



УДК 577.1+547.9

**РЕАКЦИЯ НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКРАШИВАНИЯ В СИСТЕМЕ  
D-ЛАКТОЗА–*n*-АМИНОБЕНЗОЙНАЯ КИСЛОТА В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ  
БИОГЕННЫХ *d*-МЕТАЛЛОВ****NON-ENZYMATIC BROWNING OF *D*-LACTOSE WITH *p*-AMINO BENZOIC  
ACID IN THE PRESENCE OF BIOGENIOUS *d*-METAL IONS****И.С. Черепанов, В.С. Князева  
I.S. Cherepanov, V.S. Knyazeva**Удмуртский государственный университет, Россия, 426034, Ижевск, ул. Университетская, 1  
Udmurt State University, 1 Universitetskaya St., Izhevsk, 426034, Russia

E-mail: cherchem@mail.ru

**Аннотация**

Представлены результаты исследования поведения системы *D*-лактоза–*n*-аминобензойная кислота (ПАБК)– $M^{2+}$  в подкисленных водно-этанольных средах в условиях реакции Майяра. Отмечено увеличение интенсивности окрашивания в присутствии ионов меди(II), при этом рост концентрации  $Cu^{2+}$  (до 120 мг/л) приводит к увеличению скорости меланоидинообразования; в то же время присутствие ионов  $Zn^{2+}$  (до 100 мг/л) практически не оказывает влияния на скорость неферментативной деструкции. Отличие во влиянии ионов металлов на amino-карбонильные взаимодействия может быть связано с их различной окислительно-восстановительной активностью по отношению к аминоконъюгатам: ионы  $Cu^{2+}$ , обладая более высокой способностью к восстановлению, нежели ионы  $Zn^{2+}$ . Показано отсутствие нарастания интенсивности окрашивания в системах *D*-лактоза–ПАБК– $M^{2+}$ –хелатирующий реагент, что надежно свидетельствует об участии ионов меди (II) в начальных стадиях изученных процессов, а также в свободных от амина системах лактоза– $M^{2+}$ , что показывают отсутствие заметного протекания карамелизации лактозы в условиях эксперимента и позволяет отнести изученные эффекты именно к меланоидинообразованию.

**Abstract**

The results of investigation of *D*-lactose–*p*-amino benzoic acid (PABA)– $M^{2+}$  system in the acidic aqueous-ethanolic media in the Maillard reaction condition are presented. The colour intensity rising in the presence of copper(II) ions is shown, and the rise of copper ions concentration (until to 120 mg/l) is also lead to increase of melanoidin formation rate. At the same time presence of zinc ions (until to 100 mg/l) is not influenced on the non-enzymatic browning intensity. Difference in influence of metals ions on amino-carbonyl interactions can be bound to their various oxidation-reduction activity in relation to amino conjugates:  $Cu^{2+}$  ions, having higher ability to reduction, than  $Zn^{2+}$  ions. Absence of browning intensity rising in the *D*-lactose–PABA– $M^{2+}$ –chelating agent, what reliably demonstrates participation of copper(II) ions in incipient stages of the studied processes, and the lactose– $M^{2+}$  systems without PABA is also noted, that show absence of lactose caramelization processes in experimental conditions and allows to refer the effects studied to melanoidin formation.

**Ключевые слова:** *D*-лактоза, неферментативное окрашивание, *n*-аминобензойная кислота, ионы *d*-металлов.

**Key words:** *D*-lactose, non-enzymatic browning, *p*-amino benzoic acid, *d*-metal ions

**Введение**

Меланоидинообразование как один из наиболее биологически важных процессов с участием углеводов изучается уже более ста лет, в то же время исследования реакций сахар-аминных конденсаций в присутствии металлов проводятся систематически лишь в последние десятилетия в связи с возросшим

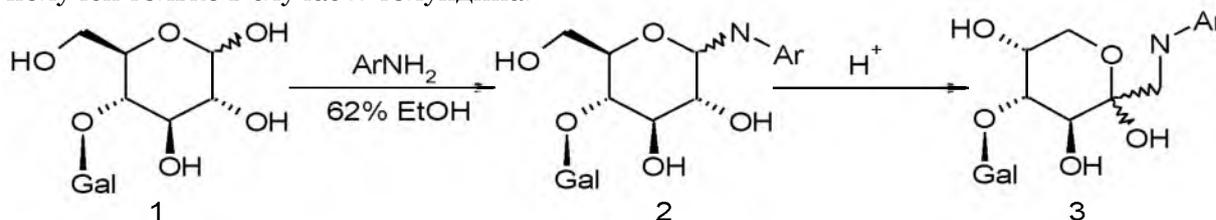
интересом к способности продуктов различных стадий реакции Майяра к взаимодействию с биогенными элементами [Gomyo, Horikoshi, 1976], обнаруживающему ряд кинетических закономерностей [Ramonaityte et al, 2009], а также хелатирующий эффект [Zhuang, Sun, 2011]. Анализ публикаций по данной тематике показывает, что наиболее изученными на сегодняшний день являются системы углеводов–аминокислота– $M^{n+}$ , где  $M^{n+}$  –  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , при этом полученные данные относятся к водным растворам и производным алифатического ряда [Randleman, Inglett, 1990; Kim, 2013], в то время как ароматические аминокислоты в качестве реагентов в том числе и в средах на смешанных растворителях, также представляющих определенный практический интерес, практически не освещены. Настоящее исследование посвящено изучению влияния ионов меди(II) и цинка на процессы меланоидинообразования при кислотно-катализируемом взаимодействии *D*-лактозы с *n*-аминобензойной кислотой в водно-этанольных средах.

### Объекты и методы исследования

Исследования проводились в водно-этанольных средах (62% *EtOH*) нагреванием эквимольных количеств *D*-лактозы и ПАБК в присутствии каталитических количеств уксусной кислоты в колбе с обратным холодильником, туда же в начале экспериментов добавлялись требуемые объемы спиртовых растворов ацетатов меди(II) или цинка таким образом, что концентрация ионов металлов в системе соответствовала расчетным значениям в интервале от 20 до 120 мг/л. Электронные спектры разбавленных проб, отбираемых по мере протекания процесса, снимались в кварцевых кюветах на спектрофотометре СФ-2000, колебательные спектры твердых продуктов реакции (1:200 *KBr*) регистрировались на ИК Фурье-спектрометре ФСМ-2201.

### Результаты и их обсуждение

Ранее нами [Cherepanov et al, 2016] были изучены процессы кислотно-каталитической конденсации *D*-лактозы (1) с замещенными ароматическими аминами, в частности *n*-толуидином и ПАБК, при этом показано, что первичные продукты amino-карбонильных взаимодействий – *N*-гликозиламины (2) – образуются в случае обоих ариламинов, а продукт перегруппировки Амадори (3) может быть получен только в случае *n*-толуидина.



Пониженная основность азота ПАБК затрудняет перегруппировку, и *N*-*n*-карбоксифенилдезоксиллактоза с приемлемым выходом выделена не была, развитие процессов меланоидинообразования в этом случае также подавлено.

Анализ спектров поглощения изучаемых систем в УФ-области (рис. 1) показывает возрастание оптической плотности во времени по мере увеличения концентрации ионов меди (II) в интервале от 20 до 120 мг/л.

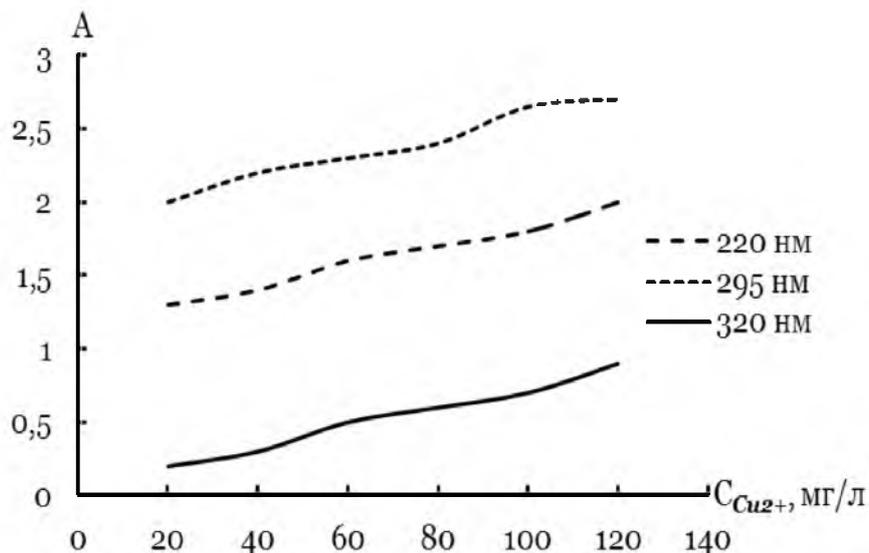


Рис. 1. Изменение оптической плотности реакционной системы *D*-лактоза (0.002 моль)–ПАБК (0.002 моль) в зависимости от концентрации ионов меди(II) (62% *EtOH*, 80°C,  $\tau=80$  мин)  
 Fig. 1. Optical density of *D*-lactose (0.002 mol)–PABA (0.002 mol) reactive system as function of copper(II) ion concentration (62% *EtOH*, 80°C,  $\tau=80$  min)

Полные электронные УФ-спектры изучаемой реакционной системы в присутствии 120 мг/л ионов меди (II) при различной продолжительности нагревания также показывают усиление окрашивания во времени (рис. 2).

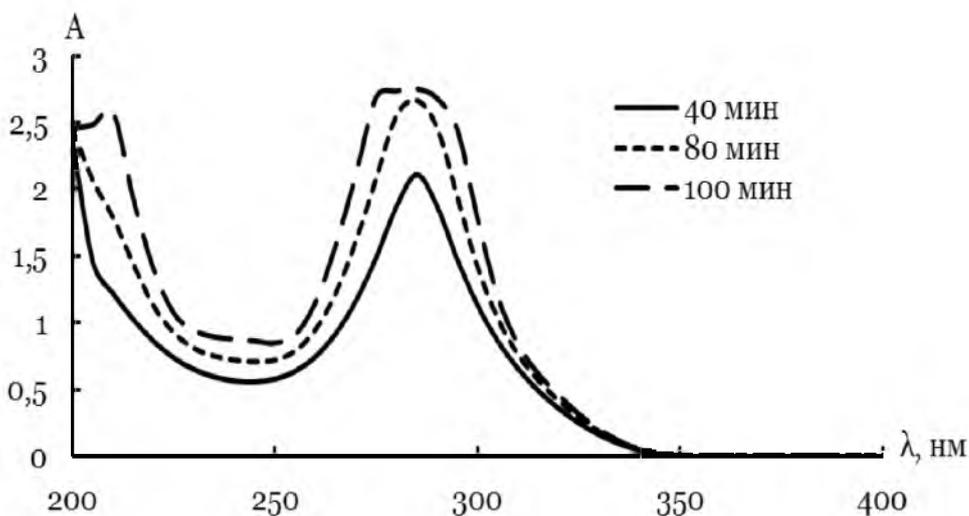


Рис. 2. Спектры поглощения реакционной системы *D*-лактоза (0.002 моль)–ПАБК (0.002 моль) в присутствии ионов  $Cu^{2+}$  (120 мг/л), регистрируемые при различной продолжительности нагревания (62% *EtOH*, 80°C)  
 Fig. 2. Absorption spectra of *D*-lactose (0.002 mol)–PABA (0.002 mol) reactive system in the presence of copper(II) ions (120 mg/l) recorded at the various heating duration (62% *EtOH*, 80°C)

Гиперхромный эффект может быть связан с ускорением реакции Майяра посредством взаимодействия ионов  $Cu^{2+}$  с первичными продуктами аминокарбонильных реакций, что облегчает последующую деградацию до редуктонов и развитие меланоидинообразования. Дифференциальные спектры поглощения в видимой области (рис. 3) показывают выраженную амплитуду на участке 410–420 нм, что характеризует нарастание во времени поглощения в данной области, отвечающее ускорению формирования «браун»-полимеров.

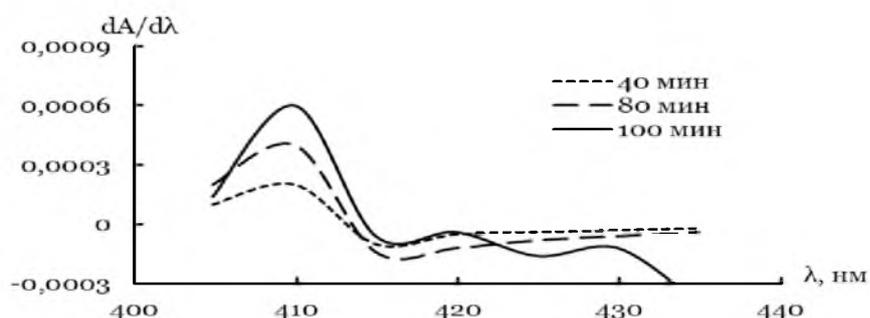


Рис. 3. Дифференциальные спектры поглощения реакционной системы *D*-лактоза (0,002 моль)–ПАБК (0,002 моль) в присутствии ионов  $Cu^{2+}$  (120 мг/л), регистрируемые при различной продолжительности нагревания (62% EtOH, 80°C)

Fig. 3. First-order derivative absorption spectra *D*-lactose (0,002 mol)–PABA (0,002 mol) reactive system in the presence of copper(II) ions (120 mg/l) recorded at the various heating duration (62% EtOH, 80°C)

В то же время введение в реакционную систему ионов цинка не показывает закономерного изменения характеристик спектров (рис. 3), при этом наблюдается некоторое снижение оптической плотности в ультрафиолетовой области, подобный эффект был ранее объяснен связыванием некоторого количества низкомолекулярных продуктов реакции ионами металлов [Zhuang, Sun, 2011].

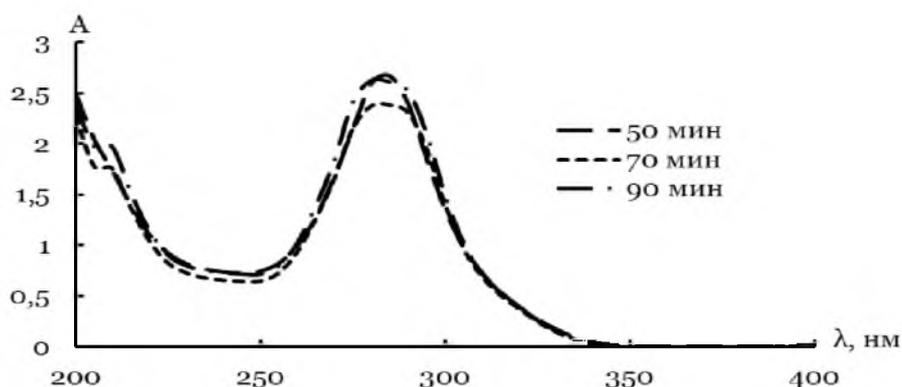
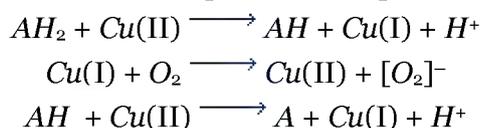


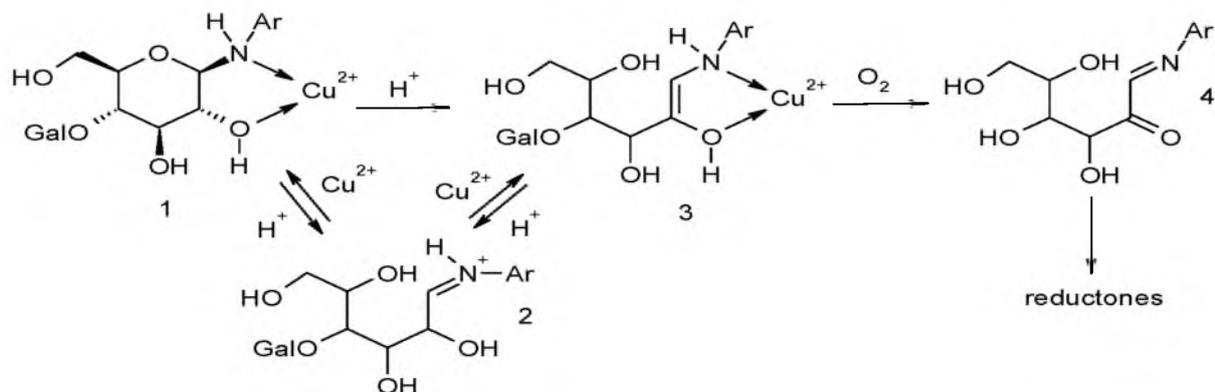
Рис. 4. Спектры поглощения реакционной системы *D*-лактоза (0,002 моль)–ПАБК (0,002 моль) в присутствии ионов  $Zn^{2+}$  (100 мг/л), регистрируемые при различной продолжительности нагревания (62% EtOH, 80°C)

Fig. 4. Absorption spectra of *D*-lactose (0,002 mol)–PABA (0,002 mol) reactive system in the presence of zinc ions recorded at the various heating duration (62% EtOH, 80°C)

Отличие во влиянии ионов металлов на аминокарбонильные взаимодействия может быть связано с их различной окислительно-восстановительной активностью по отношению к аминоконъюгатам: ионы  $Cu^{2+}$ , обладая более высокой способностью к восстановлению, нежели ионы  $Zn^{2+}$ , участвуют в окислении [Cheng et al, 1991; Hofmann, Schieberle, 2000] в соответствии с механизмом, предложенному ранее [Kawakishi et al, 1991], согласно которому аминоконъюгат  $AH_2$  под действием  $Cu(II)$  переходит в промежуточную окисленную форму  $AH$ , при этом происходит восстановление меди до ионов  $Cu(I)$ , которые при участии кислорода регенерируются в исходное двухзарядное состояние, завершающее образование оксоформы  $A$ :



Исходя из представленного механизма, можно предположить координацию меди(II) с *N*-гликозиламинами в циклической форме (1) [Черепанов и др., 2015; Черепанов, 2016], которая далее трансформируется, вероятно, через протонированный по атому азота азометин (2), в ациклический  $\text{Cu}^{2+}$ -энаминол (3) с последующим окислением до оксоформы (4):



Структура промежуточных соединений остается дискуссионной; вполне вероятно, что ионы металла в данных условиях образуют комплексы с ациклическими основаниями Шиффа, как об этом сообщалось ранее [Zhuang, Sun, 2011; Jing, Kitts, 2004]. Введение в реакцию систему хелатирующих агентов (ЭДТА) не показывает ускоряющего эффекта, что также подтверждает участие меди(II) в формировании промежуточных продуктов.

Реакционные системы в присутствии цинка не обнаруживают заметного комплексообразования, твердые продукты, выделенные из растворов, не имеют в ИК-спектрах четких характеристических полос, отвечающих образованию связей металл-лиганд (рис. 5), что подтверждается опубликованными ранее данными [O'Brien, Morrissey, 1997], которые отмечают более слабую комплексообразующую активность ионов  $\text{Zn}^{2+}$  по отношению к аминоконъюгатам и меланоидинам.

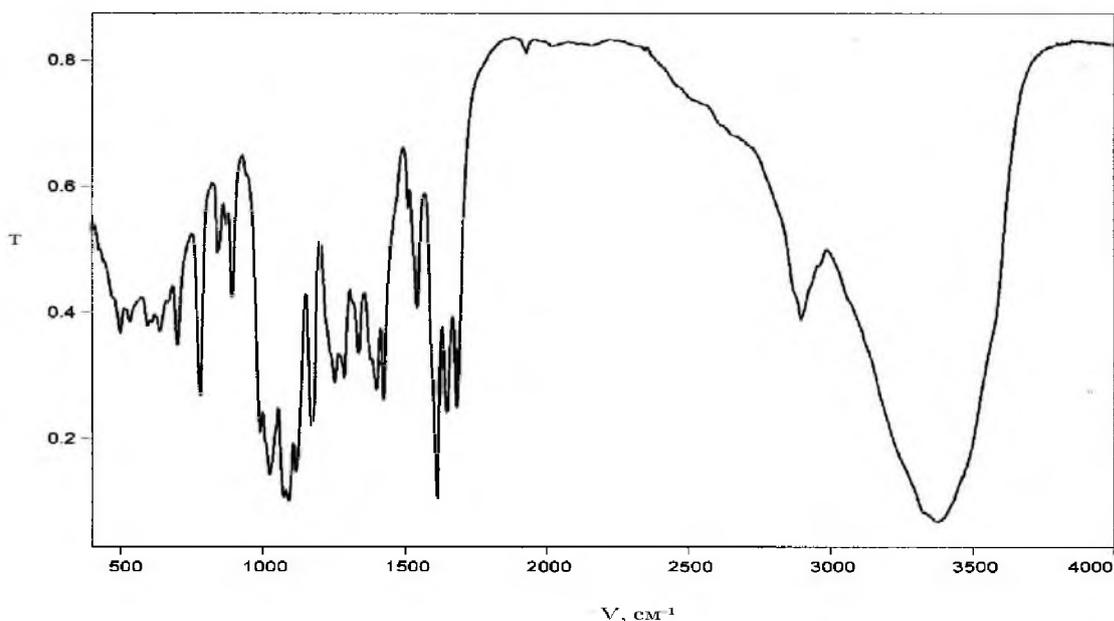


Рис. 5. ИК-спектр твердого продукта, выделенного из реакционной системы *D*-лактоза (0.002 моль)–ПАБК (0.002 моль)– $\text{Zn}^{2+}$  (100 мг/л) (1:200 KBr)

Fig. 5. FTIR-spectrum of the solid product, isolated from *D*-lactose (0.002 mol)–PABA (0.002 mol)– $\text{Zn}^{2+}$  (100 mg/l) system (KBr pellet, 1:200)



В заключение следует отметить, что в исследуемых растворах, не содержащих ПАБК, заметного окрашивания не наблюдается при термостатировании (80°C) в течение двух часов, что показывает отсутствие заметного протекания процессов карамелизации лактозы [Kroh, 1994] в условиях эксперимента и позволяет отнести изученные эффекты именно к меланоидинообразованию.

### Заключение

Представлены результаты исследования поведения системы *D*-лактоза–*n*-аминобензойная кислота (ПАБК)– $M^{2+}$  в подкисленных водно-этанольных средах в условиях реакции Майяра. Отмечено увеличение интенсивности окрашивания в присутствии ионов меди(II), при этом рост концентрации  $Cu^{2+}$  (до 120 мг/л) приводит к увеличению скорости меланоидинообразования; в то же время присутствие ионов  $Zn^{2+}$  (до 100 мг/л) практически не оказывает влияния на скорость неферментативной деструкции. Показано отсутствие нарастания интенсивности окрашивания в системах *D*-лактоза–ПАБК– $M^{2+}$ –хелатирующий реагент, а также в свободных от амина системах лактоза– $M^{2+}$ .

### Список литературы References

1. Черепанов И.С. 2016. Синтез и изучение поведения функционализированных производных углеводов в медь(II)-содержащих растворах. *Наука Удмуртии*, 78 (4): 134–138.
- Cherepanov I.S. 2016. Synthesis and study of the function substituted carbohydrate's compounds in copper(II)-containing media. *Nauka Udmurtii*, 78 (4): 134–138. (in Russian)
2. Черепанов И.С., Трубачев А.В., Сергеева К.А. и др. 2015. Изучение взаимодействия меди (II) с *N*-гликозилами. *Химическая физика и мезоскопия*, 17 (4): 604–608.
- Cherepanov I.S., Trubachev A.V., Sergeeva C.A. et al. 2015. Study the interaction of copper(II) with *N*-glycosyamines. *Himicheskaja fizika i mezoskopija*, 17 (4): 604–608. (in Russian)
3. Cheng R., Tsunehiro J., Uchida K, Kawakishi S. 1991. Oxidative damage of glycated protein in the presence of transition metal ions. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55 (8): 1993–1998.
4. Cherepanov I.S., Abdullina G.M., Kornev V.I. 2016. Interaction of *D*-lactose with aromatic amines in aqueous-ethanolic media. *Butlerov Communication*, 46 (4): 71–76.
5. Gomyo T., Horikoshi M. 1976. On the interaction of melanoidins with metallic ions. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40 (1): 33–40.
6. Hofmann T., Schieberle P. 2000. Formation of aroma-active Strecker-aldehyde by a direct oxidative degradation of Amadori compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (9): 4301–4305.
7. Jing H., Kitts D. 2004. Antioxidant activity of sugar-lysine Maillard reaction products in cell free and cell culture systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 429 (1): 154–163.
8. Kawakishi S., Tsunehiro J., Uchida K. 1991. Autoxidative degradation of Amadori compounds in the presence of copper ion. *Carbohydrate Research*, 211 (1): 167–171.
9. Kim J.-S. 2013. Antioxidant and antiradical properties of Maillard reaction products in both aqueous and ethanolic fructose-glycine oligomer solutions. *The Food Science and Biotechnology*, 22 (3): 831–837.
10. Kroh L. 1994. Caramelization in food and beverages. *Food Chem.*, 51 (2): 373–379.
11. O'Brien J., Morrissey P. 1997. Metal ion complexation by products of Maillard reaction. *Food Chemistry*, 58 (1): 17–27.
12. Randleman J., Inglett G. 1990. The influence of  $Cu^{2+}$  in the Maillard reaction. *Carbohydrate Research*, 201 (2): 311–326.
13. Ramonaityte D., Kerstiene M., Adams A. 2009. The interaction of metal ions with Maillard reaction products in a lactose-glycine model system. *Food Research International*, 42 (3): 331–336.
14. Zhuang Y., Sun L. 2011. Antioxidant activity of maillard reaction products from lysine-glucose model system as related to optical property and copper(II) binding ability. *African Journal of Biotechnology*, 10 (35): 6784–6793.