



УДК 544.72:553.611.6

## НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ СОРБЦИИ АНТОЦИАНОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ГЛИН

**А.Н. Чулков, В.И. Дейнека,  
Л.А. Дейнека**

Белгородский государственный  
национальный исследовательский  
университет, Россия, 309015,  
г. Белгород, ул. Победы, 85

E-mail: [deineka@bsu.edu.ru](mailto:deineka@bsu.edu.ru)

В работе проведен анализ особенности сорбции антоцианов на поверхности монтмориллонита с учетом геометрических параметров антоцианов – трех типов 3-гликозидов, с учетом строения поверхности пакета слоистого минерала. В работе с использованием спектрофотометрического и хроматографического методов доказано, что рост числа углеводных радикалов в гликозидном фрагменте у третьего атома углерода антоцианидиновой основы приводит к ослаблению сорбции. Обсуждаются параллели и различия в сорбции антоцианов по ионообменному механизму и по механизму гидрофобного выталкивания на поверхность обращенно-фазового сорбента.

Ключевые слова: антоцианы, глина, монтмориллонит, сорбция, ионообменный механизм, геометрические параметры.

### Введение

В наших предыдущих исследованиях было показано, что глины обладают высокой сорбционной активностью по отношению к антоцианам [1-2]. Это в целом не удивительно, поскольку антоцианы при  $pH < 4.5$  существуют в окрашенной положительно заряженной флавилиевой форме [3], а глины относятся к эффективным катионообменным материалам: известны работы по сорбции на глинах как ионов металлов [4], так и катионных органических частиц [5, 6]. Однако при оптимизации процессов сорбции следует учитывать, что взаимодействие органических ионов с поверхностью глин, по крайней мере, в ряде случаев [5] не ограничивается лишь катионообменным процессом: по мере увеличения степени заполнения поверхности органическим ионом сорбент постепенно приобретает и гидрофобные свойства.

Вследствие высокой антиоксидантной активности антоцианов (и связанным с нею различным проявлениям биологической активности) глины представляют особый интерес как дешевые и доступные сорбенты для их очистки от сопутствующих экстрактивных веществ сложной природной матрицы [7]. По этой причине определение закономерностей процессов сорбции – десорбции антоцианов глинами представляет не только теоретический, но и значительный практический интерес, что и определило цель настоящей работы.

### Материал и методы исследования

В качестве объекта исследования в работе использована бентонитовая глина (Армения) переведенная в  $H^+$  форму отмучиванием в 0.1 М водном растворе соляной кислоты. В качестве антоциановых объектов использовали экстракты ягод вишни (*Cerasus vulgaris*) и восковницы (*Myrica rubra*). Перед использованием экстракты антоцианов были очищены и сконцентрированы методом твердофазной экстракции на патронах Диапак С18.

Суммарное содержание антоцианов определяли дифференциальным спектрофотометрическим методом (спектрофотометр СФ-56) с пересчетом на цианидина-3-глюкозид [8].

Соотношение индивидуальных антоцианов в растворах определяли методом ВЭЖХ в обращенно-фазовом варианте, используя хроматограф Agilent 1260 с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами. Разделение проводили в изократическом режиме в подвижной фазе ацетонитрил – муравьиная кислота – вода (8 : 10 : 92), при скорости подвижной фазы 1 мл/мин. Для разделения использовали хроматографическую колонку – Symmetry® С18 4.6×250 мм с термостатированием при 40 °С. Масс-спектры записывали на квадрупольном масс спектрометре Agilent 6130 Quadrupole LC/MS в режиме ESI (ионизация распылением в электрическом поле) с позитивным режимом сканирования в диапазоне масс 250-1200. Напряжение на фрагментаторе – 200 В. Давление газа-распылителя 30 psi, скорость газа осушителя 10 л/мин, температура газа осушителя 350 °С, температура испарителя 250 °С.



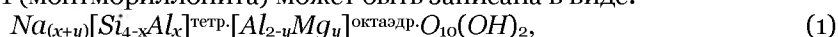
Элементный состав глины был определен методом энергодисперсионного анализа на приборе Quanta 200 3D (ЦКП БелГУ).

### Результаты исследования и обсуждение

Идеальный состав слоистых силикатных минералов 2:1 - типа (два слоя кремнекислородных тетраэдров с обеих сторон своими вершинами закрывают один слой металл-гидроксидных октаэдров [7]) –  $[Si_4O_{10}(OH)_2]^{6-}$ ; при этом в зависимости от типа металла, образующего октаэдрический слой, различают диоктаэдрические (металл –  $Al^{3+}$ ) и триоктаэдрические (металл –  $Mg^{2+}$ ) типы структур с конечными составами  $Si_4Al_2O_{10}(OH)_2$  и  $Si_4Mg_3O_{10}(OH)_2$ , соответственно. Но такие структуры электрически нейтральны, - заряд возникает при:

- изоморфном замещении кремния (степень окисления +4) в тетраэдрических слоях на ионы металлов с меньшим зарядом, например, на ионы  $Al^{3+}$ ;
- изоморфном замещении алюминия (заряд 3+) в октаэдрических слоях на ионы металлов с меньшим зарядом, например, на ионы  $Mg^{2+}$ .

Обобщенная формула наиболее часто встречаемого в природе слоистого диоктаэдрического алюмосиликата типа 2:1 (монтмориллонита) может быть записана в виде:



где  $0.2 < (x+y) < 0.6$  и  $x \ll y$ .

При набухании глины в воде возможно проникновение воды в межпакетные пространства вплоть до их полного разделения, что соответствует диспергированию исходных частиц глины. При этом на внешних поверхностях пакетов образуется двойной электрический слой. Вследствие выхода гидратированных ионов  $Na^+$  в диффузионную часть двойного электрического слоя частицы глины приобретают отрицательный заряд и, следовательно, отрицательный электрокинетический потенциал.

Отметим, что поверхность монтмориллонита даже в идеальном случае (при отсутствии дефектов) трудно признать плоской и однородной. Если пренебречь некоторыми, понижающими симметрию структуры искажениями [9], то можно считать, что центральный октаэдрический слой пакета минерала в идеале образует две плоскости атомов кислорода с целостной плотнейшей шаровой упаковкой (белые и серые шары, рис.1). Но в прикрывающих эти слои сверху и снизу тетраэдрических кремнекислородных слоях внешние плоскости атомов кислорода при упаковке, близкой к плотнейшей шаровой, имеют гексагональные пустоты (на месте серых шаров, рис.1); октаэдрические пустоты имеются при этом и в октаэдрических слоях минерала 2:1-типа.

Антоцианы, как и другие органические вещества, находящиеся в растворе в виде катионов (алкалоиды, метиловый синий, метиленовый голубой и др.) сорбируются на глине по катионообменному механизму: соединения, существующие в растворе в виде анионов, такие как метиловый оранжевый, практически не сорбировались на использованной в работе глине. Антоцианы существуют во флавилиевой форме только в кислых растворах, применяемых для их экстракции, поэтому и глина, которую предполагают использовать для очистки антоцианов, должна быть предварительно обработанной кислотой. В зависимости от условий кислотной обработки кроме замены противоионов (ионов  $Na^+$  в исходном сорбенте на ионы  $H^+$ ) и удаления карбонатов возможны и другие изменения сорбента. Так, например, протонирование внешних силоксановых атомов кислорода (черные шары на рис.1) приведет к образованию относительно сильных кислотных брэнстедовских центров. Поскольку образование таких центров возможно в результате захвата сорбентом протонов из двойного электрического слоя, то это должно привести к снижению суммарного отрицательного заряда и, следовательно, к уменьшению по модулю  $\zeta$ -потенциала. Строго говоря, нет стерических препятствий и к протонированию атомов кислорода, общих для октаэдрического и тетраэдрического слоев (отмечены белым цветом на рис.1) – доступ к ним обеспечивают указанные выше гексагональные пустоты в тетраэдрических слоях.

К аналогичному результату должно привести также протонирование атомов кислорода ОН-групп октаэдрического слоя, не являющихся общими с вершинами тетраэдрического слоя (серые шары, рис.1); выход атома кислорода из структуры пакета в виде молекулы воды приведет к образованию льюисовских кислотных центров, которые могут отвечать, например, за каталитическую активность активированных глин [10]. Кроме того, возможно проникновение протонов внутрь «пустых» октаэдров, смежных с октаэдрами, имеющими заряд из-за замещения ионов  $Al^{3+}$  ионами  $Mg^{2+}$ . Поэтому не удивительно также и то, что обратный перевод сорбентов из  $H^+$ -формы в  $Na^+$ -форму сопровождается ростом абсолютной величины  $\zeta$ -потенциала, приводящего к получению необычайно устойчивых коллоидных растворов. Так в настоящей



работе были получены коллоидные растворы глины в  $Na^+$ -форме, не расслаивавшиеся до полного высыхания на воздухе.

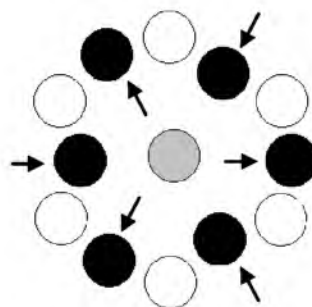
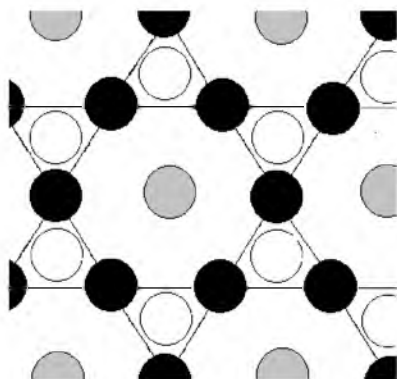


Рис.1. Два слоя атомов кислорода слоистого минерала 2:1 - типа

Шары черные – верхний слой (основания тетраэдров) и белые – нижний слой – (вершины тетраэдров, закрытые атомами кремния) – атомы кислорода. Стрелочкой указаны направления искажения структуры

В принципе, возможен еще один механизм изменения поверхностного заряда глин – вытеснение протоном ионов металлов из октаэдрических слоев. Но этот процесс должен, наоборот, привести к росту суммарного заряда пакета, хотя при этом более вероятно простое разрушение структуры слоев пакета или образование дефектов. В жестких условиях возможны разрушения в пределах каждого из слоев пакета.

Особенностью ионообменных процессов является то, что равновесие между ионами в фазе раствора и ионами двойного электрического слоя неоднозначно: входящий ион может замещать

- а) противоионы глины в первом слое (слое Гельмгольца);
- б) противоионы в диффузном слое до границы скольжения;
- в) противоионы в остальной части диффузного слоя.

Для ионообменных процессов это важно по следующей причине. Слой Гельмгольца может быть охарактеризован площадью поверхности, приходящейся на 1 противоион,  $S_0$ . Тогда если площадь, которую займет при сорбции в этом слое одноименный с той же абсолютной величиной заряда органический ион  $A$ , равна  $S_A$ , то возможно два варианта:

- 1) если  $S_A \leq S_0$ , то при одинаковых величинах зарядов стехиометрия замещения равна 1:1, и возможны лишь небольшие изменения  $\zeta$ -потенциала;
- 2) если  $S_A \geq S_0$  – то сорбат при равенстве зарядов ионов вытесняет большее число противоионов; при этом абсолютная величина  $\zeta$ -потенциала должна возрасти.

$S_0$  можно оценить по приближенной формуле (1) состава монтмориллонитов с учетом длины ребра кремнекислородного тетраэдра ( $2.7 \text{ \AA}$  [11]). Для изолированных друг от друга 2:1-пакетов на каждой из поверхностей тетраэдрических слоев атомов кислорода расчет позволяет определить диапазон:

$$84 < S_0 < 250 (\text{\AA}^2), \tag{2}$$

КОЕ глин при этом будет варьировать в диапазоне:

$$1.5 > \text{КОЕ} > 0.5 \text{ (ммоль-экв/г)}. \tag{3}$$

Для сорбента, использованного в настоящей работе, КОЕ (катионообменная емкость), определенная по прямому титрованию глины в  $H^+$ -форме раствором щелочи, составила  $0.48 \pm 0.03$  ммоль/г. Это в целом согласуется с приведенными выше расчетами. Но следует учесть, что реальный материал нельзя считать ни идеальным (не имеющим дефектов), ни монокомпонентным, поскольку по данным рентгенофазового анализа в нем присутствуют примеси других минералов, например, кварца. Сохранение примерно половины атомов кислорода после кислотной обработки глины указывает либо на присутствие в глине инородных минералов, либо на неполное разделение пакетов монтмориллонита при этой обработке (табл. 1). Следовательно, оценка  $S_0$  в  $250 \text{ \AA}^2$  может считаться завышенной.

Таблица 1

**Элементный состав бентонитовой глины (Армения) в пересчете на оксиды**

Образец	Элементный состав глины, масс.%, в пересчете на оксиды								
	$Na_2O$	$MgO$	$Al_2O_3$	$SiO_2$	$K_2O$	$CaO$	$TiO_2$	$Fe_2O_3$	$CuO$
Исходная	2.02	3.03	18.04	68.09	0.81	1.17	0.62	4.91	0.40
$H^+$ форма	0.97	3.75	15.72	70.11	1.00	1.92	0.85	5.69	0.11



Природные антоцианы различаются обычно по двум параметрам: по числу и положению *OH*- и *CH<sub>3</sub>O*- групп в кольце В (заместители *R*<sub>1</sub> и *R*<sub>2</sub>, рис.2), и по числу и положению углеводных заместителей, гликозилирующих, чаще всего, гидроксильную группу в положении 3, или одновременно две гидроксильные группы в положениях 3 и 5 на рисунке 2. При этом в каждом из положений гликозидный фрагмент может быть дополнительно гликозилирован другими молекулами гексоз или пентоз, а в ряде случаев и ацилирован органическими кислотами.

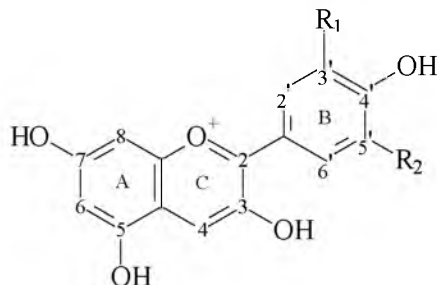


Рис 2. Структура антоциановых комплексов

Увеличение числа углеводных радикалов должно привести к увеличению размеров катионов антоцианов и к росту площади, занимаемой ими на поверхности сорбента. К сожалению возможна лишь ориентировочная оценка этого параметра, который зависит от конкретного конформационного состояния в адсорбционном слое, которое не обязательно должно соответствовать наиболее устойчивой конформации антоцианов в растворе. Для трех соединений: цианидин-3-гексозы, цианидин-3-гексозилгексозы и цианидин-3-рамнозилгексозилгексозы методом молекулярной механики (AMBER в программном продукте HyperChem 8.0) были рассчитаны площади поверхности этих антоцианов. Понятно, что поверхность, занимаемая ими на сорбенте, будет не более половины от этих величин, хотя сопоставимость площадей  $S_0$  и  $S_A$  очевидна при соотношении  $S_0 < S_A$ .

Для проверки реальности оценки расчетных параметров  $S_A$ , можно сопоставить две величины:  $S_A(II)/S_A(I)$  и  $S_A(II)/S_A(I)$  с одной стороны и тангенсы угла наклона линий трендов в координатах относительного анализа удерживания антоцианов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ для 3-дигликозидов и 3-тригликозидов относительно 3-моноголикозида, соответственно (табл. 2).

Таблица 2

Сопоставление параметров относительного удерживания производных цианидина

№	Тип заместителя	$1/2 S^*$ , Å <sup>2</sup>	Антоциан	Расчетные параметры		M/Z
				ВЭЖХ**	$S(i)/S(1)$	
1	3-моноголикозид	252	Cy-3-Glu	1.00	1.00	449.3
			Cy-3-Sopho	1.16	1.10	611.4
2	3-дигликозид	274	Cy-3-Sam	1.12		581.5
			Cy-3-Rut	1.14		595.5
3	3-тригликозиды	335	Cy-3-2 <sup>G</sup> Rut	1.32	1.33	757.4
			Cy-3-2 <sup>X</sup> Rut	1.28		727.2

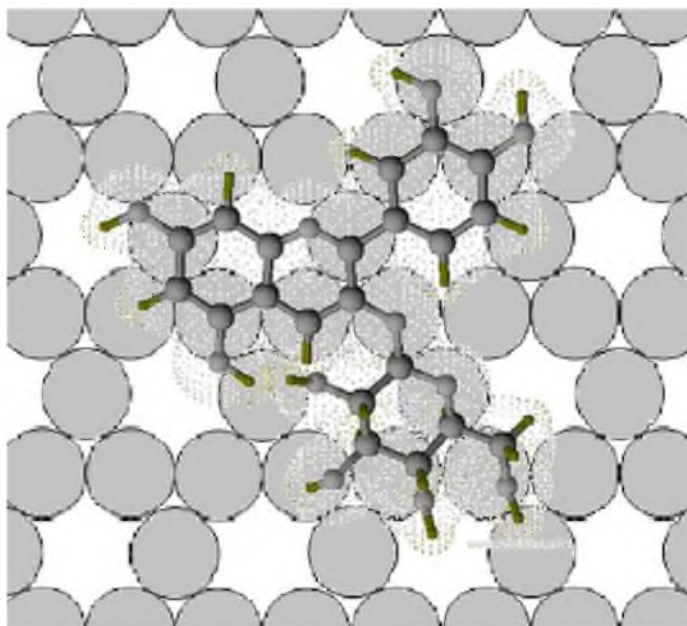
\* – расчетное значение половины площади по программе HyperChem 8.0 \*\*– тангенс угла наклона прямой линии на карте относительного удерживания; Cy-3-Sopho - цианидин-3-сафорозид, Cy-3-Sam - цианидин-3-самбубиозид, Cy-3-Rut – цианидин-3-рутинозид, Cy-3-2<sup>G</sup>Rut – цианидин-3-(2-О-глюкозилрутинозид), Cy-3-2<sup>X</sup>Rut - цианидин-3-(2-О-ксилозилрутинозид)

Совпадение расчетных и теоретических результатов можно считать более чем удовлетворительным, но тогда необходимо объяснить, почему при  $S_0 < S_A$  сорбция антоцианов приводит к уменьшению а не к росту (по модулю)  $\zeta$ -потенциала. Так, в работе [12] показано, что при заполнении поверхности глины антоцианами происходит увеличение  $\zeta$ -потенциала: изначально отрицательный заряд поверхности глины – 8.20 мВ при заполнении поверхности антоцианами уменьшается по модулю до – 3.48 мВ.

Известно, что изоморфное замещение в монтмориллоните локализовано главным образом в октаэдрических слоях [9]. Но катионы антоцианов могут приблизиться только к внешней плоскости атомов кислорода поверхностных тетраэдрических слоев, в то время как катионы маленьких размеров могут попасть в гексагональные полости, обеспечивающие наиболее близкий контакт катиона с заряженным фрагментом пакета. При сорбции молекулы антоциана на внешней поверхности оснований кремнекислородных тетраэдров должны перекрывать



несколько гексагональных пор (рис. 3), предотвращая выход из них катионов, что и может обеспечить снижение модуля  $\zeta$ -потенциала.



Предположение о зависимости величины ионообменной сорбции антоцианов на глине от размера молекул сорбата не противоречило ранее полученным результатам при исследовании суммарной сорбции сложных композиций антоцианов неочищенных растительных экстрактов [1]. Поскольку сопутствующие вещества могут существенно изменить параметры сорбции антоцианов [13], в настоящей работе данное положение было проверено на примере смеси очищенных антоцианов.

Рис.3. Молекула цианидин-3-глюкозида на поверхности пакета монтмориллонита

Смесь антоцианов, рис.4, использованную в настоящей работе, составили из экстрактов плодов вишни и восковницы.

Экстракт плодов восковницы содержал только один антоциан - цианидин-3-глюкозид (**2**, рис. 4); антоциановый комплекс плодов вишни, использованной в настоящей работе, был представлен в основном двумя производными цианидина: цианидин-3-рутинозидом (**3**), и цианидин-3-(2-О-глюкозил)рутинозидом (**1**). При смешивании этих экстрактов была получена смесь, содержащая одновременно три типа антоцианов – от моногликозида до тригликозида, рис.4. Для расчета суммарной избыточной сорбции антоцианов использовали спектрофотометрический метод. Пересчет полученного результата на индивидуальные составляющие выполняли по данным ВЭЖХ по площадям пиков антоцианов в исходном и в равновесных растворах. По представленным на рис. 4 данным очевидно, что содержание моногликозида в равновесном растворе уменьшается быстрее, чем ди- и, тем более, тригликозидов.

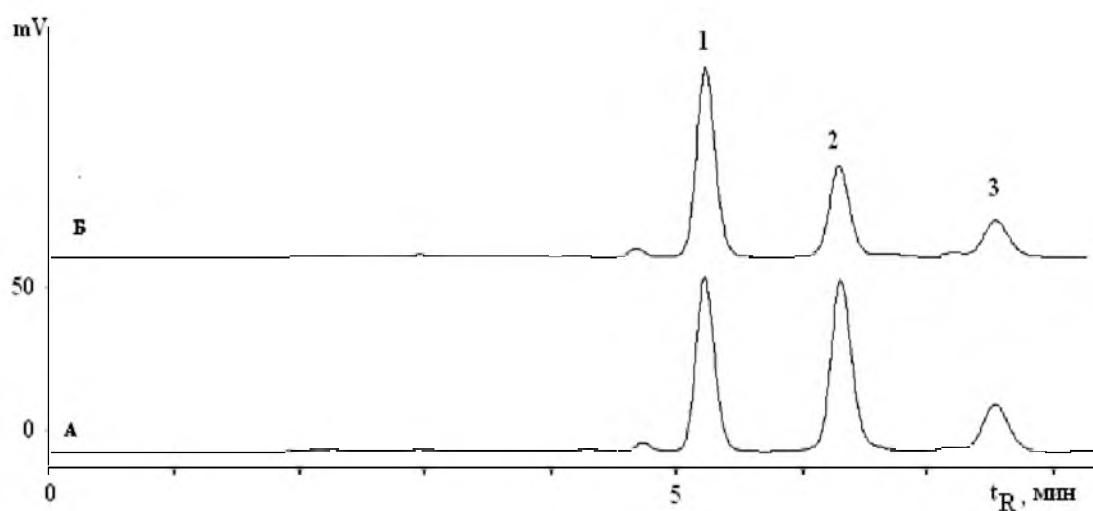


Рис 4. Хроматограммы модельной смеси антоцианов

А – исходный экстракт, Б – равновесные экстракты после сорбции на глине: 1 - цианидин-3-(2-О-глюкозил) рутинозид, 2 – цианидин-3-глюкозид и цианидин-3-рутинозид



При половинном заполнении поверхности глины антоцианами доля тригликозида (**1**) в равновесном растворе возрастает в два раза по сравнению с исходной смесью, а наибольшее падение концентрации получено для моногликозида (**2**). Фрагменты изотерм сорбции индивидуальных гликозидов представлены на рисунке 5.

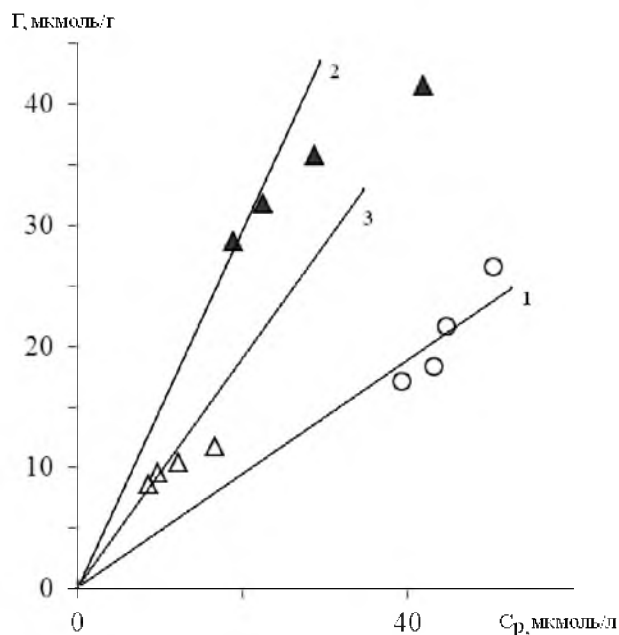


Рис. 5. Изотермы сорбции индивидуальных компонентов на глине  
1-цианидин-3-глюкозид, 2-цианидин-3-рутинозид, 3-цианидин-3-(2-О-глюкозил)рутинозидом

На изотермах сорбции антоцианов точки, соответствующие моногликозиду, располагаются закономерно выше точек для ди- и три-гликозидов, что полностью согласуется с предложенной ранее моделью ионообменной сорбции. Для сорбции на обращенно-фазовом сорбенте при экстраполяции данных, полученных с различными добавками ацетонитрила на элюенты без органического модификатора, соотношение между логарифмами коэффициентов удерживания (т.е. сорбируемостью) этих же анализов оказываются принципиально иными (рис. 6).

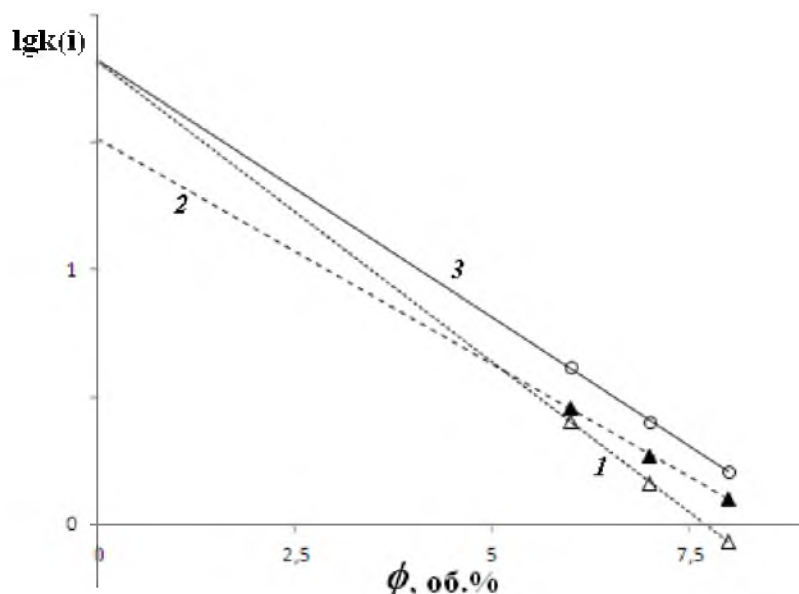


Рис. 6. Зависимость удерживания гликозидов цианидина от объемной доли ацетонитрила в подвижной фазе

Колонка: Symmetry® C18 4.6×250 мм, элюенты, содержащие ацетонитрил и 10 об.% HCOOH в воде.  
Номера соединений – см. рис. 5



На обращенно-фазовом сорбенте 3-глюкозид цианидина должен удерживаться слабее остальных соединений. Следовательно, отличие сорбционной способности антоцианов по отношению к глинам в сравнении липофильными фазами может быть использовано для направленного изменения селективности концентрирования компонентов сложных матриц.

### Выводы

Сорбция антоцианов на глине происходит по ионообменному механизму, при этом размерные факторы приводят к снижению  $\zeta$ -потенциала сорбента. В работе предложена модель, позволяющая предсказывать сорбируемость соединений по величинам удельной поверхности молекул (или заряженных частиц).

### Список литературы

1. 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.
2. Антоцианы и алкалоиды: Особенности сорбции природными глинистыми минералами / В.И. Дейнека, В.А. Хлебников, А.Н. Чулков и др. // *Химия растительного сырья*. – 2007. – № 2. – С. 63–66.
3. Giusti M.M., Wrolstad R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy // *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons. – 2001. Unit F. 1.2.1–F1.2.1.
4. Kraepiel A.M.L., Keller K., Morel F.M.M. A Model for Metal Adsorption on Montmorillonite // *J. Coll. Interface Sci.* - 1999. – Vol. 210. – P. 43–54.
5. The adsorption of berberine by montmorillonite and thermo-XRD analysis of the organo-clay complex / E. Cohen, T. Joseph, I. Lapedes, S. Yariv // *Clay Minerals*. – 2005. – Vol. 40. – P. 223–232.
6. Сорбция солей органических азотистых оснований на глинистых минералах / В.И. Дейнека, О.Е. Лебедева, М.А. Лазебная, И.П. Анисимович // *Сорбц. и хроматогр. процессы*. – 2007. – Т. 7, Вып. 3. – С. 473–480.
7. Патент РФ 2381245 Способ получения концентрированного красителя. – 10.02.2010.
8. Giusti M., Ronald E. // *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. – 2001. F1.2.1–F1.2.13.
9. Bergaya F., Jaber M., Lambert J.-F. Ch. 1. Clays and clay minerals / In «Rubber-Clay Nanocomposites: Science, Technology, and Applications», Ed. Maurizio Galimberti, John Wiley & Sons, Inc. – 2011. – P. 3–44.
10. Ravichandran J., Sivasankar B. Properties and catalytic activity of acid modified montmorillonite and vermiculite // *Clays Clay Minerals*. – 1997. – Vol. 45. – P. 854–858.
11. Sugiyama K., Ryu H.J., Waseda Y. Local ordering structure of meta-kaolinite and meta-dickite by the X-ray radial distribution function analysis // *J. Materials Sci.* – 1993. – Vol. 28. – P. 2783–2788.
12. Дейнека В.И., Григорьев А.М. Относительный анализ удерживания гликозидов цианидина. // *Ж. физ. химии*. – 2004. – Т. 78, – № 5. – С. 923–926.
13. Влияние модифицирования поверхности глин берберином на сорбцию антоцианов / А.Н. Чулков, В.И. Дейнека, А.А. Тихова и др. // *Ж. физической химии*. – 2012. – Т. 86. – № 3. – С. 500–502.

## SOME ASPECTS OF ANTHOCYANINS SORPTION ON CLAY SURFACES

**A.N. Chulkov, V.I. Deineka,  
L.A. Deineka**

*Belgorod State National Research  
University, Pobedy St.85,, Belgorod,  
308015, Russia*

*E-mail: deineka@bsu.edu.ru*

In the paper particularities of anthocyanins sorption upon montmorillonite surface have been analyzed, geometrical parameters of three anthocyanin types 3-glycosides as well as that of layered mineral surface being taken into account. The spectrophotometric and chromatographic methods were explored to prove the decrease of anthocyanins sorbability at the increase of carbohydrates radicals number attached to a 3-th carbon number of anthocyanidine backbone. Similarities and differences of anthocyanin sorption by ion-exchange and solute hydrophobic repulsion mechanism onto reversed-phase sorbent surface are discussed.

Keywords: anthocyanins, clay, montmorillonite, sorption, ion-exchange mechanisms, geometrical parameters.