

УДК 543.637: 547.814.5

ВЛИЯНИЕ СТРОЕНИЯ АНТОЦИАНОВ НА ИХ АНТИОКСИДАТНУЮ АКТИВНОСТЬ: 3,5-ДИГЛЮКОЗИДЫ ОТНОСИТЕЛЬНО 3-ГЛЮКОЗИДОВ

С.Л. МАКАРЕВИЧ
В.И. ДЕЙНЕКА
Л.А. ДЕЙНЕКА
В.Н. СОРОКОПУДОВ

*Белгородский государственный
национальный исследовательский университет*

e-mail: deyneka@bsu.edu.ru

В работе сопоставлены антиоксидантные свойства 3-глюкозидов пеларгонидина, цианидина и дельфинидина между собой и с продуктами их дополнительного глюкозилирования в положении 5 амперометрическим методом при различных потенциалах на стеклоуглеродном аноде. Установлено, что при 0.6 В окисляемость несколько увеличивается при введении второго углеводного радикала, т.е. 3,5-диглюкозиды оказываются более сильными антиоксидантами по отношению к относительно более «мягким» окислителям. Но при росте потенциала на аноде изменения в окисляемости производных трех антоцианидинов неодинаковы даже по направлению и зависят от потенциала.

Ключевые слова: амперометрический метод, антиоксиданты, 3-глюкозиды антоцианов, 3,5-диглюкозиды антоцианов.

Виноград и получаемые из него напитки известны как богатые источники природных антиоксидантов, отвечающих за благоприятное влияние на организм, подчеркнутое в хорошо известном факте, получившем название «французский парадокс» [1]. Но широкое распространение винограда вида *Vitis vinifera* L. из Средиземноморья по другим природным зонам ограничено высокой требовательностью традиционных сортов растения к условиям произрастания. Скрещивание *V. vinifera* с некоторыми другими видами винограда позволило получать сорта гибридов, способные выдерживать зимы с более суровым климатом, более устойчивые к различным болезням и пригодные для акклиматизации, например, в условиях Белгорода благодаря морозостойкости и укороченному периоду созревания. Но в окрашенных в темно-красные или в темно-синие цвета плодах сортов *V. vinifera* осуществляется биосинтез в основном 3-глюкозидов антоцианидинов цианидинового или дельфинидинового рядов, соответственно, рис.1, [2]. Эти компоненты в большей или в меньшей степени могут быть дополнены продуктами ацилирования указанных антоцианов уксусной, *para*-кумаровой и др. кислотами. В то же время у межвидовых гибридов могут появиться не характерные для *V. vinifera* 3,5-диглюкозиды [2].

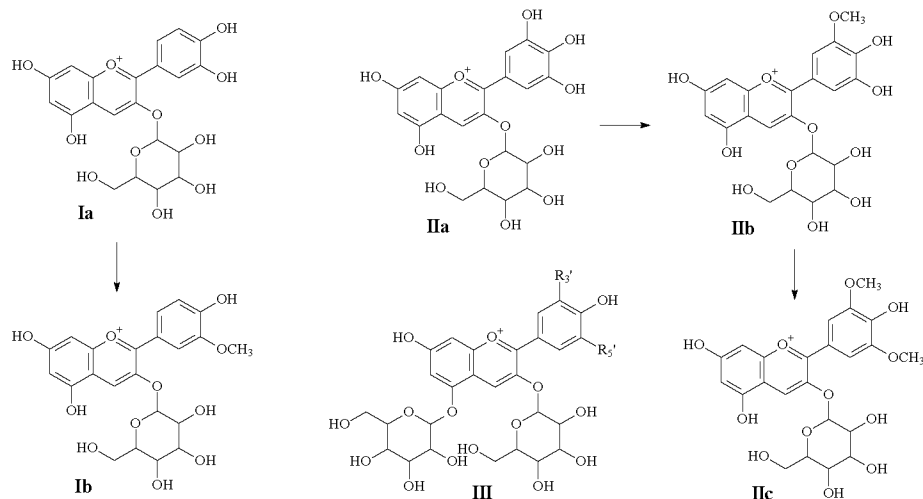


Рис.1 Типичные антоцианы плодов *Vitis* sp. 3-глюкозиды антоцианов цианидинового ряда: Ia - цианидина (C₃G), Ib – пеонида (Pn₃G); дельфинидинового ряда: IIa – дельфинидина (Dp₃G); IIb – петунидина (Pt₃G); IIc – мальвидина (Mv₃G) и III – 3,5-диглюкозиды тех же антоцианидинов гибридных сортов

Не обсуждая причины введения Евросоюзом запрета на изготовление вина из виноградов, содержащих 3,5-диглюкозид мальвидина [3], отметим, что, строго говоря, антиоксидант-

ная активность антоцианов зависит от их строения [4]. Однако работ, в которых бы сопоставляли антиоксидантную активность 3-гликозидов и 3,5-дигликозидов антоцианидинов, нами в литературе не обнаружено.

Цель настоящей работы – сопоставление антиоксидантной активности 3-гликозидов и 3,5-дигликозидов трех антоцианидинов – пеларгонидина, цианидина и дельфинидина, отличающихся последовательным добавлением в этом ряду ОН-группы в кольцо В.

Материалы и методы исследования. В работе антоцианы экстрагировали из плодов винограда *Vitis coignetiae* Pulliat ex Planch, плодов барбариса, черной смородины и цветков розы настаиванием растительного материала в 0.1 М растворе соляной кислоты и очищали методом твердофазной экстракции на патронах ДИАПАК С18 (БиоХимМак СТ, Москва) [5].

Затем методом полупрепаративной ВЭЖХ на хроматографе Shimadzu на колонке 10×250 мм Supelcosil™С18, 5 мкм при спектрофотометрическом детектировании (SPD-20А, 515 нм) в подвижной фазе 8 об.% СН₃CN и 10 об.% НСООН в воде выделяли фракции индивидуальных 3-гликозидов дельфинидина, цианидина (из антоцианового комплекса плодов черной смородины) и пеларгонидина (из экстракта плодов барбариса) и 3,5-дигликозиды дельфинидина и цианидина (из плодов винограда) и пеларгонидина (из цветков розы). Индивидуальность фракций проверяли в этом же элюенте на хроматографе Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектированием на колонке 4.6×250 мм Symmetry®С18/ 5 мкм.

Для определения антиоксидантной активности полученные фракции разбавляли до получения раствором с оптической плотностью 0.70 ±0.02 в максимуме абсорбции и вводили в стеклоуглеродный детектор прибора ЦветЯуза-01-АА порциями по 20 мкл (кран-дозатор Rheodyne 7125) в токе элюента того же состава.

Результаты и их обсуждение. Мальвидин-3,5-дигликозид обнаруживается во многих гибридных сортах, например, в плодах винограда кишмиш Венус (Венера), выдерживающего морозы ниже -28°С, рис.2.

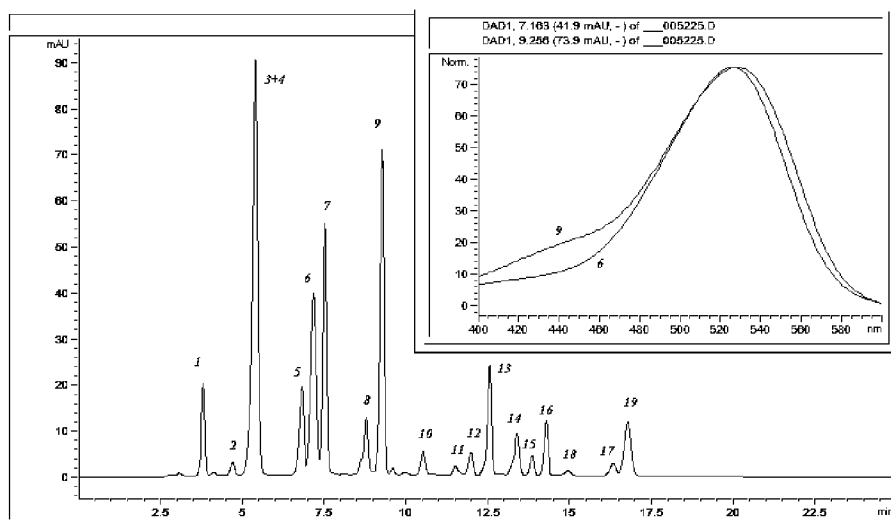


Рис. 2. Разделение антоцианов плодов винограда сорта кишмиш «Венус»

Градиентное элюирование в системе ацетонитрил – вода – 10 об. % муравьиной кислоты. Антоцианы: 1 – дельфинидин-3,5-дигликозид; 2 – цианидин-3,5-дигликозид; 3+4 – пелунидин-3,5-дигликозид и дельфинидин-3-гликозид; 5 – цианидин-3-гликозид; 6 – мальвидин-3,5-дигликозид; 7 – пелунидин-3-гликозид; 8 – пеоинидин-3-гликозид; 9 – мальвидин-3-гликозид; 10 – 19 – ацилированные антоцианы.

Но основной акцент, сделанный на мальвидин-3,5-дигликозид, строго говоря, не имеет под собой научной основы, поскольку кроме мальвидин-3,5-дигликозида (в зависимости от соотношения 3-гликозидов различных антоцианидинов) на хроматограммах обнаруживаются также 3,5-дигликозиды остальных антоцианидинов. Следовательно, действие гликозил-5-трансферазы не зависит от строения кольца В флавилиевой основы. В настоящей работе для выделения 3,5-дигликозидов дельфинидина и цианидина использовали экстракт плодов винограда японского (*Vitis coignetiae* Pulliat ex Planch.) из ботанического сада НИУ БелГУ, состоящий практически исключительно из 3,5-дигликозидов пяти основных антоцианидинов, что хорошо видно на фоне хроматограммы антоцианов винограда лесного, *Vitis vinifera* subsp. *sylibéstris*, содержащего только 3-гликозиды, рис. 3.

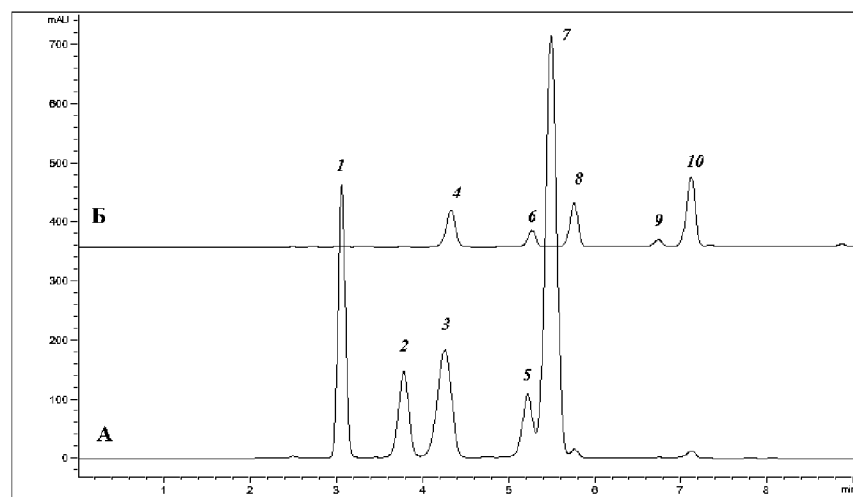


Рис.3. Разделение антоцианов виноградов японского (А) и лесного (Б)

Градиентное элюирование в системе ацетонитрил – вода – 10 об. % муравьиной кислоты. Антоцианы: 1 – дельфинидин-3,5-диглюкозид; 2 – цианидин-3,5-диглюкозид; 3 – петунидин-3,5-диглюкозид и дельфинидин-3-глюкозид; 5 – пеонидин-3,5-диглюкозид, 6 – цианидин-3-глюкозид; 7 – мальвидин-3,5-диглюкозид; 8 – петунидин-3-глюкозид; 9 – пеонидин-3-глюкозид; 10 – мальвидин-3-глюкозид.

По нашему опыту при определении антиоксидантной активности антоцианов на приборе ЦветЯуза-01-АА удобно использовать элюент, обычный для ВЭЖХ-определения и полупрепаривного выделения антоцианов в методе обращенно-фазовой хроматографии: 10 об. % НСООН и 8÷10 об. % ацетонитрила в воде [6]. Этот элюент позволяет уменьшить расхождение между параллельными наблюдениями и повысить надежность численных значений, характеризующих антиоксидантную активность.

Отметим, что создатели прибора ЦветЯуза-01-АА предложили с его помощью определять «количество антиоксидантов». Однако, как указывалось в работе [7], разнообразие в терминологии, связанной с антиоксидантной активностью может быть преодолено обращением к химической сущности процессов. Более того, выражение этого свойства в единицах содержания некоторого «реперного» соединения не всегда оправдано. Т.е., использование термина «количество антиоксидантов» – имеющего право на существование, в данном случае малоинформативная характеристика. Привязка к растворам одинаковой оптической плотности, использованная в настоящей работе, позволяет сопоставлять антоцианы, как колоранты сравнением величины сигнала детектора (площадей пиков) сопоставляемых веществ. Важным преимуществом метода является то, что возможно изменение потенциала на аноде, позволяющее варьировать «силу» окислителя, анализируя изменение отклика антиоксиданта на этот процесс.

Сопоставление 3-глюкозидов дельфинидина, цианидина и пеларгонидина.

По литературным данным [8] окисление антоцианов на аноде начинается при потенциале около 0,5 В, что в целом согласуется с данными, полученными в настоящей работе, рис.4.

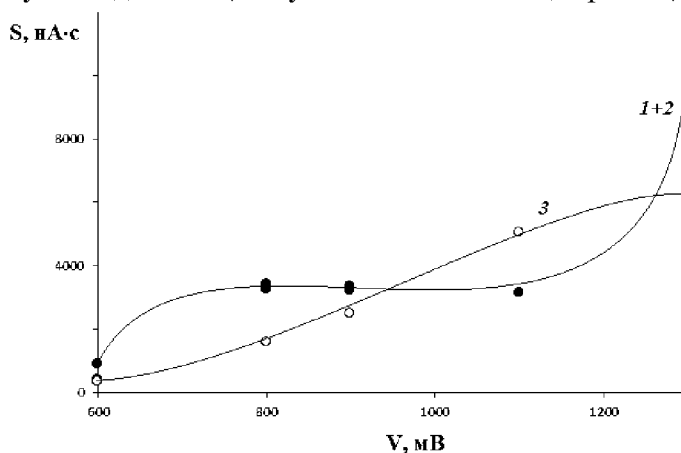


Рис. 4. Зависимость площадей пиков растворов 3-глюкозидов трех антоцианов от потенциала на аноде. Данные для 3-глюкозидов: 1 – дельфинидина, 2 – цианидина, 3 – пеларгонидина.

Из представленных данных следует, что:

- а) при любых потенциалах поведение на аноде Dp3G и Cy3G мало различимо;
- б) при потенциалах в диапазоне 0.6 – 0.9 В окисляемость Pg3G меньше, чем Dp3G (и Cy3G).

Это не удивительно, поскольку хорошо известно, что высокой антиоксидантной активностью обладают соединения, содержащие две *орто*-гидрокисльные группы, которые имеются в структурах Dp3G и Cy3G и их нет в Pg3G, рис.5.

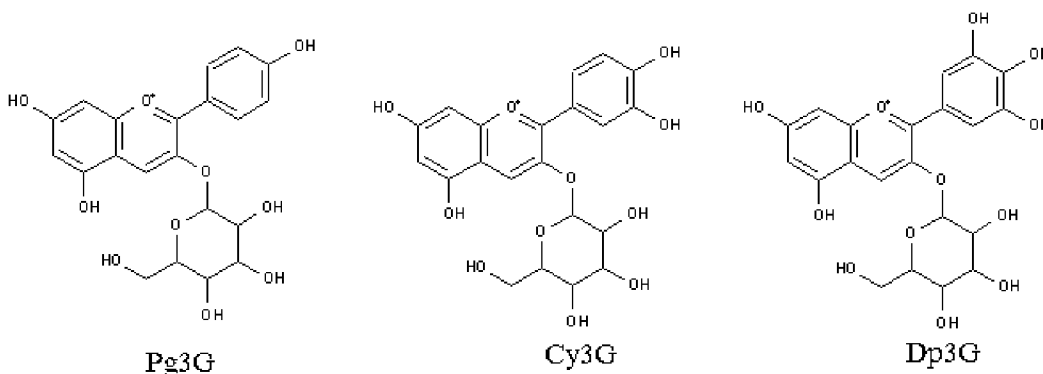


Рис.5. 3-гликозиды пеларгонидина (Pg3G), цианидина (Cy3G) и дельфинидина (Dp3G)

в) с ростом потенциала на аноде сигнал от Pg3G растет быстрее, чем от остальных рассматриваемых антоцианов, в итоге даже превосходя их.

г) быстрый рост площадей сигналов при потенциале большем чем 1.2 В, скорее всего, связан с тем, что происходит более глубокое окисление: потенциал разложения воды равен 1.2 В.

Сопоставление 3,5-диглюкозидов дельфинидина, цианидина и пеларгонидина. Введение глюкозного радикала в структуру исходного 3-глицерида по-разному сказалось на изменении отклика детектора, рис.6 (на рисунке показаны отношения площадей пиков одготипных антоцианов вследствие добавления глюкозидного радикала (R(3,5/3)).

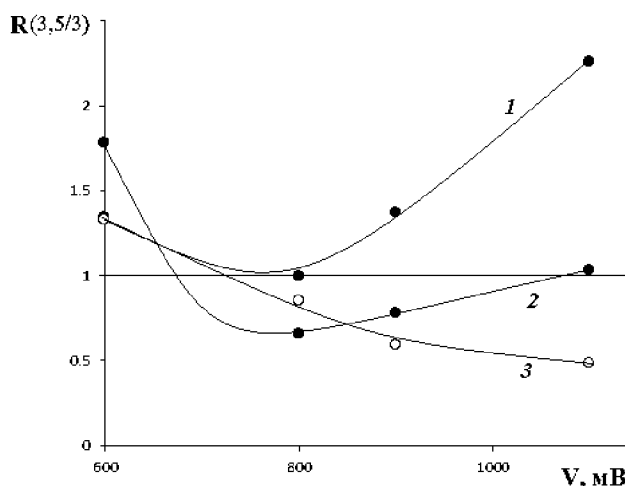


Рис. 6. Изменение отклика детектора на добавление глюкозидного радикала в положение 5 3-гликозида соответствующего антоцианидина. Данные для 3-гликозидов: 1 – дельфинидина, 2 – цианидина, 3 – пеларгонидина

Из представленных данных следует, что:

а) при потенциала 0.6 В для всех трех структур площади пика (и антиоксидантная активность оказались заметно выше. Следовательно, по отношению к действию относительно слабых окислителей появление 3,5-диглюкозидов антоцианов в плодах виноградов благоприятно скажется на антиоксидантных свойствах плодов и продуктов их переработки;

б) при росте потенциала на аноде R(3,5/3) вначале уменьшается для всех веществ;

в) но при росте потенциала затем для дельфинидина R(3,5/3) возрастает, для цианидина – приближается к единице, а для пеларгонидина – уменьшается.



Выводы. Таким образом, влияние изменения структуры на антиоксидантные свойства, измеренные амперометрическим методом, неоднозначно и зависит от конкретных условий (окислительной способности оксиданта) и от структуры базового антоцианидина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке областного гранта на проведение научно-исследовательских работ по приоритетным направлениям социально-экономического развития Белгородской области от 10.11.2013 г, № Г-16

Литература

1. Xia E.-Q., Deng G.-F., Guo Y.-J., Li H.-B. Biological Activities of Polyphenols from Grapes // *Int. J. Mol. Sci.* 2010. – V.11. – P. 622-646.
2. He F., Mu L., Yan G.-L., Liang N.-N., Pan Q.-H., Wang J., Reeves M.J., Duan C.-Q. Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes // *Molecules.* 2010. – V.15. – P. 9057-9091
3. Сластья Е.А., Жилиякова Т.А., Аристова Н.И., Ткачѳв И.Ф., Пилипенко Д.С. Новый экспресс-метод полуколичественного определения мальвидин-3,5-диглюкозида в винограде и в вине // *Вісник Харківського національного університету.* 2005. – №669. Хімія. Вип.13(36). – С.119-124.
4. Kähkönen M.P., Heinonen M. Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons // *J. Agric. Food Chem.* 2003. – V.51. – P. 628-633
5. Дейнека Л.А., Блинова И.П., Чулков А.Н., Саенко И.И., Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н. Метод экстракции и очистки антоцианов из плодов аронии черноплодной. // *Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация.* – 2012. – №.10 (129), Вып. 18/2. – С. 60-64.
6. Дейнека В.И., Григорьев А.М. Исследование удерживания антоцианов в элюентах системы ацетонитрил – муравьиная кислота – вода // *Ж. физ. химии.* 2005. – Т.79. – №5. – С. 900-903.
7. И.П. Анисимович, В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, П.А. Фролов, П.А. Мясникова Параметры антиоксидантной активности соединений: относительная антиоксидантная активность чая // *Научные ведомости БелГУ. Сер. Естественные науки.* – 2010 – №9(80) – вып. 11 – стр. 104-111
8. Lima A.A., Sussuchi E.M., De Giovanni W.F. Electrochemical and Antioxidant Properties of Anthocyanins and Anthocyanidins // *Croatica Chemica Acta.* – 2007. – V. 80. – P. 29-34.

INFLUENCE OF ANTHOCYANINS STRUCTURE UPON ANTIOXIDANT ACTIVITY: 3,5-DIGLUCOSIDES VS 3-GLUCOSIDES

S.L. MAKAREVITCH
V.I. DEINEKA
L.A. DEINEKA
V.N. SOROKOPUDOV

*Belgorod National
Research University*

e-mail: deyneka@bsu.edu.ru

Antioxidant properties of 3-glucosides of pelargonidin, cyanidin and delphinidin were compared with that of their 5-glucosylated derivatives by means of amperometric approach at different potentials on glass-carbon anode. It has been established that at 0.6В potential 3,5-diglucosides are readily oxidized than 3-glucosides. Thus 3,5-diglucosides are more active antioxidants towards mild oxidation agents, while the rise of potential results in quietly different alteration of solutes antioxidant activity.

Key words: amperometric approach, antioxidants, 3-glucosides of anthocyanins, 3,5-diglucosides of anthocyanins.