-9.
3. Schwarz M., Hillebrand S., Habben S., Degenhardt A., Winterhalter P. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. *Biochem. Engineer. J.*, 2003, vol. 14, pp. 179-189. doi:10.1016/S1369-703X(02)00219-X.
4. da Costa C.T., Horton D., Margolis S.A. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*., 2000, vol. 881, pp. 403–410. doi:10.1016/S0021-9673(00)00328-9.
5. Yuzuak S., Ma Q., Lu Y., Xie D.-Y. Chapter HPLC-MS(n) Applications in the Analysis of Anthocyanins in Fruits / In “High Performance Liquid Chromatography - Recent Advances and Applications” Ed. Nunes O., Sentellas S., Grandos M., Saurina J.: IntechOpen (May 24, 2023). doi:10.5772/intechopen.110466.
6. Willemse C.M., Stander M.A., de Villiers A. Hydrophilic interaction chromatographic analysis of anthocyanins. *J. Chromatogr.* A., 2013, vol. 1319, pp. 127-140. doi:10.1016/j.chroma.2013.10.045.
7. Deineka V.I., Saenko I.I., Deineka L.A., Blinova I.P. [Hydrophilic Interaction Chromatography as an Alternative to Reversed-Phase HPLC in Determining Anthocyanins and Betacyanins]. *Zh. analit. khimii.* [*J. Anal. Chem.*], 2016, vol. 71, no. 3, pp. 310-314. (in Russian).
8. Castaneda-Ovando A., de Lourdes Pacheco-Hernandez M., Paez-Hernandez E., Rodriguez J.A., Galan-Vidal C.A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.,* 2009. vol. 113, pp. 859–871. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.001.
9. Trouillas P, Sancho-García J.C., De Freitas V., Gierschner J., Otyepka M., Dangles O. Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. *Chem. Rev.*, 2016, vol. 116, pp. 4937−4982. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00507.
10. Mónica Giusti M., Wrolstad R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analyt. Chem.* 2001. F1.2.1-F1.2.13. doi:10.1002/0471142913.faf0102s00.
11. *GOST 32709 - 2014 Produkciya sokovaya. Metody opredeleniya antocianinov*. [*State Standard 32709 – 2014. Juice products. Methods for determination of anthocyanins*]. Moscow, Standartinform Publ., 2014. 18 p. (in Russian).
12. Lee J., Rennaker C., Wrolstad R.E. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chem*., 2008, vol. 110, pp. 782–786. doi:10.1016/j.foodchem.2008.03.010.
13. Deineka V.I., Oleinits E.Yu., Blinova I.P., Deineka L.A [Selectivity Control of the Separation of Anthocyanins: Replacing Acetonitrile for Methanol in the Mobile Phase]. *Zh. analit. khimii.* [*J. Anal. Chem.*], 2021, vol. 76, pp. 939–945. (in Russian).
14. Doronin A., Deineka V., Deineka L., Tretiakov V., Tokhtar V., Chulkov A. Peculiarities of Use of Bentonite Clay at Solid-Phase Purification of Anthocyanins and Flavonoids from Leaves of Plants *Proceedings of the 1st International Symposium Innovations in Life Sciences* (ISILS 2019). *Adv. Biol. Sci. Res.,* 2019, vol. 7, pp. 90-93. doi:10.2991/isils-19.2019.21.
15. Dejneka L.A., Blinova I.P., Kul’chenko Ya.I., Ozer P.S., Saenko I.I., Dejneka V.I. Sohrannost’ i perekhod mezhdu formami antocianov

v rastvorah // Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya, 2016, no 2, pp. 16-20. (In Russian)
16. Salasina Ya.Yu., Kalinikin D.A., Deineka V.I., Deineka L.A. [Some regularities in the process of anthocyanin extraction from vegetable sources]. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* [*Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*]. 2020, vol. 10, pp. 691–699. doi:10.21285/2227-2925-2020-10-4-691-699 (In Russian).
17. Deineka V.I., Blinova I.P. [Efficiency Maps for Comparing the Properties of Different Chromatographic Systems]. *Zh. fiz. khimii* [*J. Phys. Chem.*], 2023, vol. 97, pp. 2577–2581 (in Russian).