

**ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ КРАСИТЕЛИ НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТОВ ЯГОД
ВИНОГРАДА И ЧЁРНОЙ СМОРОДИНЫ**

ИШУНИНА Т.А.

**HISTOLOGICAL DYES BASED ON EXTRACTS OF GRAPE BERRIES AND BLACK
CURRANT**

ISHUNINA T.A.

Кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии (зав. кафедрой – профессор А.В. Иванов), ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Курск.

Получены новые гистологические красители ядерного типа на основе ягод винограда и чёрной смородины, которые можно использовать в качестве аналогов гематоксилина, тионина и крезилового фиолетового. К их достоинствам можно отнести цвет, интенсивность, стойкость и избирательность окрашивания, а также доступность исходного сырья, использование нетоксичных ингредиентов и простоту приготовления красящего раствора. В результате проведенных экспериментов разработаны общие рекомендации для получения качественных основных красителей на основе растительного сырья с высоким содержанием антоцианов.

Ключевые слова: гистологические красители растительного происхождения, виноград, чёрная смородина, ядерный (основной) краситель.

New histological nuclear dyes were obtained from grape berries and black currant. They can be used as analogues of hematoxylin, crezyl violet and thionine. Their advantages include color, intensity, stability and selectivity of the staining, as well as the easy availability of raw materials, usage of nontoxic ingredients and simplicity of preparation of the coloring solution. As a result of the experiments general recommendations were developed to obtain high quality basic dyes based on vegetable raw materials with a high content of anthocyanins.

Key words: histological dyes of vegetable origin, grape, black currant, nuclear (basic) dye.

Введение. Антоциановые пигменты широко распространены в растительном мире, где они окрашивают плоды, листья и цветы растений в различные оттенки от розового до чёрно-фиолето-

вого цвета. Многочисленные положительные и лечебные эффекты антоцианов, связанные прежде всего с их фотопротекторными и антиоксидантными свойствами, объясняют их использование в качестве натуральных красителей в пищевой (для окраски молочных продуктов, напитков, джемов, конфитюров), косметической и фармацевтической промышленности [1, 2, 3]. Сведений об их использовании в качестве красителей для гистологии немного [4]. В предыдущем исследовании нами был предложен ядерный краситель на основе плодов черноплодной рябины, содержащей значительное количество антоцианов [4]. При этом возник вопрос о возможном получении гистологических красителей на основе других источников антоциан-содержащего растительного сырья.

Цель исследования - получить гистологические красители на основе ягод темного сорта винограда «Изабелла» (*Vitis labrusca* x *Vitis vinifera*) и ягод чёрной смородины (*Ribes nigrum* L.) и разработка общих рекомендаций по приготовлению антоциановых гистологических красителей. Ягоды винограда отличаются высоким содержанием фенольных соединений, к которым относятся и антоцианы (собственно флавоноиды). При этом самое высокое содержание флавоноидов отмечено в ягодах сорта «Изабелла» [1]. Основным красящим веществом является моногликозид энидина энин. В ягодах чёрной смородины среди антоциановых соединений следует отметить 3-гликозиды и 3-рутинозиды дельфинидина и цианидина [2]. Интересно, что энидин винограда является эфиром дельфинидина, а цианидин в большом количестве содержится в плодах черноплодной рябины. Так как агликоны антоцианов растворимы в спирте и не растворимы в воде, в качестве экстрагента красящих веществ в настоящей работе использовался этиловый спирт. По данным других авторов [1, 5] для экстрагирования антоцианов также предпочтительным является этанол. Более того, было показано, что применение этанола в качестве экстрагента в значитель-

ной степени увеличивает количество красящих веществ и обеспечивает большую стабильность и максимальную сохранность антоциановых пигментов [6].

Материал и методы исследования.

Свежие ягоды винограда (сорт «Изабелла») или чёрной смородины разминают ступкой, заливают 90% этиловым спиртом, плотно закрывают крышкой, оборачивают фольгой и помещают в защищённое от света место. Через 3-4 дня стеклянную банку с плодами помещают в водяную баню при температуре 90° на 15-20 минут. После охлаждения продолжают настаивать в течение нескольких дней (недели). Затем плоды отжимают и получают тёмно-красный непрозрачный спиртовой раствор (рН 0-1), который можно хранить в течение длительного времени. Непосредственно перед окрашиванием добавляют медный купорос из расчёта 2-2,5 грамма медного купороса на 50 мл раствора. При использовании в качестве сырья ягод тёмных сортов винограда, в качестве протравы помимо медного купороса (рис. 1) можно использовать сульфат магния (рис. 2), железный купорос и алюмокалиевые квасцы. Выбор протравных солей в этом случае повлияет на цвет окрашенных структур. В полученный краситель помещают депарафинированные срезы на 15-20 минут. Возможна более длительная экспозиция до 30-40 минут. Интенсивность окрашивания при этом будет ещё выше. После окраски срезы переносят в 70% спирт на 3-5 секунд, затем по два раза в 96% спирт и ксилол на 35-45 секунд и заключают под покровные стёкла.

Результаты исследования и их обсуждение. Ядра клеток и базофильные структуры

цитоплазмы окрашиваются в фиолетовый цвет (рис. 1, рис. 3). Хорошо визуализируются глыбки хроматина, ядрышки и кариолемма. При окраске нервной ткани (рис. 1, рис. 3) прекрасно идентифицируются цитоархитектонические особенности. Следует отметить высокую избирательность окрашивания. Окраска стойкая. При хранении срезы не обесцвечиваются. Возможно многократное использование красящего раствора в течение нескольких недель. Специальных способов фиксации материала не требуется. Для этой цели достаточно стандартного 10% раствора формалина. Цвет окрашенных структур зависит от типа протравной соли. При использовании медного купороса, ядра и базофильные структуры фиолетового цвета (рис. 1, рис. 3), при добавлении сернокислого магния (для экстракта винограда) эти же структуры красно-фиолетового цвета (рис. 2). Следует отметить некоторое преимущество красителя на основе чёрной смородины (рис. 3), возможно, связанное с тем, что дельфинидины чёрной смородины имеют более интенсивный чёрный цвет и обладают высокой стабильностью [2]. Что касается протравных солей, то наилучшие результаты окрашивания наблюдались при использовании медного купороса.

Проведенные эксперименты позволяют предложить следующие рекомендации для получения основных гистологических красителей на основе растений с высоким содержанием антоцианов. Наиболее подходящим сырьём являются свежие мягкие плоды тёмного цвета. Для экстракции лучше использовать 90% этиловый спирт. При этом, чем дольше экстрагирование (от двух до четырёх недель), тем интенсивнее цвет

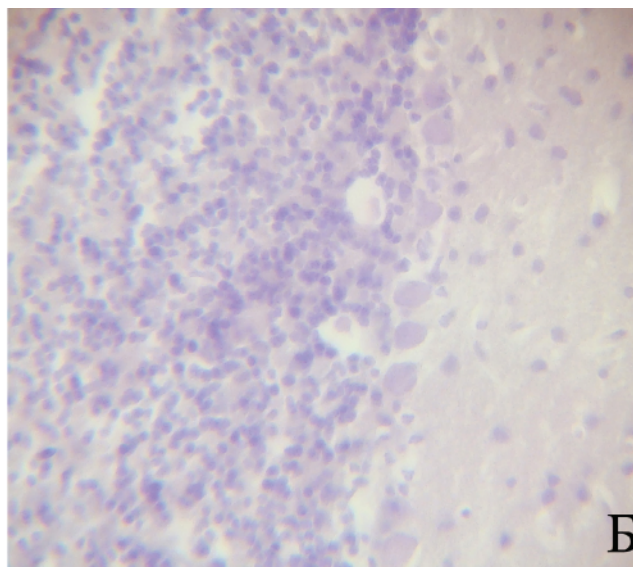
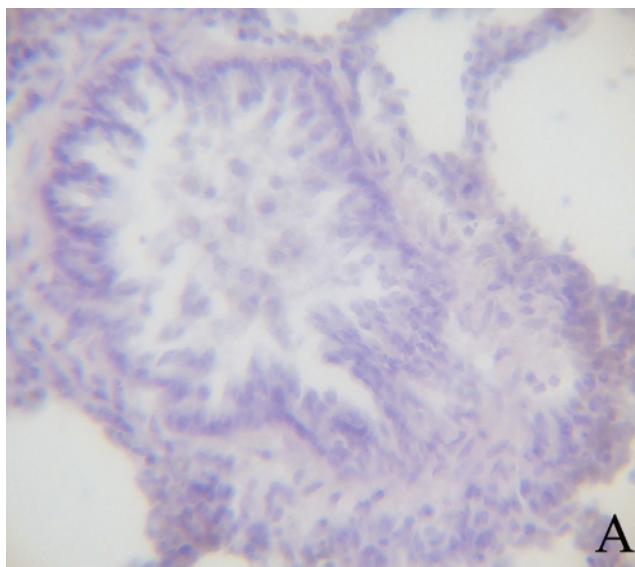


Рис. 1. Окрашивание красителем на основе экстракта винограда с добавлением медного купороса. А. Срез лёгкого крысы. Б. Срез коры мозжечка крысы. Ув.400.

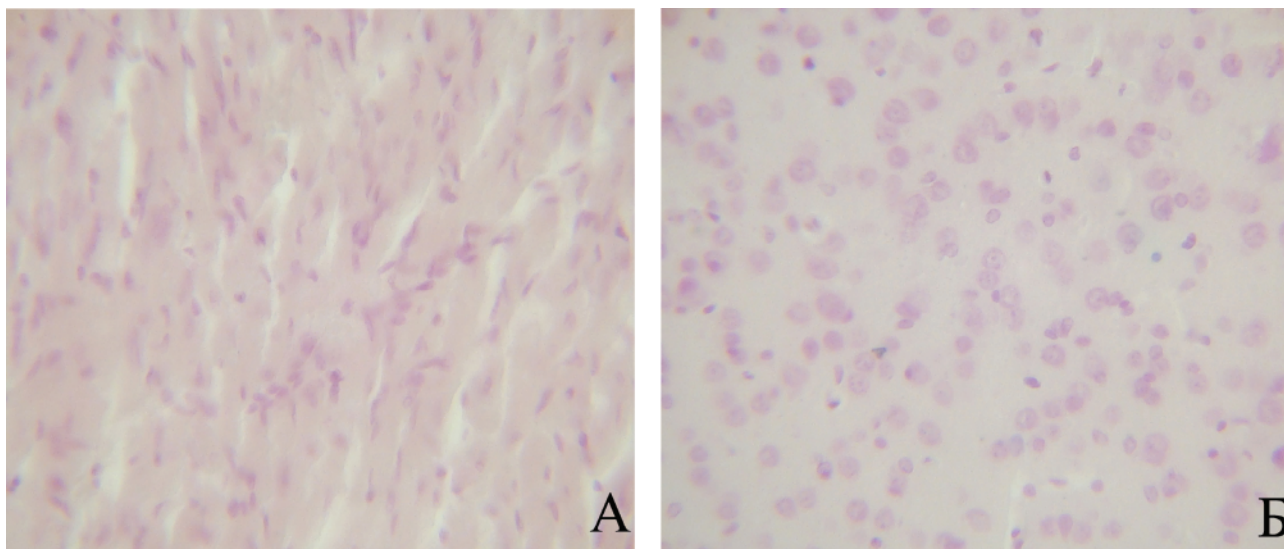


Рис. 2. Окрашивание красителем на основе экстракта винограда с добавлением сульфата магния. А. Срез миокарда крысы. Б. Срез головного мозга крысы. Ув.400.

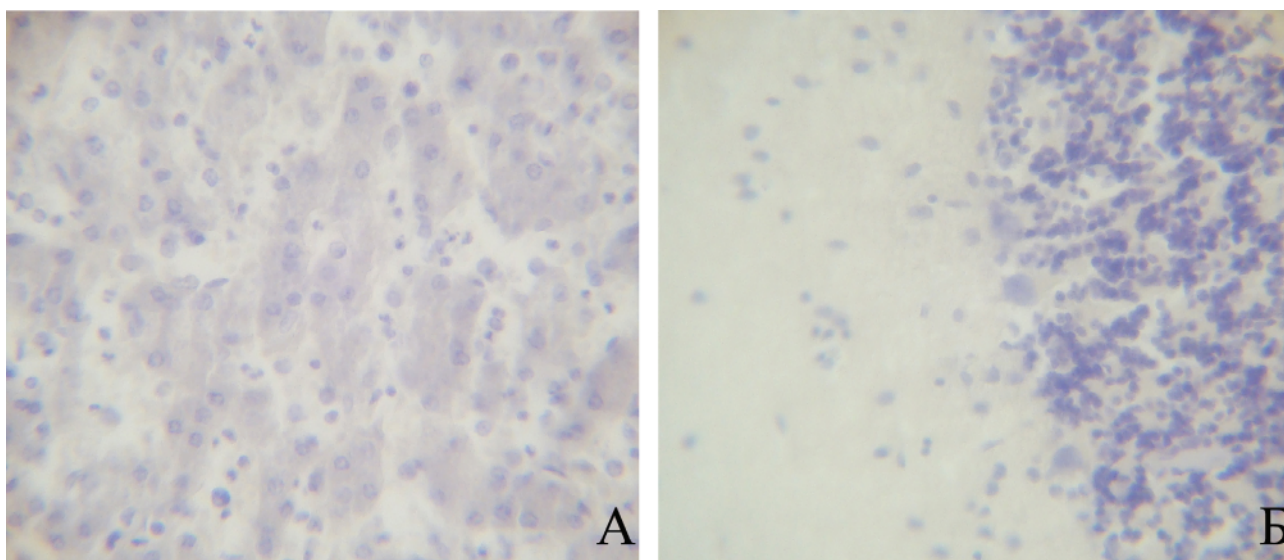


Рис. 3. Окрашивание красителем на основе экстракта чёрной смородины с добавлением медного купороса. А. Срез печени. Б. Срез коры мозжечка. Ув.400.

красителя. В процессе экстракции рекомендуется нагревание в водяной бане (900 в течение 15-20 минут). В полученный после отжима ягод спиртовой раствор перед гистологическим окрашиванием необходимо добавить медный купорос из расчёта 2-2,5 грамма на 50 мл раствора.

Предлагаемый способ подходит для доступного, широко распространённого в Центрально-Чернозёмном районе растительного сырья, отличается лёгкой экстракцией красящих веществ, простотой приготовления красящего раствора и низкой себестоимостью. Немаловажно, что используются нетоксичные ингредиенты. Получаемые красители могут заменить более дорогие, чаще всего импортируемые аналоги.

Химический механизм предлагаемого способа заключается в реакции комплексообразования, в которой участвуют агликоны антоцианов и соли металлов [7]. В структуре агликонов присутствует положительно заряженный оксониевый атом кислорода, образующий донорно-акцепторную связь с атомами металлов-комплексообразователей (медь, железо и др.). В результате, и атом кислорода, отдавший неподелённую пару электронов, и металл-комплексообразователь оказываются в цепочке сопряжённых связей. При этом металл оказывает воздействие на всю сопряжённую систему своей электронной оболочкой и зарядом ядра [7]. Поэтому в зависимости от типа соли, добавляемой в экстракт, будет отличаться окраска

структур, что в настоящей работе наглядно продемонстрировано как для красителя на основе ягод винограда (рис. 1 и рис. 2), так и для красителя на основе чёрной смородины.

Таким образом, для получения ядерных красителей для гистологических целей следует использовать растительное сырьё с высоким содержанием антоцианов. Основной характер получаемых красителей объясняется химической структурой агликонов, в которой присутствует положительно заряженный оксониевый атом кислорода. Благодаря наличию у последнего неподеленной пары электронов, агликоны легко вступают в реакции комплексообразования с металлами, в результате чего образуются дополнительные связи между красителем и окрашиваемой тканью.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Бондакова, М.В., Бутова, С.Н., Солдатова, С.Ю. Получение и использование экстракта красящих веществ винограда в косметических продуктах / Бондакова, М.В., Бутова, С.Н., Солдатова, С.Ю. // Вестник НВГУ. - 2015. - №1.
2. Петрова, С.Н., Кузнецова, А.А. Состав плодов и листьев смородины чёрной *Ribes Nigrum* (обзор) / Петрова, С.Н., Кузнецова, А.А. // Химия растительного сырья. -2014. -№4. -С. 43-50.
3. Переверткина, И.В., Титова Н.Н. Способ получения антоцианового красителя из выжимок тёмных сортов ягод / Переверткина, И.В., Титова Н.Н. // Патент РФ № 2515478. – 2014.
4. Ишунина, Т.А., Солоненко, О.В. Гистологический краситель на основе антоцианов ягод черноплодной рябины (*Aronia melanocarpa*). / Ишунина, Т.А., Солоненко, О.В. // Морфологические ведомости. -2014. -№4. -С. 58-61.
5. Шестернин, В.И., Севодин, В.П. Изучение состава антоцианов винограда «Загадка Шарова» / Шестернин, В.И., Севодин, В.П. // Химия растительного сырья. -2013. -№3. -С. 177-180.
6. Саввин, П.Н., Комарова, Е.В., Болотов, В.М., Шичкина, Е.С. Исследование натуральных каротиноидно-антоциановых красителей / Саввин, П.Н., Комарова, Е.В., Болотов, В.М., Шичкина, Е.С. // Химия растительного сырья. -2010. -№4. -С. 135-138.
7. Михеев, В.В., Миронов, М.М., Абдуллина, В.Х. Химия красителей и крашения. Учебное пособие / Михеев, В.В., Миронов, М.М., Абдуллина, В.Х. // Казань: Изд-во Казан. гос. технол. ун-та, 2009. -81 с.

Авторская справка:

Ишунина Татьяна Александровна, доцент, кандидат медицинских наук; 305041, г. Курск, ул. Карла Маркса 3, КГМУ, кафедра гистологии, 8 9606891979, E-mail: ishunina@gmail.com.