
LEK. SIROV.	God. XXXIII	Broj 33	Str. 19 – 37	Beograd 2013.
LEK. SIROV.	Vol. XXXIII	No. 33	PP. 19 – 37	Belgrade 2013.

Pregledni rad – Review paper
UDC: 615.279:547.973

Rukopis primljen: 28.11.2013.
Prihvaćen za publikovanje: 13.12.2013.

ANTOCIJANI – HEMIJSKA ANALIZA I BIOLOŠKA AKTIVNOST

Nada Čujić¹, Tatjana Kundaković², Katarina Šavikin¹

¹ Institut za proučavanje lekovitog bilja „dr Josif Pančić“, Tadeuša Koćuška 1, 11000 Beograd, Srbija

² Farmaceutski fakultet, Instiut za farmakognoziiju, Vojvode Stepe 450, 11000 Beograd, Srbija

IZVOD

Antocijani su grupa od preko 500 različitih jedinjenja koja uzrokuju crvenu, ljubičastu i plavu boju mnogih biljaka, a posebno voća, povrća i žitarica. Antocijani strukturno pripadaju flavonima. Uglavnom se voće smatra glavnim izvorom antocijana, mada su oni prisutni i u povrću, korenju, lukovicama, pulpama plodova, mahunarkama i žitaricama. Ogromna raznovrsnost antocijana koja može da se nađe u prirodi čini ih veoma složenom i interesantnom grupom. U biljnim vrstama su prisutni u vidu heterozida. Aglikoni antocijana poznati su kao antocijanidini, a u prirodi je do sad poznato 6 antocijanidina: pelargonidin, cijanidin, peonidin, delfinidin, petunidin i malvidin. Pelargonidin kao najstabilniji antocijanidin je i najviše zastupljen u prirodi. U glikozidne derivate najviše rasprostranjene u prirodi spadaju 3-monozidi, 3,5 biozidi i 3,7 diglukozidi. Interesovanje za antocijane je sve veće proteklih par godina, zbog njihove potencijalne primene u farmaceutskoj industriji, industriji hrane i kozmetičkoj industriji. Uprkos tome njihova upotreba je i dalje ograničena zbog njihove relativne nestabilnosti i niskom procentu ekstrahovanja iz biljnog materijala. Antocijani su reaktivna i dosta nestabilna jedinjenja. Reverzibilno trpe strukturne transformacije sa promenom pH što ima najveći uticaj na boju. pH je određen kao uzročnik najveće nestabilnosti antocijana, i od pH u najvećoj meri zavisi njihova pigmentacija. Antocijani su polarni molekuli tako da su se kao najefikasniji rastvarači za ekstrakciju pokazale smeše polarnih rastvarača kao što su etanol, metanol i aceton. Metode ekstrakcije koje se koriste za izolovanje antocijana nisu selektivne jer pored antocijana ekstrahuje se i veliki broj balastnih materija kao što su šećeri i organske kiseline. Neophodno je implementirati nove tehnike

prečišćavanja, kao što su ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE), ekstrakcije tečno-tečno (LLE), kao i korišćenje sofisticiranih hromatografskih tehnika kao što su protivstrujna hromatografija (CCC), i visoko efikasna tečna hromatografija (HPLC). Identifikacija antocijana ima ključnu ulogu u taksonomiji, i proceni kvaliteta biljnih droga i hrane koja sadrži antocijane. Reverzno fazna RP-HPLC povezana sa fotodiodom (DAD detektor) je najviše korišćena metoda za identifikaciju i određivanje antocijana. Priprema uzoraka za HPLC analizu uglavnom podrazumeva kiselu hidrolizu antocijana da bi se oslobodili antocijanidini. Antocijani mogu biti kvantifikovani preko bilo kog prečišćenog standarda, ali najčešće se kao standard koristi cijanidin-3-glikozid, a kvantifikacija se vrši na talasnoj dužini od 520 nm. Metoda izbora za brz skrining ukupnih antocijana u povrću i voću je spektrofotometrijsko određivanje na 528 nm, pri kontrolisanoj pH. Ova metoda funkcioniše veoma dobro gde je potrebna procena, a ne preciznost kvantifikacije. Antocijani se slabo resorbuju i ne metabolišu se u istom stepenu kao drugi flavonoidi, zbog čega se smatra da imaju malu bioraspoloživost. Ispitivanje bioraspoloživosti antocijana uglavnom je vršeno je na životinjama. Većina studija je pokazala da dostižu maksimalnu koncentraciju u krvi nakon 15 min - 2h. Zainteresovanost za antocijane je posebno porasla poslednjih godina zbog njihovih pozitivnih efekata na zdravlje. Deluju kod hroničnih bolesti, a u prvom redu kod kardiovaskularnih oboljenja. Oni su zajedno sa ostalim flavonoidima važni nutritivni sastojci zbog svojih antioksidativnih sposobnosti, što ukazuje na njihovu potencijalnu primenu u prevenciji nekoliko bolesti koje su povezane sa oksidativnim stresom. Neke biljke sa visokim sadržajem antocijana imaju ulogu u prevenciji mutageneze i inhibitori su kancerogeneze. Ekstrakti dobijeni iz bobičastog voća imaju najveći potencijal uklanjanja slobodnih radikala i kod njih je antioksidativna aktivnost proporcionalna sadržaju antocijana.

Ključne reči: antocijani, hemijska analiza, kardiovaskularna oboljenja, antioksidativna aktivnost.

UVOD

Antocijani su najvažnija grupa vodeno rastvornih pigmenata u biljkama. Obuhvataju grupu od preko 500 različitih jedinjenja koja su odgovorna za crvenu, ljubičastu i plavu boju mnogih biljaka a posebno voća, povrća i žitarica. Antocijani pripadaju grupi jedinjenja poznatih pod nazivom flavonoidi, koji su podgrupa još veće grupe jedinjenja poznatih pod nazivom polifenoli [1].

Do sada je ukupno izolovano 539 antocijana od kojih je 277 izolovano posle 1992. godine, što ukazuje na to koliko se antocijani intenzivno istražuju. Dve klase dimera antocijana su izolovane iz biljaka. Prva grupa uključuje pigmente gde su antocijani, flavoni ili flavonoli povezani na svakom kraju sa dikarboksilnim kiselinama. Druga grupa uključuje 4 različita katehina povezanih kovalentno sa pelargonidin-3-glikozidom. Tokom prethodne decenije, izolovano je 7 novih dezoksiantocijanidina i novi tipovi antocijanidina nazvanih piranoantocijanidini [2].

Uglavnom se voće smatra glavnim izvorom antocijana, mada su oni prisutni i u povrću, korenju, lukovicama, pulpama plodova, mahunarkama i žitaricama. Antocijani se nalaze u listovima i cvetovima nekih biljaka koje se tradicionalno konzumiraju širom sveta. Familije u kojima su zastupljeni antocijani su: *Alliaceae*, *Convolvulaceae*, *Gentianaceae*, *Geraniaceae*, *Labiatae*, *Liliaceae*, *Nymphaeaceae*, *Orchidaceae*, *Ranunculaceae*, *Solanaceae* [2]. Neke od biljnih vrsta u kojima se sreću antocijani su: *Vitis vinifera*, *Sambucus nigra*, *Brassica oleracea*, *Hibiscus sabdariffa*, *Citrus sinensis*, *Aronia melanocarapa* i druge [3]. Aronija se smatra najboljim izvorom antocijana u prirodi, i sadržaj u plodovima ili u sveže iscedenom soku dostiže vrednost od 300-2000mg/100g. Pokazano je da aronija ima najvišu antioksidativnu aktivnost u odnosu na sve ostale dijetarne vrste familije *Rosaceae*, kojoj u najvećoj meri doprinose antocijani.

Antocijani strukturno pripadaju flavonima. Njihovo ime je izvedeno od grčke reči *antho* što znači cvet, i *kyanos* što znači plav. U biljnim vrstama su prisutni u vidu heterozida. Aglikoni antocijana poznati su kao antocijanidini. Antocijani su pigmenti koji se nalaze u sprovodnim snopićima i boja biljnih organa zavisi od pH soka [4]. U ćeliji su prisutni u vakuoli vezani za šećer [5]. Štite biljke od UV zračenja, štetnih mikroorganizama i pomažu u oprašivanju i raznošenju semena privlačenjem insekata [6].

Antocijani su hranljive bioaktivne komponente sa dvostrukim značajem, prvim tehnološkim, zbog njihovog uticaja na senzorne karakteristike prehrambenih proizvoda, i drugim biološkim zbog svojih zdravstvenih efekata, među kojima je jedan od najvažnijih kardioprotektivni efekat [5].

Interesovanje za antocijane je sve veće proteklih par godina, zbog njihove potencijalne primene u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja i kancera. U Evropskoj Uniji svi derivati antocijana su prepoznati kao prirodni pigmenti i klasifikovani kao E163 [6]. I kod nas su dozvoljeni prema Pravilniku o prehrambenim aditivima ali kao pigmenti nisu dozvoljeni svi antocijani već samo sledeći aglikoni: cijanidin, peonidin, malvidin, delfinidin, petunidin, pelargonidin [7].

Postoji niz faktora koji ograničavaju primenu antocijana kao pigmenata koji bi se potencijalno široko upotrebljavali. Oni uključuju njihovu nestabilnost prema svetlosti i toploti i njihovoj sposobnosti ka degradativnim reakcijama. Efektivan pH raspon za većinu antocijana je ograničen na kiselu hranu zbog promena boje i nestabilnosti koji se javljaju iznad pH= 4 [6].

Antocijani su prirodni pigmenti, koji imaju sve veću primenu zbog svog dijapazona boja, jer su bezopasni i korisni po zdravlje. Uprkos njihovom velikom potencijalu primene u farmaceutskoj industriji, industriji hrane, kozmetičkoj industriji, njihova upotreba je i dalje ograničena zbog njihove relativne nestabilnosti i niskom procentu ekstrahovanja iz biljnog materijala. Najviše istraživanja je upravo fokusirano na rešavanje ovih problema, ali i na samo izolovanje i prečišćavanje antocijana od ostalih sastojaka sa kojima se nalaze u određenoj biljnoj vrsti. Antocijani, kao najvažniji pigmenti mnogih biljaka, neškodljivi su i lako rastvorni u vodenoj sredini, što ih čini pogodnim za upotrebu kao prirodnog i u vodi rastvorljivog pigmenta. Ovi pigmenti su odgovorni za narandžastu, roze, crvenu, ljubičastu i plavu boju u cvetovima i plodovima nekih biljaka. Još jedna značajna primena, je njihova antioksidativna aktivnost, koja igra ključnu ulogu u prevenciji neuroloških i kardiovaskularnih bolesti, kancerogenih oboljenja i dijabetesa. Postoji nekoliko izveštaja u kojima se navodi efikasnost antocijana u tretmanu i prevenciji kancerogenih oboljenja. Zbog ogromnog potencijala antocijana, kao prirodnih i neškodljivih pigmenata, sve je veći broj istraživanja u različitim oblastima kao što su: razvoj analitičkih metoda, njihovo izolovanje i odvajanje, identifikacija, upotreba u hrani i farmaceutskim proizvodima, praćenje promena boje, biosinteza [8].

HEMIJSKI SASTAV

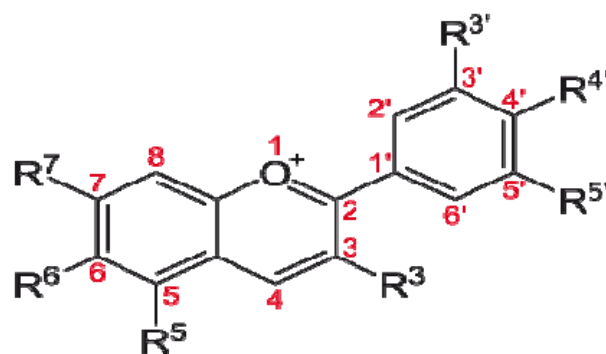
Antocijani su široko rasprostranjeni u prirodi i javljaju se u vidu velikog broja jedinjenja. Glavne razlike između njih su broj hidroksilnih grupa koje sadrže, priroda i broj šećera u njihovoj strukturi, alifatične ili aromatične kiseline vezane za šećer u molekulu, i položaj ovih vezivanja [8].

90% antocijana je pronađeno u glikozidnom obliku, i imaju svom sastavu neki od 6 prirodno prisutnih aglikona. Kod briofita, u osnovi antocijana su 3-deoksiantocijanidini koji su locirani u ćelijskom zidu [2].

Antocijani su glikozilirani, polihidroksi ili polimetoksi derivati 2-fenilbenzopirilijuma ili flavijum katjona i sadrže dva benzoil prstena (A i B) razdvojena heterocikličnim prstenom C. Strukturne varijacije antocijana se javljaju usled različitog broja hidroksi grupa i njihovog stepena metilovanja, prirode i broja šećera povezanih za fenolni (aglikonski deo) molekula, kao i položaja tih supstituenata, i prirode i broja alifatičnih i aromatičnih kiselina vezanih za šećer [8].

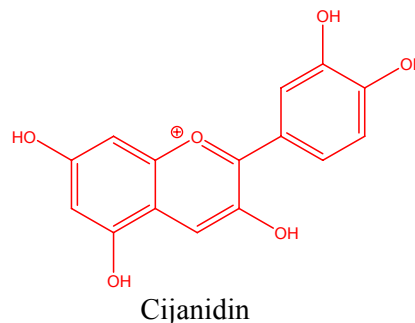
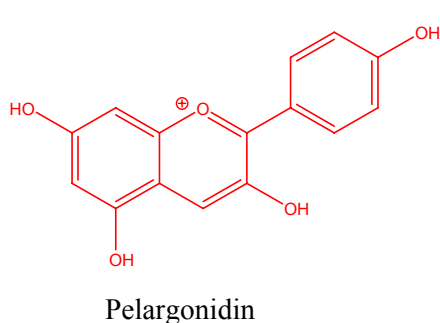
Antocijanidini su osnova strukture antocijana. To su aglikonski delovi, a u prirodi je do sad poznato 6 antocijanidina: pelargonidin, cijanidin, peonidin, delfinidin, petunidin i malvidin (Slika 2). Prema literaturnim podacima do sada je poznato više od 23 antocijanidina, od kojih se samo 6 najčešće sreće u prirodi. Antocijanidini su aglikoni koji se sastoje od aromatičnog prstena, kondenzovanog heterociklusa koji sadrži kiseonik, za koga je takođe vezan C-C vezom treći

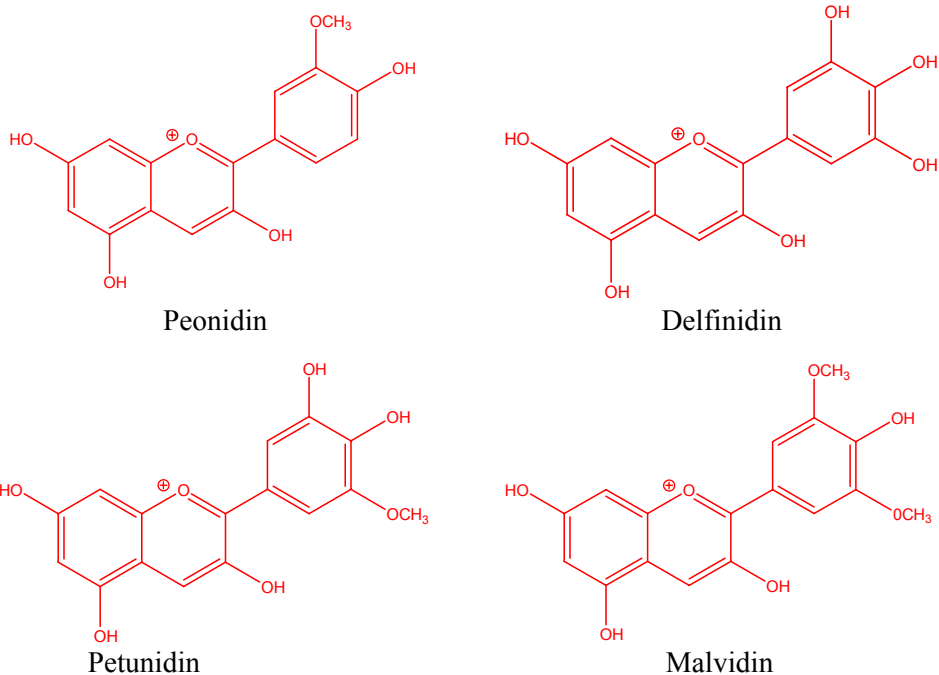
aromatični prsten (Slika 1) [8]. Supstitucija sa H, OH i OCH₃ na B prstenu je uzrok postojanja 6 različitih antocijanidina [6]. Glikozidni deo mogu činiti šećeri kao što su glukoza, galaktoza, ramnoza, ksiloza, arabinoza. Ovi šećeri mogu biti vezani za položaj 3 i 5 na prstenovima A i C. Varijacije i raznolikost u strukturi antocijana su najviše javljaju zbog acilovanja šećernih grupa različitim kiselinama. Kiseline mogu biti alifatične kao što su sirćetna kiselina, p-kumarinska kiselina, kafeinska kiselina, malonska kiselina, maleinska, ferulična kiselina, oksalna i ćilibarna [8].



Slika 1. Opšta formula antocijana
Picture 1. General anthocyanins structure

Glikozidni derivati tri najčešća nemetilovana antocijanidina (cijanidin, delfinidin i pelargonidin) su najčešći u prirodi, i čine 80% pigmenta u lišću, 69% u plodovima, i 50% u cveću. Distribucija i zastupljenost 6 najčešćih antocijanidina u voću i povrću je: cijanidin 50%, delfinidin 12%, pelargonidin 12%, peonidin 12%, petunidin 7% i malvidin 7%. U glikozidne derivate najviše rasprostranjene u prirodi spadaju 3-monozidi, 3,5 biozidi i 3,7 diglukozidi [9].





Slika 2. Najčešći antocijanidini izolovani iz plodova bobičastog voća
Picture 2. The most common anthocyanidins in berries

Hemijski nazivi najčešće izolovanih antocijanidina i njihove molekulske formule prikazane na slici 2 [8]:

Cijanidin: 3,3',4',5,7-pentahidroksi-flavilijum-hlorid ($C_{15}H_{11}O_6Cl$)

Peonidin: 3,4',5,7-tetrahidroksi-3'-metoksiflavilijum-hlorid ($C_{16}H_{13}O_6Cl$)

Malvidin: 3,4',5,7-tetrahidroksi-3',5'-dimetoksiflavilijum-hlorid ($C_{17}H_{15}O_7Cl$)

Delphinidin: 3,5,7-trihidroksi-2-(3,4,5-trihidroksifenil)-1-benzopirilijum-hlorid ($C_{15}H_{11}O_7Cl$)

Petunidin: 3,3',4',5,7-pentahidroksi-5'-metoksiflavilijum-hlorid ($C_{16}H_{13}O_7Cl$)

Pelargonidin: 3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-1-benzopirilijum-hlorid ($C_{15}H_{11}O_5Cl$)

Ovo dovodi do značajnih strukturnih varijacija sa preko 500 različitih antocijana identifikovanih u prirodi [6]. Ogromna raznovrsnost antocijana koja može da se nađe u prirodi čini ih veoma složenom i interesantnom grupom [9]. Antocijani reverzibilno trpe strukturne transformacije sa promenom pH što ima najveći uticaj na boju [6].

Pojavu boje prvi je objasnio Pauling 1939. godine, koji je objasnio da je rezonantna struktura flavijum jona odgovorna za intenzitet njihove boje [8].

Flavijum katjon je stabilan jedino u veoma niskom području pH. Kako se pH vrednost povećava, boja flavijum kartjona (crvena) prelazi u bezbojan hromenol (pH=4-5). Pri pH vrednosti 6-7 boja je ljubičasta, zbog prisustva hinoidalne anhidrobaze, pH=7-8 zbog prisustva jonske anhidro baze boja je tamno plava, i pri pH=7-8 jonska anhidro baza se transformiše tako što se prsten otvara i dobija se halkan žute boje. Pri višim pH vrednostima boja se može stabilizovati prisustvom viševalentnih jona Al^{3+} , Fe^{3+} . Formirani kompleks sa metalima je tamno plave boje [2]. Povećanje broja hidroksilnih grupa u molekulu vodi više ka plavoj boji (pelargonidin→cijanidin→delfinidin), dok formiranje glikozida i metilovanje rezultira pojavom crvene boje (pelargonidin→pelargonidin-3-glikozid, cijanidin→peonidin) [2].

Pri višim vrednostima slobodni antocijanidini se degradiraju preko hromenola i α -diketona do aldehida i karboksilnih kiselina [2].

Smatra se da su proantocijanidini, prvo nazvani leukoantocijanidinima, bezbojni prekursori antocijanidina [2].

Pelargonidin kao najstabilniji antocijanidin je i najviše zastupljen u prirodi. Nasuprot aglikonima, monoglikozidni i diglikozidni derivati su stabilniji u neutralnoj sredini gde se molekuli šećera ne raspadaju do fenolne kiseline i aldehida. Ispitivanja stabilnosti antocijana i njihove razlike u boji u zavisnosti od pH dovela su do zaključka da su promene u boji ovih jedinjenja značajnije u baznoj sredini (8).

ZASTUPLJENOST ANTOCIJANA U VOĆU I POVRĆU [10]

Jabuka 0–60,0 mg/100 g s.m.
Borovnica 300–698 mg/100 g s.m.
Crn aribizla 130–476 mg/100 g s.m.
Crne masline 42–228 mg/100 g s.m.
Crni pirinač 10–493 mg/100 g s.m.
Kupina 82,5–325,9 mg/100 g s.m.
Višnja 2–450 mg/100 g s.m.
Aronija 410–1480 mg/100 g s.m.
Brusnica 67–140 mg/100 g s.m.
Plavi patlidžan 8–85 mg /100 g s.m.

Zova 664–1816 mg/100 g s.m.
Godži 49,4/100 g s.m.
Grejpfrut 5,9 mg/100 g s.m.
Zelena salata 2,5–5,2 mg/100 g s.m.
Nektarine 2,4 mg/100 g s.m.
Breskva 4,2 mg/100 g s.m.
Kruška 5–10 mg/100 g s.m.
Šljiva 2–25 mg/100 g s.m.
Nar, neprerađan sok 15–252 mg/L
Kukuruz 1642 mg/100 g s.m.
Malina 20–687 mg/100 g s.m.
Crveni kupus 322 mg/100 g s.m.
Crvena ribizla 22 mg/100 g s.m.
Crveno grožđe 30–750 mg/100 g s.m.
Crveni luk, obrađan 23,3–48,5 mg/100 g s.m.
Rotkvica 100–154 mg/100 g s.m.
Crveno vino 16,4–35 mg/100 mL
Jagoda 19–55 mg/100 g s.m.

s.m. – sveža masa

STABILNOST ANTOCIJANA

Antocijani su reaktivna i dosta nestabilna jedinjenja. Mogu da reaguju sa drugim jedinjenjima sa kojima se mogu zajedno naći, tako što formiraju bezbojna do braon jedinjenja. Gubitak boje antocijana takođe može biti izazvan prisustvom kiseonika ili različitih enzima, ili visokom temperaturom prilikom prerade voća ili povrća u kome su prisutni. Pored kiseonika, temperature čuvanja, svetla, njihove hemijske strukture, rastvarača, enzima i ostalih flavonoida, proteina i metalnih jona, pH je određen kao uzročnik najveće nestabilnosti antocijana, i od pH u najvećoj meri zavisi pigmentacija antocijana. Iako su antocijani u stvari flavonoidi, njihova biohemija je mnogo kompleksnija nego kod ostalih flavonoidnih jedinjenja. U vodenom rastvoru antocijani se nalaze kao različite molekulske forme koje su u dinamičkoj ravnoteži [11]. Stabilnost antocijanidina zavisi od supstituenata na prstenu B, i prisustva dodatnih hidroksilnih i metoksi grupa, koje smanjuju stabilnost aglikona u neutralnoj sredini.

Hemijska stabilizacija antocijana je danas jedna od glavnih tema zbog bogate i potencijalne primene antocijana, njihovih blagotvornih efekata i njihove upotrebe kao alternative za veštačke pigmente [8].

EKSTRAKCIJA ANTOCIJANA

Antocijani su polarni molekuli tako da su se kao najefikasniji rastvarači za ekstrakciju pokazale smeše polarnih rastvarača kao što su etanol, metanol i aceton. Ove metode ekstrakcije podrazumevaju i ekstrakciju nefenolnih jedinjenja, kao što su šećeri, organske kiseline, i proteini što zahteva naknadno prečišćavanje (npr. ekstrakciju na čvrstoj fazi-SPE). Među metodama koje se najviše koriste su one sa zakišljenim metanolom i etanolom kao ekstragensima. Tačnije, dokazano je da je ekstrakcija metanolom 20% efikasnija od ekstrakcije etanolom, a 73% efikasnija od ekstrakcije vodom. Ipak u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji ekstrakcija etanolom je metoda izbora u odnosu na metanol zbog njegove toksičnosti [8].

METODE PREČIŠĆAVANJA

Metode ekstrakcije koje se koriste za izolovanje antocijana nisu selektivne, kao što je već pomenuto, jer pored antocijana ekstrahuje se i veliki broj balastnih materija kao što su šećeri i organske kiseline. Shodno tome, neophodno je implementirati nove tehnike prečišćavanja. U tom smislu predlaže se čitav niz tehnika kao što su ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE), ekstrakcije tečno-tečno (LLE), kao i korišćenje sofisticiranih hromatografskih tehnika kao što su protivstrujna hromatografija (CCC), i visoko efikasna tečna hromatografija (HPLC) [8].

METODE IDENTIFIKACIJE ANTOCIJANA

Identifikacija antocijana ima ključnu ulogu u taksonomiji, i proceni kvaliteta biljnih droga i hrane koja sadrži antocijane, zbog njihove široke primene. Neki antocijani imaju sličnu strukturu i mogu dovesti do formiranja kompleksnih mešavina, što ih čini još dodatno teškim za izolovanje. Spektralne karakteristike antocijana daju kvalitativne i kvantitativne informacije, pa je zapravo spektroskopija glavna tehnika identifikacije koja se široko primenjuje zbog svoje jednostavnosti i niske cene. Metode koje se koriste za karakterizaciju i kvantifikaciju antocijana uključuju papirnu hromatografiju, tankoslojnu hromatografiju, hromatografiju na koloni, protiv strujnu hromatografiju, UV spektroskopiju, visoko efikasnu tečnu hromatografiju-HPLC, masenu spektroskopiju-MS, nuklearnu magnetnu spektroskopiju.

HPLC sa fotodiodom kao detektorom (PDA) je jedna od najviše korišćenih metoda kako za identifikaciju antocijana tako i za kvantifikaciju [8].

Metoda tankoslojne hromatografije-TLC

Monografija za plod borovnice, Ph. Eur 7.0

Suv plod borovnice, *Myrtili fructus siccus*

Ispitivani rastvor: 2g sprasene droge se pomeša sa 20 ml metanola. Ekstahovanje se vrši 15 minuta uz mešanje pa se vrši filtracija.

Svež plod borovnice, *Myrtili fructus recens*

5g sveže usitnjene droge se pomeša sa 20 ml metanola. Ekstahovanje se vrši 15 minuta uz mešanje pa se vrši filtracija.

Referentni (poredbeni) rastvor: Rastvori se 5 mg hrizantemina u 10 ml metanola.

Ploča: TLC silika gel pločica

Mobilna faza: Anhidrovana mravlja kiselina:voda:butanol (16:19:65)

Ispitivani rastvor nanositi u trakama po 10 µl. Razviti u dužini od 10 cm. Ploču sušiti na vazduhu. Detekcija se vrši na sobnoj svetlosti.

Tabela 1. Izgled TLC ploče

Tabele 1. TLC plate

Vrh pločice	
	Crveno-ljubičasta zona slabog intenziteta
Hrizantemin Crveno-ljubičasta zona	Crveno-ljubičasta zona
	Crveno-ljubičasta zona
	Plavo-ljubičasta zona
	Plavo-ljubičasta zona
	Plavo-ljubičasta fluorescentna zona
Referentni rastvor	Test rastvor

METODE ODREĐIVANJA

Sadržaj antocijana, se dugo koristio kao indikator kvaliteta kako svežih tako i prerađenih proizvoda od bobičastog voća. Stalnim napredovanjem metoda i instrumenata koje se koriste za separaciju i određivanje strukture, HPLC, LC-MS, NMR, omogućeno je koristiti male količine uzorka za analize, i dobijanje preciznih rezultata. Sve ove metode se široko koriste u nauci a neke i u industriji [9,12].

Profil antocijana je karakterističan za različite vrste, i sve te varijacije utiču na način određivanja. Reverzno fazna RP-HPLC povezana sa fotodiodom (DAD detektor), je najviše korišćena metoda za identifikaciju i određivanje antocijana. Antocijani se mogu razdvojiti prema polarnosti, tako da se na hromatoframu vide na različitim retencionim vremenima. Antocijani mogu biti kvantifikovani preko bilo kog prečišćenog standarda. Obično se kao standard koristi cijanidin-3-glikozid, a kvantifikacija antocijana HPLC metodom se vrši na talasnoj dužini od 520 nm. Nekoliko studija pokazuje da talasna dužina na kojoj antocijani imaju maksimalnu apsorpciju delimično zavisi od hromofora u antocijanima [12].

Zbog sve većeg interesovanja za antocijane, postoji potreba za efikasnom kontrolom kvaliteta svežih i prerađenih proizvoda od bobičastog voća. Ove metode moraju da obezbede autentičnost izvora antocijana i sadržaj u ovim proizvodima mora odgovarati sadržaju na etiketi. Najčešća metoda identifikacije koja se koristi je spektrofotometrijsko određivanje na 528 nm na kontrolisanoj pH. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih antocijana bez hidrolize je obično prilagođena metoda zbog relativno blažih uslova, manjih troškova i brzine rada. Ova metoda funkcioniše veoma dobro gde je potrebna procena a ne preciznost kvantifikacije. To je metoda izbora za brz skrining ukupnih antocijana u povrću i voću. Spektralne sličnosti kod većine antocijana čini ovo određivanje relativno izvodljivim i antocijani se izražavaju preko eksternog standarda što je u većini slučajeva cijanidin-3-glikozid. Varijacije u ekstrakciji uzoraka (voda, zakišljena voda, organske kiseline), različita hemijska struktura antocijana dovode do različite korelacije između izmerene apsorbanace i stvarne koncentracije antocijana merenjem apsorbanacije u UV oblasti. Mnogo preciznije metode identifikacije i kvantifikacije su HPLC i LC-MS. Većina ovih metoda je kvalitativna ili semikvantitativna, i pruža informaciju o identifikaciji antocijana u njihovom izvoru. Veliki izazov je kvantifikacija antocijana HPLC metodom zbog većine komercijalno nedostupnih standarda. Kod većine antocijana aglikonska komponenta predstavlja okosnicu i obično su to 6 aglikona prisutnih u prirodnim izvorima antocijana. Oni su i komercijalno dostupni i mogu se koristiti za kvantifikaciju ukupnih antocijana preko antocijanidina hromatografskim ili spektrofotometrijskim metodama. Priprema uzoraka za HPLC analizu uglavnom podrazumeva kiselu hidrolizu antocijana da bi se oslobodili antocijanidini. Kako

hidroliza zahteva visoku koncentraciju mineralnih kiselina, to rezultira njihovom degradacijom čime je rešen problem netačnih i veoma promenljivih rezultata [13].

Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih antocijana u plodovima i sokovima bobica koje sadrže antocijane (Metoda po Ph. Eur 6.0) [14]

Monografija Bilberry fruit, fresh

***Myrtilli fructus recens*, svež plod borovnice**

50 g ploda se dobro usitni i homogenizuje u blenderu. Odmeri se precizno 5 g usitnjenog ploda (ili količina soka koja je ekvivalentna 5 g ploda), doda se 95 ml metanola i ekstrahuje se na magnetnoj mešalici 30 min. Nakon toga se rastvor filtrira direktno u normalni sud od 100 ml. Filter papir isprati metanolom i dopuniti istim do 100 ml. Dobijeni rastvor se razblažuje 50 puta sa 0,1%V/V HCl u metanolu. Apsorbanca se meri na talasnoj dužini od 528 nm. Kao slepa proba se koristi 0,1%V/V HCl u metanolu. Sadržaj ukupnih antocijana se izračunava prema formuli (izraženoj u odnosu na cijanidin-3-glikozid hlorid):

% antocijana = $A \times 5000 / 718 \times m$, gde je:

718-specifična apsorbanca cijanidin-3-glikozid hlorida na 528 nm

A-apsorbanca na 528 nm

m-masa odmerenog usitnjenog ploda u gramima

Analize treba da se izvode u najmanje tri ponavljanja, a rezultate prezentovati kao srednju vrednost ± standardna devijacija.

Sadržaj pojedinačnih aglikona antocijana u plodovima sorti crvenih i crnih ribizli metodom visoko efikasne tečne hromatografije-HPLC [15]

50 g ploda se dobro usitni i homogenizuje u blenderu. Odmeri se precizno 5 g usitnjenog ploda (ili količina soka koja je ekvivalentna 5 g ploda), ekstrahuje se smešom rastvarača voda:etanol (1:1 V/V) na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 20 min. Rastvarač za ekstrakciju se izrađuje na sledeći način: 50 ml metanola+33 ml vode+ 17 ml 37% HCl. Posle ekstrakcije rastvor se profiltrira kroz teflonski filter od 0,45 µm, filtrat se (količina od 3 ml) prebaci u teflonsku vijalicu i hidrolizuje 60 minuta na 100°C. Nakon toga se rastvor filtrira direktno u normalni sud od 100 ml. Posle brzog hlađenja na sobnoj temperaturi rastvor se injektira u tečni hromatograf. Analize treba da se izvode u najmanje tri ponavljanja, a rezultate prezentovati kao srednju vrednost ± standardna devijacija.

Injekcioni volume: 20 µl ekstrakta

Aparatura: tečni hromatograf sa DAD detektorom

Kolona: 100 RP -18e 250 x 4.6 mm (5 µm)

Mobilna faza: A: 10%(V/V) HCOOH u H₂O

B: MeCN

Gradijent: start B 1%, 1-4 min B 7%, 7,5 min B 10%, 11,5-15,5 min 14%, 18,5-22 min B 18%

Protok: 1,0ml/min

Detekcija: 290, 350, 520 nm

Temperatura: 35°C

BIORASPOLOŽIVOST ANTOCIJANA

Antocijani su veliki molekuli, dobro rastvorljivi u vodi [13]. Antocijani se slabo resorbuju i ne metabolišu se u istom stepenu kao drugi flavonoidi. Zbog toga se smatra da antocijani imaju malu bioraspoloživost. Ipak antocijani dele zajedničke metaboličke reakcije sa ostalim flavonoidima. Antocijani su kao i flavonoidi prisutni u hrani uglavnom kao glikozidi. Aglikonski deo je hidrofoban i lako prolazi kroz membrane pasivnom difuzijom. Difuzija hidrofilnog dela antocijana se ne odvija lako kroz membrane. Apsorpcija antocijana se odigrava aktivnim transportom tako što prvo dolazi do hidrolize. Mnoge kliničke studije ukazuju na to da se resorpcija antocijana odvija u malom intestinumu, mada još uvek do kraja nije razjašnjeno kako ulaze u enterocite. Pretpostavlja se da se vrši natrijum-glikozidnim transportom ili pasivnom difuzijom aglikona koji se pre prolaska kroz membranu izdvojio iz glikozida posle hidrolize laktat pilorizin hidrolazom [6].

Smatra se da antocijani imaju nisku bioraspoloživost. Ispitivanje bioraspoloživosti antocijana uglavnom je vršeno je na životinjama. Većina tih studija je pokazala da antocijani dostižu maksimalnu koncentraciju u krvi nakon 15 min – 2 h [1,10,16,17].

Jedno od ispitivanja bioraspoloživosti rađeno je u studiji na pacovima. Kod pacova teških 400mg/kg posle jedne oralne aplikacije antocijani su detektovani u plazmi posle samo 15 minuta i dostigli su maksimalnu koncentraciju od 2-3µg/ml posle 1,5h. Koncentracija antocijana je naglo opala nakon 2 h. Antocijani se izlučuju putem urina u obliku glikozida i to 0,018-0,37% od unete doze [16-18].

Pored organa u kojima se obično odigravaju metaboličke reakcije i eliminacije antocijana kao što su jetra i bubrezi, ovi polifenoli su takođe detektovani, u ispitivanjima na životinjama, u oku, u regionu mozga, što je pokazalo uticaj na kognitivne karakteristike u korteksu, hipokampusu [19-21].

Metaboloizam antocijana u GITu

Gastrointestinalni trakt je karakterističan kao region sa različitom pH vrednošću i različitom mikroflorom, a oba ova faktora mogu da modifikuju

antocijanske komponente. pH u stomaku je nizak, sa vrednošću oko 1-2, tako da su antocijani uglavnom prisutni u vidu flavijum jona koji je najstabilnija forma antocijana. Stabilnost antocijana u uslovima sličnim uslovima u GIT-u je potvrđena različitim *in vivo* studijama. U suprotnosti sa stomakom, okruženje malog i velikog intestinuma je većinom u neutralnom pH području gde će višemolekularne forme antocijana biti prisutne i gde će antocijani biti manje stabilni. Aglikonski deo je nestabilan u neutralnoj pH sredini i veoma brzo se razlaže na fenolne kiseline i aldehide [22].

BIOLOŠKE AKTIVNOSTI ANTOCIJANA

Zainteresovanost za antocijane je posebno porasla poslednjih godina zbog njihovih pozitivnih efekata na zdravlje (smanjenje rizika od nastanka koronarnih bolesti srca, srčanog udara, kancerogenih bolesti, kod inflamatornih stanja, poboljšanje vida pri slabijem osvetljenju i poboljšanje kognitivne sposobnosti). Dobar primer za to je upotreba ploda aronije u Černobiljskoj katastrofi kod ljudi koji su bili izloženi radijaciji. Takođe poznata je pojava da Francuzi, jedni od najvećih konzumenata crvenog vina znatno manje boluju od kardiovaskularnih oboljenja u odnosu na ostale Evropljane [6].

Antocijani mogu delovati antioksidativno, antiinflamatorno, antitumorno, antidijabetično, antiedematozno, imaju efekat na permeabilnost kapilara, deluju hepatoprotektivno, antiagregacijski, antiulcerozno, antibakterijski, radioprotektivno, imunomodulatorno, inhibiraju herpes virus, virus influence, deluju protektivno na endotelne ćelije u odnosu na razne stresne agense [3-5, 11].

Deluju kod hroničnih bolesti kao što su Alchajmerova bolest i u prvom redu kod kardiovaskularnih oboljenja. Oni su zajedno sa ostalim flavonoidima važni nutritivni sastojci zbog svojih antioksidativnih sposobnosti, što ukazuje na njihovu potencijalnu primenu u prevenciji nekoliko bolesti koje su povezane sa oksidativnim stresom [11].

Dnevna potrošnja antocijana je procenjena na 3-215mg/danu [11, 22, 23]. Prema Evropskoj agenciji za bezbednost hrane, bezbedan unos hranom je 36 mg antocijana dnevno.

Antocijani mogu da deluju na različite ćelije koje su uključene u razvoj ateroskleroze. Poznato je da hemokinski monocit protein 1 (MCP-1) posreduje u aktivaciji makrofaga na mestu infekcije ili upale, i to je momenat uključivanja MCP-1 u aterogenezu. Antocijani imaju zaštitno delovanje protiv TNF- α koji je indukovano od strane MCP-1 u endotelnim ćelijama kod ljudi. Vaskularni faktor rasta (VEGF) je glavni pro-aterosklerotski faktor. Antocijani, posebno delfinidin i cijanidin, su pokazali da mogu da spreče ekspresiju VEGF-a, koji je aktiviran faktorom rasta trombocita (PDGF-AB) u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama

tako što sprečavaju aktivaciju p38-aktivirajuće protein kinaze (p38 MAPK) i C-Jun terminalne kinaze(JNK) [11].

Antocijani posebno oni iz aronije, borovnice, zove pokazuju endotel zavisnu relaksaciju koronarnih arterija [11]. Osim toga, stalnim konzumiranjem antocijana povećava se koncentracija glutationa koji je prirodni sakupljač slobodnih radikala u organizmu. Antocijani smanjuju povećan nivo holesterola i na taj način štite endotelne ćelije od CD40-indukovane proinflamatorne signalizacije [24].

ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

Jedinjenja koja se lakše oksidišu su često najbolji antioksidanti, jer njihovi molekuli mogu da doniraju slobodan elektron. Više studija je pokazalo da je sadržaj antocijana povezan sa visokom antioksidativnom aktivnošću, i da doprinose da voće i povrće koji ih sadrže imaju pozitivan efekat na degenerativne i hronične bolesti. Neke biljke sa visokim sadržajem antocijana imaju ulogu u prevenciji mutageneze i inhibitori su kancerogeneze [8].

U kateholima oksidacija se odvija preko slobodnih radikala dok se ne formira stabilni semihinon. Jedinjenja sa kateholnom grupom ili 1,4 hidrohonom se posebno lako oksidišu zato što fenoksi radikal može biti stabilisan kiseonikom [8].

Antocijanidini i antocijani pokazuju veću antioksidativnu aktivnost nego vitamini C i E. Ova jedinjenja su sposobna da uhvate slobodne radikale doniranjem vodonika iz fenolnih grupa. Ono što je još primećeno je da postoji linearana korelacija između antioksidativnog kapaciteta i sadržaja antocijana u kupini, crvenoj malini, crnoj malini, jagodi. Osim toga, opisano je da ekstrakti dobijeni iz bobičastog voća imaju najveći potencijal uklanjanja slobodnih radikala, i kod njih je antioksidativna aktivnost proporcionalana sadržaju antocijana [8].

ZAKLJUČAK

Zbog njihovog pozitivnog efekta na zdravlje, antocijani i biljne vrste koje ih sadrže mogu da predstavljaju osnovu za dijetetske suplemente značajne naročito za ljude sa faktorima rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti ili metaboličkog sindroma. Takođe, konzumacija proizvoda koji sadrže antocijane, s obzirom na njihov visok antioksidativni potencijal, može imati i pozitivne efekte u prevenciji drugih oboljenja što otvara nova polja istraživanja [3, 5].

LITERATURA

1. T. K. McGhie, M. C. Walton (2007): The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding-Review, *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 51, 702-713

2. H. D. Beliz, W. Grosch, P. Scheberle (2004): Food Chemistry, 3rd Edition, Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
3. P. Bridle, C. F. Timberlake (1997): Anthocyanins as natural food colours- selected aspects, *Food Chemistry*, vol. 58, 103-109
4. J. M. Kong, L. S. Chia, T. F. Chia, N. K. Goh, R. Brouillard (2003): Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochemistry*, vol. 64 (5), 923–933
5. T. De Pascual, B. S. Sanchez (2008): Anthocyanins, from plant to health, *Phytochem. Rev*, vol. 7, 281–299
6. R.E. Wrolstad (2004): Anthocyanin Pigments- Bioactivity and Coloring Properties, *Journal of Food Science*, vol. 69, 419-425
7. Pravilnik o kvalitetu i uslovima upotrebe aditiva u namirnicama, Službeni glasnik RS, 5/2004
8. A. C. Ovando, L. P. Hernandez, E. P. Hernandez, J. A. Rodriguez, C. A. Galan-Vidal (2009): Chemical studies od anthocyanins: A review, *Food Chemistry*, vol. 113, 859-871
9. Ø. M. Andersen, K. R. Markham (2006): Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications, CRC Press, Taylor & Francais Group.
10. T. S. de Pascual, D. A. Moreno, C. Garcia-Viguera (2010): Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 11, 1679-1703
11. A. Croizer, D. Del Rio, M. N. Cliffprd (2010): Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds- Review, *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 31, 446-467
12. J. Lee, C. Rennaker, R. E. Wrolstad (2008): Correlation of two anthocyanin quantification metods: HPLC and spectrophotometric methods, *Food Chemistry*, vol. 110, 782-786
13. A. Chandra, J. Rana, Y. Li (2001): Separation, Identification, Quantification, and Mthod Vlidation of anthocyanins in Botanical supplement raw material by HPLC and HPLC-MS, *J. Agric.Food Chemistry*, vol. 49, 3515-3521
14. European Pharmacopoeia, 6 th edition, European Directorate for the Quality of Medicines, Strasbourg, France, 2008.
15. B. Đorđević, K. Šavikin, G. Zdunić, T. Janković, T. Vulić, Č. Oparnica, D. Radivojević (2010): Biochemical properties of red currant varieties in relation to storage, *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 65, 4, 326-332
16. C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, C. Rémésy (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies, *Am. J. Clin. Nutr*, vol. 81, 230–242
17. T. Lapidot, S. Harel, R. Grani, J. Kannaer (1998): Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine, *J. Agric. Food Chem*, vol. 46, 4297–4302.

18. C. Felgines, S. Talavera, M.P. Gonthier, O. Texier, A. Scalbert, J.L. Lamaison, C. Remesy (2003): Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro and sulfoconjugates in humans, *J. Nutr*, vol. 133, 1296–1301
19. C. D. Kay (2006): Aspects of anthocyanin absorption , metabolism and pharmacokinetics in humans, *Nutr. Res. Rew*, vol. 19, 137-146
20. C. Andres-Lacueva, B. Shukitt-Hale, R. L. Galli, O. Jauregui, R.M. Lamuela-Raventos, J.A. Joseph (2005): Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutr. Neurosci*, vol. 8, 111–120
21. S. Passamonti, U. Vrhovsek, A. Vanzo, F. Mattivi (2005): Fast access of some grape pigments to the brain, *J. Agric. Food Chem*, vol. 53, 7029–7034
22. X.L. Wu, G.R. Beecher, J.M. Holden, D.B. Haytowitz, S.E. Gebhardt, R.L. Prior (2006): Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal Consumption, *J. Agric. Food Chem*, vol. 54, 4069–4075.
23. O.K. Chun, S.J. Chung, W.O. Song (2007): Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults, *J. Nutr* , vol. 137, 1244–1252
24. M. Xia, W. Ling, H. Zhu, Q. Wang, J. Ma, M. Hou, Z. Tang, L. Li, Q. Ye (2007): Anthocyanin prevents CD40-activated proinflammatory signaling in endothelial cells by regulating cholesterol distribution, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, vol. 27, 519–524.

ANTHOCYANINS – CHEMISTRY AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Nada Ćujić¹, Tatjana Kundaković², Katarina Šavikin¹

¹Institute for Medicinal Plant Research „Dr Josif Pančić“, Tadeuša Koćuška 1, 11000 Belgrade, Republic of Serbia

² Faculty of Pharmacy, Department of pharmacognosy, University of Belgrade, Vojvode Stepe 450, 11000 Belgrade, Republic of Serbia

SUMMARY

Anthocyanins are a group of over 500 different compounds that cause red, purple and blue colours of many plants, especially fruits, vegetables and cereals. Anthocyanins structurally belong to flavones. Mainly fruit is considered the main source of anthocyanins, although they are present in vegetables, roots, bulbs, fruit pulps, pulses and cereals. Huge diversity of anthocyanins, which can be found in nature makes them very complex and interesting group. In plants anthocyanins are present in the form of heterosides. Aglycone anthocyanins are known as anthocyanins. In nature there is 6 well known anthocyanins: pelargonidin, cyanidin, peonidin, delphinidin, malvidin and petunidin. Pelargonidin as stable anthocyanins is the most frequent in nature. The glycoside derivatives of the most widespread in nature are 3-monoside, 3.5 and 3.7 biosides. Interest for anthocyanins is growing over the past few years due to their potential applications in the pharmaceutical industry, the food and cosmetic industries. Despite their great potential, their use is still limited because of their relative instability and the low percentage of extracting from the plant material. Anthocyanins are quite reactive and unstable compounds. They transform reversibly with pH changes. pH is defined as the greatest cause of instability of anthocyanins, and has the greatest impact on colour. Anthocyanins are polar molecules and the most efficient solvent for extraction are the mixture of polar solvent such as ethanol, methanol and acetone. Extraction methods for anthocyanins isolation are not selective because solvents extracted anthocyanins with ballast and the great number of substances such as sugars and organic acids. Because of that, it is necessary to implement a new purification techniques, such as solid phase extraction (SPE), liquid-liquid extraction (LLE), countercurrent chromatography (CCC), and high performance liquid chromatography (HPLC). Identification of anthocyanins play a key role in the taxonomy and evaluate the quality of herbal drugs and foods containing anthocyanins. Reversed phase RP-HPLC connected to a photodiode (DAD detector) is the most used method for detection and identification of anthocyanins. Sample preparation for HPLC analysis usually involves acid hydrolysis of anthocyanins to release

anthocyanidins. Anthocyanins may be quantified using any purified standard, but most commonly used is standard of cyanidin-3-glucoside, and quantification is carried out at a wavelength of 520 nm. The method of choice for the rapid screening of total anthocyanins in vegetables and fruits is spectrophotometric determination at 528 nm, with a controlled pH. This method works very well, when the assessment is required and not the accuracy of the quantification. Anthocyanins are poorly absorbed and metabolised to the same extent as other flavonoids, which are considered to have low bioavailability. Examination of bioavailability for most of the anthocyanins was carried out on animals. Most studies have shown maximum concentration in blood after 15min-2h. Interest in anthocyanins has especially grown in recent years due to their positive effects on health. Anthocyanins are effective for chronic diseases, especially in cardiovascular diseases. Together with the other nutritional ingredients are important because of their antioxidant ability, suggesting their potential application in the prevention of several diseases which are associated with oxidative stress. Some plants with high content of anthocyanins play a role in the prevention of mutagenesis and carcinogenesis as inhibitors. Extracts obtained from berries have the highest potential for the removal free radicals. Antioxidant activity of them is proportional to the content of anthocyanins.

Key words : anthocyanins, chemical analysis, cardiovascular disease, antioxidant activity