

УДК 577.13:543.424.7

Н.Ю. Колбас

канд. биол. наук, доц., зав. каф. химии
Брестского государственного университета имени А.С. Пушкина
e-mail: nkolbas@gmail.com

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТОЦИАНОВ

Представлены данные о динамике антиоксидантной активности, спектрофотометрических параметров окраски (интенсивность, тон, процент желтого, красного и пурпурного цветов, фиолетовый индекс, а также параметры CIE L*a*b*) трех антоцианов: цианидин-3-О-глюкозида, дельфинидин-3-О-глюкозида и мальвидин-3-О-глюкозида в модельном растворе «сок» при pH 3,7. Начальная концентрация антоцианов была 100 ± 0,4 мг/л и снижалась в процессе хранения; наибольшая устойчивость отмечена для цианидин-3-О-глюкозида. Антиоксидантная активность антоцианов была оценена тремя методами и варьировала от 2,96 до 3,36 тролокс-эквивалента по методу ABTS, от 1,68 до 1,88 тролокс-эквивалента по методу ORAC и от 4,23 до 5,71 Fe²⁺-эквивалента по методу FRAP. В процессе хранения модельных растворов их антиоксидантная активность снижалась.

Введение

В настоящее время в биохимическом составе растений выявлено около 600 антоцианов, которые чаще находятся в виде гликозидов и ацилгликозидов. По химической структуре агликоны антоцианов являются полигидрокси- и полиметоксипроизводными катиона 2-фенилбензопирилияма (флавилиум-катион или 2-фенилхромен-катион) [1]. Самыми распространенными антоцианами растений являются производные цианидина (Cy), дельфинидина (Dp), мальвидина (Mv), пеларгонидина (Pg), пеонидина (Pn) и петунидина (Pt) (таблица 1).

Таблица 1. – Химическая структура шести основных агликонов антоцианов

| Название | Аббревиатура | Базовая структура | R ₁ | R ₂ |
|--------------|--------------|-------------------|------------------|------------------|
| Пеларгонидин | <i>Pg</i> | | H | H |
| Цианидин | <i>Cy</i> | | ОН | H |
| Дельфинидин | <i>Dp</i> | | ОН | ОН |
| Пеонидин | <i>Pn</i> | | ОСН ₃ | H |
| Петунидин | <i>Pt</i> | | ОСН ₃ | ОН |
| Мальвидин | <i>Mv</i> | | ОСН ₃ | ОСН ₃ |

В системе биоантиоксидантов антоцианы являются неферментными, низкомолекулярными антиоксидантами прямого действия; для животной клетки они экзогенные, а для растительной – эндогенные, внутриклеточные. Как и другие биоантиоксиданты, антоцианы способны воздействовать в фармакологических концентрациях без необратимой инактивации ферментативных и генетических систем, а следовательно, быть относительно безопасными для живого организма. Антоцианы проявляют свою антиоксидантную способность в различных типах сред (в водной и водно-липидной) как по отношению к активным формам кислорода (супероксид-радикал, гидроксил-радикал), так и к органическим радикалам, в том числе специфическим [2–8].

В настоящее время общепризнанными являются два пути антиоксидантного действия антоцианов: реакции с радикалами (антирадикальное действие) и связывание

металлов с переменной валентностью (хелатирующее действие) [2]. Литературные данные [3–8] свидетельствуют о наличии прямой зависимости антиоксидантной активности (АОА) антоцианов от количества ОН-групп в их химической структуре, что объясняется повышением электронодонорной способности. В пределах всей группы антоцианов имеются как сильные, так и слабые антиоксиданты.

В чистом виде антоцианы представляют собой окрашенные кристаллы. Среди многочисленных соединений класса флавоноидов антоцианы окрашены более интенсивно, так как поглощают свет с наибольшей длиной волны [9]. Разнообразие окраски антоцианов определяется строением их агликона, рН среды, комплексообразованием с ионами металлов и адсорбцией на полисахаридах.

Степень гидроксирования антоцианов определяет батохромный сдвиг. Например, *Pg* ($\lambda = 523$ нм), *Sy* ($\lambda = 538$ нм) и *Dp* ($\lambda = 548$ нм), имеющие в кольце *A* соответственно одну, две и три гидроксогруппы, окрашены в оранжевый, красный и пурпурный цвета. Однако при изучении аналогичной зависимости у флавонолов, как одной из групп флавоноидов, а именно: кемпферола (одна ОН-группа), кверцетина (две ОН-группы) и мирицитина (три ОН-группы), – батохромный сдвиг не обнаружен. Эти три вещества имеют одинаковую желтую окраску [9]. Данный факт указывает на непосредственное участие связующего трехуглеродного фрагмента антоцианов в формировании их окраски. Влияние рН среды на строение антоцианов и их окраску было проанализировано нами ранее в [10]. Вышеописанные свойства антоцианов обусловили их широкое применение в качестве красителей в пищевой и косметической промышленности [11].

Целью нашего исследования было определить изменение АОА антоцианов и окраски их модельных растворов. В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

- 1) изучить стабильность антоцианов в процессе хранения в условиях модельного раствора «сок»;
- 2) проанализировать динамику спектрофотометрических показателей окраски растворов антоцианов в процессе их хранения;
- 3) определить АОА антоцианов в модельных растворах с применением трех методов и проследить ее динамику в процессе хранения.

Материалы и методы исследования

В исследовании использовали три антоциана: *Sy*-3-глюкозид, *Dp*-3-глюкозид и *Mv*-3-глюкозид (> 99,5 %, «Extrasynthese», Франция).

Модельный раствор «сок» (МРС) готовили на основе буферного раствора (0,1 М КН Фталат–HCl), подкисленного лимонной кислотой до рН = 3,7. Начальная концентрация антоциана в МРС была $100 \pm 0,4$ мг/л. Растворы для каждого антоциана готовили в трехкратной повторности и хранили при 22 °С в плотно закрытых флаконах без доступа света в течение 9 недель. Для исходных растворов, а также через 7 дней и затем через каждые 14 дней хранения определяли спектрофотометрические параметры окраски и АОА.

Изменение концентрации антоцианов в процессе хранения МРС фиксировали методом ВЭЖХ-UV-MS, используя систему сепарации и анализа Thermo-Accela High Speed LC. Разделение компонентов осуществляли на хроматографической колонке с обращенной фазой Agilent Nucleosil 100-5C18 (250×4,0 мм; размер частиц силикагеля 5,0 мкм). Элюирование вели при температуре +40 °С и фиксированной пропускной способности 0,3 мл в минуту, при этом объем инъекционного образца составил 20 мкл. В качестве мобильной фазы А применяли 5 %-ный водный раствор HCOOH; мобильной фазы В – 5 %-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле со следующим градиентом элюирования: 10–35 % В, 0–25 мин; 35–100 % В, 25–35 мин; 100 % В, 35–40 мин;

100–10 % В, 40–41 мин; стабилизация системы в течение 4 мин (10 % В). Длина волны детектирования составила 520 нм. Константу скорости распада антоциана рассчитывали в программе Excel, учитывая экспоненциальную зависимость концентрации от времени хранения. Период полуреакции определяли по формуле:

$$\tau_{1/2} = \ln 2/k,$$

где k – константа скорости реакции (недель⁻¹). Время, за которое происходит распад 90 % антоциана от первоначального, рассчитывали как $T = 1/k$.

Желтый цвет в окраске МРС определяли по абсорбции при $\lambda = 420$ нм; красный – при $\lambda = 520$ нм; пурпурный – при $\lambda = 620$ нм и при длине оптического пути в 1 см. Измерения проводили на спектрофотометре V-630 («Jasco», Япония). Интенсивность окраски рассчитывали как сумму желтого, красного и пурпурного цветов ($A_{420} + A_{520} + A_{620}$). Для каждого цвета рассчитывали % от интенсивности окраски. Кроме того, рассчитывали коричневый индекс (тон) как отношение A_{420} / A_{520} и фиолетовый индекс – как отношение A_{620} / A_{520} [12].

Спектрофотометрическая характеристика окраски растворов антоцианов была также оценена в системе CIE $L^*a^*b^*$ согласно методике [13; 14]. Для последующей компьютерной визуализации окраски МРС применяли конвертер для системы RGB [15].

АОА антоцианов в МРС оценивали тремя методами. Измерение АОА методом *ORAC* (англ. *Oxygen Radical Absorption Capacity*) проводили по методике, описанной в [16]. Для получения кинетической кривой угасание флуоресценции регистрировали в течение 90 мин с интервалом в 1 мин при температуре реакционной смеси +37 °С, длине волны возбуждения 485 нм и волны испускания – 530 нм.

АОА методом *ABTS* (англ. *azinobis (3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid*) регистрировали по изменению оптической плотности смеси рабочего раствора катион-радикала *ABTS* (300 мкл) и анализируемого модельного раствора (10 мкл) в течение 10 мин при длине волны 734 нм и температуре +25 °С. Непосредственно перед анализом аликвоту исходного раствора *ABTS*^{•+} диспергировали дистиллированной водой до абсорбции $0,7 \pm 0,002$. АОА рассчитывали как степень ингибирования [5].

В качестве стандарта АОА для этих двух методов использовали тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) и выражали в единицах тролокс-эквивалента (ТЭ).

Определение АОА методом *FRAP* (англ. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) проводили согласно рекомендациям [17]. Оптическую плотность анализируемой смеси регистрировали при $\lambda = 593$ нм. АОА выражали в ммоль Fe^{+2} на л МРС.

Все измерения проводили на спектрофлуориметре BMG LABTECH (Германия) с термостатированием и устройством для считывания микропланшеты на 96 ячеек.

Для статистической обработки полученных данных применяли программу R software (version 2.14.1, R Foundation for Statistical Computing, Австрия).

Результаты и их обсуждение

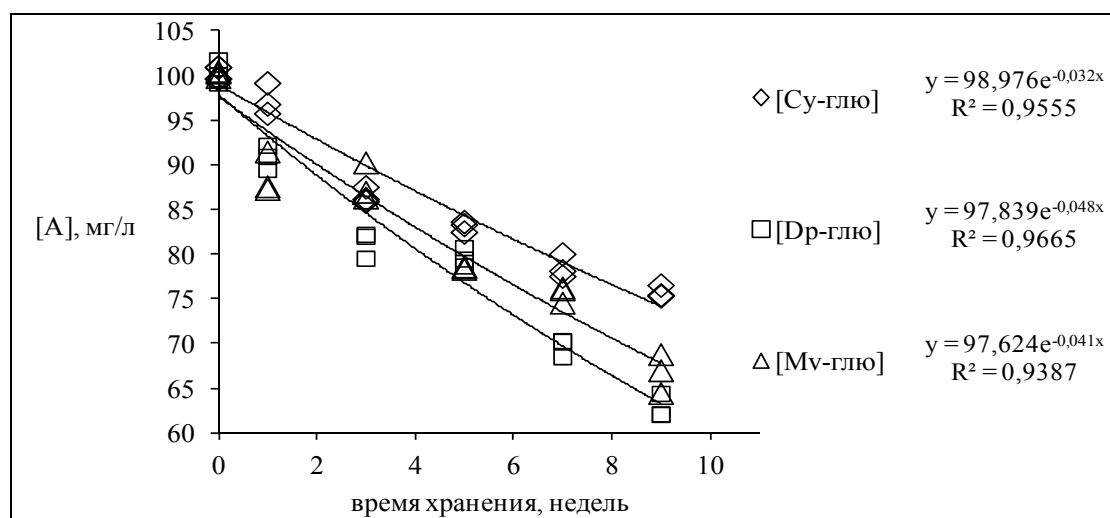
Изменение концентрации антоцианов в процессе хранения модельных растворов представлено в таблице 2 и на рисунке 1. Снижение концентрации для *Dp*-3-глюкозида и *Mv*-3-глюкозида достоверно уже после 1 недели хранения и составило 9,25 % и 11,44 % соответственно. Наибольшая стабильность выявлена для раствора *Sy*-3-глюкозида. За 9 недель хранения концентрация *Sy*-3-глюкозида снижается на 24,45 %, *Mv*-3-глюкозида – на 33,41 % и *Dp*-3-глюкозида – на 37,21 %. Период полураспада антоцианов варьирует от 14,44 до 21,66 недель, а время, за которое происходит распад 90 % антоциана от первоначального, колеблется от 20,83 до 31,25 недель (таблица 3). Изученные антоцианы располагаются в порядке повышения значений параметров как *Dp*-3-глюкозид > *Mv*-3-глюкозид > *Sy*-3-глюкозид.

Таблица 2. – Изменение концентрации антоцианов и параметров окраски в процессе хранения их модельных растворов

| Антоциан | Время хранения, неделя | [A] | Параметры CIE $L^*a^*b^*$ | | | | | h _{ab} | Параметры R:G:B |
|---------------|------------------------|-------------------|---------------------------|--------------|--------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | | L* | a* | b* | C* _{ab} | | | |
| Су-3-глюкозид | начальное | 100,37 ± 0,74 a | 60,86 ± 0,12 | 69,48 ± 0,07 | 45,89 ± 0,35 | 83,27 ± 0,25 | 33,45 ° ± 0,18 | 255:78:69 | |
| | 1 | 97,31 ± 1,75 b | 61,05 ± 0,08 | 68,74 ± 0,11 | 45,40 ± 0,38 | 82,39 ± 0,3 | 33,09 ° ± 0,2 | 255:82:74 | |
| | 3 | 86,61 ± 0,87 d | 61,29 ± 0,30 | 69,07 ± 0,21 | 43,98 ± 1,03 | 81,88 ± 0,72 | 32,49 ° ± 0,53 | 255:79:76 | |
| | 5 | 83,20 ± 0,60 e | 61,87 ± 0,42 | 68,58 ± 0,37 | 41,85 ± 1,49 | 80,34 ± 1,09 | 31,39 ° ± 0,77 | 255:84:80 | |
| | 7 | 78,63 ± 1,30 f | 62,5 ± 0,55 | 67,84 ± 0,58 | 39,13 ± 1,94 | 78,33 ± 1,46 | 29,97 ° ± 1,02 | 255:84:85 | |
| | 9 | 75,82 ± 0,67 c | 62,89 ± 0,76 | 67,21 ± 0,83 | 36,96 ± 2,44 | 76,71 ± 1,91 | 28,79 ° ± 1,3 | 255:89:91 | |
| Dp-3-глюкозид | начальное | 100,21 ± 0,12 a | 58,59 ± 0,06 | 70,53 ± 0,04 | 14,37 ± 0,11 | 71,97 ± 0,06 | 11,52 ° ± 0,08 | 249:69:118 | |
| | 1 | 90,93 ± 1,35 c | 58,19 ± 0,26 | 70,04 ± 0,21 | 14,27 ± 0,05 | 71,47 ± 0,2 | 11,44 ° ± 0,04 | 249:70:119 | |
| | 3 | 81,31 ± 1,49 f, e | 59,84 ± 0,08 | 69,41 ± 0,07 | 12,12 ± 0,12 | 70,46 ± 0,08 | 9,9 ° ± 0,08 | 254:79:127 | |
| | 5 | 79,68 ± 1,04 c, d | 61,31 ± 0,09 | 67,88 ± 0,09 | 10,08 ± 0,15 | 68,62 ± 0,12 | 8,45 ° ± 0,12 | 255:84:133 | |
| | 7 | 69,75 ± 1,02 b | 63,05 ± 0,18 | 65,32 ± 0,23 | 8,01 ± 0,2 | 65,81 ± 0,24 | 6,99 ° ± 0,14 | 255:94:141 | |
| | 9 | 62,92 ± 1,34 i | 64,49 ± 0,22 | 62,65 ± 0,30 | 6,7 ± 0,15 | 63,01 ± 0,31 | 6,1 ° ± 0,11 | 255:100:145 | |
| Mv-3-глюкозид | начальное | 100,33 ± 0,31 a | 57,74 ± 0,001 | 69,57 ± 0,04 | -0,8 ± 0,01 | 69,58 ± 0,04 | 357,34 ° ± 0,01 | 243:73:142 | |
| | 1 | 88,85 ± 2,35 d, c | 57,47 ± 0,001 | 69,25 ± 0,04 | -0,8 ± 0,01 | 69,26 ± 0,04 | 357,68 ° ± 0,01 | 242:69:139 | |
| | 3 | 87,92 ± 2,11 d, c | 58,55 ± 0,25 | 68,38 ± 0,16 | -0,75 ± 0,06 | 68,38 ± 0,16 | 359,38 ° ± 0,22 | 242:76:142 | |
| | 5 | 78,56 ± 0,14 f | 59,84 ± 0,11 | 66,63 ± 0,14 | -0,73 ± 0,1 | 66,64 ± 0,14 | 359,37 ° ± 0,08 | 247:83:147 | |
| | 7 | 75,69 ± 0,92 g | 61,12 ± 0,04 | 64,56 ± 0,02 | -0,35 ± 0,03 | 64,56 ± 0,02 | 359,69 ° ± 0,03 | 246:91:150 | |
| | 9 | 66,81 ± 2,19 h | 64,2 ± 0,6 | 56,90 ± 0,74 | -0,35 ± 0,3 | 56,90 ± 0,73 | 359,13 ° ± 0,33 | 245:109:157 | |

Примечание. – Су – цианидин; Dp – дельфинидин; Mv – мальвидин; [A] – концентрация антоциана, мг/л; параметры окраски [15]: L* – яркость; a* – положение цвета в диапазоне зеленый–красный; b* – положение цвета в диапазоне синий–желтый; C*_{ab} – цветовая насыщенность; h_{ab} – угол в 3D цветовой системе; a, b, c, d, e, f, g, h, i – статистические различия в пределах параметра (Tukey-тест при p < 0,05).

Согласно литературным данным, при деструкции антоцианов могут образовываться гидроксibenзойные кислоты, флаван-3-олы и орто-хиноны [18, с. 157–158; 19]. Отметим, что хроматограммы, полученные ВЭЖХ-УФ-МС (в статье не приводятся) для МРС в процессе хранения, демонстрируют уменьшение площади пиков соответствующих антоцианов; появление новых пиков не наблюдалось.



Cy – цианидин, Dp – дельфинидин, Mv – мальвидин, [А] – концентрация антоциана

Рисунок 1. – Динамика концентрации антоцианов в процессе хранения модельных растворов

Таблица 3. – Кинетические параметры распада антоцианов при хранении модельных растворов

| Антоциан | Кинетическое уравнение | R ² | К, недель ⁻¹ | τ ^{1/2} , недель | T, недель |
|---------------|----------------------------|----------------|-------------------------|---------------------------|-----------|
| Cy-3-глюкозид | $y = 98,976 \exp(-0,032x)$ | 0,955 | 0,032 | 21,66 | 31,25 |
| Dp-3-глюкозид | $y = 97,839 \exp(-0,048x)$ | 0,966 | 0,048 | 14,44 | 20,83 |
| Mv-3-глюкозид | $y = 97,624 \exp(-0,041x)$ | 0,939 | 0,041 | 16,91 | 24,39 |

Примечание. – Cy – цианидин, Dp – дельфинидин, Mv – мальвидин; y – концентрация антоциана, мг/л, x – время хранения, недель; k – константа скорости реакции; τ^{1/2} – период полураспада; T – время, за которое происходит распад 90 % антоциана от первоначального

В литературе имеются сведения о зависимости стабильности антоцианов от их строения при воздействии температуры, света, экзогенных окислителей. Показано, что чем выше степень гидроксирования антоцианов, тем ниже их устойчивость, в то время как при метилировании наблюдается обратная зависимость. Гликозильные формы антоцианов более стабильны, чем их агликоны [20; 21]. Недавние исследования показали, что в процессе переработки и хранения продукции ацилированные антоцианы более стабильны, чем их неацелированные аналоги [22].

Окраска трех антоцианов в МРС была оценена двумя спектрофотометрическими методами. Согласно первому методу (таблица 4), интенсивность окраски варьировала от 1,341 до 1,988 и снижалась в последовательности Cy-3-глюкозид > Dp-3-глюкозид > Mv-3-глюкозид, в том числе и к концу хранения МРС. Различия данного параметра при хранении Cy-3-глюкозида не были статистически достоверными. Интенсивность окраски Dp-3-глюкозида снизилась после трех недель хранения на 8,8 % от первоначального и на 14,2 % – к окончанию эксперимента; у Mv-3-глюкозида на 7 и 11% соответственно.

Таблица 4. – Спектрофотометрические цветовые показатели модельных растворов антоцианов

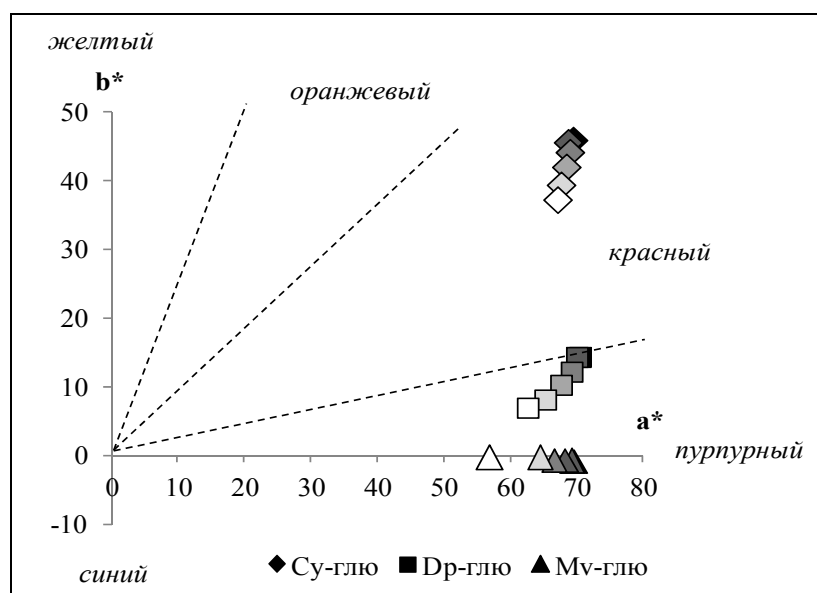
| Антоциан | Время хранения, неделя | Цветовые показатели | | | | | | | Тон | ФИ |
|---------------|------------------------|---------------------|---------------|--------------|----------------|----------------|-------------------|------|-----|----|
| | | ИО | Ж, % | К, % | П, % | Ж, % | К, % | П, % | | |
| Су-3-глюкозид | начальное | 1,988 ± 0,09 | 34,55 ± 0,68 | 65,5 ± 0,75 | 0,23 ± 0,08 | 0,528 ± 0,016 | 0,004 ± 0,001 | | | |
| | 1 | 1,963 ± 0,024 | 33,94 ± 0,01 | 65,8 ± 0,04 | 0,26 ± 0,047 | 0,516 ± 0,001 | 0,004 ± 0,001 | | | |
| | 3 | 1,868 ± 0,108 | 34,7 ± 0,54 | 65,02 ± 0,53 | 0,28 ± 0,01 | 0,534 ± 0,013 | 0,004 ± 0,0002 | | | |
| | 5 | 1,934 ± 0,042 | 32,83 ± 0,36* | 66,76 ± 0,36 | 0,4 ± 0,002* | 0,492 ± 0,008* | 0,006 ± 0,0001* | | | |
| | 7 | 1,900 ± 0,174 | 32,06 ± 0,86* | 67,46 ± 0,86 | 0,48 ± 0,003* | 0,475 ± 0,019* | 0,007 ± 0,0001** | | | |
| Dp-3-глюкозид | 9 | 1,895 ± 0,07 | 33,1 ± 1,61 | 66,26 ± 1,54 | 0,58 ± 0,07*** | 0,5 ± 0,036 | 0,009 ± 0,0001*** | | | |
| | начальное | 1,7 ± 0,033 | 26,55 ± 0,49 | 71,56 ± 0,59 | 1,89 ± 0,1 | 0,371 ± 0,01 | 0,026 ± 0,002 | | | |
| | 1 | 1,654 ± 0,029 | 26,22 ± 0,33 | 72,02 ± 0,48 | 1,76 ± 0,15 | 0,364 ± 0,007 | 0,024 ± 0,002 | | | |
| | 3 | 1,55 ± 0,013* | 26,78 ± 0,17 | 71,45 ± 0,19 | 1,77 ± 0,01 | 0,375 ± 0,003 | 0,025 ± 0,0003 | | | |
| | 5 | 1,555 ± 0,027* | 25,38 ± 0,33 | 73,02 ± 0,39 | 1,59 ± 0,06* | 0,348 ± 0,006 | 0,022 ± 0,001* | | | |
| Mv-3-глюкозид | 7 | 1,453 ± 0,058** | 25,88 ± 0,36 | 72,44 ± 0,79 | 1,68 ± 0,22* | 0,357 ± 0,009 | 0,023 ± 0,006 | | | |
| | 9 | 1,458 ± 0,014** | 24,9 ± 0,07* | 73,83 ± 0,1 | 1,30 ± 0,04** | 0,337 ± 0,001* | 0,017 ± 0,001* | | | |
| | начальное | 1,506 ± 0,022 | 23,93 ± 0,29 | 72,04 ± 0,47 | 4,03 ± 0,19 | 0,332 ± 0,006 | 0,056 ± 0,003 | | | |
| | 1 | 1,436 ± 0,078 | 24,81 ± 1,41 | 71,11 ± 1,51 | 4,08 ± 0,09 | 0,349 ± 0,027 | 0,057 ± 0,003 | | | |
| | 3 | 1,4 ± 0,035* | 25,15 ± 0,95 | 70,84 ± 1,37 | 4,02 ± 0,42 | 0,355 ± 0,02 | 0,057 ± 0,007 | | | |
| | 5 | 1,448 ± 0,024* | 24,01 ± 0,46 | 72,47 ± 0,81 | 3,52 ± 0,36 | 0,331 ± 0,01 | 0,049 ± 0,005 | | | |
| | 7 | 1,388 ± 0,007** | 24,39 ± 0,09 | 72,33 ± 0,15 | 3,27 ± 0,06* | 0,337 ± 0,002 | 0,045 ± 0,001* | | | |
| | 9 | 1,341 ± 0,085* | 22,26 ± 1,03* | 74,36 ± 0,65 | 2,71 ± 0,44* | 0,299 ± 0,024* | 0,045 ± 0,009* | | | |

Примечание. – Су – цианидин; Dp – дельфинидин; Mv – мальвидин; ИО – индекс окраски; Ж – желтый цвет в окраске; К – красный; П – пурпурный; ФИ – фиолетовый индекс; * – статистические достоверные различия от первоначального значения при 0,01 < P < 0,05, ** – при 0,001 < P < 0,01, *** – при P < 0,001.

Самый большой процент в общую окраску исследованных МРС вкладывает красный цвет (72,04–65,5 % в последовательности *Mv*-3-глюкозид \approx *Dp*-3-глюкозид > *Cy*-3-глюкозид). Изменения данного параметра в процессе хранения трех МРС не были достоверны. Доля желтого цвета в общей окраске исходных растворов составила 23,93–34,55 %, его изменения были незначительны. Процент пурпурного цвета для трех МРС различался значительно и на начальном этапе составил 0,23 % для *Cy*-3-глюкозида, 1,89 % для *Dp*-3-глюкозида и 4,03 % для *Mv*-3-глюкозида. Причем для *Cy*-3-глюкозида этот параметр возрастал уже начиная с пятой недели хранения и увеличился к концу хранения в 1,5 раза. МРС двух других антоцианов продемонстрировал снижение пурпурного цвета в окраске на 32,6 % к концу хранения. Тон растворов варьировал от 0,332 до 0,528 и снижался в процессе хранения. Фиолетовый индекс составил 0,004 для *Cy*-3-глюкозида, 0,026 для *Dp*-3-глюкозида и 0,056 для *Mv*-3-глюкозида. У МРС двух последних антоцианов параметр снижается к концу хранения, визуальными изменениями проявляются как снижение яркости окраски.

Более объективную оценку окраске модельных растворов антоцианов дает спектрофотометрическая система CIE $L^*a^*b^*$ (таблица 2).

Окраска исходного МРС *Cy*-3-глюкозида довольно светлая ($L^* = 60,86 \pm 0,12$), красно-оранжевая (параметры $a^* = 69,48 \pm 0,07$ при $b^* = 45,89 \pm 0,35$; $h_{ab} = 33,45^\circ \pm 0,18$), яркая, насыщенная ($C^*_{ab} = 83,27 \pm 0,25$). В процессе хранения раствор становится более красным (рисунок 2) и менее насыщенным (рисунок 3).



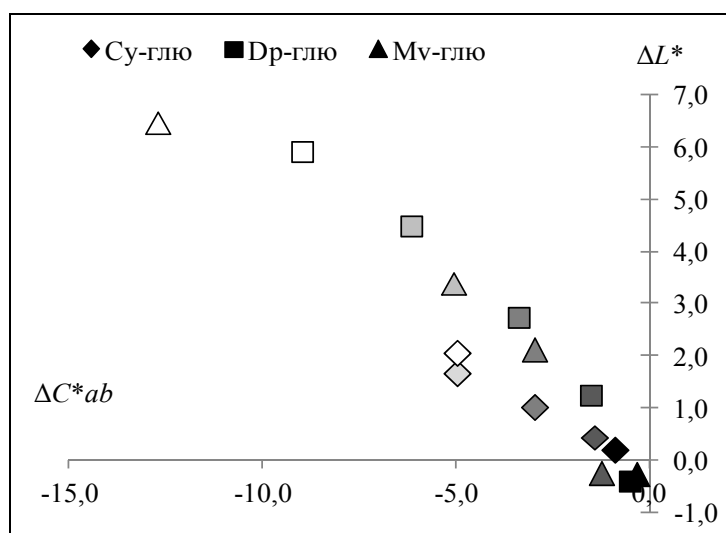
Cy – цианидин, *Dp* – дельфинидин, *Mv* – мальвидин;
 a^* – положение цвета в диапазоне зеленый – красный,
 b^* – положение цвета в диапазоне синий–желтый;
 черный цвет маркеров соответствует первоначальному раствору,
 темно-серый – первой и третьей неделе, серый – пятой,
 светло-серый – седьмой, белый – девятой неделе хранения;
 штрихпунктирная линия – условная граница цветов

Рисунок 2. – Изменение окраски модельных растворов антоцианов в процессе хранения

Исходный МРС *Dp*-3-глюкозида – более темный ($L^* = 58,59 \pm 0,06$), имеет красно-пурпурную окраску (параметры $a^* = 70,53 \pm 0,04$ при $b^* = 14,37 \pm 0,11$; $h_{ab} = 11,52^\circ \pm 0,08$),

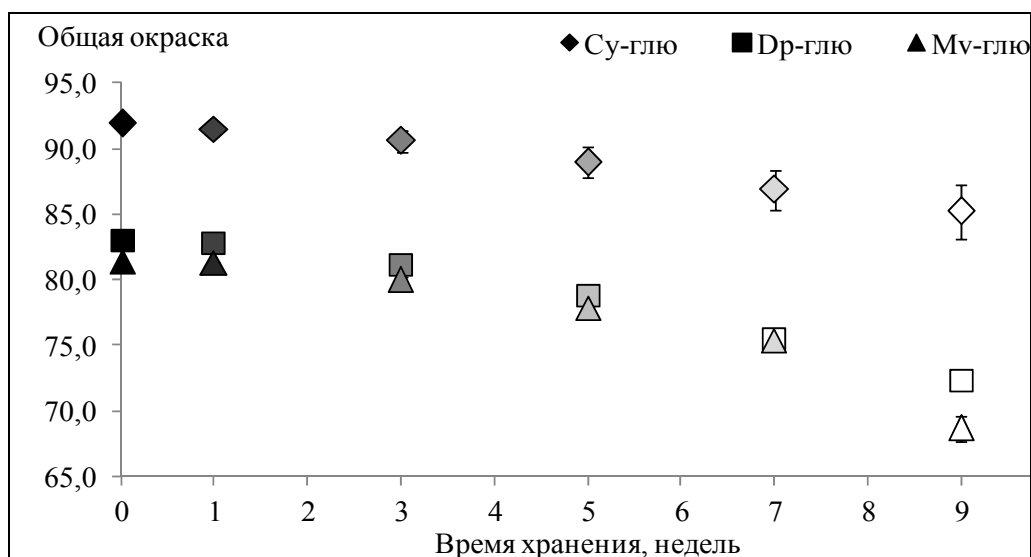
но менее яркую и насыщенную ($C^*_{ab} = 71,97 \pm 0,06$). В процессе хранения окраска становится более пурпурной (рисунок 2), но бледной (рисунок 3).

Исходный МРС *Mv*-3-глюкозида – пурпурный ($L^* = 57,74$; $a^* = 69,57 \pm 0,04$ при $b^* = -0,8 \pm 0,01$; $h_{ab} = 357,34^\circ \pm 0,01$), яркий и насыщенный ($C^*_{ab} = 71,97 \pm 0,06$). Как и для *Dp*-3-глюкозида, в процессе хранения окраска становится бледной (рисунок 3).



Cy – цианидин, *Dp* – дельфинидин, *Mv* – мальвидин; черный цвет маркеров соответствует первой неделе, темно-серый – третьей, серый – пятой, светло-серый – седьмой, белый – девятой неделе хранения

Рисунок 3. – Динамика яркости (ΔL^*) и цветовой насыщенности (ΔC^*_{ab}) модельных растворов антоцианов в процессе хранения



Cy – цианидин, *Dp* – дельфинидин, *Mv* – мальвидин

Рисунок 4. – Динамика общей окраски модельных растворов антоцианов в процессе хранения

Общая окраска изученных МРС трех антоцианов в процессе хранения снижается (рисунок 4). Наиболее заметно это становится на седьмой неделе хранения. К концу хранения МРС параметр снижается на 7,4 % от первоначальной для *Cy*-3-глюкозида,

на 12,9 % – для *Dp*-3-глюкозида и на 15,6 % – для *Mv* -3-глюкозида. Таким образом, при pH = 3,7 лучше всего свою цветность сохраняет модельный раствор *Sy*-3-глюкозида.

Результаты наших исследований можно интерпретировать как АОА индивидуальных антоцианов при pH 3,7 и АОА их MPC.

По методу *ABTS* средняя АОА антоцианов в нашем исследовании превышает параметр тролокса в $3,36 \pm 0,21$ раза для *Sy*-3-глюкозида, в $2,96 \pm 0,12$ раза для *Dp*-3-глюкозида и в $3,12 \pm 0,21$ раза для *Mv*-3-глюкозида. Полученные результаты в целом согласуются с имеющимися в литературе данными. В работах [3; 4] показано, что АОА трех антоцианов по методу *ABTS* превышает соответствующий параметр тролокса в 2,06–3,7 раза. Полученные результаты АОА по методу *ORAC* колеблются от 1,68 до 1,88 в эквиваленте тролокса и в целом согласуются с литературными данными [4; 8]. Однако по сравнению с литературными сведениями снижается с иной последовательностью (*Mv*-3-глюкозид > *Dp*-3-глюкозид \approx *Sy*-3-глюкозид), что, вероятно, связано с изменением структуры антоцианов при pH 3,7.

По снижению значений их АОА по методу *FRAP* (в ммоль Fe²⁺ / ммоль антоциана) антоцианы можно расположить в следующей последовательности: *Sy*-3-глюкозид ($5,71 \pm 0,13$) > *Dp*-3-глюкозид ($4,62 \pm 0,38$) \approx *Mv*-3-глюкозид ($4,23 \pm 0,09$).

Значения АОА изученных нами модельных растворов представлены в таблице 5.

Таблица 5. – Динамика АОА антоцианов в MPC

| Антоциан | Время хранения, недель | Метод оценки АОА | | |
|-----------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|---|
| | | <i>ABTS</i> , ммоль ТЭ/л | <i>ORAC</i> , ммоль ТЭ/л | <i>FRAP</i> , ммоль Fe ²⁺ /л |
| <i>Sy</i> -3-глюкозид | начальное | 0,64 ± 0,021 a | 0,37 ± 0,009 d | 1,17 ± 0,044 a |
| | 1 | 0,65 ± 0,019 a | 0,38 ± 0,006 d | 1,06 ± 0,006 b |
| | 3 | 0,68 ± 0,031 a | 0,36 ± 0,015 d,e | 1,07 ± 0,054 a, b |
| | 5 | 0,71 ± 0,049 a | 0,27 ± 0,002 f | 1,04 ± 0,018 b |
| | 7 | 0,46 ± 0,009 d | 0,25 ± 0,002 g | 0,89 ± 0,038 c, d |
| | 9 | 0,47 ± 0,019 d | 0,19 ± 0,014 j,i | 0,91 ± 0,031 c |
| <i>Dp</i> -3-глюкозид | начальное | 0,53 ± 0,025 b, c | 0,45 ± 0,006 a | 0,87 ± 0,005 c |
| | 1 | 0,54 ± 0,028 b, c | 0,40 ± 0,001 c | 0,81 ± 0,014 e, d |
| | 3 | 0,53 ± 0,009 c | 0,29 ± 0,014 f | 0,60 ± 0,044 f, g, h, i |
| | 5 | 0,54 ± 0,017 b, c | 0,21 ± 0,013 j | 0,64 ± 0,019 f, g |
| | 7 | 0,38 ± 0,015 e | 0,19 ± 0,001 i | 0,63 ± 0,003 g |
| | 9 | 0,35 ± 0,012 e, f | 0,16 ± 0,006 k | 0,61 ± 0,009 h |
| <i>Mv</i> -3-глюкозид | начальное | 0,58 ± 0,024 b | 0,41 ± 0,008 b | 0,83 ± 0,019 d, e |
| | 1 | 0,58 ± 0,002 b | 0,39 ± 0,001 c | 0,69 ± 0,028 f |
| | 3 | 0,56 ± 0,009 b | 0,35 ± 0,007 e | 0,75 ± 0,07 e, f |
| | 5 | 0,56 ± 0,013 b | 0,26 ± 0,003 g | 0,59 ± 0,027 h, i |
| | 7 | 0,36 ± 0,008 e | 0,24 ± 0,001 h | 0,58 ± 0,028 h, i |
| | 9 | 0,32 ± 0,02 f | 0,17 ± 0,002 k | 0,56 ± 0,022 i |

Примечание. – *Sy* – цианидин, *Dp* – дельфинидин, *Mv* – мальвидин; MPC – модельный раствор «сок»; АОА – антиоксидантная активность; ТЭ – тролокс эквивалент; a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k – статистические различия в пределах метода (*Tukey*-тест при $p < 0,05$)

По результатам применения метода *ABTS* АОА исходных MPC варьирует от 0,53 до 0,64 ммоль ТЭ/л и снижается в последовательности: *Sy*-3-глюкозид > *Mv*-3-глюкозид \approx *Dp*-3-глюкозид. Эта же последовательность сохраняется к концу эксперимента. Достоверное снижение АОА у исследованных MPC наблюдается с седьмой недели хранения и к концу эксперимента составило 0,32–0,47 ммоль ТЭ/л. Аналогичная тенденция отмечена для MPC при оценке их АОА по методу *FRAP*. Для исходных MPC

АОА колеблется от 0,83 до 1,17 ммоль Fe^{+2} /л и снижается в последовательности: Су-3-глюкозид > Dp-3-глюкозид > Mv-3-глюкозид. К концу эксперимента АОА составила 0,56–0,91 ммоль Fe^{+2} /л и ее снижение сохранилось в первоначальной последовательности. В отличие от АОА, оцененной методом *ABTS*, согласно методу *FRAP*, данный параметр снижался уже после первой недели хранения. Иную тенденцию продемонстрировали MPC по результатам метода *ORAC*. Так, АОА исходных растворов варьирует от 0,45 до 0,37 ммоль ТЭ/л и снижается в последовательности: Dp-3-глюкозид > Mv-3-глюкозид > Су-3-глюкозид. Достоверное снижение значений АОА для MPC Dp-3-глюкозида и Mv-3-глюкозида отмечено уже после первой недели хранения. Наибольшую стабильность АОА по методу *ORAC* проявляют растворы Су-3-глюкозида. Отметим, что к концу хранения последовательность распределения изученных MPC изменилась: Су-3-глюкозид > Dp-3-глюкозид > Mv-3-глюкозид, а значения параметра составили 0,16–0,19 ммоль ТЭ/л.

Заклучение

Среди трех изученных антоцианов наибольшую стабильность в модельных растворах проявляет Су-3-глюкозид. Окраска его раствора изменяется от красно-оранжевой до красной, а интенсивность остается стабильной при хранении модельных растворов в течение 7 недель. Окраска MPC Dp-3-глюкозида и Mv-3-глюкозида была красно-пурпурная и пурпурная соответственно, и ее интенсивность снизилась после трех недель хранения. С учетом трех методов оценки АОА и ее изменения в процессе хранения наибольшей АОА обладает MPC Су-3-глюкозида.

Представленные в работе результаты могут быть использованы для разработки напитков с повышенной АОА. Однако в перспективе необходимо изучить изменение АОА антоцианов в MPC при разных температурных режимах хранения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mazza, G. In *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains* / G. Mazza, E. Miniati. – Boca Raton : CRC Press, 1993. – P. 149–199.
2. Prior, R. L. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements / R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich // *J. Agricultural and Food Chem.* – 2005. – Vol. 53, № 10. – P. 4290–4302.
3. Rice-Evans, C. A. Antioxidant properties of phenolic compounds / C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga // *Trends in plant sci.* – 1997. – Vol. 2, № 4. – P. 152–159.
4. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests / J. Tabart [et al.] // *Food Chem.* – 2009. – Vol. 113. – P. 1226–1233.
5. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / R. Re [et al.] // *Free Radical Biology & Medicine.* – 1999. – Vol. 26, № 9/10. – P. 1231–1237.
6. Activité antiradicalaire des vins rouges: synergie des anthocyanes et ellagitanins. Comparaison avec différentes sources de polyphénols / N. Saint-Cricq De Gaulejac [et al.] // *J. Int. Sc. Vig. Vin.* – 2000. – № 4. – P. 57–64.
7. Kähkönen, M. P. Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons / M. P. Kähkönen, M. J. Heinonen // *J. Agricultural and Food Chem.* – 2003. – Vol. 51, № 3. – P. 628–633.
8. Wang, H. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins / H. Wang, G. Cao, R. L. Prior // *J. Agricultural and Food Chem.* – 1997. – Vol. 45, № 2. – P. 304–309.
9. Бриттон, Г. Биохимия природных пигментов : пер. с англ. / Г. Бриттон. – М. : Мир, 1986. – 422 с.

10. Колбас, Н. Ю. Механізми копигментации антоціанов / Н. Ю. Колбас // Вучон. зап. Брэсц. ун-та. – 2014. – Вып. 10, ч. 2 : Прыродазнаўчыя навукі. – С. 30–38.
11. Rymbai, H. Biocolorants and its implications in Health and Food Industry. A Review / H. Rymbai, R. R. Sharma, M. Srivastav // Int. J. Pharm Tech Research. – 2011. – Vol. 3, № 4. – P. 2228–2244.
12. Zozio, S. Evaluation of anthocyanin stability during storage of a coloured drink made from extracts of the Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.), açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and black carrot (*Daucus carota* L.) / S. Zozio, D. Pallet, M. Dornier // Fruits. – 2011. – Vol. 66, № 3. – P. 203–2015.
13. Wrolstad, R. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products / R. Wrolstad, R. Durst, J. Lee // Trends in Food Science & Technology. – 2005. – Vol. 16. – P. 423–428.
14. Application of Differential Colorimetry To Evaluate Anthocyanin–Flavonol–Flavanol Ternary Copigmentation Interactions in Model Solutions / B. Gordillo [et al.] // J. Agricultural and Food Chem. – 2015. – Vol. 63, № 35. – P. 7645–7653.
15. Color Converter – RGB to HEX and more [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.workwithcolor.com/color-converter-01.htm>. – Date of access: 21.03. 2017.
16. Dávalos, A. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay / A. Dávalos, C. Gomez-Cordoves, B. Bartolome // J. Agricultural and Food Chem. – 2004. – Vol. 52, № 1. – P. 48–54.
17. Benzie, I. F. F. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay / I. F. F. Benzie, J. J. Strain // J. Anal. Biochem. – 1996. – № 239. – P. 70–76.
18. Handbook of Enology [Traité d'oenologie. English] / P. Ribéreau-Gayon [et al.] – West Sussex : John Wiley & Sons Ltd., 2006. – Vol. 2 : The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. – 444 p.
19. Anthocyanone A: A quinone methide derivative resulting from malvidin 3-oglucoside degradation / P. Lopes [et al.] // J. Agricultural and Food Chem. – 2007. – Vol. 55, № 7. – P. 2698–2704.
20. Fossen, T. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions / T. Fossen, Ø. M. Andersen // J. Food Chem. – 2000. – Vol. 68, № 1. – P. 101–107.
21. Lee, P. M. Thermal Degradation of Blue Anthocyanin Extract of *Clitoria ternatea* Flower / P. M. Lee, R. Abdullah, K. H. Lee // 2nd Intern. Conference of Biotechnology and Food Science, IPCBEE. – 2011. – Vol. 7. – P. 49–53.
22. Wallace, T. C. Determination of Color, Pigment, and Phenolic Stability in Yogurt Systems Colored with Nonacylated Anthocyanins from *Berberis boliviana* L. as Compared to Other Natural/Synthetic Colorants / T. C. Wallace, M. M. Giusti // J. Food Sci. – 2008. – Vol. 73, № 4. – P. 241–248.

Рукапіс паступіў у рэдакцыю 08.12.2017

Kolbas N.Yu. Antioxidant Activity of Anthocyanins

*Dynamic of antioxidant activity and changes of spectrophotometric colour parameters (intensity, tone, percentage of yellow, red and magenta colours, purple index, and CIE L*a*b*) of three anthocyanins: cyanidin-3-O-glucoside, delphinidin-3-O-glucoside and malvidin-3-O-glucoside in a model "juice" solution at pH 3.7 are presented in the article. The initial concentration of anthocyanins was 100±0.4 mg/l and decreased during storage. Antioxidant activity of anthocyanins varied from 2.96 to 3.36 trolox equivalent by the ABTS method, from 1.68 to 1.88 trolox equivalent by the ORAC method and from 4.23 to 5.71 in mmol of Fe²⁺/mmol anthocyanin by the FRAP method. The antioxidant activity of model solutions decreased during storage.*