

## Визначення вмісту флавоноїдів у настоях з використанням комп'ютерної колориметрії

О. О. Петруша, К. А. Науменко

Національний університет харчових технологій  
\*Corresponding author. E-mail: petrushao@ukr.net

Paper received 27.01.17; Accepted for publication 05.02.17.

**Анотація.** У статті представлено результати визначення вмісту флавоноїдів у настоях з листя чорної смородини, горобини звичайної, яблуні та трави вербени з використанням комп'ютерної колориметрії та спектрофотометрії. Встановлені кореляційні залежності між колірними RGB-, XYZ-, Lab-характеристиками та кількісним вмістом флавоноїдів у водних розчинах.

**Ключові слова:** забарвлення, комп'ютерна колориметрія, колірні координати, барвні речовини.

**Вступ.** Визначення кількості барвних речовин в сировині, напівфабрикатах та готовій продукції є важливим і необхідним для встановлення біологічної дії цих сполук на організм людини, стандартизування їх кількості в продукції із відповідним зазначенням в нормативних документах та на маркуванні.

Цінним джерелом натуральних барвних речовин є листя плодово-ягідних дерев і трави лікарських рослин, а також їх настої або екстракти [1]. Забарвлення настоїв від світло-жовтого до коричневого кольору зумовлене вмістом флавоноїдів, які є флавоновими пігментами і мають Р-вітамінну дію. Деякі з них мають помаранчеве (аурони) або червоне і синє забарвлення (антоціани). Високий вміст цих речовин мають листя чаю, листя іквітигречихи, плоди шипшини, шкірка лимона, незрілі плодиволоського горіха таїн.

Існують різні методи якісного та кількісного визначення флавоноїдів в настоях. Хімічні методи дозволяють провести якісне виявлення цих сполук, спектрофотометричні – визначити їх кількість, метод хроматографії (газової, рідинної, паперової) – детально вивчити склад барвних сполук за класами і є найбільш точним [2].

**Короткий огляд публікацій за темою.** Однією з традиційних методик кількісного визначення флавоноїдів є спектрофотометричний метод з перерахунком на рутин. Основою методики є властивість флавоноїдів утворювати забарвлений комплекс із спиртовим розчином хлориду алюмінію [3]. Для реалізації методики необхідним є побудова калібрувального графіка залежності оптичної густини від концентрації рутину в розчині [4]. Через можливий внесок інших речовин в оптичну густину аналізованих розчинів проводить їх очищення до флавоноїдної фракції або застосовуються реакції комплексоутворення. Фотоколориметричний метод заснований на основі кольорових реакцій флавоноїдів солями різних металів (алюмінію, цирконію, титану, хрому, сурми), з лимонно-борним реактивом і на реакції відновлення цинком або магнієм в кислому середовищі.

Проте, варто відмітити, що високоточні спектрофотометричні і хроматографічні методи є досить затратними, коштовними та тривалими [5]. Тому доцільно розробляти та впроваджувати експресні та недорогі сучасні цифрові технології для кількісного визначення поліфенольних сполук і хлорофілів. До них відноситься метод комп'ютерної колориметрії, предметом дослідження якої є така фізична характеристика як колір.

Згідно класичних тлумачень, колір є суб'єктивною характеристикою світла, що відображає здатність людського ока розрізняти довжину хвилі електромагнітного випромінювання у видимому спектрі з довжиною хвилі 360...780 нм [6]. Для визначення кольору харчового продукту як показника якості використовують термін «забарвлення». Цей показник значною мірою залежить від міцності об'єкта, коефіцієнта заломлення, ступеня блиску, фактури тощо. Колір, в свою чергу, є більш ширшим поняттям, яке включає в себе забарвлення та умови освітлення об'єкта.

**Метою досліджень** стало визначення вмісту флавоноїдів на основі оцінки забарвлення настоїв з рослинної сировини з використанням методу комп'ютерної колориметрії та порівняння отриманих результатів з даними спектрофотометричного визначення.

**Матеріали та методи.** Предметом дослідження було обрано представник флавоноїдів – рутин, настої листя чорної смородини, поживтілого листя яблуні, листя горобини звичайної, трави вербени, які містять в своєму складі флавоноїди. Рутин використовували у вигляді жовтого кристалічного порошку.

Для визначення вмісту барвних речовин настоїв проводили оцінку забарвлення методом комп'ютерної колориметрії, спектрофотометрії і органолептично, що дало змогу перевірити співставність результатів вимірів. Для визначення концентрації флавоноїдів в досліджуваних настоях застосовано метод побудови калібрувального графіка:

1) залежності значень колірних координат від концентрації рутину у водному розчині (метод комп'ютерної колориметрії);

2) залежності оптичної густини розчину рутину від його концентрації (спектрофотометричний метод).

Для отримання калібрувальних графіків було приготовлено стандартні розчини рутину з концентраціями 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 мг/мл.

Комп'ютерна колориметрія ґрунтується на тому, що колір можна представити у вигляді суми трьох лінійно незалежних кольорів [7]. Для кількісної оцінки кольору створені та удосконалені основні системи координат кольору: RGB, CIEXYZ, CIELab.

В системі RGB основоположними кольорами виступають червоний (R), зелений (G) та синій (B), тобто три монохроматичні випромінювання довжиною хвилі 700,0; 546,1; 435,8 нм відповідно. Значення кожної колірної координати в системі RGB змінюється в межах від 0 до 255 умовних одиниць колірнос-

ті.Ефективним інтегральним показником забарвлення можуть використовуватись геометричні параметри діаграм, побудовані в полярних координатах, на яких відкладено результати вимірів величин інтенсивності колірних компонент в колірній системі RGB.Якщо RGB-система є просторовою, то CIEXYZ є ортогональною, а колірні координати XYZ змінюються від 0 до 100. В системі CIELabкоордината L задаєяскравність забарвлення і змінюється від 1 до 100, а – зміна кольору в діапазоні від зеленого (-128) до червоного (127), b–від синього (-128) до жовтого (127).

Оцінку забарвлення настоїв та визначення колірних координат проводили за такими етапами. Спочатку було підготовлено скляну кювету, наповненої досліджуваним зразком настою, встановлено кювету до кюветотримача та розміщено його на сканері. Підготовка зразків настоїв не потрібна, оскільки при застосуванні комп'ютерної колориметрії мутність, супутні речовини, частки сировини не впливають на якість зображення та його колірні характеристики. Визначення колірних координат настоюздійснювалось скануваннямдна кювети в обраному режимі.За допомогою програм обробки зображень отримане зображення ідентифікували та визначали його колірні координати в системі RGB, CIEXYZ, CIELab.

Визначення оптичної густини настоїв проводили на спектрофотометрі UNICO в кварцовій кюветі з тов-

щиною оптичного шару 1 см при довжині хвилі 440 нм[8].

**Результати та обговорення.**Калібрувальний графік залежності оптичної густини при довжині хвилі 440 нмза рутином наведено на рис. 1.

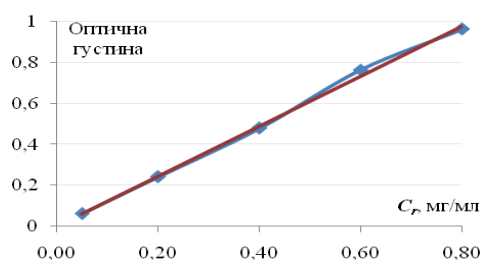


Рис. 1. Калібрувальний графік залежності оптичної густини від концентрації рутину

Залежність оптичної густини  $D_r$  від концентрації рутину  $C_r$  в межах 0,05...0,8 мг/мл є лінійною, що підтверджується високим ступенем кореляції  $R^2 \geq 0,997$  і вказує на адекватність отриманого рівняння для встановлення величини вмісту пігменту за отриманою величиною оптичної густини

$$D_r = 1,219 * C_r \quad (1)$$

Калібрувальний графік залежності колірних координат від концентрації рутину наведено на рис. 2.

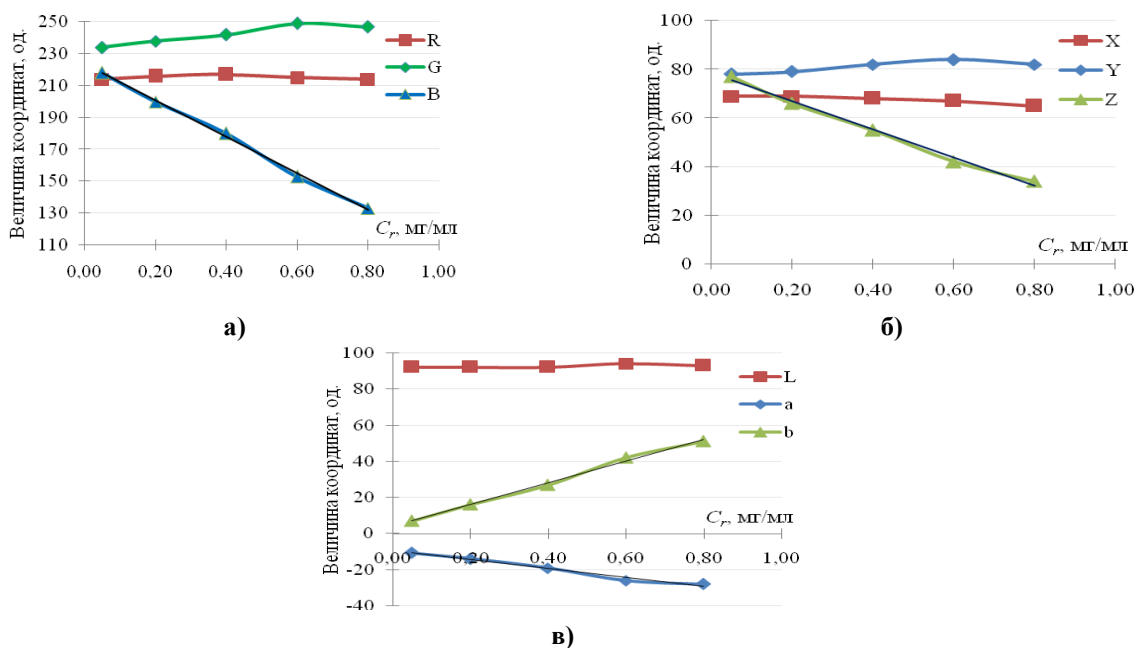


Рис. 2. Калібрувальний графік залежності колірних координат від концентрації рутину: а) RGB-координати, б) XYZ-координати, в) Lab-координати

За побудованим калібрувальним графіком для рутину з RGB- та XYZ-координатами виявлено, що R та G, Xта Y компоненти є незмінними, окрім невисокого піку зростання в межах концентрації пігменту 0,6...0,8 мг/мл.В системі RGB для рутину існує виражена лінійна залежність за B компонентою, в системі XYZ– за Z компонентою,які мають низхідний характер. Це означає, що при зміні концентрації пігменту, змінюється відтінок кольору і ця зміна напряму залежить від зміни синьої складової кольору. Для отриманого графіка складено рівняння з високим ступенем

кореляції, що свідчить про відтворюваність даних і вірний вибір колірних компонент  $B_r$  та  $Z_r$  для розрахунку

$$B_r = -114,2 * C_r + 223,6 \quad R^2 \geq 0,997 \quad (2)$$

$$Z_r = -57,7 * C_r + 78,46 \quad R^2 \geq 0,992 \quad (3)$$

Для системи Lab-координат чутливими до зміни забарвлення досліджуваних розчинів є a- та b-компоненти, зміна яких від концентрації рутину описується рівняннями

$$a_r = -24,5 * C_r - 9,5 \quad R^2 \geq 0,978 \quad (4)$$

$$b_r = 60,0 * C_r + 4 \quad R^2 \geq 0,995 \quad (5)$$

Побудовані калібрувальні графіки залежності колірної В, Z, aIb-координат та оптичної густини за рутинном є адекватними, тому їх можна використовувати для визначення флавоноїдів в екстрактах.

Апробацію калібрувальних графіків та визначення ефективності їх використання провели для реальних об'єктів – настоїв листя чорної смородини, яблуні, горобини та трави вербени, які згідно літературних даних містять в своєму складі флавоноїди. Органолептична оцінка забарвлення настоїв на 3-й та 7-й день екстрагування наведена у таблиці 1.

Вміст флавоноїдів визначали також на 3-й та 7-й день настоювання за калібрувальними кривими, побудованими за допомогою комп'ютерної колориметрії і спектрофотометра. У таблиці 2 наведені колірні координати настоїв.

Результати визначення флавоноїдів у настоях з використанням спектрофотометра та комп'ютерної колориметрії наведено в таблиці 3.

**Таблиця 1.** Органолептична оцінка забарвлення настоїв на 3-й та 7-й день настоювання

Настій	Забарвлення	
	3-й день настоювання	7-й день настоювання
Листя чорної смородини	Жовто-зелений	Світло-коричневий з відтінком зеленого
Пожовтіле листя яблуні	Світло-жовтий	Буро-коричневий
Листя горобини	Жовто-зелений	Буро-зелений
Трава вербени	Світло-жовтий	Жовто-коричневий

**Таблиця 2.** Колірні координати настоїв на 3-й та 7-й день настоювання

Настій	R	G	B	X	Y	Z	L	a	b
3-й день настоювання									
Листя смородини	218	240	220	73	82	80	93	-10	7
Листя яблуні	215	237	213	70	80	75	92	-13	9
Листя горобини	218	241	222	74	83	81	93	-10	7
Трава вербени	217	235	213	70	79	74	91	-11	9
7-й день настоювання									
Листя смородини	215	236	218	71	79	78	91	-9	6
Листя яблуні	216	238	188	68	79	59	91	-15	22
Листя горобини	216	237	217,5	71	80	77	92	-10	7
Трава вербени	216	240	206	71	81	70	92	-12	14

**Таблиця 3.** Вміст флавоноїдів в настоях, у перерахунку на рутин

№ з/п	Настій	Вміст флавонолів, мг/ 100 мл					
		Спектрофотометрично		Комп'ютерна колориметрія			
				RGB	XYZ	Lab (a-коорд.)	Lab (b-коорд.)
1	Листя смородини	3-й день	8,1±0,1	3,1	2,7	2,0	5,0
		7-й день	14,1±0,1	4,9	0,8	2,0	3,3
2	Листя яблуні	3-й день	<b>9,5±0,1</b>	<b>9,3</b>	6,0	14,3	8,5
		7-й день	<b>30,0±0,1</b>	<b>31,1</b>	33,7	22,4	30,0
3	Листя горобини	3-й день	1,1±0,1	1,4	4,4	2,0	5,0
		7-й день	4,1±0,1	5,3	2,5	2,0	5,0
4	Трава вербени	3-й день	<b>9,0±0,1</b>	<b>9,3</b>	7,7	6,1	8,5
		7-й день	<b>15,5±0,1</b>	<b>15,4</b>	14,7	10,2	16,7

Згідно даних таблиці 3 найбільший вміст флавоноїдів спостерігається в настої з листя яблуні, а найменший – в екстракті листя горобини. Співставляючи результати, отримані при спектрофотометричному аналізі, та результати комп'ютерної колориметрії встановили, що кількість флавоноїдів в настої з листя яблуні та вербени є однаковою, для настою листя смородини та горобини – спостерігається різниця за двома методами визначення. Такі відмінності пов'язані із переходом до екстракту не лише фенольних сполук, а й каротиноїдів і хлорофілів, які значно впливають на колір настою та після екстрагування мають властивість до окислення та зміни забарвлення розчинів, що призводить до зсуву колірних координат зображення та максимумів світлопоглинання, що в свою чергу впливає на кінцевий результат розрахунків.

Серед наведених розрахунків вмісту флавоноїдів за В, Z, a і b-координатами можна встановити, що опрацювання результатів сканування кольору настоїв з використанням RGB-системи є найбільш точним, оскільки отримані результати є наближеними до ре-

зультатів контрольного методу – спектрофотометрії. Тому доцільно вважати, що отримане рівняння регресії (2)  $V_f=f(C_f)$  є адекватним для визначення флавоноїдів у настоях з низьким вмістом супутніх барвних речовин – хлорофілів та каротинів тощо.

**Висновки.** Проведена оцінка ефективності методики визначення флавоноїдів з використанням комп'ютерної колориметрії на прикладі настоїв рослинної сировини. Отримані результати засвідчили співставність результатів сканування в RGB-системі з спектрофотометричними визначеннями з урахуванням точності вимірювання для настоїв з пожовтілого листя яблуні та трави вербени. Однак відмінність результатів щодо вмісту рутину для листя смородини та горобини відповідно, потребує проведення досліджень із отримання калібрувальних графіків та виконання розрахунків для комплексів барвних сполук, таких як: хлорофіл-каротиноїдний комплекс, каротиноїдно-антоціановий комплекс.

За отриманими результатами можна стверджувати, що методика є достовірною для рідких рослинних настоїв і може використовуватись для оцінки забарв-

лення інших рідких систем. Використання комп'ютерної колориметрії значно пришвидшує про-

цес аналізу вмісту флавоноїдів та зменшує частину витрат на хімічні реагенти і обладнання.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Бриттон, М.Г. Биохимия природных пигментов / М.: ЭКСМО-Пресс, 2006, 422 с.
2. Маркарян А. А., Абрамов А. А. Хроматографическое изучение фенольного состава сухого экстракта «Нефрофит» // Вестн. Моск. ун-та. Химия, 2003, Т. 44, № 5, С. 356–360.
3. Темердашев З. А., Фролова Н. А., Колычев И. А. Определение фенольных соединений в лекарственных растениях методом обращенно-фазовой ВЭЖХ // Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66, № 4. С. 417–424.
4. Дмитриенко В. А., Кудринская В.А., Апяри В. В. Методы выделения, конденсирования и определения кверцетина // Журн. аналит. химии, 2012, Т. 67, № 4., С. 340–353.
5. Карцова Л. А., Алексеева А. В. Хроматографические и электрофоретические методы определения полифенольных соединений // Журн. аналит. химии, 2008, Т. 63, № 11., С. 1126–1136.
6. Домасев, М.В. Цвет. Управление цветом //СПб.: Питер, 2009. – 224 с.
7. Бобожинова, Г. А. Колориметрический метод идентификации подлинности и контроля качества напитков: дис. канд. техн. наук 05.18.15 / РЭУ им.Г.В. Плеханова, М., 2014. 123 с.
8. Khoddami Ali., Meredith Wilkes A., Roberts Thomas H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds// Molecules, 2013. 18(2).

#### REFERENCES

1. Brytton, M.H. Vyokhymyya pryrodnykh pyhmentov / М.: EKSMO-Press, 2006, 422 p.
2. Markaryan A. A., Abramov A. A. Khromatohrafycheskoe yzuchenye fenolnoho sostava sukhoho ekstrakta «Nefrofyt» // Vestn. Mosk.un-ta. Khymyya, 2003, Т. 44, № 5, S. 356–360.
3. Temerdashev Z. A., Frolova N. A., Kolychev Y. A. Opredelenye fenolnykh soedynenyy v lekarstvennykh rastenyyakh metodom obrashchenno-fazovoy VEZhKh // Zhurn. analyt. khymyy. 2011. Т. 66, № 4. P. 417–424.
4. Dmytryenko V. A., Kudrynskaya V.A., Apyary V. V. Metody vydelenyya, kondensirovaniya y opredelenyya kvvertsetyna // Zhurn. analyt. khymyy, 2012, Т. 67, №4., P. 340–353.
5. Kartsova L. A., Alekseeva A. V. Khromatohrafycheskye y elektroforetycheskye metody opredelenyya polyfenolnykh soedynenyy // Zhurn. analyt. khymyy, 2008, Т. 63, № 11., P. 1126–1136.
6. Domasev, M.V. Tsvet. Upravlenye tsvetom / M.V. Domasev, S.P. Hnatyuk.SPb.,Pyter, 2009, 224 h.
7. Bobozhonova, H. A. Kolorymetrycheskyy metod ydentyfykat-syy podlynnosty y kontrolya kachestva napytkov: dys. kand. tekhn. nauk 05.18.15 / REU ym.H.V. Plekhanova, M., 2014, 123 p.
8. Khoddami Ali.,Meredith Wilkes A., Roberts Thomas H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds// Molecules, 2013. 18(2).

#### Determination of flavonoids in extracts using computer calorimetry

**O. A. Petrusha, K. A. Naumenko**

**Abstract.** The article presents a results of determination of flavonoids in leaves extract of black currant, mountain ash, apple and herb verbena using computer colorimetry and spectrophotometry. Correlation of color RGB-, XYZ-, Lab-properties dependence of quantitative content of flavonoids in aqueous solutions.

**Keywords:** painting, computer colorimetry, color coordinates, pigments.

#### Определение содержания флавоноидов в настоях с использованием компьютерной колориметрии

**О. А. Петруша, К. А. Науменко**

**Аннотация.** В статье представлены результаты определения содержания флавоноидов в настоях с листьев черной смородины, рябины обыкновенной, яблони и травы вербены с использованием компьютерной колориметрии и спектрофотометрии. Установлены корреляционные зависимости между цветовыми RGB-, XYZ-, Lab-характеристиками и количественным содержанием флавоноидов в водных растворах.

**Ключевые слова:** цвет, компьютерная колориметрия, цветовые координаты, пигменты.