

## МУЛЬТИРАЗДЕЛЕНИЕ АНТОЦИАНОВ И АНТОЦИАНИДИНОВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ОДНОВРЕМЕННЫМ ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ПОВЕРХНОСТИ ОТКЛИКА

Бу Ти Транг<sup>1,2</sup>, Ли Хоанг Дук<sup>2</sup>, Нгаен Хай Ти<sup>2</sup>, Ле Ти Хонг Хао<sup>1,2</sup>, Нгаен Сюан Чанг<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный институт контроля пищевой продукции, Вьетнам, Ханой, Фам Тан Дуат, 65

<sup>2</sup>Вьетнамский национальный университет, Вьетнам, Ханой, Ле Тхань Тонг, 19

*Описывается методика, посредством которой было достигнуто разделение антоцианов и антоцианидинов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЖХ). Применены разные экспериментальные процедуры для многомерной оптимизации экспериментальных условий ВЖХ. Для создания математических моделей использованы три независимых фактора, а именно концентрация муравьиной кислоты, соотношение ацетонитрила и скорость потока. Откликом стало выделение четырех пар пиков, наиболее трудных для разделения, включая пеларгонидин-3-глюкозид и дельфинидин, дельфинидин и пеонидин-3-глюкозид, пеонидин-3-глюкозид и мальвидин-3-глюкозид, пеонидин и мальвидин. Вариационный анализ доказал, что выбранная модель наилучшим образом подходила для заданного эксперимента, а применение метода поверхности отклика позволило добиться хороших результатов в улучшении разделения антоцианов и антоцианидинов. Оптимизированные параметры ВЖХ выглядели следующим образом: колонка C<sub>18</sub> (250 мм × 4,6 мм × 5 мкм), мобильная фаза муравьиной кислоты 10 % и ацетонитрил в качестве градиента; скорость потока 0,8 мл/мин. При этих оптимальных условиях было достигнуто разделение соединений с высоким разрешением за период времени менее 30 минут. Достоверность метода была оценена, и результаты соответствовали требованиям АОАС (Ассоциации химиков-аналитиков): линейная область 0,2–10 ppm с R<sup>2</sup> ≥ 0,9955, предел обнаружения 0,05–0,1 мг/кг, относительное стандартное отклонение 4,79–6,45 %, восстановление чистого вещества 85,4–109,6 %. Метод был применен для определения антоцианов и антоцианидинов в образцах некоторых фруктов и овощей с содержанием антоцианидинов 5,74–218,27 мг/100 г. Антоцианы в основном обнаруживаются в кожуре фруктов и овощей; кожура темных бобов содержит антоцианы в наибольшем количестве.*

**Ключевые слова:** антоциан, антоцианидин, метод поверхности отклика, высокоэффективная жидкостная хроматография, антиоксидант, хроматография.

Антоцианы являются самой значимой и самой большой группой растворимых в воде пигментов, именно им многочисленные фрукты и овощи обязаны своей синей, пурпурной, красной или оранжевой кожурой. Антоцианы в своем естественном состоянии являются глюкозидами ядер соответствующих агликонов (антоцианидинов) с долей сахара. Различия между антоцианами вызваны числом гидроксильных групп, сущностью и количеством сахаров, привязанных к молекуле, позицией этих сахаров, а также природой и количеством алифатических или ароматических кислот, привязанных к сахарам [1]. Как известно, в растительных источниках всего было обнаружено более 600 различных антоцианов [2]. Большинство из них сформировано на основе шести наиболее распространенных антоцианидинов, вклю-

чая цианидин (Cya), дельфинидин (Del), петунидин (Petu), пеларгонидин (Pelar), мальвидин (Mal) и пеонидин (Peo) [3]. Антоцианы редко встречаются в природе в свободном состоянии (когда они не прошли процесс гликозилирования), потому что недостаток электронов в катионном флавилии приводит к большой реактивности данных соединений, вследствие чего молекула является нестабильной. Считается, что сахар в качестве скрепляющего соединения важен для стабильности пигмента. Подобные вещества встречаются, как правило, в виде 3-моноголюкозидов, 3,5-диглюкозидов или 3,7-диглюкозидов [4].

Антоцианы обладают определенными потенциальными антиокислительными свойствами, а также являются полезными для здоровья. Благодаря

© Бу Ти Транг, Ли Хоанг Дук, Нгаен Хай Ти, Ле Ти Хонг Хао, Нгаен Сюан Чанг, 2019

**Бу Ти Транг** – кандидат наук, заведующий лабораторией контроля качества пищевых продуктов и пищевых добавок (e-mail: trang2103@gmail.com; тел.: +8 (491) 614-91-06; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0924-6376>).

**Ли Хоанг Дук** – студент (e-mail: duclhd2909@gmail.com; тел.: +8 (497) 355-23-66).

**Нгаен Хай Ти** – студент (e-mail: nguyenhoaitu2596@gmail.com; тел.: +8 (435) 967-31-39).

**Ли Ти Хонг Хао** – кандидат наук, генеральный директор (e-mail: lethihonghao@yahoo.com; тел.: +8 (490) 424-81-67; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3570-8570>).

**Нгаен Сюан Чанг** – кандидат наук, преподаватель (e-mail: trungnx2004@gmail.com; тел.: +8 (490) 430-35-13).

полезным свойствам и растущей популярности, антоцианы и антоцианидины постепенно вытесняют искусственные пищевые красители.

Дневное потребление антоцианов в пищевом рационе жителей США оценивается примерно в 180–215 мг, в то время как потребление других пищевых флавоноидов, таких как генистеин, кверцетин, или андапигенин, не превышает 20–25 мг в день<sup>-1</sup> [5]. Антоцианы, предположительно, действуют как антиоксиданты путем выделения атомов кислорода для образования свободных радикалов с высокой реактивностью [6].

Существует несколько методов, применяющихся для определения антоцианов или антоцианидинов: среди них можно назвать УФ-ВИД [7], ВЖХ [8–10], ЖХ-МС [11–14] или капиллярный электрофорез [15, 16]. Однако во всех опубликованных работах речь обычно идет об определении общего количества антоцианов или антоцианидинов. Как выяснили исследователи, одновременное определение глюкозидов антоциана и агликонов антоцианидина затруднено вследствие различных полярностей, которыми обладают группа глюкозида антоциана и группа агликона антоцианидина [17]. Поэтому в данном исследовании основной задачей было добиться мультиразделения 12 антоцианов и антоцианидинов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением метода поверхности отклика.

**Описание эксперимента. Материалы и реагенты.** Стандартные антоцианидины, включая хлорид дельфидина, хлорид цианидина, хлорид пеларгонидина, хлорид пеонидина и хлорид мальвидина, были приобретены у компании Sigma-Aldrich. Хлорид петунидина был приобретен у компании Chromadex. Стандартные антоцианы, включая пеларгонидин-3-глюкозид (Pelar-3-G), цианидин-3-глюкозид (Cya-3-G), пеонидин-3-глюкозид (Peo-3-G) и мальвидин-3-глюкозид (Mal-3-G), были приобретены у компании Sigma-Aldrich; дельфинидин-3-глюкозид (Del-3-G) и петунидин-3-глюкозид (Petu-3-G) – у компании Chromadex. Все остальные реагенты и химикаты были приобретены у компании Merck, и их качество соответствовало требованиям, предъявляемым к реагентам и химикатам для аналитического использования при ВЖХ.

Овощи и фрукты для анализа (красное яблоко, красный картофель, черный виноград, темные бобы и т.д.) были случайным образом приобретены на рынках и супермаркетах города Ханой (Вьетнам) и проанализированы с помощью оптимизированного метода.

**Оборудование и процедуры.** Все эксперименты проводились на жидкостном хроматографе Shimadzu LC 20AD series, оснащенном вакуумным дегазатором, бинарным насосом, автоматическим пробоотборником, колонной печью и матричным фотодиодным детектором. Инструментальный контроль, получение и анализ данных осуществлялись с помощью программного обеспечения LC Solution.

Разделение осуществлялось на колонке Sun Fire C<sub>18</sub> с размерами 250 мм×4,6 мм×5 мкм с защитной колонкой. Объем впрыскивания равнялся 20 мкл с фотодиодной детекцией при 520 нм. В качестве элюирующих растворителей использовались муравьиная кислота для воды и ацетонитрил – для специфических соединений.

Гомогенизированный образец взвешивался, а затем помещался в термоустойчивую колбу. Затем в колбу добавляли 30 мл метанола. Экстракция раствора происходила в течение 30 минут при 100 °С. После охлаждения экстракт разбавляли и фильтровали при помощи 0,45-миллиметровой мембраны. И, наконец, полученный раствор анализировали при помощи ВЖХ с матричным фотодиодным детектором на предмет наличия в нем антоцианов.

Для определения антоцианидинов применялась следующая процедура: к экстракту антоциана добавлялась концентрированная соляная кислота, пока ее концентрация не достигала 2,4 М, после чего раствор нагревался на водной бане при температуре 90 °С в течение 60 минут. Затем раствор охлаждали до комнатной температуры, разбавляли метанолом, фильтровали и анализировали при помощи ВЖХ с матричным фотодиодным детектором на предмет наличия в нем антоцианидинов.

**Анализ данных.** Данные анализировались при помощи статистического программного обеспечения Design-Expert Version 10.0.7 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, США). Факторная значимость рассчитывалась при помощи вариационного анализа (ANOVA), с ее оценкой и сведением к эффектам взаимодействия первого порядка. Для всех расчетов предполагалось, что эффекты взаимодействия более высокого порядка не вносили существенный вклад в поведение выбранной статистической модели, поскольку шансы на возникновение подобных эффектов были ничтожно малы.

**Валидация метода.** Эффективность оптимизированного метода была подтверждена следующими параметрами: линейностью и диапазоном, точностью, аккуратностью, пределом обнаружения и количественным определением. Результаты верифицированы в соответствии с жесткими требованиями, предъявляемыми к подобным процедурам Ассоциаций химиков-аналитиков (АОАС).

**Результаты и их обсуждение.** Выбор аналитических параметров ВЖХ. По причине разных полярностей антоцианов и антоцианидинов в качестве разделительной колонки была выбрана неполярная C<sub>18</sub>. Как известно, антоцианидины и антоцианы можно элюировать ацетонитрилом или кислотой, например, муравьиной в концентрации 0,05–10 %, трехфтористой уксусной кислотой в концентрации 0,05–0,1 %, ортофосфорной кислотой – 0,3–4,0 % или соляной кислотой – 5 mM [18–23]. В особенности муравьиная и трехфтористая уксусная кислоты широко использовались в данном процессе, потому что органические кислоты усиливают

сигнал, и их следует добавлять в воду в качестве элюента. Использование неорганических кислот, таких как соляная или ортофосфорная, в высоких концентрациях могло оказать определенное влияние на функционирование хроматографической колонки. Поэтому в данном исследовании для разделения антоцианидинов и антоцианов использовались именно муравьиная и трехфтористая уксусная кислоты.

Предварительные эксперименты показали, что использование трехфтористой уксусной кислоты приводило к появлению резких, симметричных, но частично накладывающихся друг на друга пиков, в то время как 0,1%-ная муравьиная кислота полностью разделяла эти пики. Однако, так как муравьиная кислота слабее трехфтористой уксусной кислоты, можно было увеличить ее концентрацию для достижения более высокой чувствительности (получить более четкий пик). Поэтому для оптимизации разделения была выбрана именно муравьиная кислота.

Антоцианидины и антоцианы из-за своей разной полярности по-разному взаимодействуют со стационарными фазами. В процессе элюирования в изократном режиме они могут быть полностью отделены друг от друга, но анализ, вполне вероятно, может длиться примерно 50–60 минут, а сигнал может оказаться очень слабым. Поэтому необходимо изменить соотношение состава мобильной фазы и градиентной программы.

Помимо этого, скорость потока может оказывать значительное влияние на мощность элюирования, количество потребленного растворителя и продолжительность анализа. Для колонки  $C_{18}$  (250 мм × 4,6 мм × 5 мкм) была выбрана скорость потока, равная 0,6–1,0 мл/мин<sup>-1</sup>.

Затем проведена серия исследований для того, чтобы выяснить, при каких условиях разрешение четырех пар пиков (Pelar-3-G and Del, Del and Peo-3-G, Peo-3-G and Mal-3G, Peo и Mal) было выше 2 для достоверного определения веществ.

*Оптимизация аналитических факторов методом поверхности отклика.* Метод поверхности отклика – это набор математических и статистических инструментов для построения эмпирических моделей. Тщательное построение экспериментальных процедур призвано оптимизировать отклик (выходная переменная), на которую оказывают влияние несколько независимых переменных (входные переменные). Эксперимент проводится в виде серии тестов, в каждом из которых во входные переменные вносятся некоторые изменения с целью определить, какие причины вызывают изменения в выходной переменной.

Для того чтобы одновременно определить 12 антоцианов и антоцианидинов было совершенно необходимо достичь надлежащего их разделения. Следовательно, необходимо найти такое условие, при котором пики были бы абсолютно разделены, что означало, что разрешение пиков должно было быть достаточно высоким (больше 2). Был исполь-

зован квадратичный центральный композиционный план с тремя независимыми факторами, включая концентрацию муравьиной кислоты в мобильной фазе ( $X_1$ ), начальную долю ацетонитрила в градиенте ( $X_2$ ), и скорость потока ( $X_3$ ). Откликами стали разрешения пиков, которые обычно невелики. Согласно нашим предварительным результатам, были выбраны следующие четыре отклика: разрешение между Pelar-3-G и Del ( $Y_1$ ), Del и Peo-3-G ( $Y_2$ ), Peo-3-G и Mal-3-G ( $Y_3$ ), Peo и Mal ( $Y_4$ ).

Количество экспериментов, проведенных над квадратичной центральной композиционной матрицей, было подсчитано по следующей формуле:

$$N = N_0 + N^* + N_c,$$

где  $N^*$  – количество экспериментов в точке \*,  $N^* = 2n$ ;  $N_c$  – количество экспериментов в центральной точке,  $N_0 > 1$ ;  $N_0$  – количество экспериментов в начальной точке,  $N_0 = 2^{n-q}$  ( $n$  – количество факторов,  $q$  – количество приведенных коэффициентов).

Для  $n = 3, q = 0$  мы получили:  $N^* = 6; N_0 = 8; N_c = 6$ .

Таким образом, всего проведено 20 экспериментов ( $n = 20$ ) с 6 повторяющимися экспериментами в контрольной точке и на расстоянии от первоначальной точки до точки \*, равном  $d = 2^{(n-q)/4} = 1,682$ .

С помощью программного обеспечения Design Expert оценен квадратичный отклик с тремя факторами; результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1

Базовые уровни трех факторов с их кодами

Фактор	Уровень		
	-1	0	+1
$X_1$ (концентрация муравьиной кислоты, % v/v)	5	10	15
$X_2$ (начальная доля ацетонитрила, %)	1	6,5	12
$X_3$ (скорость потока, мл/мин <sup>-1</sup> )	0,6	0,8	1,0

Матрицы плана и соответствующие значения разрешений приведены в табл. 2. Все эксперименты выполнялись в случайном порядке с целью минимизации эффектов неконтролируемых переменных, которые могут привести к снижению точности измерений.

Приняв за аксиому подходящую полную квадратичную модель, описанную уравнением (1), мы получили математические модели для каждого отклика ( $Y_i$ ) в виде закодированных факторов после определения соответствия уравнению (1) по наименьшей квадратной регрессии (табл. 3).

$$Y_i = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq k} b_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2, \quad (1)$$

где  $k$  – количество факторов (переменных);  $b_0$  – параметр пересечения;  $b_i, b_{ij}$  и  $b_{ii}$  – параметры регрессии для линейных эффектов, эффектов взаимодействия и квадратичных эффектов каждого фактора  $x_i$  соответственно.

Таблица 2

Экспериментальные матрицы плана закодированных переменных и изученных откликов

Ст. номер	Номер теста в серии	Закодированная переменная			Отклик			
		$X_1$	$X_2$	$X_3$	$Y_1$	$Y_2$	$Y_3$	$Y_4$
19	1	10	6,5	0,8	2,641	3,483	2,344	2,696
3	2	5,0	12	0,6	5,044	0,468	4,525	2,394
15	3	10	6,5	0,8	2,637	3,609	2,381	2,717
4	4	15	12	0,6	1,838	1,566	3,206	3,415
9	5	1,6	6,5	0,8	1,589	0,729	3,227	1,601
1	6	5,0	1,0	0,6	1,229	0,000	0,548	0,140
8	7	15	12	1,0	2,271	2,272	2,988	3,122
10	8	18,4	6,5	0,8	0,685	3,040	3,345	3,549
7	9	5,0	12	1,0	4,479	0,611	3,522	2,579
20	10	10	6,5	0,8	2,641	3,483	2,344	2,696
6	11	15	1,0	1,0	1,527	3,010	2,593	3,438
11	12	10	0,0	0,8	1,250	0,832	0,717	2,495
14	13	10	6,5	1,1	2,663	3,500	2,143	2,405
12	14	10	15,7	0,8	4,560	0,000	3,878	3,639
13	15	10	6,5	0,5	2,669	1,271	1,817	0,943
5	16	5,0	1,0	1,0	0,000	1,673	0,997	1,932
16	17	10	6,5	0,8	2,630	3,438	2,325	2,717
18	18	10	6,5	0,8	2,639	3,430	2,326	2,695
2	19	15	1,0	0,6	1,436	0,877	1,382	2,427
17	20	10	6,5	0,8	2,625	3,462	2,338	2,713

Таблица 3

Уточненные уравнения регрессии и статистические параметры для изученных откликов

Отклик	Уравнение регрессии <sup>a</sup>	К.В. (%) <sup>b</sup>	Уточненный $R^2$	Прогнозируемый $R^2$	Адекватная точность
$Y_1^c$	$Y_1 = 2,72 - 0,38X_1 + 1,10X_2 - 0,094X_3 - 0,89X_1X_2 + 0,29X_1X_3 - 0,54X_1^2$	9,22	0,9707	0,9286	37,040
$Y_2$	$Y_2 = 3,49 + 0,65X_1 - 0,15X_2 + 0,62X_3 + 0,13X_1X_3 - 0,37X_2X_3 - 0,59X_1^2 - 1,11X_2^2 - 0,42X_3^2$	7,35	0,9878	0,9628	34,651
$Y_3^c$	$Y_3 = 2,32 + 0,057X_1 + 1,03X_2 + 0,072X_3 - 0,54X_1X_2 + 0,19X_1X_3 - 0,36X_2X_3 + 0,32X_1^2 - 0,14X_3^2$	4,12	0,9904	0,9705	57,652
$Y_4$	$Y_4 = 2,67 + 0,63X_1 + 0,40X_2 + 0,38X_3 - 0,28X_1X_2 - 0,16X_1X_3 - 0,36X_2X_3 + 0,13X_2^2 - 0,36X_3^2$	4,44	0,9830	0,9433	46,720

Примечание: <sup>a</sup> – получены путем обратного исключения условий, не являющихся значимыми ( $P > 0,05$ ), из полных моделей; <sup>b</sup> – коэффициент вариации; <sup>c</sup> – не являющиеся значимыми условия  $X_3$  (в  $Y_1$ ),  $X_1$  (в  $Y_3$ ) были включены в уравнение с целью поддержания иерархии модели.

Существует несколько потенциальных проблем, связанных с предполагаемой нормальностью модели, неравной дисперсией ошибок при обработке или блокировании и взаимодействием между обработкой и блокированием; следовательно, необходимо проверить адекватность предполагаемой модели. В данном исследовании проверка адекватности конечных уточненных моделей осуществлялась путем применения такого статистического инструмента, как адекватная точность и нормальный график распределения вероятностей для остатков. «Адекватная точность» определяет соотношение сигнала и помех. Желательным является соотношение выше 4. Соотношения 37,040, 34,651, 57,652, и 46,720 говорят о том, что сигналы вполне адекватны. Эта модель может использоваться для передвижения в плановом пространстве. Помимо этого, подобран-

ная модель обычно оценивается при помощи коэффициента детерминации  $R^2$ . Эта статистическая величина вызывает некоторые опасения, так как она всегда возрастает, когда в модель добавляются новые условия, даже если они не являются значимыми. Поэтому она обычно является более низкой для уточненной модели, чем для соответствующей ей полной модели. Для того чтобы преодолеть недостатки, связанные с применением  $R^2$ , обычно используются уточненные коэффициенты  $R^2$ . Следовательно, для получения более простой, но вместе с тем более точной модели из персональной модели были удалены условия, не являющиеся значимыми ( $p > 0,05$ ). Хотя основной эффект  $X_3$  не являлся значимым условием для моделей, соответствующих  $Y_1$ , а  $X_1$  не являлся значимым условием для моделей, соответствующих  $Y_3$ , они были включены в оконча-

тельные уравнения с целью соблюдения иерархии моделей. Помимо этого, значения оказались внутри разумного диапазона, с прогнозируемым коэффициентом  $R^2$  и в пределах приемлемого значения  $R^2 \geq 0,80$ , что означает, что полученные данные вполне соответствовали полиномиальным уравнениям второго порядка. Значения модели  $F$  указывали на то, что все четыре модели являются значимыми. Шанс того, что настолько большое значение  $F$  могло быть получено вследствие помех, равнялся 0,01%. Значения, полученные для коэффициента вариации (К.В.) в процентах (измеряют воспроизводимость модели), были менее 10% (от 4,12 до 9,22%).

Как можно видеть из табл. 3 и рис. 1, факторы оказывали очень разные эффекты на отклики. Концентрация муравьиной кислоты и скорость потока имели положительный эффект на отклики  $Y_2, Y_3, Y_4$ , и отрицательный эффект – на отклик  $Y_1$ . Концентрация ацетонитрила оказывала положительный эффект на отклики  $Y_1, Y_3, Y_4$ , и отрицательный – на отклик

$Y_2$ . Для разрешения  $Y_1$  (pelar-3-G и Del), разрешения  $Y_3$  (Peo-3-G и Mal-3-G) условие  $X_2$  производило наиболее значимый эффект на разделение. Эти разрешения были увеличены  $X_2$ . Взаимодействие между муравьиной кислотой и ацетонитрилом увеличивало разрешения, в то время как взаимодействие между ацетонитрилом и скоростью потока уменьшало их. Почти квадратичные условия производили негативные эффекты. Скорость потока оказывала менее значительный эффект на отклики, чем два других фактора, возможно, из-за ограниченного рабочего диапазона.

На рис. 1, б изображен эффект от концентрации муравьиной кислоты и скорости потока в разрешении Peo и Mal при сохранении доли ацетонитрила 6,5%. Как можно увидеть, увеличение как концентрации муравьиной кислоты, так и скорости потока привело к постепенному увеличению разрешения. Это может быть объяснено тем, что антоцианы и антоцианидины являются стабильными

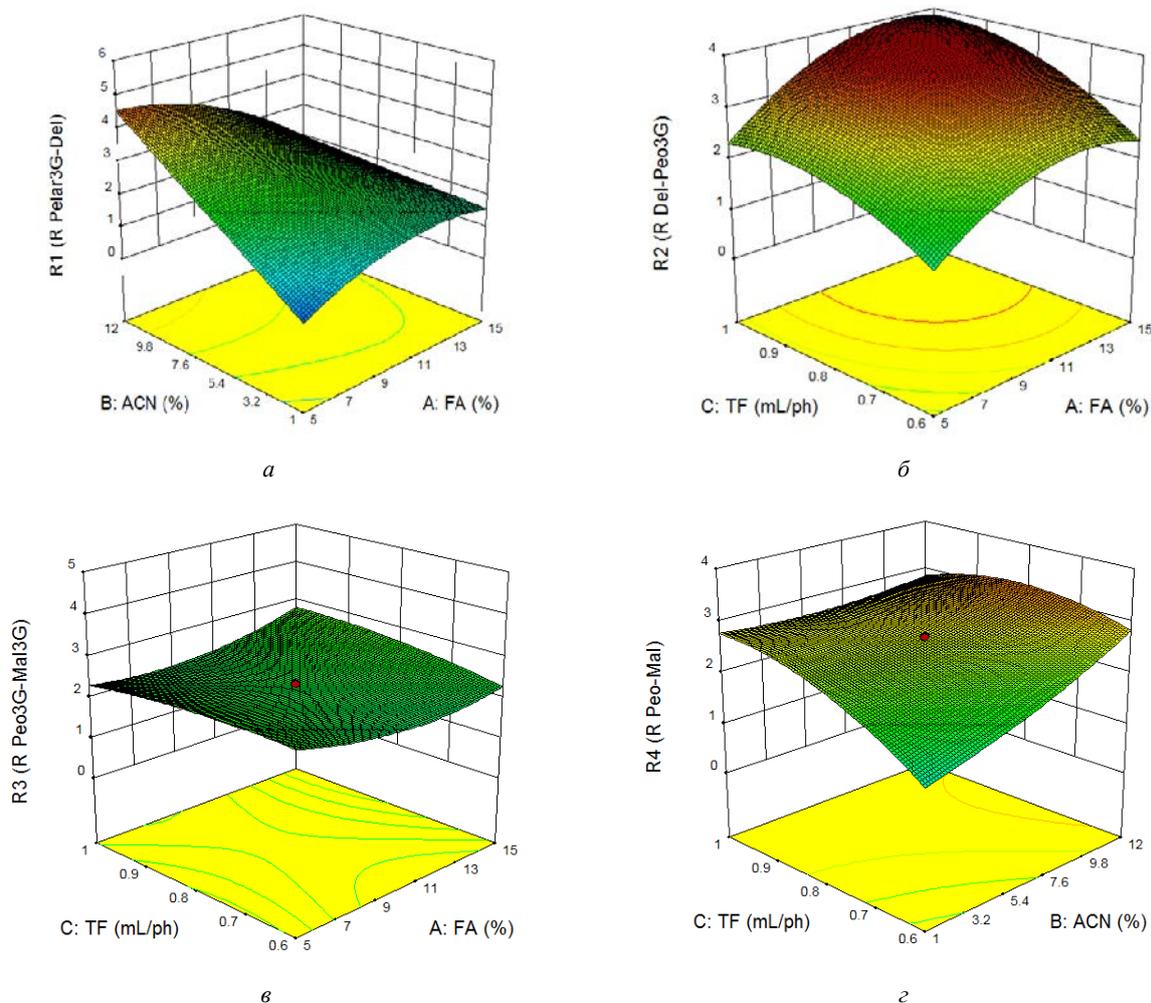


Рис. 1. Участки поверхностей отклика с отображением откликов: а – разрешение Pelar-3-G и Del как функция доли ацетонитрила и концентрации муравьиной кислоты; б – разрешение Del и Peo-3-G как функция скорости потока и концентрации муравьиной кислоты; в – разрешение Peo-3-G и Mal-3-G как функция скорости потока и концентрации муравьиной кислоты; г – разрешение Peo и Mal функция скорости потока и доли ацетонитрила

Настройки для оптимизации индивидуальных факторов и откликов с учетом многочисленных критериев

Фактор/ Отклик	Цель	Нижний предел	Верхний предел	Важность
$X_1$	В диапазоне	5	10	3
$X_2$	В диапазоне	1	12	3
$X_3$	Цель = 1	0,6	1	3
$Y_1$	Максимум	0	5,044	2
$Y_2$	Максимум	0	3,609	5
$Y_3$	Максимум	0	4,525	5
$Y_4$	Максимум	0	3,639	4

при  $pH < 3$ . Более высокая концентрация кислоты и более низкий уровень  $pH$  могут увеличить долю катиона флавилия, область пика и разрешение. Однако органические кислоты могут увеличить полярность мобильной фазы, что в результате приведет к меньшей мощности элюирования и, следовательно, к более длительному периоду удержания. Последующее сокращение периода удержания могло быть вызвано конкурирующим взаимодействием между молекулами муравьиной кислоты и полярными группами антоцианов для группы силанола на алкилированной силикатной поверхности при добавлении дополнительного объема органической кислоты.

При анализе простого отклика в плановом регионе определяются области, где процесс вероятнее всего даст желаемые результаты. Многие из проблем, связанных с методом поверхности отклика, приводят к тому, что анализировать приходится несколько откликов. Между тем одновременное рассмотрение многих откликов приводит к необходимости построить подходящую модель поверхности отклика для каждого отклика и определить такой набор рабочих условий, который в определенном смысле оптимизирует все отклики или, по крайней мере, сохраняет их в желаемом диапазоне. Настройки для оптимизации индивидуальных факторов и откликов с учетом многочисленных критериев приведены в табл. 4.

Применение этой стратегии в функции общей желательности позволило объединить цели, и полная желательность для оптимального решения была определена на уровне 0,748. С учетом вышеописанных условий и ограничений были получены следующие оптимальные расчетные параметры: концентрация муравьиной кислоты 10 %, доля ацетонитрила 10 % и скорость потока 0,80 мл/мин<sup>-1</sup>.

Оптимизированные параметры ВЖХ были следующими: колонка  $C_{18}$  Sun Fire компании Waters (250 мм × 4,6 мм × 5 мкм), мобильная фаза FA 10 % и ацетонитрила с градиентом: начиная с 10 % рост доли ацетонитрила 10–12 % за 0–10 минут, ацетонитрил на уровне 12 % в период 8,01–10,0 минуты, ацетонитрил постоянно на уровне 19 % в период 10,01–21,0 минуты, постоянно на 10 % в период 21,01–25,0 минуты, постоянно на уровне 10,5 % для последующего анализа; скорость потока: 0,8 мл/мин<sup>-1</sup>. На рис. 2 изображена хроматограмма мультиразделения антоцианов и антоцианидинов с высокими разрешениями.

Порядок элюирования был следующим: (1) Del-3-G, (2) Cyu-3-G, (3) Petu-3-G, (4) Pelar-3-G, (5) Del, (6) Peo-3-G, (7) Mal-3-G, (8) Cyu, (9) Petu, (10) Pelar, (11) Peo, (12) Mal.

*Валидация метода.* Калибровочная кривая антоцианов и антоцианидинов была установлена в диапазоне концентраций 0,2–10 мг/л с коэффициентом корреляции  $> 0,9955$ . Предел обнаружения определяли постепенным добавлением небольших количеств стандартного раствора в пустые образцы

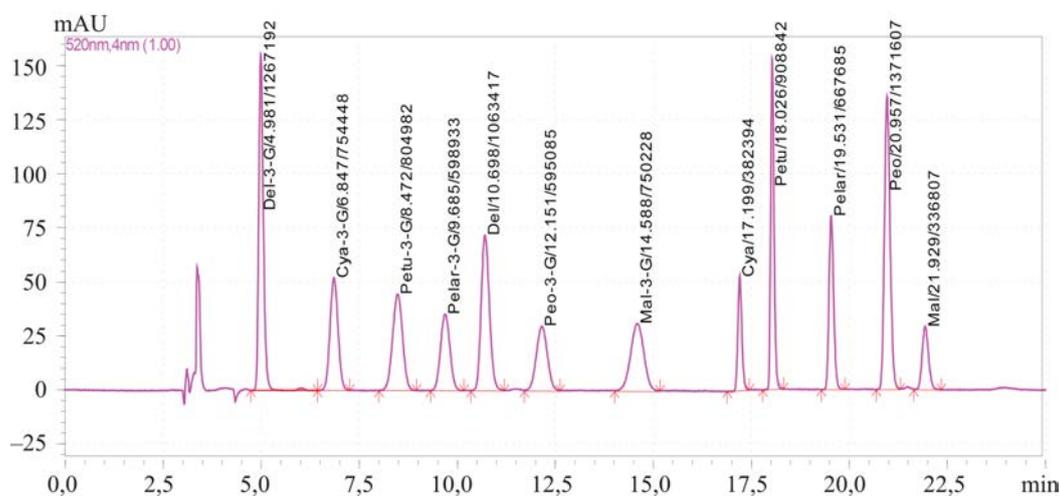


Рис. 2. Хроматограмма двенадцати антоцианов и антоцианидинов, полученная при оптимизированных условиях

Таблица 5

Содержание антоцианов в продаваемых продуктах

Образец	Содержание (мг/100 г)			
	Cya-3-G	Pelar-3-G	Peo-3-G	Mal-3-G
Слива				
Красный картофель	1,57	–	–	–
Темные бобы (кожура)	–	1,05	–	–
Красное яблоко (кожура)	18,67	–	8,28	19,30
Чеснок (кожура)	11,23	–	–	–
Баклажан (кожура)	8,4	–	–	–
Яблоко (кожура)	–	–	–	–
Красные бобы	27,17	–	–	–
Виноград (кожура)	1,76	7,40	–	–

до тех пор, пока сигнал не достигал 3. Результаты показали, что ВЖХ с применением матричного фотодиодного детектора обеспечивала достаточную чувствительность для определения антоцианов и антоцианидинов с пределом обнаружения 0,05–0,1 мг/кг. Точность оценивали при помощи шести повторов тестов на некоторых матрицах образцов. Относительное стандартное отклонение колебалось в пределах 1,91–6,45 %. Восстановление определяли путем добавления стандартных растворов в образцы сливы, сладкого картофеля при трех разных концентрациях. Тесты выполнялись в сериях по три повтора на каждую добавленную концентрацию. Были достигнуты уровни восстановления чистого образца в пределах между 85,4 и 109,6 %. Метод удовлетворял требованиям к восстановлению концентрации соответствующего аналита, установленным Ассоциацией химиков-аналитиков (АОАС).

*Анализ продуктов, продаваемых на рынке.* Образцы были случайным образом приобретены на рынках и в супермаркетах г. Ханой, Вьетнам. После гомогенизации образцы были проанализированы в соответствии с вышеописанной процедурой.

После экстракции некоторые антоцианы трансформировались в антоцианидины. Содержание антоцианидинов до и после гидролиза некоторых фруктов приведено в табл. 5 и показано на рис. 3.

Соответственно, содержание антоцианидинов было значительно выше, чем содержание антоциана-3-глюкозида, но в образцах были и другие типы антоцианов, исключая антоцианы-3-глюкозид. Среди них во фруктах и овощах наиболее часто встречался цианидин-3-глюкозид, другие же антоцианы были обнаружены в меньших количествах. Помимо этого, цианидин был и самым распространенным

антоцианидином, который обнаруживался почти во всех образцах; за ним следовал дельфинидин.

В кожуре темных бобов содержалось наиболее разнообразное количество антоцианидинов, включая шесть наиболее распространенных; также наиболее высоким было их общее содержание, которое превышало 600 мг в 100 г образца. Содержание антоцианидинов также было высоким в кожуре винограда, более 450 мг на 100 г, основным из них был мальвидин. В образцах сливы, кожуры красного яблока, кожуры яблока и чеснока был обнаружен только цианидин. В красном картофеле и баклажанах были обнаружены только пеларгонидин и дельфинидин соответственно.

**Выводы.** Основной целью данного исследования было обнаружение оптимальных условий ВЖХ для одновременного разделения 12 антоцианов и антоцианидинов посредством серии экспериментов, проведенных согласно определенной процедуре. Доказано, что математические модели, разработанные для соотношения разрешений и состава мобильной фазы, являются эффективной стратегией для оптимизации хроматографического метода. В рамках моделей обнаружено значительное совпадение между прогнозируемыми и наблюдаемыми данными, это означает, что данный метод подходит для анализа соединений. Метод позволяет одновременно определять антоцианы и антоцианидины в образцах овощей и фруктов за короткий период времени с высокой селективностью и чувствительностью. Процедура проста в применении и не требует значительных затрат, ее стоимость вполне разумна.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

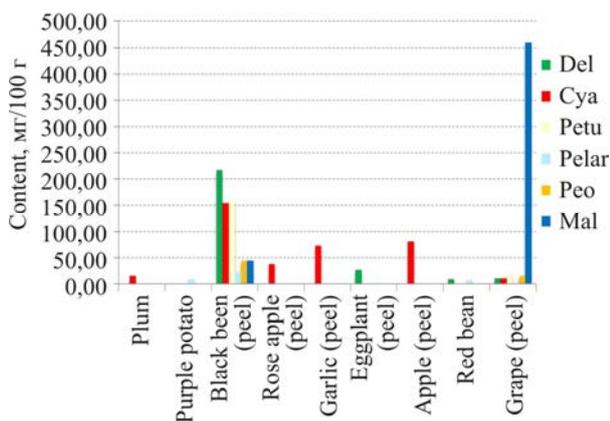


Рис. 3. Содержание антоцианидинов в продаваемых продуктах

### Список литературы

- Bordonaba J.G., Crespo P., Terry L.A. A new acetonitrile-free mobile phase for HPLC-DAD determination of individual anthocyanins in blackcurrant and strawberry fruits: A comparison and validation study // Food Chemistry. – 2011. – № 129. – P. 1265–1273. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.09.114
- Deineka V.I., Deineka L.A., Saenko I.I. Regularities of Anthocyanins Retention in RP HPLC for «Water–Acetonitrile–Phosphoric Acid Mobile» Phases // Journal of Analytical Methods in Chemistry. – 2015. – Vol. 1. – P. 6. DOI: 10.1155/2015/732918

3. Chemical studies of anthocyanins: A review / A. Castañeda-Ovando, L. Pacheco-Hernández, E. Paez, J.A. Rodríguez, C.A. Galan-Vidal // *Food Chemistry*. – 2009. – № 113. – P. 859–871. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.001
4. Separation of some anthocyanidins, anthocyanins, proanthocyanidins and related substances by reversed phase high performance liquid chromatography / K.V. Castele [et al.] // *Journal of chromatography*. – 1983. – № 259. – P. 291–300.
5. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands / M.G. Hertog, P.C. Hollman, M.B. Katan, D. Kromhout // *Nutr. Cancer*. – 1993. – № 20. – P. 21–29. DOI: 10.1080/01635589309514267
6. Catherine A.R., Nicholas J.M., George P. Structure-antioxidants activity relationships of flavonoids and phenolic acids // *Free Radical Biology & Medicine*. – 1996. – № 20. – P. 933–956. DOI: 10.1016/0891-5849(95)02227-9
7. Lee J., Wrolstad R.E., Durst R. AOAC Official Method 2005.02 Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines pH Differential Method // *Official Methods of Analysis of AOAC International*. – 2005. – Chapter 37. – P. 37–39.
8. Evaluation of processing effects on anthocyanin content and colour modifications of blueberry (*Vaccinium* spp.) extracts: Comparison between HPLC-DAD and CIELAB analyses / S. Cesa, S. Carradori, G. Bellagamba, M. Locatelli, M. Antonietta Casadei, A. Masci, P. Paolicelli // *Food Chemistry*. – 2017. – № 232. – P. 114–123. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.03.153
9. Fibigr J., Satínský D., Solich P. A UHPLC method for the rapid separation and quantification of anthocyanins in acai berry and dry blueberry extracts // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2017. – № 143. – P. 204–213. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.05.045
10. Development and validation of a liquid chromatography method for anthocyanins in strawberry (*Fragaria* spp.) and complementary studies on stability, kinetics and antioxidant power / G.A.B. Canuto, D.R. Oliveira, L.S.M. Da Conceição, J.P.S. Farah, M.F.M. Tavare // *Food Chemistry*. – 2016. – № 192. – P. 566–574. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.06.095
11. Polyphenols, anthocyanins, and flavonoids contents and the antioxidant capacity of various cultivars of highbush and half-high blueberries / D. Li, B. Li, Y. Ma, X. Sun, Y. Lin, X. Meng // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2017. – № 62. – P. 84–93. DOI: 10.1016/j.jfca.2017.03.006
12. Extraction, separation and identification of anthocyanins from red wine by-product and their biological activities / E.D. Trikas, M. Melidou, R.M. Papi, G.A. Zachariadis, D.A. Kyriakidis // *Journal of functional food*. – 2016. – № 25. – P. 548–558.
13. Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS / Zh. Huang, B. Wang, P. Williams, R.D. Pace // *Food Science and Technology*. – 2009. – № 42. – P. 819–824. DOI: 10.1016/j.lwt.2008.11.005
14. Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC-DAD-ESI-MS/MS / A. Ruiz, I. Hermosin-Gutiérrez, C. Vergara, D. Von Baer, M. Zapata, A. Hirschfeld, L. Obando, C. Mardones // *Food Research International*. – 2013. – № 51. – P. 706–713. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.01.043
15. Bridle P., Garcia-Viguera C., Tomas-Barberan F.A. Analysis of Anthocyanins by Capillary Zone Electrophoresis // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. – 1996. – Vol. 19, № 4. – P. 537–545. DOI: 10.1080/10826079608005518
16. CZE separation of strawberry anthocyanins with axitic buffer and comparison with HPLC / M.F. Caboni, P. Comandini, B. Giampaolo, A. Cardinali, L. Cerretani // *Journal of separation of science*. – 2008. – № 31. – P. 3257–3264. DOI: 10.1002/jssc.200800199
17. Rapid method for determination of anthocyanin glucosides and free delphinidin in grapes using u-HPLC / Y. Shim, S. Kim, D. Seo, H. Park, J. Ha // *Journal of Chromatographic Science*. – 2014. – № 52. – P. 629–635. DOI: 10.1093/chromsci/bmt091
18. Gao L., Mazza G. Rapid Method for Complete Chemical Characterization of Simple and Acylated Anthocyanins by High-Performance Liquid Chromatography and Capillary Gas-Liquid Chromatography // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – № 42. – P. 118–125. DOI: 10.1021/jf00037a020
19. Optimisation of aqueous two-phase extraction of anthocyanins from purple sweet potatoes by response surface methodology / X. Liu, T. Mu, H. Sun, M. Zhang, J. Chen // *Food Chemistry*. – 2013. – № 141. – P. 3034–3041. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.05.119
20. Nyman N.A., Kumpulainen J.T. Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2001. – № 49. – P. 4183–4187. DOI: 10.1021/jf010572i
21. Deividas B., Ivanauskas L., Dirse V. Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits // *Meditsina (Kaunas, Lithuania)*. – 2007. – Vol. 43, № 12. – P. 971–977.
22. Welch C., Wu Q., Simon J. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization // *Current Analytical Chemistry*. – 2008. – Vol. 4, № 2. – P. 75–101. DOI: 10.2174/157341108784587795
23. Zhang Zh., Kou X., Fugal K. Comparison of HPLC Methods for Determination of Anthocyanins and Anthocyanidins in Bilberry Extracts // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2004. – № 52. – P. 688–691. DOI: 10.1021/jf034596w

*Мультиразделение антоцианов и антоцианидинов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с одновременным применением метода поверхности отклика / Ву Ту Транг, Ли Хоанг Дук, Нгаен Хай Ту, Ли Ту Хонг Хао, Нгаен Сюан Чанг // Анализ риска здоровью. – 2019. – № 3. – С. 118–127. DOI: 10.21668/health.risk/2019.3.14*

## MULTISEPARATION OF ANTHOCYANINS AND ANTHOCYANIDINS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY COMBINED WITH RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

**Vu Thi Trang<sup>1,2</sup>, Le Hoang Duc<sup>2</sup>, Nguyen Hoai Thu<sup>2</sup>, Le Thi Hong Hao<sup>1,2</sup>, Nguyen Xuan Trung<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>National Institute for Food Control, 65 Pham Than Duat, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>VNU University of Science, Vietnam National University-Hanoi, 19 Le Thanh Tong, Hanoi, Vietnam

*A method has been developed for the separation of anthocyanins and anthocyanidins with high performance liquid chromatography (HPLC). Experimental designs were applied for multivariate optimization of the HPLC experimental conditions with using response surface methodology (RSM). Three independent factors, namely formic acid concentration, initial ratio of acetonitrile in gradient program and flow rate, were used to design mathematical models. The responses were resolutions of four peak couples which were the most difficult to separate including: pelargonidin-3-glucoside and delphinidin, delphinidin and peonidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside and malvidin-3-glucoside, peonidin and malvidin. Variance analysis proved a chosen model was highly fit and the RSM method yielded good results in improving separation of anthocyanins and anthocyanidins. The optimized HPLC parameters were as follows: C18 column (250 mm × 4.6 mm × 5 μm), mobile phase is FA 10% and ACN used as a gradient; flow rate 0.8 mL.min<sup>-1</sup>. Using these optimum conditions, separation of compounds with good resolutions and a run time of less than 30 min were archived. The results for method validation satisfied the requirement of AOAC, linearity range from 0.2–10 ppm with R<sup>2</sup> ≥ 0.9955, LOD from 0.05–0.1 mg/kg, RSD from 4.79–6.45% and the recovery is from 85.4–109.6%. The method was applied to determine anthocyanins and anthocyanidins in some fruits and vegetables samples with the content of anthocyanidins being from 5.74–218.27 mg/100g. Anthocyanins primarily concentrate in peel of fruits and vegetables, black bean peel contains most anthocyanins.*

**Key words:** anthocyanin, anthocyanidin, response surface methodology (RSM), HPLC, antioxidant, chromatography.

### References

1. Bordonaba J.G., Crespo P., Terry L.A. A new acetonitrile-free mobile phase for HPLC-DAD determination of individual anthocyanins in blackcurrant and strawberry fruits: A comparison and validation study. *Food Chemistry*, 2011, no. 129, pp. 1265–1273. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.09.114
2. Deineka V.I., Deineka L.A., Saenko I.I. Regularities of Anthocyanins Retention in RP HPLC for «Water–Acetonitrile–Phosphoric Acid Mobile» Phases. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2015, vol. 1, pp. 6. DOI: 10.1155/2015/732918
3. Castañeda-Ovando A., Pacheco-Hernández L., Paez E., Rodríguez J.A., Galan-Vidal C.A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 2009, vol. 113, pp. 859–871. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.001
4. Castele K.V. [et al.]. Separation of some anthocyanidins, anthocyanins, proanthocyanidins and related substances by reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*, 1983, vol. 259, pp. 291–300.
5. Hertog M.G., Hollman P.C., Katan M.B., Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr. Cancer*, 1993, no. 20, pp. 21–29. DOI: 10.1080/01635589309514267
6. Catherine A.R., Nicholas J.M., George P. Structure-antioxidants activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 1996, no. 20, pp. 933–956. DOI: 10.1016/0891-5849(95)02227-9
7. Lee J., Wrolstad R.E., Durst R. AOAC Official Method 2005.02 Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines pH Differential Method. Official Methods of Analysis of AOAC International, 2005, chapter 37, pp. 37–39.
8. Cesa S., Carradori S., Bellagamba G., Locatelli M., Antonietta Casadei M., Masci A., Paolicelli P. Evaluation of processing effects on anthocyanin content and colour modifications of blueberry (*Vaccinium* spp.) extracts: Comparison between HPLC-DAD and CIELAB analyses. *Food Chemistry*, 2017, no. 232, pp. 114–123. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.03.153

© Vu Thi Trang, Le Hoang Duc, Nguyen Hoai Thu, Le Thi Hong Hao, Nguyen Xuan Trung, 2019

**Vu Thi Trang** – PhD., candidate, head of Laboratory of Food Quality and Food Additives (e-mail: trang2103@gmail.com; tel.: +84916149106).

**Le Hoang Duc** – Student (e-mail: duclhd2909@gmail.com; tel.: +84973552366).

**Nguyen Hoai Thu** – Student (e-mail: nguyenhoaitu2596@gmail.com; tel.: +84359673139).

**Le Thi Hong Hao** – PhD., general director (e-mail: lethihonghao@yahoo.com; tel.: +84904248167).

**Nguyen Xuan Trung** – PhD., lecturer (e-mail: trungnx2004@gmail.com; tel.: +84904303513).

9. Fibigr J., Satínsky D., Solich P. A UHPLC method for the rapid separation and quantification of anthocyanins in acai berry and dry blueberry extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017, no. 143, pp. 204–213. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.05.045
10. Canuto G.A.B., Oliveira D.R., Da Conceição L.S.M., Farah J.P.S., M.F.M. Tavaré. Development and validation of a liquid chromatography method for anthocyanins in strawberry (*Fragaria* spp.) and complementary studies on stability, kinetics and antioxidant power. *Food Chemistry*, 2016, no. 192, pp. 566–574. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.06.095
11. Li D., Li B., Ma Y., Sun X., Lin Y., Meng X. Polyphenols, anthocyanins, and flavonoids contents and the antioxidant capacity of various cultivars of highbush and half-high blueberries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2017, no. 62, pp. 84–93. DOI: 10.1016/j.jfca.2017.03.006
12. Trikas E.D., Melidou M., Papi R.M., Zachariadis G.A., Kyriakidis D.A. Extraction, separation and identification of anthocyanins from red wine by-product and their biological activities. *Journal of functional food*, 2016, no. 25, pp. 548–558.
13. Huang Zh., Wang B., Williams P., Pace R.D. Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS. *Food Science and Technology*, 2009, no. 42, pp. 819–824. DOI: 10.1016/j.lwt.2008.11.005
14. Ruiz A., Hermosín-Gutiérrez I., Vergara C., Von Baer D., Zapata M., Hirschfeld A., Obando L., Mardones C. Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Research International*, 2013, no. 51, pp. 706–713. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.01.043
15. Bridle P., Garcia-Viguera C., Tomas-Barberan F.A. Analysis of Anthocyanins by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 1996, vol. 19, no. 4, pp. 537–545. DOI: 10.1080/10826079608005518
16. Caboni M.F., Comandini P., Giampaolo B., Cardinali A., Cerretani L. CZE separation of strawberry anthocyanins with axitic buffer and comparison with HPLC. *Journal of separation of science*, 2008, no. 31, pp. 3257–3264. DOI: 10.1002/jssc.200800199
17. Shim Y., Kim S., Seo D., Park H., Ha J. Rapid method for determination of anthocyanin glucosides and free delphinidin in grapes using u-HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, 2014, no. 52, pp. 629–635. DOI: 10.1093/chromsci/bmt091
18. Gao L., Mazza G. Rapid Method for Complete Chemical Characterization of Simple and Acylated Anthocyanins by High-Performance Liquid Chromatography and Capillary Gas-Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, no. 42, pp. 118–125. DOI: 10.1021/jf00037a020
19. Liu X., Mu T., Sun H., Zhang M., Chen J. Optimisation of aqueous two-phase extraction of anthocyanins from purple sweet potatoes by response surface methodology. *Food Chemistry*, 2013, no. 141, pp. 3034–3041. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.05.119
20. Nyman N.A., Kumpulainen J.T. Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, no. 49, pp. 4183–4187. DOI: 10.1021/jf010572i
21. Deividas B., Ivanauskas L., Dirse V. Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits. *Meditisina (Kaunas, Lithuania)*, 2007, vol. 43 no. 12, pp. 971–977.
22. Welch C., Wu Q., Simon J. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Current Analytical Chemistry*, 2008, vol. 4, no. 2, pp. 75–101. DOI: 10.2174/157341108784587795
23. Zhang Zh., Kou X., Fugal K. Comparison of HPLC Methods for Determination of Anthocyanins and Anthocyanidins in Bilberry Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, no. 52, pp. 688–691. DOI: 10.1021/jf034596w

*Vu Thi Trang, Le Hoang Duc, Nguyen Hoai Thu, Le Thi Hong Hao, Nguyen Xuan Trung. Multiseparation of anthocyanins and anthocyanidins by high performance liquid chromatography combined with response surface methodology. Health Risk Analysis, 2019, no. 3, pp. 118–127. DOI: 10.21668/health.risk/2019.3.14.eng*

Получена: 27.05.2019

Принята: 26.07.2019

Опубликована: 30.09.2019