

УДК 543.421/424:543.64

СОХРАННОСТЬ И ПЕРЕХОД МЕЖДУ ФОРМАМИ АНТОЦИАНОВ В РАСТВОРАХ

Дейнека Л.А., Блинова И.П., Кульченко Я.И., Озер П.С., Саенко И.И., Дейнека В.И.
ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
Белгород, e-mail: deyneka@bsu.edu.ru

Проведен анализ требования выдержки растворов антоцианов при pH = 1 в течение 15 мин (и не более 1 ч) по используемой во всем мире методике и по ГОСТ, принятому в РФ. В исследовании использованы экстракты трех растительных источников – плодов черники и паслена черного, а также оберток пурпурной кукурузы. Из стартового экстракта были приготовлены три раствора с различными значениями pH. Перед спектрофотометрическим определением из каждого из них были приготовлены растворы с pH = 1, оптическую плотность которых контролировали в течение времени, превышающего нормативный 1 час. В итоге было показано, что в общем случае время, необходимое для установления равновесия после скачкообразного уменьшения кислотности от pH = 3 (имитация среды соков) и pH = 4,5 до pH = 1 может превышать сутки; но процесс более чем на 98% завершается при выдержке в течение 6 ч. По этой причине недоопределение антоцианов при выдержке раствора при pH = 1 менее 1 ч может достигать 8–9%. Кроме того, установлено, что выдержка экстрактов неацелированных антоцианов при pH = 3 или 4,5 может привести к безвозвратным потерям от 10 до 20% антоцианов исходного экстракта, увеличивающимся с ростом выдержки при этих pH; в случае ацелированных антоцианов потери значительно снижаются.

Ключевые слова: спектрофотометрия, антоцианы, соотношение форм, растворы, pH, стабильность, скорость

STABILITY AND RATES OF INTERCONVERSION BETWEEN ANTHOCYANIN FORMS IN SOLUTION

Deyneka L.A., Blinova I.P., Kulchenko Y.I., Ozer P.S., Saenko I.I., Deyneka V.I.
Belgorod National Research University, Belgorod, e-mail: deyneka@bsu.edu.ru

The analysis of requirements to measure the solution absorption at pH = 1 after 15 and no more than 1 h from the time of solution preparation according worldwide accepted method as well as to the State Standard, adopted in the Russian Federation has been done in the paper. The study used extracts from three plant sources – fruits of blueberries and black nightshade, as well as of purple corn husk. From the initial extracts three solutions with different pH values were prepared. Before spectrophotometric determination, for each of them the acidity was returned to pH = 1, and the optical density was monitored over time exceeding 1 hour. Finally it was shown that in general case the time required to establish equilibrium after an abrupt increase in acidity from pH = 3 (simulation of acidic fruit juices) and pH = 4,5 to pH = 1 can exceed the day; but the process is more than 98% is completed after 6 h. For this reason, underestimation of anthocyanin content in the extract solution can reach 8–9%. Furthermore it is established that exposure of non acylated anthocyanin extracts at pH 3 or 4,5 may result in irreversible loss of 10 to 20% of the source anthocyanins, increasing with the growth of exposure at this pH while in the case of acylated anthocyanins losses are significantly reduced.

Keywords: spectrophotometry, anthocyanins, the ratio of forms, solutions, pH, stability, rate

Антоцианы являются подклассом флавоноидов, их особенность – высокая растворимость в воде, существование в растворах нескольких pH-зависимых и независимых форм, некоторые из которых обладают окраской, а также высокая антиоксидантная активность и связанная с ней высокая биологическая активность [3]. В сфере интересов ученых антоцианы находятся с начала 20-го века, поэтому к настоящему времени накоплена обширная информация о свойствах этих соединений, которая, к сожалению, не всегда учитывается в современных работах. Так, например, при спектрофотометрическом определении антоцианов [1, 6] в пересчете на цианидин-3-глюкозид (или на мальвидин-3-глюкозид), выполняемом по принятой во всем мире методике, измеряют оптическую плотность растворов при двух pH для исключения из суммы полимерных антоцианов. При этом,

во-первых, не совсем понятно, зачем делают такое исключение, поскольку никто не анализировал влияние присутствия полимерных антоцианов ни на красящие свойства, ни на антиоксидантные свойства сложных смесей антоцианов. Но, во-вторых, наиболее любопытно требование выдержки раствора после понижения установления pH (1,0 или 4,5) 15 мин и не более 1 ч. По мнению авторов [6], при большей выдержке возможно получение завышенных показаний спектрофотометра (*All measurements should be made between 15 min and 1 hr after sample preparation, since longer standing times tend to increase observed readings*). Это довольно странно, поскольку дополнительный биосинтез антоцианов в экстрактах при pH = 1, представляется маловероятным. Настоящая работа посвящена экспериментальному анализу обоснованности данного требования.

Экспериментальная часть

Для проведения исследований в настоящей работе были выбраны антоцианы экстрактов плодов паслена черного и черники, а также антоцианы экстракта обертки пурпурной кукурузы. Антоцианы первого источника представлены ацилированными гидроксикоричными кислотами 3,5-дигликозилированных производных антоцианидинов дельфинидинового ряда [2]; они были выбраны в качестве наиболее стабильных (по литературным данным) антоцианов [7]. Во втором случае в экстракте обнаруживают сложную смесь простых моногликозидов антоцианидинов дельфинидинового и цианидинового рядов [3], а в третьем случае в антоциановом комплексе преобладают производные только цианидина, большей частью ацилированные малоновой кислотой [4].

в красные тона – от оранжевого до синеватого оттенков ($\lambda_{\max} = 490\text{--}530\text{ нм}$), – в зависимости от строения. Считается, что при pH = 1 и ниже на ее долю в растворах приходится основная часть антоцианов. При повышении pH флавилиевая форма переходит в форму псевдооснования (полуацетальную), II. Эта форма не окрашена, – максимум абсорбции находится в коротковолновой области (около 270 нм). Полуацетали изомеризуются до цис- и транс-халконных форм (III и IV), которые должны иметь лишь немногим более длинноволновые максимумы абсорбции в УФ-диапазоне (330 и более нм) (рис. 1).

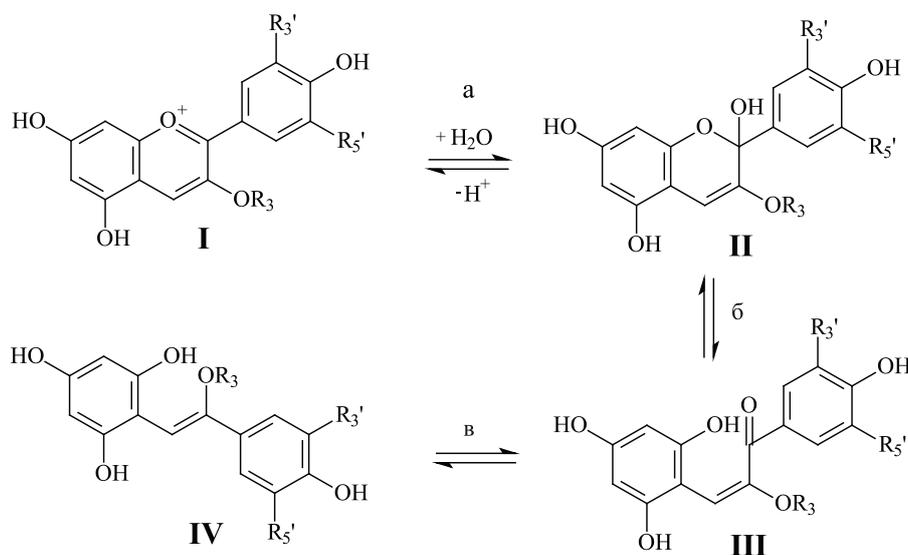


Рис. 1. Равновесия между четырьмя формами антоцианов

Экстракты получали настаиванием растительного материала в 0,1 М водном растворе HCl с последующим отделением экстракта от остатка фильтрованием через бумажный фильтр. Заданное значение pH (перед пробоподготовкой к спектрофотометрическому определению) устанавливали добавлением к аликвотной порции экстракта 1 М водных растворов HCl и NaOH с потенциометрическим контролем реакции среды (рН-метр Эксперт-рН, стеклянный комбинированный электрод ЭСК-1). Перед измерением оптической плотности растворов (спектрофотометр Shimadzu UV-2550, кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см) растворы готовили по методике [6].

Результаты исследования и их обсуждение

В средах от сильнокислых до слабокислых антоцианы могут существовать в виде четырех различных структур, между которыми устанавливается равновесие. Наиболее важна (как природный краситель) флавилиевая форма, I, в водных растворах окрашенная

Рассмотрим равновесие (а) между флавилиевой формой антоцианов (A⁺, I) и полуацетальной (B, II), которое можно представить уравнением



Такое равновесие описывается кажущейся константой равновесия (K):

$$K = \frac{[B] \cdot [H^+]}{[A^+] \cdot [H_2O]} \quad (2)$$

Если при одинаковой суммарной концентрации антоцианов изменять pH раствора, то характеристическая (для многих производных цианидина с максимумом абсорбции в районе 510–515 нм) окраска раствора будет ослабевать вследствие образования бесцветной полуацетальной формы B:

$$\frac{I_i}{I_0} = \frac{[A^+]}{[A^+] + [B]} = \frac{[A^+]}{[A^+] + [A^+] \cdot K \cdot [H_2O] / [H^+]} = \frac{[H^+]}{K^* + [H^+]} \quad (3)$$

Введенная константа K^* определяется как $K \cdot [H_2O]$. При этом результаты моделирования изменения окраски, представленные на рис. 2, показывают, что для значений констант на границах интервала (0,001; 0,003) следует ожидать недоопределения антоцианов из-за неполного превращения (на 1 и 3% соответственно) их во флавилиевую форму, а также из-за неполного обесцвечивания (на 3 и 1% соответственно) при переходе в форму полуацетала. При этом как рост, так и уменьшение константы приведет только к увеличению недоопределения антоцианов из-за крутых спуска и подъема кривых на рис. 2.

чем четырехкратного объем ацетатного буфера, без контроля pH полученного раствора, строго говоря, некорректно. Растительные экстракты также представляют собой буферные растворы, поэтому и буферной емкости добавки может не хватить для достижения $pH = 4,5$.

Из литературных данных известно, что равновесия (рис. 1, а и б) устанавливаются быстро, но равновесие (рис. 1, в) – очень медленно [8], хотя представить себе возврат менее напряженной структуры IV в стерически напряженную структуру III трудно. В другой работе [9] в качестве медленной стадии рассматривается

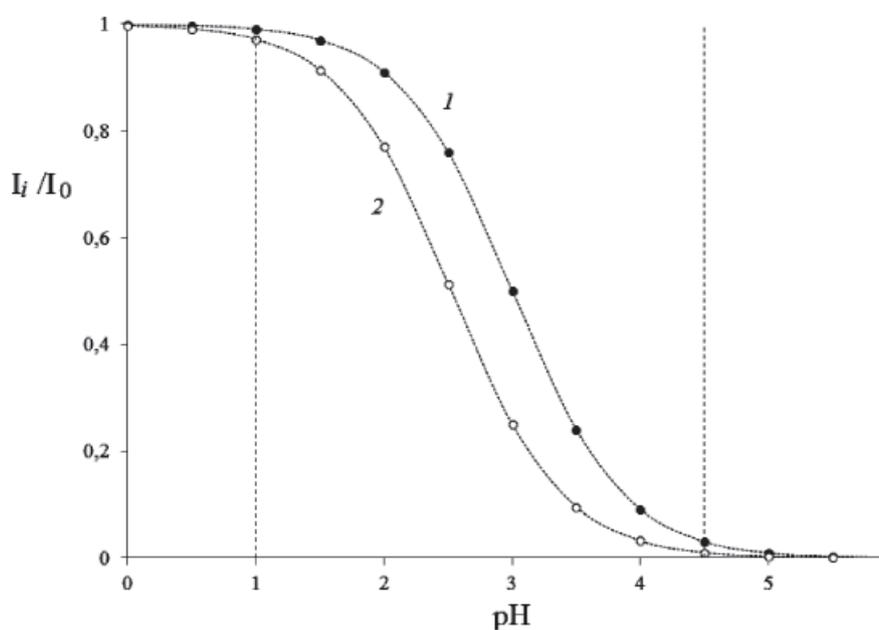


Рис. 2. Моделирование изменения интенсивности окраски раствора антоцианов в зависимости от pH и константы гидратации флавилиевого иона: $K^* = 0,001$ (1) и $0,003$ (2)

Вовлечение халконных форм (при установлении равновесия) ничего не меняет, поскольку равновесие между этими формами не зависит от pH. Таким образом, выбор pH трудно считать обоснованным. Действительно, тенденция к снижению оптической плотности при повышении pH ниже $pH = 4,5$ была установлена нами для ряда экстрактов. Впрочем, значительное повышение pH может привести к появлению окрашенных хиноидных структур, а неполнота определения антоцианов при использовании указанных pH может быть скорректирована изменением (уменьшением на 4%) коэффициента молярного погашения. Следует также учитывать, что предложение добавлять к экстракту более

переход II в III, а возврат трансхалконной формы IV в III и далее через II в I возможен при УФ-облучении или под действием кислотного катализа.

В настоящей работе мы исследовали поведение в растворах не индивидуальных соединений, а экстрактов, которые кроме антоцианов могут содержать сопутствующие экстрактивные вещества; именно этот случай имеет первостепенное значение для реального определения суммы антоцианов в исследуемых объектах. При этом эксперимент был проведен так, что каждый из исходных экстрактов делили на три равные части, создавая в одной из них $pH = 1$ (что требуется по методике [1]). В другой части pH повышали до ~ 3 (имитация соков или

иных прохладительных напитков, которые могут быть стартовым материалом), а в третьей – $\text{pH} \sim 4,5$ (для полного, по мнению составителей методик [1, 6], перехода антоцианов из I в II–IV. Затем после выдержки в течение примерно 1 ч получали по три раствора для каждого объекта с одинаковой суммарной концентрацией антоцианов, в которых pH был возвращен до $\text{pH} = 1$ – для определения антоцианов.

В результате выполненных исследований было установлено, что в случае экстракта плодов черники всех трех растворов (с $\text{pH} = 1; 3$ и $4,5$) после возврата к $\text{pH} = 1$

наблюдается далеко не мгновенное превращение всех форм в I (рис. 3). Выдержка раствора даже в течение 1 ч (не говоря уже о 15 мин) недостаточна для возврата к равновесной концентрации флавилиевой формы – недоопределение антоцианов по методикам, предложенным в [1, 6], находится на уровне 2,5–3,5 процентов и вырастает до 5–7% при выдержке в течение 15 мин. При этом увеличение выдержки до 1 суток (по нашим данным) приводит обычно к росту оптической плотности растворов еще на 1–2%, хотя иногда этот рост компенсируется разрушением антоцианов.

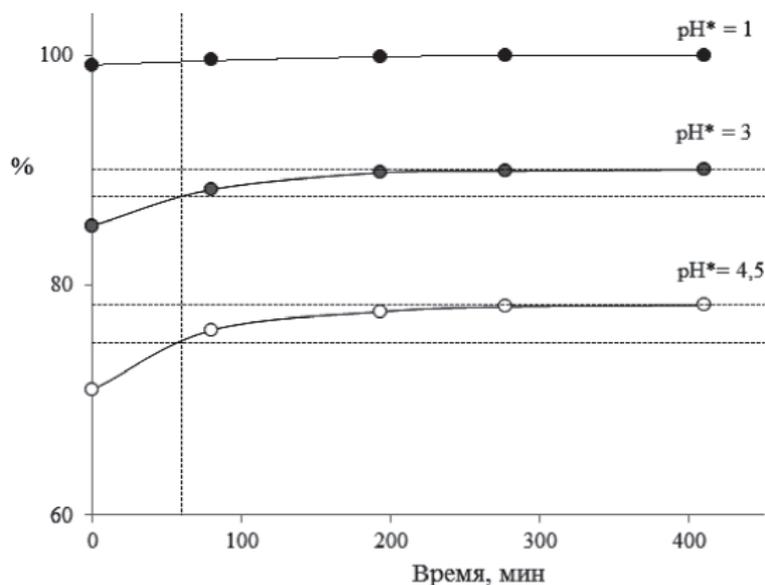


Рис. 3. Превращение во флавилиевую форму антоцианов плодов черники при возврате pH к 1 от трех различных стартовых pH^*

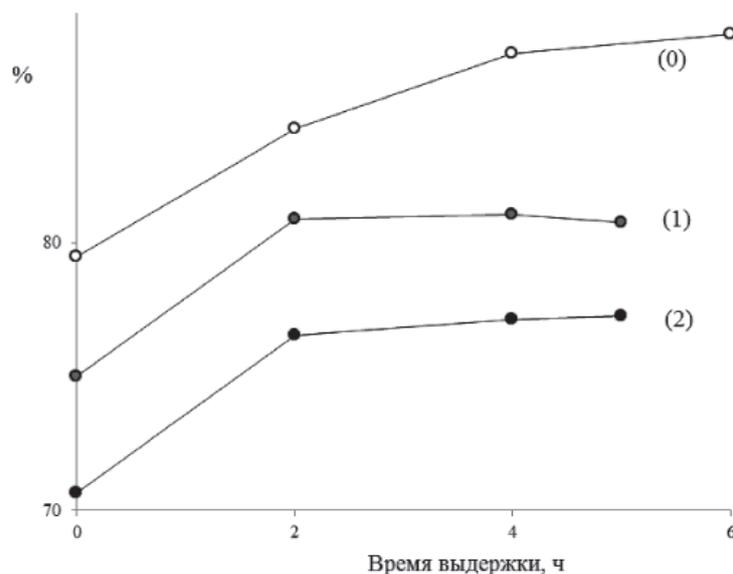


Рис. 4. Возврат к флавилиевой форме антоцианов плодов черники после хранения при $\text{pH} = 4,5$ в течение 0; 1 и 2 суток (числа в скобках) после возврата к $\text{pH} = 1$

При исследовании стабильности антоцианов растворы выдерживали при pH = 3 и при pH = 4,5 в течение 0, 1 и 2-х суток с последующим возвратом к pH = 1. В результате выполненной работы было установлено, что необратимые потери антоцианов даже при небольшой выдержке оказываются весьма значительными – от 10 до 21% при минимальной выдержке и с тенденцией к росту потерь с увеличением pH промежуточного раствора и времени выдержки такого раствора (рис. 4).

Причин таких потерь может быть несколько – от окисления менее устойчивых по отношению к внешним воздействиям форм II–IV до образования формы IV, не превращающейся обратно в III в условиях проведения эксперимента. Дифференциация и определение типа потерь можно выполнить, исследуя индивидуально выделенные антоцианы, но в данной работе мы основное внимание уделяем образцам, для контроля концентрации антоцианов в которых и разработана методика [5]. Но в целом полученные данные не противоречат идее о том, что равновесие (б) устанавливается не мгновенно, а равновесие (в) вообще трудно достичь, при быстрой скорости превращения цис-халконной формы в трансхалконную. Так при pH = 3 на долю флавилиевого иона может приходиться менее половины антоцианов (по графику на рис. 2), а при pH = 4,5 флавилиевая форма остается только в небольших количествах (до 5%). То есть доля, приходящаяся на полуацетальную форму, в первом случае изначально примерно вдвое меньше, чем во втором. Соответственно, в тех же соотношениях будут находиться цис-халконные формы, и тогда понятно, почему безвозвратных потерь (из-за перехода в транс-форму) во втором случае вдвое больше, чем в первом. В принципе, увеличение безвозвратных потерь с ростом времени выдержки раствора при «неблагоприятных» для флавилиевой формы pH, рис. 4, также укладывается в высказанную идею, хотя для строгих выводов следует провести работу по исключению возможности окисления продуктов кислородом воздуха.

Для аналогичного эксперимента с экстрактом плодов паслена черного безвозвратные потери антоцианов оказались существенно меньшими (около 5% при минимальной выдержке растворов), что подтверждает большую устойчивость антоцианов, ацилированных замещенными коричными кислотами, по сравнению с простыми гликозидами антоцианидинов [7]. Причиной такой устойчивости может быть

стабилизация форм I и II за счет внутримолекулярного стэкинга – упаковки кольца В флавилиевой основы и ароматического кольца радикала пара-кумаровой кислоты, ацилирующей рутинозидный фрагмент структуры. Такой стэкинг-эффект может обеспечить жесткость конструкции антоцианов и, как следствие, к большим энергетическим барьерам на пути превращения псевдооснования в халконные формы.

В случае антоцианов оберток початков кукурузы, особенность которых – ацилирование малоновой кислотой, невозвратные потери антоцианов также не превышали 5%, но наблюдался более медленный и длительный возврат к флавилиевой форме. Такое поведение не удивительно, поскольку повышение не удивительно, поскольку повышение стабильности (без указания причин этого повышения) для антоцианов, ацилированных алифатическими, особенно дикарбоновыми кислотами, известно [10]. Для этого объекта для завершения рассматриваемого процесса необходима выдержка раствора в течение суток и более, поэтому по [1, 6] недоопределение антоцианов превысит 6%.

Таким образом, при определении общего содержания антоцианов по методикам [1, 6] в общем случае требуется выдержка раствора с pH = 1 в течение не менее 6 ч. Но лучше рекомендовать выдержку в течение ночи, например, сопряженную с экстракцией антоцианов из растительного материала.

Список литературы

1. ГОСТ Р 53773-2010. Продукция соковая. Методы определения антоцианинов.
2. Дейнека В.И., Гостищев Д.А., Дейнека Л.А. Изучение состава и строения ацилированных антоцианов плодов *Solanum melongena*, *Capsicum annuum* и *Solanum nigrum* / Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы IV Всероссийской конференции. 21–23 апреля 2009 г. Кн. 2. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2009. – С. 245–247.
3. Дейнека В.И., Григорьев А.М., Дейнека Л.А. и др. // Зав. лаб. – 2006. – № 3. – С. 16–20.
4. Третьяков М.Ю., Хорошилов С.А., Сидоров А.Н., и др. // Достижения науки и техники АПК. – 2012. – № 9. – С. 30–32.
5. Anthocyanins. Biosynthesis, Functions, and Applications / Ed. Kevin Gould, Kevin Davies, Chris Winefield. – Springer Science + Business Media, LLC. 2009. – 329 p.
6. Giusti M.M., Wrolstad R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy / In R.E. Wrolstad (Ed.), Handbook of analytical food chemistry. – New York: John Wiley & Sons, 2005. – Unit F1.2.
7. Bąkowska-Barczak A. Acylated anthocyanins as stable natural food colorants – a review // Pol. J. Food Nutr. Sci. – 2005. – Vol. 14/55, № 2. – P. 107–116.
8. Brouillard R., Lang J. The hemiacetal-*cis*-chalcone equilibrium of malvin, a natural anthocyanin // Can. J. Chem. – 1990. – Vol. 68. – P. 755–761.
9. Preston N.W., Timberlake C.F. Separation of anthocyanin chalcones by high-performance liquid chromatography // J. Chromat. – 1981. – Vol. 214. – P. 222–228.
10. Stinzinger F.C., Stinzinger A.S., Carle R. et al // J. Agric. Food Chem. – 2002. – Vol. 50. – P. 396–399.