

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 543.637:615.322

СОПОСТАВЛЕНИЕ ДВУХ КЛАССОВ ВОДОРАСТВОРИМЫХ АНТИОКСИДАНТОВ: АНТОЦИАНОВ И БЕТАЦИАНИНОВ

И.И. САЕНКО
В.И. ДЕЙНЕКА
Л.А. ДЕЙНЕКА

*Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет*

e-mail: deineka@bsu.edu.ru

В работе сопоставляются некоторые физико-химические свойства двух природных антиоксидантов: антоцианов и бетацианинов. Проанализировано изменение окраски этих колорантов при изменении pH, определяющее различные диапазоны pH их практического использования. Красящая способность сопоставлена с антиоксидантной активностью антоцианов и бетацианинов – очищенных и исходных экстрактов.

Ключевые слова: антоцианы, бетацианины, диапазон pH растворов, колорант, стабильность, антиоксидантная активность.

Введение. Свободные радикалы являются промежуточными частицами, возникающими в организме по различным, в том числе и по естественным, механизмам. Для нейтрализации естественно образующихся свободных радикалов организм человека обладает собственной антиоксидантной ферментативной системой, но она не рассчитана на повышенное образование свободных радикалов – следствия оксидативного стресса современного общества. Поэтому для профилактики множества заболеваний, сопутствующих чрезмерному образованию свободных радикалов, необходимо использование «скорой помощи» – природных антиоксидантов, которыми богаты определенные виды пищи. Исследования в некоторых странах Европы показали, что причиной участвовавших случаев сердечных и онкологических заболеваний был недостаток в пище антиоксидантов, и изменение рациона питания очень скоро приводило к благоприятным изменениям в клинико-эпидемиологической ситуации.

Все антиоксиданты можно условно разделить на две большие группы – водорастворимые и жирорастворимые, выполняющие свои функции в тканях различной липофильности. К природным водорастворимым антиоксидантам, обладающим окраской от красной до фиолетовой, относятся два класса синтезируемых растениями гетероциклических соединений: антоцианы (I) и бетацианины (II) (рис. 1).

Несмотря на принципиальные различия в строении, эти вещества в кислых растворах обладают красной окраской с близкими значениями λ_{\max} , поэтому известны научные публикации, в которых даже тип красных пигментов был определен неправильно [1]. Отметим, что к настоящему времени не обнаружены растения, в которых оба типа пигмента накапливались бы одновременно [2].

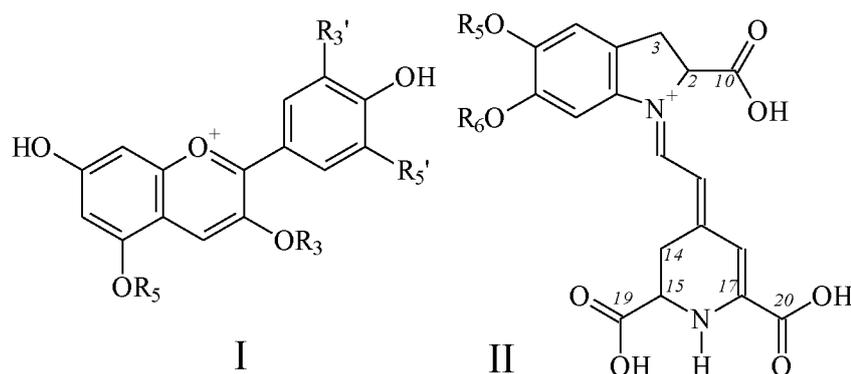


Рис. 1. Обобщенное строение антоцианов и бетацианинов

Антоцианы встречаются заметно чаще бетацианинов; они обеспечивают окраску в цвета от красного до иссиня-черного цветкам, плодам, листьям большинства растений. Бетацианины встречаются заметно реже – их распространение ограничено растениями порядка гвоздичноцветные (Cariophyllales, кроме семейств гвоздичные, Sanguiflorales, и моллюгиновые, Molluginaceae): они также могут окрашивать цветки, плоды (и корнеплоды), листья и т.д. [3]. Из хорошо известных растений бетацианины, прежде всего, накапливаются в корнеплодах красной столовой свеклы, успешно выращиваемой на территории России, а также в листьях амаранта, пурпурный цвет которых определяется наличием пигментов этого класса [4]. Основным бетацианином свеклы является бетанин (R_5 = глюкозильный радикал на рис. 1), в то время как доминирующий бетацианин амаранта (амарантин) содержит в положении 5 более сложный заместитель – глюкоронилглюкозидный радикал [5].

Антоцианам и бетацианинам приписывается разнообразная биологическая активность, в том числе и антиканцерогенная, что позволяет использовать их не только в качестве красящих компонентов, но и для профилактики и лечения ряда заболеваний. При решении задачи выбора красителя из этих двух классов для использования в пищевой или фармацевтической промышленности следует учитывать диапазон значений pH продукта, т. к. особенно молекулы антоцианов чувствительны по отношению к кислотности среды и могут потерять окраску, переходя в бесцветные формы. И, несмотря на то, что известно большое число опубликованных работ по исследованию свойств антоцианов и бетацианинов, исследования по сопоставлению этих двух классов колорантов нами не обнаружены.

Целью работы явилось сопоставление ряда важных для пищевой и фармацевтической промышленности физико-химических свойств природных антоцианов и бетацианинов.

Материалы и методы. Антоцианы и бетацианины выделяли настаиванием растительного материала в 0.1 М водном растворе HCl. Экстракты отфильтровывали и очищали методом твердофазной экстракции на патронах ДИАПАК C18.

Состав и строение объектов исследования определяли методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием хроматографа Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектором. Хроматографическая колонка 250×4.6 мм Kromasil 100-5C18 использовалась при определении бетацианинов в элюенте 5 об.% ацетонитрила и 2 об.% муравьиной кислоты в воде, 1 мл/мин. Хроматографическая колонка 250×4.6 мм Symmetry C18 использовалась при определении антоцианов в элюенте 9 об.% ацетонитрила и 10 об.% муравьиной кислоты в воде, 1 мл/мин.

Для исследования зависимости спектральных характеристик пигментов экстракты переносили в растворы, pH которых доводили до заданного при контроле прибором pH-150M, и спектрофотометрировали на спектрофотометре СФ-56 в стеклянных кюветах.

Измерение АОА производили на приборе «Цвет Яуза 01-АА» с вольт-амперометрическим детектором при постоянстве напряжении 1,3В в постоянно-токовом режиме (АД п.т.). В качестве элюента использовали 2.2 мМ раствор ортофосфорной кислоты. Скорость подачи элюента 1.2 см³/мин.

Результаты и обсуждения. Сопоставление окраски растворов антоцианов и бетацианинов.

Экстракты антоцианов и бетацианинов в кислых водных растворах имеют красную окраску и трудно различимы по этому свойству, Впрочем, для антоцианов, построенных на различной основе (на различных агликонах-антоцианидинах), можно видеть некоторое изменение окраски: при переходе от производных пеларгонидина к производным антоцианов цианидинового и дельфинидинового рядов красная окраска с алым оттенком заменяется на чисто красную и далее появляются фиолетовый оттенок. В настоящей работе использовали растворы антоцианов чая «Каркадэ», представленные смесью 3-самбубиозиидов цианидина и дельфинидина [6].

Результаты исследования спектров растворов антоцианов (А) и бетацианинов (Б) в водных растворах при различных рН приведены на рис. 2, 3.

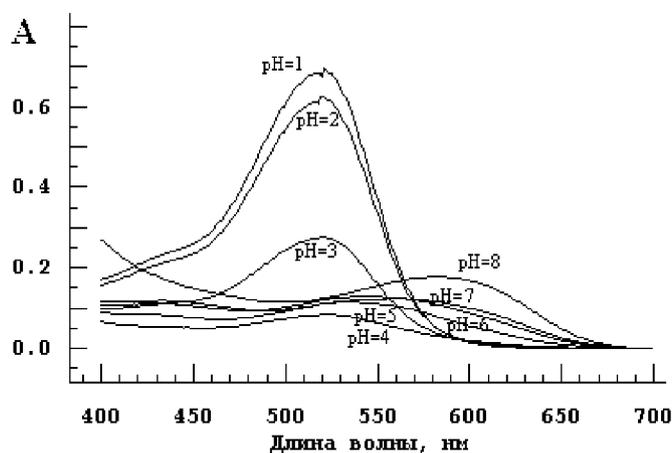


Рис. 2. Спектры растворов антоцианов при различных рН

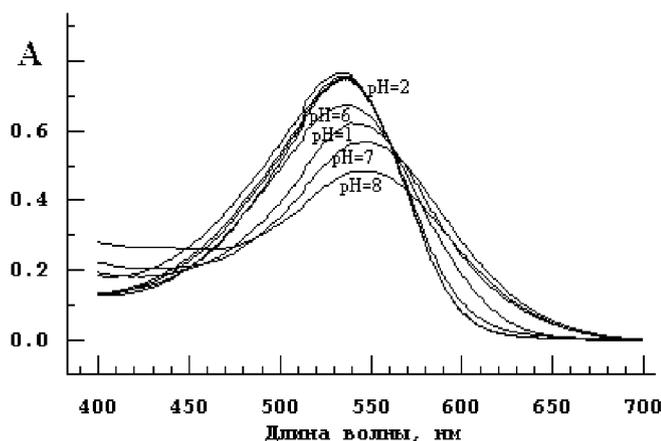


Рис. 3. Спектры растворов бетацианинов при различных рН

Как видно из представленных данных, интенсивность окраски антоцианов быстро снижается при увеличении рН от 1,0 и растворы практически обесцвечиваются при рН=4.5. Дальнейшее увеличение рН приводит к появлению грязно-зеленого, неприемлемого для технологических целей цвета; следовательно, применение антоцианов в качестве колорантов ограничено нижним пределом рН (менее 4.5). Изменения в спектрах бетацианинов в том же диапазоне рН также видны, но не являются критич-

ными: цвет практически не изменяется, а происходит лишь изменение интенсивности окраски (рис. 4).

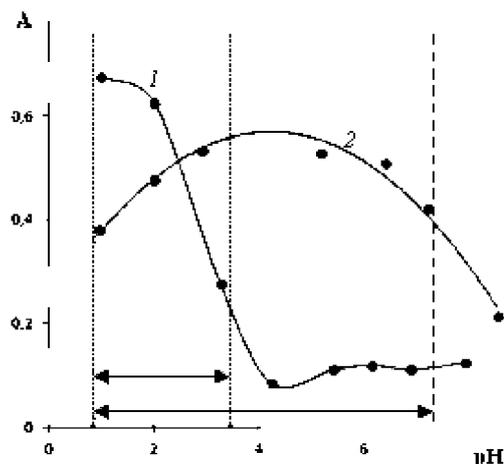


Рис. 4. Изменение интенсивности окраски антоцианов (1) и бетацианинов (2) как функция рН при $\lambda(1)=520$ нм и $\lambda(2)=537$ нм

Следовательно, возможный диапазон использования бетацианинов существенно шире по сравнению с антоцианами – от кислых до нейтральных и даже слабощелочных растворов.

Таким образом, несмотря на схожесть окраски антоцианов и бетацианинов в кислых растворах, различие становится более чем очевидным в растворах, близких к нейтральным, что может быть использовано для простой и эффективной дифференциации типа колорантов в растительных материалах.

Важным параметром колорантов кроме диапазона рН является их устойчивость при хранении. Сохранность антоцианов зависит от рН: в кислых растворах антоцианы обычного строения достаточно устойчивы – при 4°C растворы могут храниться в течение нескольких месяцев. В нейтральных растворах антоцианы, переходя в полуацетальную форму, превращаются в *цис*-халконы, которые в свою очередь изомеризуются в *транс*-форму, из которой возврат во флавилиевую форму весьма проблематичен. По нашим наблюдениям, лишь специфические антоцианы (из лепестков цветков алыс-ромерии), содержащие гидроксильную группу в положении 6, относительно быстро разрушаются и в кислой среде (при рН = 1÷3).

В отличие от антоцианов бетацианины не обладают такой же стабильностью при хранении – экстракты бетацианинов практически полностью обесцвечивались за два-три месяца при хранении при 4°C (в бытовом холодильнике). Выполненные нами исследования показали, что скорость исчезновения окраски бетацианинов зависит от рН (табл. 1).

Таблица 1

Сохранность бетацианинов при хранении при различных рН

рН растворов	Сохранность бетацианинов, % при хранении в течение указанного времени			
	0 суток	12 суток	44 суток	74 суток
1,0	100	47,5	15,1	4,0
4,5	100	85,8	65,6	50,3
7,0	100	74,5	54,0	40,9
10,0	100	45,4	22,0	13,0

Наименьшая скорость разрушения бетацианинов в водных растворах с ацетатными буферами найдена нами в диапазоне: $4.5 < \text{pH} < 7$.

Поэтому лучшим способом хранения бетацианинов можно считать хранение в сухом виде, получаемом при лиофильной сушке очищенных экстрактов бетацианин-содержащего сырья.

Сопоставление антиоксидантной активности. Антиоксидантная активность – это свойство соединений, которому уделяют очень много внимания, тем не менее оно к настоящему времени не имеет строгих химических критериев. Если биологи подвергают сомнению возможность переноса данных, получаемых обычно *invitro*, на условия *invivo*, то с точки зрения химии следовало бы разделить экспериментально определяемые параметры по типам заключенной в них информации. Действительно, для любых химических процессов можно рассматривать практически независимо друг от друга две характеристики – кинетическую и термодинамическую [7]. С точки зрения термодинамики антиоксидант – вещество, способное вступать в реакцию с конкретным окислителем (в том числе и со свободными радикалами). По отношению к кислороду все органические соединения являются антиоксидантами, поскольку все они могут самопроизвольно превратиться в оксид углерода (IV), воду и некоторые обычные соединения остальных химических элементов, которые могут входить в их состав.

Для водных растворов возможность протекания окислительно-восстановительного процесса определяется лишь соотношением электродных потенциалов окислителя (свободного радикала) и восстановителя (антиоксиданта). Но в таком случае в качестве окислителя может быть использовано любое устройство, способное отнимать электроны у антиоксиданта, например, анод электрохимической ячейки. Понятно, что при этом не только исходный антиоксидант, но и продукт его окисления по первой стадии, по второй и т. д. также могут выступать в качестве антиоксидантов в последовательной череде реакций на электроде. Все протекающие процессы могут быть количественно оценены амперометрическим методом при заданном потенциале на электроде, с определением суммарной (емкостной) антиоксидантной активности соединения. Именно эти идеи были использованы при создании прибора для определения антиоксидантной активности «ЦВЕТ ЯУЗА – 01-АА» [8], использованного в настоящей работе.

При экстракции пигментов из растительного сырья совместно с красящими компонентами извлекается набор сопутствующих веществ, которые также могут обладать биологической активностью, но отрицательно сказываться на некоторых эксплуатационных свойствах колоранта. Поэтому выделение колорантов из сложных природных матриц, являющееся одной из важных технологических стадий соответствующих производств, может привести к изменению ряда свойств экстрактов, включая антиоксидантную активность. Поэтому оценка таких изменений представляет интерес, например, при выборе способа очистки.

Результаты исследования антиоксидантной активности, отнесенной к единице оптической плотности (что представляется особенно важным при сопоставлении колорантов), для исходных экстрактов и очищенных методом твердофазной экстракции на обращенно-фазовых сорбентах, представлены в табл. 2. Результаты отнесены к антиоксидантной активности растворов аскорбиновой кислоты.

Таблица 2

Сопоставление антиоксидантной активности растворов бетацианинов и антоцианов

Объект	АОА*, моль/л
Бетацианины свеклы (неочищенные)	101.5±3.8%
Бетацианины свеклы (очищенные)	27.7±2.8%
Антоцианы чая «Каркадэ» (неочищенные)	183.1±4.6%
Антоцианы чая «Каркадэ»(очищенные)	88.4±1.4%

АОА* – антиоксидантная активность, отнесенная к единице оптической плотности, выраженная в единицах концентрации аскорбиновой кислоты.

Как следует из представленных данных, очистка во всех случаях приводила к падению антиоксидантной активности. Это свидетельствует о том, что исходные экстракты содержат и другие вещества, обладающие антиоксидантной активностью, но не сорбирующиеся на С18-фазах. При этом уменьшение АОА при очистке экстрактов свеклы примерно вдвое больше, чем при очистке экстрактов «Каркадэ». Очевидно



также и то, что при одинаковой интенсивности окраски антиоксидантная активность антоцианов выше, чем бетацианинов, хотя это преимущество антоцианов ограничено кислыми растворами.

Выводы. Антоцианы и бетацианины являются природными соединениями, которые могут быть использованы в качестве колорантов, обладающих высокой антиоксидантной активностью. При этом возможность использования антоцианов в качестве колорантов жидких объектов ограничена довольно кислыми средами, в то время как для бетацианинов интервал возможных рН существенно шире, но они обладают меньшей стабильностью при хранении в фазе растворов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ «Государственное задание вузу на 2012 г., проект №3.1785.2011».

Литература

1. Куликов, Ю.И. Перспективы использования натурального красителя «Лаконос Американский» при производстве колбасных изделий / Ю.И. Куликов, Н.К. Дадян // Вестник Северо-Кавказского государственного технического университета. – 2008. – № 3 (16). – С. 1997-9541.
2. Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health / D.A. Moreno [et al.] // J. Phytochem. – 2008. – P. 261-280.
3. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids / Y. Tanaka [et al.] // Plant J. – 2008. – V.54. – P. 733-749.
4. Cai, Y. Amaranthus Betacyanin Pigments Applied in Model Food Systems // J. Food Sci. – 1999. – V. 64. – P. 869-873.
5. Betalain Stability and Degradation—Structural and Chromatic Aspects/M.H. Kirsten [et al.] // J. Food Sci. – 2006. – V. 71. – P. 41-50.
6. Selective extraction, separation, and identification of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. using solid phase extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry (time-of-flight/ion trap) / A.Segura-Carretero [et al.] // Electrophoresis. – 2008. – V.29. – P. 2852-2861.
7. Параметры антиоксидантной активности соединений: относительная антиоксидантная активность чая / И.П. Анисимович, В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, П.А. Фролов, П.А. Мясникова // Научные ведомости БелГУ – 2010.– № 9(80) – Вып. 11 – С. 104-111.
8. Яшин, А.Я. Инжекционно-проточная система с амперометрическим детектором для селективного определения антиоксидантов в пищевых продуктах и напитках / А.Я. Яшин // Рос. хим. журнал (Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). – 2008. – Т. 52, № 2. – С.130-135.

COMPARISON OF TWO WATER-SOLUBLE ANTIOXIDANT CLASSES: ANTHOCYANINS AND BETACYANINS

I.I. SAENKO
V.I. DEINEKA
L.A. DEINEKA

*Belgorod National
Research University*

e-mail: deineka@bsu.edu.ru

The paper compares some of the physico-chemical properties of two natural antioxidants i.e. anthocyanins and betacyanins. The change of colour of the colorant in the change of pH, indicating the different pH ranges for their practical use is determined. The ink capacity was compared with the antioxidant activity of anthocyanins and betacyanins – peeled and source extracts.

Key words: anthocyanins, betacyanins, the range of pH, colorant, stability and antioxidant activity.