

УДК 543.637: 547.814.5

## ВЛИЯНИЕ СТРОЕНИЯ АНТОЦИАНОВ НА ИХ АНТИОКСИДАТНУЮ АКТИВНОСТЬ: ЦИАНИДИН-3-РУТИНОЗИД С ГИДРОКСИЛЬНОЙ ГРУППОЙ В ПОЛОЖЕНИИ 6

**В.И. ДЕЙНЕКА**  
**Л.А. ДЕЙНЕКА**  
**П.А. ЖАНДАРМОВА**  
**С.Л. МАКАРЕВИЧ**

*Белгородский государственный  
национальный исследовательский  
университет*

*e-mail: deyneka@bsu.edu.ru*

В работе сопоставлена антиоксидантная активность цианидин-3-рутинозида (Cy3Rut) и его 6-гидрокси-производного, (6ОНCy3Rut), выделенных из растительных источников методом полупрепаративной ВЭЖХ. Установлено, что при использовании амперометрического метода результат зависит от потенциала на стеклоуглеродном аноде. При потенциале 0.9 В антиоксидантные свойства двух антоцианов близки, несмотря на существенно меньшую стабильность 6ОНCy3Rut при хранении в растворах; что согласуется с результатами определения активности этих антоцианов в гашении свободного радикала – дифенилкрилгидразила. При росте потенциала активность Cy3Rut растет несколько быстрее, чем 6ОНCy3Rut.

Ключевые слова: цианидин-3-рутинозид, 6-гидроксицианидин-3-рутинозид, антиоксидантная активность, амперометрический метод, дифенилкрилгидразил.

Антоцианы наряду с аскорбиновой кислотой относятся к одним из самых важных природных водорастворимых антиоксидантов. Особенность антоцианов состоит не только в том, что они обладают наивысшей растворимостью в воде среди обширного класса флавоноидов, но и в том, что они обладают окраской, зависящей от pH, поэтому антоцианы рассматриваются как важнейшие природные колоранты [1], обеспечивающие продуктам на их основе лечебно-профилактическую функцию. В России в последнее время стал популярным окрашенный в красный цвет напиток «каркадэ» (получают экстракцией сушеных бутонов *Hibiscus sabdariffa* L.), обязанный окраской 3-самбубиозидам дельфинидина и цианидина, – антоцианам во флавилиевой форме (рис.1, А). При этом синяя окраска пока малоизвестного в России тайского напитка (получаемого экстракцией из сушеных цветков *Clitoria ternatea* L.) определяется копигментацией уникальных антоцианов [2], находящихся в нейтральной среде в хиноидной форме (рис.1, Б) с другими фенольными соединениями.

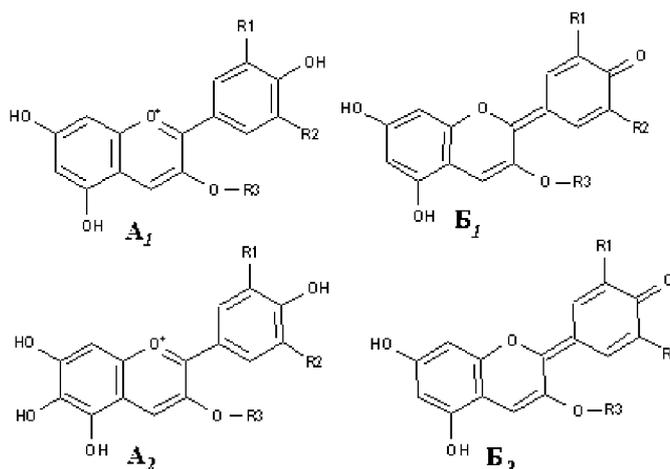


Рис. 1. Флавилиевые (А1 и А2) и хиноидные (Б1 и Б2) формы антоцианов.

В РФ нет собственного производства антоцианов, возможно, поэтому число готовых форм с их использованием весьма ограничено: в аптеках можно приобрести лишь одну биологически активную добавку «Антоциан-форте» (ООО «В-МИН+», Москва, РФ), в составе которой используются антоциановые комплексы винограда и черной смородины.

При изготовлении лечебно-профилактических препаратов с высокой антиоксидантной активностью на основе антоцианов следует учитывать, что это свойство зависит от строения антоциана [3]. Поэтому нахождение взаимосвязи между строением и антиоксидантными свой-



ствами этих соединений является актуальной задачей. В настоящей работе в этом отношении сопоставлены антоцианы традиционного строения и необычные – содержащие гидроксильные группы в положении 6.

**Материалы и методы исследования.** В работе антоцианы экстрагировали из цветков альстромерии оранжево-красного цвета (рис.2) и плодов черной смородины настаиванием растительного материала в 0.1 М растворе соляной кислоты и очищали методом твердофазной экстракции на патронах ДИАПАК С18 (БиоХимМак СТ, Москва) [4].



Рис. 2. Цветки *Alstroemeria*

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.% CH<sub>3</sub>CN и 10 об.% HCOOH в воде выделяли фракции индивидуальных 3-рутинозидов 6-гидроксицианидина и цианидина (из экстракта плодов черной смородины), – 6ОНС<sub>3</sub>R, и С<sub>3</sub>R, соответственно. Чистоту выделенных антоцианов контролировали хроматографически в том же элюенте на хроматографе Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектированием на колонке 4.6×250 мм Symmetry®С18/ 5 мкм.

Антиоксидантную активность определяли с использованием амперометрического прибора ЦветЯуза-01-АА со стеклоуглеродным анодом. Объем вводимой пробы 20 мкл (крандозатор Rheodyne 7125).

**Результаты и их обсуждение.** Определение антиоксидантной активности амперометрическим методом на приборе Цвет Яуза-01-АА можно рассматривать в качестве быстрого и недорогого по расходу реагентов метода. Однако, по нашим данным, существуют определенные проблемы. Во-первых, при использовании рекомендованного разработчиками элюента (раствор ортофосфорной кислоты 150 мкл/л в дистиллированной воде, рН ~ 2.8, при скорости подачи 1.2 мл/мин) при последовательном вводе одинаковых порций одного и того же образца площадь пиков анодного тока постепенно снижается из-за отложений на поверхности анода и поэтому требуется его регулярная очистка. Понимая, что при окислении органических веществ на гидрофобной поверхности стеклоуглеродного материала могут накапливаться гидрофобные продукты окисления водорастворимого антиоксиданта, мы использовали элюент со значительным содержанием органических модификаторов. При определении свойств антоцианов удобно использовать элюент, обычный для ВЭЖХ-определения антоцианов в обращенно-фазовой хроматографии: 10 об.% HCOOH и 8÷10 об.% ацетонитрила в воде [5]. Это позволило существенно уменьшить расхождение между параллельными наблюдениями и повысить надежность численных значений, характеризующих антиоксидантную активность.

Вторая проблема связана с количественным определением антоцианов: литературные значения коэффициентов молярного погашения индивидуальных веществ для многих видов антоцианов либо отсутствуют, либо их надежность оставляет желать лучшего [6]. По этой причине общепринято выражение содержания антоцианов в эквивалентах одного из антоцианов, например, цианидин-3-глюкозида с договорным коэффициентом молярного погашения – 26900 л/(моль×см) [6]. Этот подход можно считать наиболее приемлемым, особенно если рассматривать антоцианы как колоранты. Принятие договорного метода позволяет сопоставлять антиоксидантную активность антоцианов в пересчете на одинаковую интенсивность окраски. Впрочем, и здесь не обойтись без оговорки: антоцианы в кислой среде имеют не идентичные электронные спектры (и цвет), поэтому под одинаковой интенсивностью можно понимать оди-

наковую интенсивность абсорбции при заданной длине волны или в максимумах абсорбции (т.е. при различных длинах волн). Спектры 6ОНСуЗR и СуЗR, записанные в кювете детектора, представлены на рис.3. Добавление гидроксильной группы в положение 6 (рис.1, A2) приводит к гипсохромному сдвигу максимума абсорбции на 16 нм, что приводит к заметному изменению окраски от красной до оранжевой.

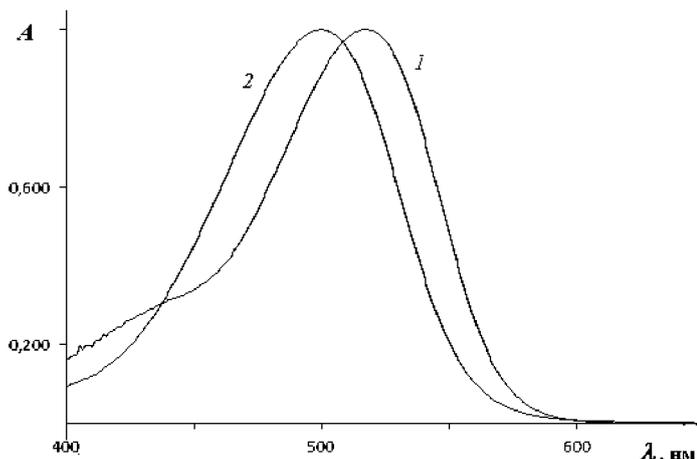


Рис.3. Спектры 3-рутинозидов цианидина и 6-гидроксицианидина

У каждого из предложенных выше подходов имеются свои достоинства и недостатки, но если известна зависимость коэффициентов молярного погашения от длин волн, то обе характеристики легко преобразуются друг в друга, табл.1. В настоящей работе пересчет проводили на одинаковую интенсивность при заданной длине волны (515 нм), что удобно для пересчета антиоксидантной активности сложных смесей исходя из площадей пиков на хроматограммах антоциановых комплексов, записанных при этой длине волны.

Таблица 1

### Параметры электронных спектров 6ОНСуЗR и СуЗR

№	Антоциан	$\lambda_{\max}$ , нм	$\epsilon_{\text{отн}}^{\lambda}$	
			515 нм	$\lambda_{\max}$ , нм
1	6-гидроксицианидин-3-рутинозид, 6ОНСуЗR	500	1.000	1.129
2	цианидин-3-рутинозид, СуЗR	516	1.000	1.000

Интерес к сопоставлению антиоксидантной активности связан с тем, что, по нашим наблюдениям, введение гидроксильной группы в положение 6 флавилиевой основы существенно уменьшает стабильность антоцианов при хранении, поэтому можно надеяться на увеличение АОА при таком изменении строения.

Примененный в настоящей работе амперометрический метод удобен тем, что существует возможность варьирования потенциала стеклоуглеродного анода. Следовательно, возможно моделирование окислительной активности оксиданта и оценка при этом ответной реакции антиоксиданта. Для получения количественных характеристик в настоящей работе вначале находили отношение площадей сигналов, полученных при амперометрическом,  $S_{\text{Цвет-яюза}}(i)$ , и спектрофотографическом,  $S_{\text{Agilent},515}(i)$ , детектировании, а затем получали отношение найденных величин для 6ОНСуЗR и СуЗR, табл. 2.:

$$R_{515} = \frac{S_{\text{Цвет-яюза}}(6\text{ОНСуЗR}) \cdot S_{\text{Agilent},515}(\text{СуЗR})}{S_{\text{Agilent},515}(6\text{ОНСуЗR}) \cdot S_{\text{Цвет-яюза}}(\text{СуЗR})}$$

при этом второй показатель учитывает изменение интенсивности сигналов при переходе к  $\lambda_{\max}$ .

$$R_{\lambda(\max)} = \frac{R_{515}(AOA)}{\epsilon_{\text{отн}}^{\lambda(\max)}}$$



Таблица 2

### Параметры относительной антиоксидантной активности 6ОНСу3R и Су3R

№	Антоциан	Показатель АОА	Относительная АОА при различных потенциалах на аноде, В			
			1.3	1.1	0.9	ДФП*
1	6ОНСу3R	$R_{515}$	0.809 ± 0.024	1.165 ± 0.033	1.232 ± 0.036	1.231 ± 0.062
		$R_{\lambda(\max)}$	0.717 ± 0.021	1.032 ± 0.031	1.091 ± 0.033	1.090 ± 0.055
2	Су3R		1	1	1	1

Примечание: ДФП\* – определено по методике с использованием дифенилпикрилгидразила.

Как следует из представленных в табл.2 данных при потенциале на аноде 0.9 В активность 6-ОН-производного, как и следовало ожидать, оказывается более высокой по сравнению антоцианом сравнения. Следовательно, соответствующее структурное изменение увеличивает чувствительность антоцианов к относительно более слабым оксидантам, поэтому 6-гидроксипроизводные антоцианов могут быть более эффективными перехватчиками низкоэнергетических свободных радикалов.

При повышении потенциала на аноде до 1.3 В соотношение между АОА меняется на противоположное. Вероятно при больших потенциалах вторичные процессы деградации антиоксиданта (после первичного окисления) вносят большой вклад, и снижение относительной АОА связано с тем, что 6ОНСу3R является веществом с большим начальным уровнем окисленности по сравнению Су3R.

Для сравнения в работе было выполнено определение относительной антиоксидантной активности этих же антоцианов более часто используемым методом, основанным на гашении свободных радикалов (дифенилпикрилгидразил, ДФПГ):

$$R_{515}(AOA) = \frac{\Delta A_{ДФПГ}(6ОНСу3R) \cdot S_{Agilent,515}(Су3R)}{S_{Agilent,515}(6ОНСу3R) \cdot \Delta A_{ДФПГ}(Су3R)}$$

где  $\Delta A$  – уменьшение оптической плотности реакционной среды при добавлении антоцианов в сопоставлении с холостым опытом, которое было измерено через 20, 30 и 40 мин – использовали среднее значение для этих времен выдерживания. Холостой опыт был использован по той причине, что антоцианы вводили в реакционную смесь в растворе элюента, а кислые элюенты сами оказываются активными по отношению к ДФПГ. Полученный результат, табл.2, совпадает с данными, полученными амперометрическим методом при потенциале на аноде, равном 0.9 В.

**Выводы.** Результаты определения антиоксидантной активности двух антоцианов – цианидин-3-рутинозида и его 6-гидрокси-производного зависят от потенциала на стеклоуглеродном аноде, при потенциале 0.9 В совпадая с данными полученными с использованием свободного радикала – дифенилпикрилгидразила. Таким образом, введение ОН-группы в положение 6, снижая устойчивость антоцианов при хранении, мало сказывается на антиоксидантной активности.

*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. Wrolstad R.E., Durst R.W., Lee J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products // Trends Food Sci. Technol. – 2005. – V.16. – P. 423–428.
2. Terahara N., Oda M., Matsui T., Osajima Y., Saito N., Toki K., Honda T. Five New Anthocyanins, Ternatins A3, B4, B3, B2, and D2, from *Clitoria ternatea* Flowers // J. Nat. Prod. – 1996. – V.59. – P. 139–144.
3. Khäkönen M.P., Heinonen M. Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons // J. Agric. Food Chem. – 2003. – V.51. – P. 628–633.
4. 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. С. Медицина. Фармация. – 2012. – №.10 (129), Вып. 18/2. – С. 60–64.



5. Дейнека Л.А., Шапошник Е.И., Гостищев Д.А., Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н., Селеменев В.Ф. ВЭЖХ в контроле антоцианового состава плодов черной смородины // Сорбц. хром. процесс. – 2009. – Т.9, Вып.4. – С. 529-536.

6. Mónica Giusti M., Wrolstad R.E. 13Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy / In «Current Protocols in Food Analytical Chemistry». John Wiley & Sons, Inc. 2001. – F1.2.1-F1.2.

## **ANTHOCYANINS STRUCTURE INFLUENCE UPON ANTIOXIDANT ACTIVITY: CYANIDIN-3-RUTINOSIDE WITH OH-GROUP AT NUMBER 6 CARBON ATOM**

**V.I. DEINEKA**  
**L.A. DEINEKA**  
**P.A. ZHANDARMOVA**  
**S.L. MAKAREVITCH**

*Belgorod National  
Research University*

*e-mail: [deineka@bsu.edu.ru](mailto:deineka@bsu.edu.ru)*

Antioxidant activity of flavonoid cyanidin-3-rutinoside (Cy3Rut) was compared with that of 6-OH derivative, (6OHCy3Rut), extracted from plant sources by semi-preparative HPLC. It was established that signal of amperometric detector depends upon potential applied to glass-carbon anode. At 0.9 V antioxidant properties of the both solutes are closed in spite of the worth stability of 6OHCy3Rut in acidic water solutions. The pattern is in a good accordance with antiradical activity of the solutes revealed by 2,2-dihenyl-1-picrylhydrazyl method. At the potential growth antioxidant Cy3Rut activity increases somewhat more than that of 6OHCy3Rut.

Key words: flavonoid cyanidin-3-rutinoside, 6-hydroxycyanidin-3-rutinoside, antioxidant activity, amperometric method, 2,2-dihenyl-1-picrylhydrazyl.