

**ПОЛУЧЕНИЕ РАЗНОЦВЕТНЫХ ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ ФОРМ
АНТОЦИАНОВ КРАСНОКОЧАННОЙ КАПУСТЫ
МЕТОДОМ ЛИОФИЛЬНОЙ СУШКИ**

Я.Ю. Кульченко, В.И. Дейнека[@], Л.А. Дейнека, И.П. Блинова

*Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Белгород 308015, Россия*

[@]Автор для переписки, e-mail: deineka@bsu.edu.ru

В работе методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием определен качественный состав антоцианов краснокочанной капусты: он включает моно- и диацелированные производные 3,5-диглюкозидов цианидина со сложным строением заместителя в положении 3. Количественный анализ упрощенным (в работе объяснена причина отказа от дифференциального метода) спектрофотометрическим методом показал, что уровень накопления антоцианов составляет порядка 0.100 г антоцианов на 100 г растительного материала (в пересчете на цианидин-3-глюкозида хлорид). На основе анализа электронных спектров экстракта при различных рН установлено образование четырех разноокрашенных структур антоцианов. Описаны процедуры экстракции, частичной очистки и получения разноцветных окрашенных форм методом лиофильной сушки. Получены 6 образцов инкапсулированных в мальтодекстрин форм различной окраски с высокой устойчивостью при хранении в морозильной камере.

Ключевые слова: *краснокочанная капуста, антоцианы, влияние рН, разноцветные инкапсулированные формы, лиофильная сушка, обращенно-фазовая ВЭЖХ.*

**OBTAINING RED CABBAGE ANTHOCYANIN COLORED ENCAPSULATED
FORMS BY THE METHOD OF FREEZE-DRYING**

Ya.Yu. Kulchenko, V.I. Deineka[@], L.A. Deineka, I.P. Blinova

Belgorod National Research University, Belgorod 308015, Russia

[@]Corresponding author e-mail: deineka@bsu.edu.ru

The method of reversed-phase HPLC with diode-array and mass-spectrometric detection was explored to determine the qualitative composition of red cabbage anthocyanins. Mono- and diacylated derivatives of cyanidin-3,5-diglycosides with a complex structure of the substituent in position were found, as well as non-esterified compounds. The acylation acids were p-coumaric, ferulic and sinapic. Quantitative analysis was performed according to a simplified spectrophotometric method: absorbance measurement at pH 4.5 was excluded. The measurement showed that the level of anthocyanins accumulation is as high as 0.100 g of anthocyanins per 100 g of raw plant material (as cyanidin-3-glucoside chloride equivalent). Analysis of electronic spectra of the extract at different pH revealed the existence of some basic structures with absorbance maxima shifted bathochromically as compared to the spectrum of flavylium structure. The existence of one basic form at pH 4.5 forced us to exclude absorbance measurement at pH 4.5 during quantitative anthocyanin determination. Thus, the possibility of obtaining some differently colored encapsulated forms was proved. Because of relative instability of non-flavylium forms of anthocyanins the freeze drying technique was used to prepare six differently colored forms of 3% anthocyanins encapsulated in maltodextrin. The decrease of anthocyanins contents at drying did not exceed 30%, while no statistically proved loss of anthocyanins was found at storage in a refrigerator during more than six months.

Keywords: *red cabbage, anthocyanins, effect of pH, colored encapsulated forms, lyophilic drying, reversed-phase HPLC.*

Антоцианами называют один из подклассов обширного класса флавоноидов. Эти соединения вызывают интерес как водорастворимые природные красители, обладающие антиоксидантной активностью [1–3]. Одна из особенностей антоцианов – существование их в водных растворах в нескольких pH-зависимых формах (рис. 1).

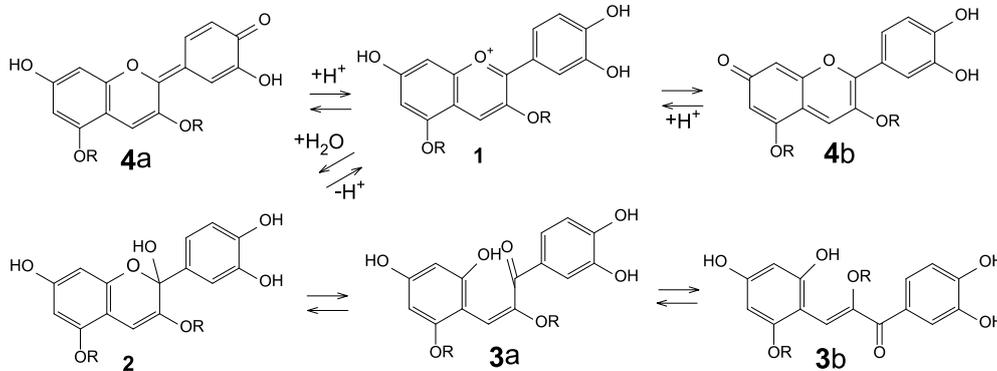


Рис. 1. Схема превращения различных форм антоцианов при изменении pH
1 – флавилиевая форма; 2 – псевдооснование; 3 – халконные формы (а – *цис*, б – *транс*);
4 (а и б) – незаряженные хиноидные формы.

оттенками. При повышении pH до 4.5 флавилиевая форма почти полностью [5, 6] исчезает и антоцианы переходят в форму псевдооснований (2), что сопровождается соответствующей потерей окраски. Именно это свойство позволило предложить дифференциальный спектрофотометрический метод для определения обобщенной концентрации мономерных антоцианов на фоне окрашенных полимерных соединений [7]. Флавилиевой форме сопутствуют две халконные структуры (3а и 3б), обладающие лишь слабой окраской. С другой стороны, в ряде работ указывалось на то, что повышение pH приводит к переходу флавилиевой формы за счет потери протона в хиноидные структуры (4а и 4б), которые также обладают интенсивной окраской, но уже в ином диапазоне электромагнитного спектра. Хиноидные структуры при дальнейшем повышении pH приобретают заряд, что также должно сказаться на окраске антоцианов. В этом отношении удивительно, что примеры работ, в которых получали сухие формы антоцианов с окраской, отличающейся от красной, очень редки [8–11]. Так, например, указанные превращения учтены в патенте [11], в котором предложен метод получения синей готовой формы из ацилированных антоцианов краснокочанной капусты.

Таким образом, в случае антоцианов возможно получение некоторого набора окрашенных форм в растворах с различным pH. Решение задачи получения форм антоцианов с различной окраской (кроме красной флавилиевой формы) и их стабилизации инкапсулированием в полисахаридную матрицу стало целью данной работы.

Обычно для представления данного подкласса используют флавилиевую форму (1), в которой атому кислорода кольца С приписывают положительный заряд [4]. Однако исключительно в этой форме антоцианы существуют в растворах лишь в сильно кислых средах (при pH < 1) и придают растворам красную окраску с различными, зависящими от строения иона

Экспериментальная часть

В качестве источника антоцианов использовали краснокочанную капусту сорта Рексома, приобретенную на местном рынке. Антоцианы из растительного материала экстрагировали 0.1 М раствором соляной кислоты, не размалывая листья, – настаиванием в течение 24 ч. Полученный экстракт отделяли от твердого остатка фильтрованием через бумажный фильтр. Экстракцию повторяли несколько раз, контролируя концентрацию антоцианов в полученных растворах.

Очистку объединенного экстракта от сопутствующих веществ осуществляли методом твердофазной экстракции на сополимере стирола и дивинилбензола (Sepabeads SP859/L) и на октадецилсиликагеле (Патроны ДИАПАК С18). Для получения сухих форм антоцианы десорбировали смесью этанола с 0.1 М водным раствором HCl в соотношении 9 : 1 (по объему). Этанол удаляли на вакуумном ротационном испарителе при температуре водяной бани 35 °С.

Для получения растворов антоцианов при повышенных pH к аликвотной порции растворов антоцианов с начальным pH 1 добавляли раствор щелочи (NaOH) до достижения заданного pH, раствор доводили до метки в мерной колбе, определяли окончательное значение pH и записывали электронные спектры полученных растворов.

Для получения сухих форм к водному концентрату антоцианов добавляли заданное количество мальтодекстрина (DE 18-20), растворы замораживали в морозильной камере (20 °С) и лиофильно высушивали с использованием сушилки «LABCONCO FreeZone 2.5» (температура конденсора 40 °С).

Обобщенную концентрацию антоцианов (в пересчете на цианидин-3-глюкозида хлорид) в исследуемых образцах определяли упрощенным спектрофотометрическим методом без коррекции на абсорбцию экстрактов при pH 4.5 [11] на спектрофотометре «Shimadzu UV-2550».

Видовой состав антоцианового комплекса исходного сырья определяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе «Agilent 1260» с диодно-матричным (1260 DAD VL) и масс-спектрометрическим (Quadrupole LC/MS 66130) детектированием. Для разделения антоцианов использовали градиентный режим. Хроматографическая колонка 2.1×150 мм Kromasil 100-5C18; элюент А: 6% об. CH₃CN, 10% об. HCOOH, 84% об. воды; элюент Б: 20% об. CH₃CN, 10% об. HCOOH и 70% об. воды. Программа градиентного режима: 0 мин – 0% Б; 20 мин – 100% Б; 30 мин – 100% Б; 31 мин – 0% Б; 40 мин – 0% Б; при постоян-

ной суммарной скорости потока – 0.200 мл/мин и при температуре термостата колонки 40 °С.

Результаты и их обсуждение

Качественный анализ антоцианов краснокочанной капусты

Наши предварительные исследования показали, что bathochromное смещение максимумов абсорбции в электронном спектре растворов антоцианов при повышенных pH наблюдается в том случае, если в выбранном объекте доминируют антоцианы, ацилированные замещенными коричневыми кислотами. К таким объектам по литературным данным относится антоциановый комплекс краснокочанной капусты [12, 13]. Действительно, записанная в настоящей работе хроматограмма антоцианов краснокочанной капусты содержит большое количество пиков с разным временем удерживания, соответствующих антоцианам с различной структурой (рис. 2).

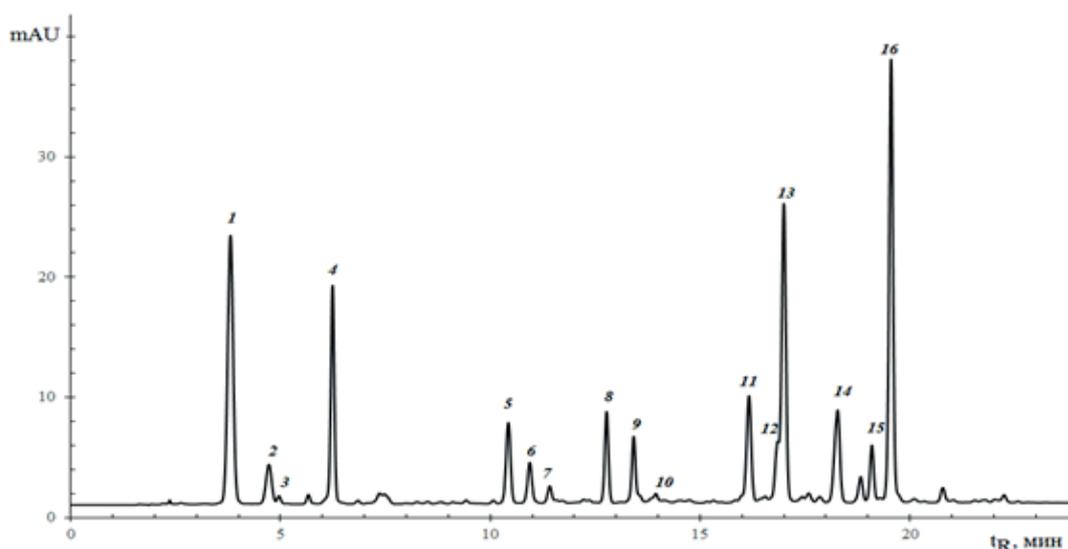


Рис. 2. ВЭЖХ-хроматограмма антоцианового комплекса краснокочанной капусты (условия - см. Эксперимент. часть, отнесение пиков - см. табл. 1).

Ацилирующими кислотами, что определяется по параметрам масс-спектров, в данном случае являются три замещенные коричневые кислоты: кумаровая, феруловая и синаповая. Более того, ацилированию подвергаются углеводные остатки только в положении 3 агликона, что определяется характеристическим набором ионов при частичной фрагментации. Предложенное отнесение пиков согласуется с известными литературными данными [12].

Количественный анализ и экстракция антоцианов краснокочанной капусты

Учитывая современную тенденцию к использованию «зеленых» технологий, мы предлагаем экстракцию антоцианов осуществлять настаиванием исходного растительного сырья в 0.1 М водном растворе HCl, отказываясь от использования подкисленных органических растворителей. При этом из-

мельчение растительного материала не желательно, поскольку при разрушении клеточных мембран облегчается экстракция сопутствующих водорастворимых полимерных соединений, способных ухудшить качество получаемого продукта, затруднить фильтрование или быстро загрязнить хроматографическую колонку, используемую для контроля состава антоцианового комплекса. Но такой метод настоя требует выдержки смеси в течение длительного времени (обычно смесь оставляли на ночь). Но на самом деле такая выдержка желательна, поскольку более полный перевод всех форм антоцианов, которые могут существовать в исходной матрице, во флавилиевую форму достигается примерно за сутки [14]. Впрочем, для быстрой количественной экстракции антоцианов в аналитических целях была использована и экстракция при растирании под слоем подкисленного водного

Таблица 1. Состав антоцианового комплекса краснокочанной капусты

№ пика*	Строение антоциана	Параметры пиков		
		t_R , мин	λ_{max} , нм	m/z
1	Cy3diG5G	3.81	514.0	773, 449, 287
2	Cy3G5G	4.72	514.0	611, 449, 287
3	Cy3diG	4.96	516.5	611, 287
4	Cy3Syn-diG5G	6.24	528.0	979, 449, 287
5	Cy3Coum-triG5G	10.43	521.5	1081, 919, 449, 287
6	Cy3Fer-triG5G	10.94	522.5	1111, 1019, 449, 287
7	Cy3Syn-triG5G	11.41	524.0	1141, 979, 449, 287
8	Cy3CounSyn-triG5G	12.77	535.0	1287, 1135, 449, 287
9	Cy3FerSyn-triG5G	13.42	535.5	1317, 1155, 449, 287
10	Cy3SynSyn-triG5G	13.95	535.0	1347, 1187, 449, 287
11	Cy3Coum-diG5G	14.15	522.0	919, 757, 449, 287
12	Cy3Fer-diG5G	16.87	522.0	949, 787, 449, 287
13	Cy3Syn-diG5G	16.99	523.0	979, 817, 449, 287
14	Cy3CoumSyn-diG5G	18.28	530.5	1125, 963, 449, 287
15	Cy3FerSyn-diG5G	19.09	535.0	1155, 993, 449, 287
16	Cy3SynSyn-diG5G	19.55	535.0	1185, 1023, 449, 287

* № пика на ВЭЖХ-хроматограмме, рис. 1.

Обозначения: Cy – цианидин; G, diG и triG – моно-, ди- и тригексозиды; радикалы кислот: Coum – пара-кумаровой, Fer – феруловой, Syn – синаповой.

раствора HCl. Результаты экстракции антоцианов по предложенной схеме представлены в табл. 2.

Подчеркнем, что измельчение под слоем кислого растворителя может быть необходимой процедурой: по нашему опыту, предварительное измельчение пурпурной

моркови блендером без добавки подкисленного экстрагента приводит к практически полному разрушению антоцианов до экстракции, а ферментная система цветков цикория быстро разрушает антоцианы лепестков, если их не экстрагировать сразу после удаления с цветка.

Таблица 2. Три стадии экстракции антоцианов из краснокочанной капусты

	1-я экстракция			2-я экстракция			3-я экстракция			Сумма
	$M_1:M_2$	α_1	%*	$M_1:M_2$	α_1	%*	$M_1:M_2$	α_1	%*	$\Sigma\alpha$
1	2.5	0.041	60	1.5	0.015	22	1.5	0.013	19	0.068
2	10	0.116	65	5.0	0.036	20	5.0	0.028	15	0.179
3	3.5	0.059	68	2.0	0.016	19	2.0	0.011	13	0.086
4	5.0	0.076	77	3.0	0.015	15	3.0	0.008	8.3	0.099
5	3.0	0.039	63	2.0	0.012	20	2.0	0.011	18	0.063
Среднее			66			19			15	0.099

Обозначения: $M_1:M_2$ – соотношение масс растворителя и растительного материала, г/г; α_1 – масса экстрагированных антоцианов на 100 г сырья в пересчете на цианидин-3-глюкозида хлорид, г; %* – доля экстрагированных антоцианов к сумме за три экстракции.

В трех параллельных опытах быстрого определения антоцианов при соотношении «экстрагент : сырье», равном 20 : 1 (г/г) было определено содержание антоцианов на уровне 0.123, 0.091 и 0.096 г / 100 г сырья в пересчете на цианидин-3-глюкозида хлорид, при среднем значении 0.103 г / 100 г, табл. 2. В опытах по препаративной экстракции антоцианов при существенно меньшем соотношении «экстрагент : сырье» (от 10 : 1 до 1.5 : 1, г/г) было установлено, что первая экстракция позволяет извлечь порядка 66% суммы антоцианов, табл. 2, вторая – около 20% и около 15%

– третья экстракция. После этого оставалось сырье только с незначительной окраской. Следовательно, рекомендуется трехэтапная экстракция для исследуемого растительного материала.

При довольно большом разбросе найденных показателей для пяти параллельных экстракций, что связано с неоднородностью порций сырья, среднее значение суммы экстрагированных антоцианов (0.099 г / 100 г сырья) оказалось статистически неотличимым от величин, полученных при экстракции с растиранием. На основании полу-

ченных данных можно утверждать, что уровень накопления антоцианов в краснокочанной капусте, использованной в настоящей работе, имеет не очень высокое значение, но с учетом простоты выращивания и сбора краснокочанную капусту можно считать хорошим источником ацилированных антоцианов, удобным для промышленного получения красителей.

Наши предварительные исследования показали, что сухие готовые формы антоцианов более устойчивы при хранении после простой частичной очистки от сопутствующих экстрактивных веществ.

Исследование окраски растворов различных форм антоцианов

Электронные спектры растворов антоцианов при различных рН представлены на рис. 3.

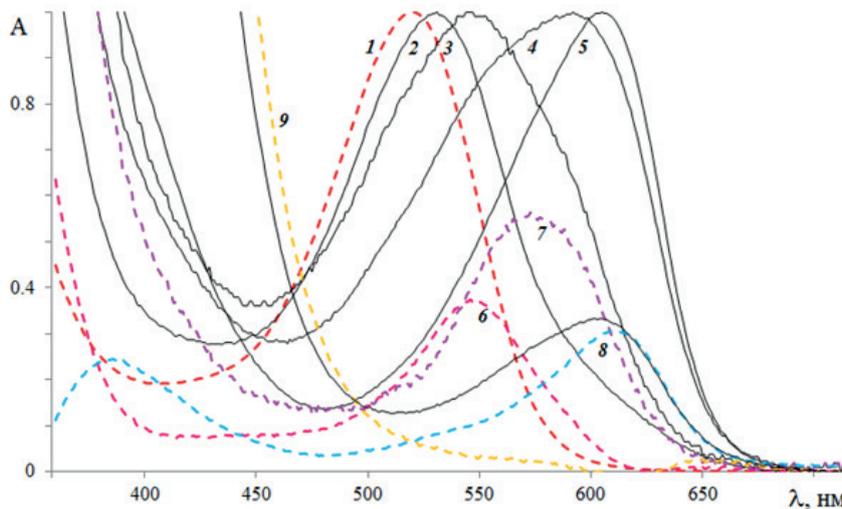


Рис. 3. Электронные спектры растворов антоцианов капусты краснокочанной при различных рН и «базисные» спектры:

1 – рН 1.1, 2 – рН 2.8, 3 – рН 4.9, 4 – рН 6.8 и 5 – рН 9.1; «базисные» спектры 6, 7, 8 и 9.

На рис. 3 представлены спектры растворов антоцианов капусты краснокочанной (масштабированные – для удобства сопоставления) при пяти различных значениях рН. Все спектры (кроме спектра флавилиевой формы, кривая 1) являются составными, т.е. представлены суммой спектров нескольких форм, присутствующих в растворе одновременно. Вычитанием полученных спектров с масштабированием несложно получить четыре «базисных» спектра (номера 6–9, рис. 3), комбинацией которых можно составить спектр раствора при любом рН: они имеют длины волн в максимумах абсорбции 545, 573 и 608 нм. Все перечисленные «базисные» спектры, включая спектр флавилиевой формы, изображены на рис. 3 пунктирной линией. Указанные положения максимумов абсорбции являются ориентировочными, поскольку применение строгих критериев для корректного математического решения проблемы в случае многокомпонентных смесей (по строению антоцианов, различающихся по спектрам при одних и тех же условиях) лишено смысла. Но использование полученных характеристик свидетельствует о том, что возможно создание нескольких разноокрашенных форм.

По общепринятой методике количественного определения антоцианов методом дифференциальной спектроскопии утверждается, что при повышении рН флавилиевая форма (λ_{max} 520 нм) постепенно

замещается неокрашенной полуацетальной формой [12]. Однако появление полосы с максимумом абсорбции при 545 нм указывает на параллельное образование еще одной окрашенной формы. И действительно, в литературе имеется информация [15] о том, что повышение рН приводит не только к нуклеофильной атаке флавилиевого иона молекулой воды, заканчивающейся присоединением ОН-группы к атому углерода в положении 2, но и к депротонированию флавилиевого иона с образованием хиноидных форм. Отметим, что авторы цитируемой работы утверждали, что равновесное содержание хиноидных форм сильно зависит от строения антоциана. В таком случае, по крайней мере, для части антоцианов дифференциальная спектрофотометрическая методика может быть неприменимой, и мы были вынуждены отказаться от нее в настоящей работе.

Получение и контроль стабильности сухих инкапсулированных форм

Известно, что наивысшей устойчивостью при хранении обладает флавилиевая форма антоцианов, а остальные формы склонны к более быстрому разрушению. По этой причине лиофильная сушка в замороженном состоянии (метод, выбранный в данной работе) представляется более удачным вариантом по сравнению с распылительной сушкой.

Водный концентрат антоцианов и мальтодекстрин смешивали в соотношении, необходимом для получе-

ния инкапсулированной формы с содержанием антоцианов 3%. После лиофилизации образцы инкапсулированных антоцианов измельчали в фарфоровой

ступке и хранили в бюксах в морозильной камере. На рис. 4 представлены фотографии шести полученных образцов спустя более 6 месяцев хранения.

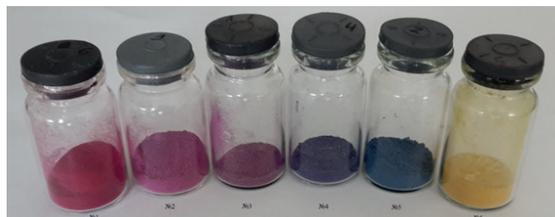


Рис. 4. Образцы инкапсулированных форм антоцианов различной окраски (№ 1 – красная; № 2 – малиновая; № 3 – сиреневая; № 4 – фиолетовая; № 5 – синяя; № 6 – желтая).

Количественный анализ, выполненный упрощенным спектрофотометрическим методом, позволил установить, что потери антоцианов при получении пяти форм (№ 1 – № 5) оказались заметными – примерно на уровне 30%, в то время как в случае желтой формы возратить в флавилиевую форму удастся лишь 17% исходных антоцианов. Однако, при последующем хранении в течение более шести месяцев статистически значимых потерь антоцианов не было обнаружено ни в одном из шести образцов.

Список литературы / References:

1. Miguel M.G. Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities // *J. Appl. Pharm. Sci.* 2011. V. 1. № 6. P. 7-15.
2. Mazza G. Anthocyanins and heart health // *Ann. Ist. Super Sanità.* 2007. V. 43. № 4. P. 369–374.
3. Taylor C. Wallace Anthocyanins in Cardiovascular Disease // *Adv. Nutr.* 2011. V. 2. P. 1–7.
4. Francis F.J. A new group of food colorants // *Trends Food Sci. Technol.* 1992. V. 31. P. 27–30.
5. Brouillard R., Lang J. The hemiacetal – cis-chalcone equilibrium of malvin, a natural anthocyanin // *Can. J. Chem.* 1990. V. 68. № 5. P. 755–761.
6. Silva V.O., Freitas A.A., Maçanita A.L., Quina F.H. Chemistry and photochemistry of natural plant pigments: the anthocyanins // *J. Phys. Org. Chem.* 2016. V. 29. № 11. P. 594–599.
7. Lee J., Durst R.W., Wrolstad R.E. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study // *J. AOAC Internat.* 2005. V. 88. № 5. P. 1269–1278.
8. Saito N., Tatsuzawa F., Toki K., Shinoda K., Shigihara A., Honda T. The blue anthocyanin pigments from the blue flowers of *Heliophila coronopifolia* L. (Brassicaceae) // *Phytochem.* 2011. V. 72. № 17. P. 2219–2229.
9. Bloor S.J. Deep blue anthocyanins from blue *Dianella* berries // *Phytochem.* 2001. V. 58. № 6. P. 923–927.
10. Yoshida K., Mori M., Kondo T. Blue flower

Выводы

Антоцианы краснокочанной капусты образованы производными цианидина с одинарным и двойным ацилированием замещенными коричневыми кислотами. При изменении pH в спектрах обнаруживается несколько «базисных» структур с различным положением максимумов абсорбции, что позволяет создавать разноцветные инкапсулированные в мальтодекстриновую матрицу формы антоцианов.

color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology // *Nat Prod Rep.* 2009. V. 26. № 7. P. 884–915.

11. Robbins R.J., Christopher Johnson J., Collins T.M., Ahmadiani N., Monica Giusti M. Natural blue anthocyanin-containing colorants: WO 2014152478 A2 Mars, Incorporated, The Ohio State University. Filled 14.03.2014. Date of Patent 25.09.2014.

12. Wiczkowski W., Szawara-Nowak D., Topolska J. Red cabbage anthocyanins: Profile, isolation, identification, and antioxidant activity // *Food Res. Internat.* 2013. V. 51. P. 303–309.

13. Ahmadiani N., Robbins R.J., Collins T.M., Giusti M.M. Anthocyanins contents, profiles, and color characteristics of red cabbage extracts from different cultivars and maturity stages // *J Agric Food Chem.* 2014. V. 62. № 30. P. 7524–7531.

14. Дейнека Л.А., Блинова И.П., Кульченко Я.И., Озер П.С., Саенко И.И., Дейнека В.И. Сохранность и переход между формами антоцианов в растворах // *Успехи современного естествознания.* 2016. №2. С. 16–20.

Deineka L.A., Blinova I.P., Kulchenko Ya.Yu., Ozer P.S., Saenko I.I., Deineka V.I. Stability and interconversions between anthocyanin forms in solutions // *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya (Advances in Current Natural Science).* 2016. № 2. С. 16–20. (in Russ.).

15. Pina F. Thermodynamics and kinetics of favylum salts // *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 1998. V. 94. № 15. P. 2109–2116.

Об авторах:

Кульченко Ярослава Юрьевна, аспирант кафедры общей химии Института инженерных технологий и естественных наук ФГФУОВО Белгородского государственного национального исследовательского университета (308015, Россия, Белгород, ул. Победы, 85).

Дейнека Виктор Иванович, профессор кафедры общей химии Института инженерных технологий и естественных наук ФГФУОВО Белгородского государственного национального исследовательского университета (308015, Россия, Белгород, ул. Победы, 85).

Дейнека Людмила Александровна, доцент кафедры общей химии Института инженерных технологий и естественных наук ФГФУОВО Белгородского государственного национального исследовательского университета (308015, Россия, Белгород, ул. Победы, 85).

Блинова Ирина Петровна, доцент кафедры общей химии Института инженерных технологий и естественных наук ФГФУОВО Белгородского государственного национального исследовательского университета (308015, Россия, Белгород, ул. Победы, 85).

About authors:

Yaroslava Y. Kulchenko, Postgraduate of General Chemistry Chair of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences, Belgorod National Research University (85, Pobeda str., Belgorod 308015, Russia).

Victor I. Deineka, Dr. Sc. (Chemistry), Professor of General Chemistry Chair of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences, Belgorod National Research University (85, Pobeda str., Belgorod 308015, Russia).

Ludmila A. Deineka, Ph. D. (Chemistry), Associate Professor of General Chemistry Chair of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences, Belgorod National Research University (85, Pobeda str., Belgorod 308015, Russia).

Irina I. Blinova, Ph. D. (Chemistry), Associate Professor of General Chemistry Chair of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences, Belgorod National Research University (85, Pobeda str., Belgorod 308015, Russia).