بررسی اثر برخی عوامل شیمیایی بر پایداری آنتوسیانینهای استخراج شده از میوه شاه توت (*Morus nigra*)

الهامه نیکخواه[۱،*]، مسعود خیامی[۲] و رضا حیدری[۲]

[۱] تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، گروه گیاهان دارویی

[۲] ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۱۸

چکیده

آنتوسیانینها که زیر گروهی از فلاونوئید ها می باشند، مسئول ایجاد رنگهای قرمز، بنفش و آبی در بسیاری از گلها، میوه ها و سبزیجات هستند. میوه ها وتوتها نمونه هایی از منابع غنی از آنتوسیانین در طبیعت هستند. آنتوسیانینها به دلیل اثرات مفید در سلامتی، به خصوص به دلیل داشتن فعالیتهای آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد التهابی و ضد رگ زایی قابل ملاحظه اند. تراکم و پایداری رنگیزه های آنتوسیانین به فاکتورهای متعددی بستگی دارد، از جمله: ساختار و غلظت رنگیزه ها، pH، دما ، نور، شدت وکیفیت حضور سایر رنگیزه ها، یونهای فلزی، آنزیمها، اکسیژن، پراکسید هیدروژن، آسکوربیک اسید، دی اکسید گوگرد. قندها و غیره. در این مطالعه رنگیزه های آنتوسیانین استخراج شده از میوه شاه توت در معرض غلظتهای متفاوت قند، H_2O_2 ، SO_2 و آسکوربیک اسید قرار داده شدند و اثرات این مواد بر پایداری آنتوسیانینها سنجیده شد. هر کدام از مواد یاد شده اثرات متفاوتی روی پایداری آنتوسیانینها داشتند، طوری که برخی در غلظتهای ویژه موجب پایداری شده و تعدادی نیز دارای اثر تخریبی بر پایداری آنتوسیانین بودند

واژه های کلیدی: آنتوسیانین، شاه توت، پایداری

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۴۴۲۰۱۹۳۵، پست الکترونیکی: tu8084@yahoo.com

مقدمه

امروزه اکثر مردم جهان ترجیح می دهند در رژیم غذایی خود از مواد غذایی طبیعی به جای مواد مصنوعی استفاده کنند. بررسی خصوصیات عملکردی مواد موجود طبیعی، به ویژه آنها که به طور طبیعی در رژیم غذایی انسان وجود دارد، در سالهای اخیر مورد توجه بوده است (۵۱). انواع مختلف توت و به ویژه شاه توت حاوی میزان زیادی آنتوسیانین است و این رنگیزه های فلاونوئیدی موجب ایجاد رنگ قرمز تا آبی در آنها می شود (۱۲). آنتوسیانینها رنگیزه های فلاوونوئیدی هستند و مسئول رنگهای قرمز تا بنفش و آبی در میوه ها و گلها می باشند (۴، ۱۹و ۲۸). عصاره هایی از منابع غنی از این رنگیزه های طبیعی (مثل انگور قرمز، شاه توت، مویز سیاه و اقطی) به عنوان رنگهای غذایی و ترکیبات دارویی استفاده می شوند. آنتوسیانینها، آنتوسیانیدینهای گلیکوزیدی وآسیل گلیکوزیدی قابل حل در آب هستند (۲۸). آنها متعلق به گروه فلاوونوئیدها از پلی فنلها بوده ودارای یک اسکلت $C_6C_3C_6$ فلاونوئیدی می باشند. آنتوسیانینها مشتقات گلیکوزیله پلی هیدروکسی و پلی متوکسی از کاتیون ۲ـ فنیل بنزوپیریلیوم یعنی کاتیون فلاویلیوم می باشند (۳). قسمت اصلی آنتوسیانینها قسمت آگلیکون آن، به نام کاتیون فلاویلیوم می باشد که شامل پیوندهای دو گانه است. مطالعات بسیاری فعالیتهای آنتی اکسیدانی و فواید سلامتی وجود آنتوسیانینها را در میوه های مختلف و سبزیجات نشان می دهد. آنتوسیانینها به عنوان دارو در بسیاری از کشورها پذیرفته شده اند (۱۶،

Archive of SID
www.SID.ir

۲۲، ۲۸ و ۳۱). مطالعات متعددی پیشنهاد می کند که آنتوسیانینهای طبیعی موجود در میوه ها و سبزیجات ، در برابر بسیاری از بیماریهای دژنرتیو عروقی مؤثرند (۲۸). از دیگر اثرات فارماکولوژیکی آنتوسیانینها می توان به کاهش ایندکس رگ زایی و کاهش سطح تری گلیسیرید و اسید های چرب آزاد اشاره داشت. Kamei و همکاران (۱۹۹۵) گزارش کردند که آنتوسیانینها بیشتر از سایر فلاونوئیدها ، جهت مهار رشد سلولهای توموری مؤثرند (۲۲). همچنین آنتوسیانینها ممکن است دارای خاصیت ضد سرطانی باشند (۴ و ۲۲). در تحقیقات زیادی، اثر مثبت میوه های آنتوسیانین دار روی سلامتی انسان گزارش شده است (۲۱، ۲۳، ۲۴، ۳۵، ۴۷ و۵۰). آنتوسیانینها به خاطر داشتن ویژگیهای ضد سرطانی، آنتی اکسیدانی، فعالیت ضد رگ زایی و ضد التهابی به سالم ماندن بدن کمک کرده و از این نظر قابل ملاحظه می باشند (۲۴ و ۳۵). این مواد می توانند ارزش غذایی غذاها را با جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدها و پروتئینها در تولیدات غذایی افزایش دهند (۲۱ و ۴۷). آنتوسیانینها بسیار ناپایدار بوده و به راحتی مستعد تخریب می باشند. پایداری آنتوسیانینها تحت تأثیر pH ، دمای نگهداری، حضور آنزیمها، نور، اکسیژن، آسکوربیک اسید، قندها، دی اکسید گوگرد، یونهای فلزی، کوپیگمانها، ساختمان و غلظت آنتوسیانینها و حضور سایر تر کیبات مثل سایر فلاونوئیدها و مواد معدنی قرار دارد (۱۳). با توجه به مطالب ذکر شده در مورد اهمیت آنتوسیانینها و نیز توجه به ناپایداری و حساسیت آنها، یافتن مواد و روشهایی که بتوان به واسطه آنها میزان پایداری آنتوسیانینها را افزایش داد، ضروری به نظر می رسد. در این پژوهش سعی شده تا اثرات برخی از مواد شیمیایی که کاربرد بالایی در صنایع غذایی دارند، بر پایداری آنتوسیانینها سنجیده شود.

مواد و روشها

در این کار جهت استخراج آنتوسیانین از روشChiriboga وFrancis (۱۹۷۰) استفاده شد. طبق این روش از اتانول ۰/۱ درصد اسیدی برای استخراج آنتوسیانین استفاده گردید (۶). شاه توتها به طور محلی از اطراف شهرستان ارومیه تهیه شده و تا روز مصرف در فریزر در دمای ۱۸-درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در زمان آزمایش، نمونه ها از فریزر خارج شده و پس از بر طرف شدن یخ زدگی در دمای اتاق، یک کیلوگرم از نمونه را وزن کرده و در مخلوط کن ریخته و همراه با آن مقداری از حلال استخراجی را که قبلا آماده شده بود به آن اضافه نموده و به مدت ۱۰ دقیقه به هم زده شد. بعد از یکنواخت شدن، محلول حاصل، تحت شرایط خلاء توسط قیف بوخنر با کاغذ واتمن شماره ۱ صاف گردید. در نهایت حلال مورد استفاده توسط دستگاه تبخیر درخلاء و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد جدا شد. بعد از جداسازی حلال، ماده غلیظی که در ته بالن باقی مانده بود تقریباً آنتوسیانینهای خالص توت بود. مقداری آب مقطر به عصاره غلیظ باقی مانده در ته بالن اضافه شده و حجم محلول حاصل به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد. محلول حاصل حدود نیم ساعت با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول شفاف بالایی جهت انجام آزمایشات جدا گردید.

تیمار با پراکسید هیدروژن، قند، آسکوربیک اسید و SO_2: جهت بررسی تأثیر پراکسید هیدروژن سه سطح مختلف پراکسید هیدروژن($mmolL^{-1}$ ۲۷/۹۲ و ۱۸/۶ ،۹/۳) برای بررسی تأثیر قند، سه سطح مختلف قند ساکارز (۲۰،۴۰ و۶۰ درصد)(w/v)، برای بررسی تأثیر دی اکسید گوگرد سه سطح مختلف SO_2 (ppm ۱۰۰ و ۵۰، ۲۵) و برای بررسی تأثیرآسکوربیک اسید، سه سطح مختلف آسکوربیک اسید (۱۰٪،۲۵٪ و۵۰٪)(w/v) انتخاب شد. در هر مورد، ۹۰ میلی لیتر از محلول آنتوسیانین به لوله های آزمایش آن گروه (با ۳ تکرار) ریخته شد. البته قبلا pH محلول آنتوسیانین توسط دستگاه pH متر و توسط اسید رقیق شده (HCl) روی ۲ تنظیم گردید . بعد از ریختن محلول آنتوسیانین به لوله ها ، غلظتهای مختلف پراکسید

Archive of SID

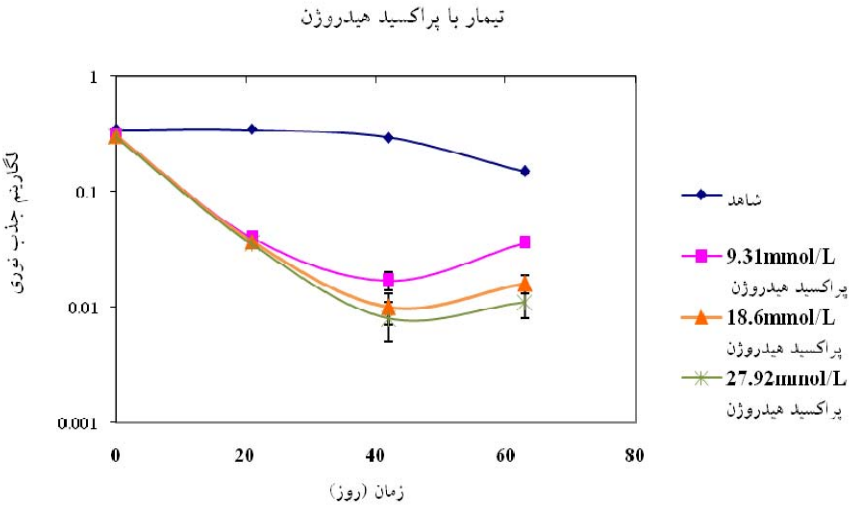
www.SID.ir

هیدروژن، قند، دی اکسید گوگرد و آسکوربیک اسید به لوله های هر گروه اضافه و هر کدام از لوله ها با برچسب شماره گذاری شده و غلظتهای اضافه شده ثبت گردید. محلولهای آنتوسیانین در شرایط تاریکی در داخل یخچال به مدت سه ماه نگهداری شده و هر سه هفته یکبار میزان جذب آنتوسیانین در طول موج 520nm برای پراکسید هیدروژن، قند و SO_2 و 526nm برای آسکوربیک اسید ثبت و مورد بررسی قرار گرفت. انتخاب غلظتهای مورد استفاده و طول موجهای مختلف بر اساس مقالات و منابع قبلی انجام گرفت. در هیچ یک از مقالات برای آسکوربیک اسید از طول موج ۵۲۰ نانومتر استفاده نگردیده و به جای آن از ۵۲۶ استفاده شده بود.

تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها (ANOVA) با استفاده از نرم افزار SAS version 7 صورت گرفت. آنالیز داده ها به صورت دو طرفه انجام گردید. برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از تیمار با پراکسید هیدروژن: طبق نتایج به دست آمده از طریق آنالیزهای آماری ، نشان داده شد که در غلظتهای بالای پر اکسید هیدروژن میزان تخریب آنتوسیانین بیشتر بوده و شدت رنگ نیز کاهش می یابد. طی ۶۳ روز، گروههای مختلف آنتوسیانین با ۳ سطح از H_2O_2 تفاوت معنی داری داشتند که این امر تأییدی بر موارد بالاست. طبق آنالیزهای آماری تفاوت معنی داری بین میانگینهای جذب نوری در پایان زمانهای مختلف یعنی ۲۱، ۴۲ و۶۳ روز وجود داشت. به تدریج طی زمان میزان جذب آنتوسیانین در ۵۲۰ نانومتر و در نتیجه محتوی آنتوسیانینی کاهش یافت. به طوری که این کاهش در پایان ۶۳ روز بیشترین مقدار را نشان داد. همچنین مطابق با افزایش غلظت H_2O_2 تفاوت معنی داری نیز بین میانگینهای جذب نوری غلظتهای مختلف وجود داشت. با افزایش غلظت H_2O_2 ، میزان تجزیه آنتوسیانین نیز افزایش یافته و در نتیجه میزان جذب کاهش یافت (نمودار۱).



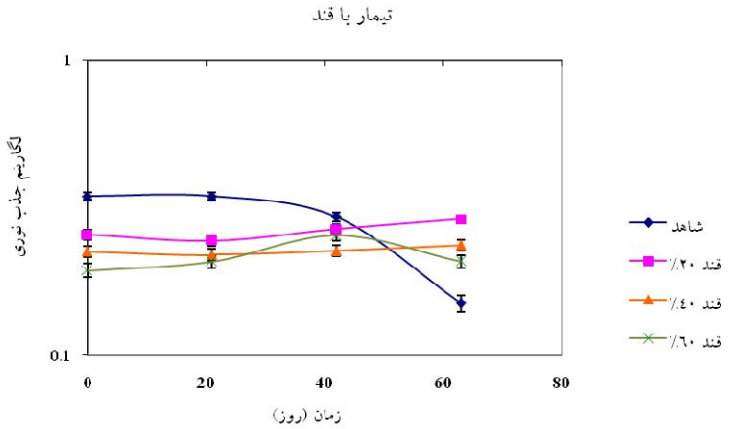
نمودار ۱- اثر پراکسید هیدروژن بر پایداری آنتوسیانینها در شاه توت. داده ها میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند.

نتایج حاصل از تیمار با قند: مطابق با نتایج به دست آمده از آنالیز های آماری، مشخص شد که تفاوت معنی داری بین میانگینهای جذب نوری در طول زمانهای معین، یعنی ۲۱، ۴۲ و۶۳ روز وجود دارد. در ضمن تفاوت معنی داری بین میانگینهای جذب نوری غلظتهای مختلف قند وجود داشت. از میان غلظتهای انتخاب شده برای قند، بیشترین

www.SID.ir

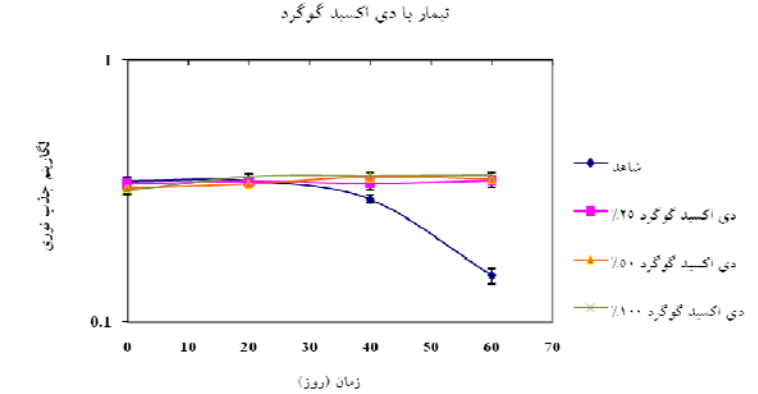
میزان جذب مربوط به غلظت ۲۰ درصد بود. بنابراین در این نقطه ، بیشترین میزان آنتوسیانین وجود داشته و این غلظت از قند، غلظت مناسب برای حفظ آنتوسیانین در این میوه بود (نمودار۲).

تیمار	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
پر اکسید هیدروژن	0.940558	13.53338	0.025052	0.185111
قند	0.991107	7.267066	0.006958	0.095741
دی اکسید گوگرد	0.978473	10.61226	0.009551	0.090000
آسکوربیک اسید	0.860477	26.27106	0.006149	0.023407



نمودار۲– اثر قند بر پایداری آنتوسیانینها در شاه توت. داده ها میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند.

نتایج حاصل از تیمار با دی اکسید گوگرد: طبق آنالیز های آماری ، اثر زمان و غلظت به تنهایی معنی دار نبودند. همچنین اثرات متقابل زمان و غلظت نیز تفاوت معنی داری نشان ندادند. اما در کل در مورد غلظت، به تدریج با افزایش در غلظت SO_2 ، مقدار جذب نیز افزایش یافت. در مورد زمان کمترین میزان جذب در رابطه با روز ۶۳ و بیشترین آن مربوط به روز ۲۱ بود (نمودار۳).

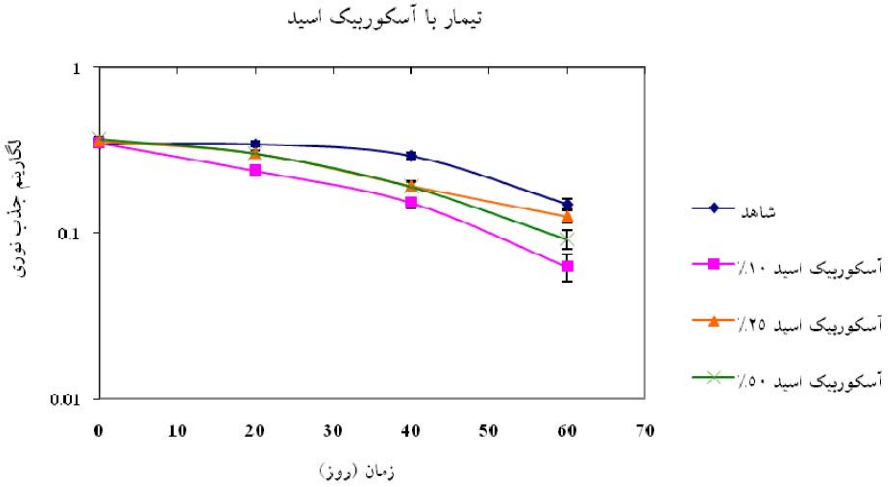


نمودار۳- اثر دی اکسید گوگرد بر پایداری آنتوسیانینها در شاه توت. داده ها میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند

www.SID.ir

تیمار	Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
پر اکسید هیدروژن	a	2	0.16066400	0.08033200	128.00	<.0001
	b	2	0.01631756	0.00815878	13.00	0.0003
	a*b	4	0.00176844	0.00044211	0.70	0.5992
قند	a	2	0.09426230	0.04713115	973.64	<.0001
	b	2	0.00255696	0.00127848	26.41	<.0001
	a*b	4	0.00028859	0.00007215	1.49	0.2467
دی اکسید گوگرد	a	2	0.07076356	0.03538178	387.86	<.0001
	b	2	0.00309489	0.00154744	16.96	<.0001
	a*b	4	0.00077556	0.00019389	2.13	0.1196
آسکوربیک اسید	a	2	0.00299163	0.00149581	39.56	<.0001
	b	2	0.00079919	0.00039959	10.57	0.0009
	a*b	4	0.00040704	0.00010176	2.69	0.0643

نتایج حاصل از تیمار با آسکوربیک اسید: نتایج آنالیز های آماری نشان داد که طی ۶۳ روز ، بیشترین میزان جذب مربوط به زمان صفر وکمترین آن مربوط به روز ۴۲ بود. این امر اثر تخریبی زمان را بر پایداری آنتوسیانینها نشان می دهد. در مورد غلظت، تفاوت معنی داری بین غلظت اولیه یعنی ۱۰ درصد و سایر غلظتها وجود داشت. در کل بیشترین میزان جذب مربوط به غلظت صفر (شاهد) و کمترین آن مربوط به غلظت ۱۰ درصد بود. اما به تدریج با افزایش در غظت آسکوربیک اسید، میزان جذب نسبت به غلظت ۱۰ درصد افزایش می یافت. در نهایت نمونه ها نسبت به شاهد، کاهش جذب داشتند و این امر نشان دهنده اثرات تخریبی آسکوربیک اسید بر آنتوسیانین بود (نمودار۴).



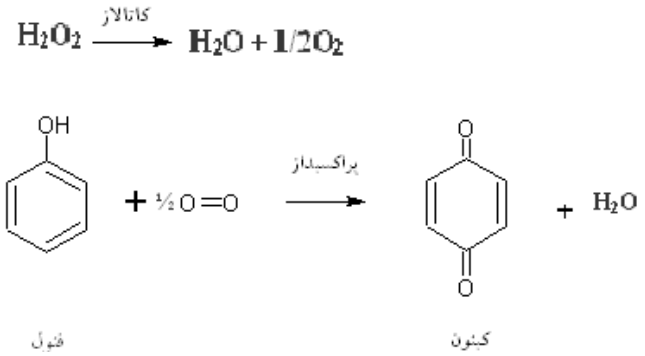
نمودار۴- اثر آسکوربیک اسید بر پایداری آنتوسیانینها در شاه توت. داده ها میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند.

www.SID.ir

بحث

بحثی در نتایج حاصل از اثر پراکسید هیدروژن: یکی از موادی که بر پایداری آنتوسیانینها اثر دارد، حضور H_2O_2 در محیط است. اثرات تخریبی H_2O_2 روی آنتوسیانین و آسکوربیک اسید در عصاره های میوه ها به خوبی شناسایی شده است. تجزیه آنتوسیانین توسط H_2O_2 در عصاره توت فرنگی توسط Sondheimer و kertes (۴۱) و عصاره گیلاس ترش توسط Őzkan (۳۰) نشان داده شده است. نتایج به دست آمده از پژوهشهای آنها تخریب آنتوسیانین را تحت تأثیر غلظتهای مختلف H_2O_2 نشان داد. حساسیت متفاوت آنتوسیانینهای مختلف به H_2O_2 توسط Sapers و Simmons در ۱۹۹۸ نیز گزارش شد (۳۸). آنها رنگ زدایی سریع در آنتوسیانینهای توت فرنگی و تمشک را توسط H_2O_2 مشاهده کردند و نیز دریافتند که آنتوسیانینهای گیلاس شیرین پایداری بیشتری نسبت به H_2O_2 دارند. آنها همچنین ، H_2O_2 را به عنوان یک ماده استرلیزه کننده سطحی در مورد گیلاس شیرین، تمشک و توت فرنگی به کار بردند و از بین رفتن سریع رنگ آنتوسیانین را در دو میوه آخر مشاهده کردند. داده های آماری آنها نشان داد که غلظت آنتوسیانین در حضور غلظتهای مختلف H_2O_2، تفاوتهای معنی داری دارد. بنابراین در غلظتهای بالا از H_2O_2 تخریب آنتوسیانین سریع تر و بیشتر بوده و این نتیجه مطابق با نتایج یافت شده در پژوهش حاضر است. Ozkan و همکاران در سال ۲۰۰۲ اثر دما و پراکسید هیدروژن را بر آنتوسیانینهای توت فرنگی، انار و گیلاس ترش بررسی کردند و نتیجه گرفتند که در مقایسه با عصاره های انار و گیلاس شیرین، آنتوسیانینهای عصاره توت فرنگی نسبت به تحریک توسط H_2O_2 بسیار حساس تر می باشند (۲۹). بنابراین حذف H_2O_2 از فرآیند های ضد عفونی کننده بسته بندی عصاره توت فرنگی باید کاملاً کنترل شود. حساسیت آنتوسیانینها نسبت به H_2O_2 از مدتها قبل مورد شناسایی قرار گرفته است. مطابق با مطالعات قبلی انجام یافته، تجزیه اکسیداتیو آنتوسیانین در دو مرحله اتفاق می افتد: یک واکنش برگشت پذیر آغازی با تشکیل آنتوسیانین – H_2O_2 ، که توسط یک واکنش برگشت ناپذیر آهسته تر دنبال می شود. محصولات تجزیه و تفکیک H_2O_2 ، مسئول اکسیداسیون و تجزیه بعدی ترکیبات فنلی هستند (۳۷و۳۸). کینونها که شکل اکسید شده فنلها هستند، طی اکسیداسیون ترکیبات فنلی، شکل می گیرند و این واکنش توسط محصولات ناشی از تجزیه پراکسید هیدروژن تسریع می گردد، بنابراین دو فاکتور در تخریب آنتوسیانینها در عصاره میوه هایی که حاوی مقادیری از ترکیبات فنلی هستند، می تواند مؤثر باشد: ۱ـ مقدار رادیکالهای آزاد وآنیون HOO^- حاصل از تخریب و تجزیه H_2O_2 (۲) مقدار کینونهای حاصل از اکسیداسیون ترکیبات فنلی (۳۸ و ۴۸) زیرا در واقع آنزیمها ابتدا ترکیبات فنلی را اکسید کرده و ایجاد کینونها را می نمایند که این کینونها با آنتوسیانینها واکنش داده و موجب تجزیه آنها و ایجاد محصولات قهوه ای رنگ می شوند. در عین حال خود کینونها مواد رنگی هستند که موجب قهوه ای شدن میوه ها می شوند. معمولاً در اثر فعالیت کاتالاز و پراکسیداز واکنشهایی به شرح زیر اتفاق می افتد:

Archive of SID
www.SID.ir



چنانچه مشاهده می شود، محصولات حاصل از تجزیه پراکسیدهیدروژن، روی پایداری فنلها اثر گذاشته و آنها را به فرم اکسایشی کینونی تبدیل می نماید.

بحثی در نتایج حاصل از اثر قند: قندها به طور کلی در میوه ها وجود دارند و معمولاً در طول پروسه آماده سازی مواد غذایی، به محصولات مختلف مثل عصاره میوه ها و مرباها افزوده می شوند. مشخص شده است که قندها پایداری آنتوسیانینها را کاهش می دهند (۴۴). در مطالعاتی که توسط Daravingas و Cain درسال ۱۹۶۸ صورت گرفت تمام قندهای آزمایش شده (مثل ساکاروز ، فروکتوز ، گلوگز و گزیلوز) ، همگی به یک روش تخریب آنتوسیانین را افزایش دادند (۷). مثال مشخص از تولیدات و محصولات تخریبی حاصل توسط قندها، فورفورال است (۲۷). Rosso و Mercadante در سال۲۰۰۷ نشان دادند که اضافه کردن قندها و نمکها اثر منفی روی پایداری آنتوسیانین دارد (۳۶). واکنشهای آنتوسیانینها با تولیدات تخریبی قندها، باعث شکل گیری رنگیزه های پلیمری قهوه ای رنگ می شود (۲۵). در مواردی هم مشخص شده است که قندها، آنتوسیانینها را محافظت می کنند. ساکارز، آنتوسیانینها را در طول ذخیره سازی به صورت یخ زده، محافظت می کند و نیز از قهوه ای شدن و شکل گیری رنگدانه های پلیمری جلوگیری می کند که این امر احتمالاً ناشی از مهار واکنشهای آنزیمی است (۱۷). همچنین کاهش فعالیت آب توسط قند ها می تواند از تخریب آنتوسیانینها جلوگیری کند (۸). Wrolstad و همکاران در ۱۹۹۰ نشان دادند که اثر حفاظتی قند روی پیگمانهای آنتوسیانین، ممکن است طی منجمد کردن، نسبت به ذخیره سازی بدون انجماد بهتر باشد. آنها همچنین نشان دادند که قهوه ای شدن و توسعه رنگهای پلیمری به طور معنی داری توسط اضافه کردن قند کاهش می یابد. اثر قند اضافه شده روی پایداری آنتوسیانین بستگی به ساختارآن، غلظت و نوع قند دارد. آنها گزارش کردند که زمانی که غلظت سوکروز تا ۲۰ درصد افزایش می یابد، پایداری آنتوسیانینهای توت فرنگی نیز افزایش می یابد که این امر مطابق با نتایج تحقیق حاضر است (۴۹). Tsai و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که بر اساس داده های ایندکس تجزیه آنتوسیانین (DI)، نیمه عمر آنتوسیانین و انرژی فعال سازی تجزیه آنتوسیانین، سوکروز یک حفاظت کننده خوب آنتوسیانین است. آنها نشان دادند که انرژی فعال سازی برای غلظتهای ۲۰، ۴۰ و ۶۰ درصد سوکروز به ترتیب ۱۴.۷۸، ۱۷.۳۲ و ۱۸.۲۱ kcal/mol است. آنتوسیانینها تحت شرایط اسیدی پایداری بیشتری از خود نشان می دهند اما تحت فرآیند های نرمال و شرایط ذخیره سازی سریعاً به مشتقات بدون رنگ و سپس به پیگمانهای قهوه ای غیر قابل حل تبدیل می شوند (۴۶). بنابراین استفاده از قند به تنهایی مؤثر نبوده و باید از روش انجماد برای کاهش فعالیتهای آنزیمی و مهار قهوه ای شدن برای حفاظت آنتوسیانین استفاده شود.

بحثی در نتایج حاصل از **اثردی اکسید گوگرد:** SO_2 به طور گسترده ای به شرابها و عصاره میوه ها به عنوان یک

Archive of SID
www.SID.ir

عامل آنتی اکسیدان و ضد میکروبی اضافه می شود، اما همچنین اثر آن در از بین بردن رنگ یا روشن تر کردن رنگ در شرابها در رابطه با شکل گیری آنتوسیانین-۴- بی سولفیت که یک ترکیب بی رنگ است نیز شناخته شده است (۵). دی اکسید گوگرد با آنتوسیانینها پیوند برقرار کرده و تولید محصول بی رنگ و پایدار می کند . واکنش به شکل زیر می باشد :

$$AH + HSO_3^- \longrightarrow AH\text{-}SO_3H$$

ثابت تعادل برای این واکنش بالا می باشد که این امر نشان دهنده این است که مقادیر کم دی اکسید گوگرد آزاد ممکن است مقادیر زیادی از آنتوسیانین را بی رنگ کند (۴۵). بی سولفیت خیلی سریع با یون فلاویلیوم واکنش داده و اگر از سیستم حذف شود، واکنش به سرعت در جهت عکس صورت می گیرد. با اسیدی کردن محلول تا pH نزدیک به یک، واکنش بی رنگ شدن قابل برگشت می باشد. هرعاملی که باعث گسستن پیوندهای دو گانه سیستم گردد، باعث از بین رفتن رنگ می گردد. وجود یون اکسونیوم مثبت در جایگاههای C-2 ، آنتوسیانین را نسبت به هجوم ترکیبات هسته خواه مثل دی اکسید گوگرد و پراکسید هیدروژن مستعد می سازد. آنتوسیانینها بعد از افزودن دی اکسید گوگرد، با شکل گیری فلاون - ۴- سوفونیک اسید به فرم بی رنگ در می آیند. با حذف این ماده از محیط در شرایط pH پایین، رنگ آنتوسیانین قابل برگشت می باشد. اگرچه این کاهش رنگ در بسیاری از غذاها مطلوب نمی باشد، با این وجود، دی اکسید گوگرد در طول پروسه های آماده سازی غذاها مورد استفاده قرار می گیرد (۳۸). استفاده بالقوه از آنتوسیانینها، به عنوان رنگهای غذایی افزودنی، به دلیل حساسیت به اضافه شونده های هسته -دوست که منجر به رنگ زدایی آنتوسیانینها می شود، کم شده است. این امر می تواند در حضور دی اکسید سولفور اتفاق بیفتد کـه این ماده یکی از موادی است کـه به طور گسترده، در صنایع غذایی به عنوان نگهـــدارنده استفاده می شود. Paul در سال ۲۰۰۲ گزارش کرده است که اضافه کردن دی اکسید سولفور اثر منفی روی رنگ شراب قرمز دارد. طبیعت آروماتیکی حلقه C آنتوسیانین، توسط واکـــنش آنتوسیانین با دی اکسید سولفور جهت تشکیل یک ترکیب بی سولفیت، تخریب می شود. این امر موجب ایجاد یک ترکیب بی رنگ می شود (۳۲). Berke و همکاران در ۱۹۹۸ بی سولفیت را به آنتوسیانین اضافه نموده و ساختار ترکیبات بی رنگ را توسط NMR بررسی نمودند. طیف های بدست آمده دلیل بر وجود دو ماده رزونانس به نسبت ۱:۱ بوده و دلیل ایجاد آنها فقدان کونجوگاسیون یون فلاویلیوم می باشد (۱).

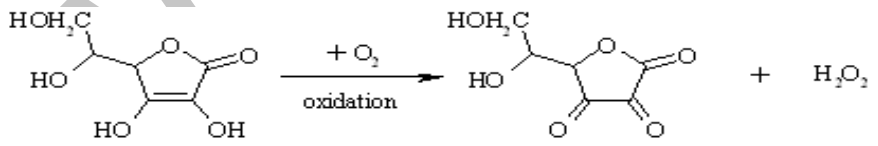
درنهایت می توان چنین نتیجه گیری کرد که SO_2 اثر منفی در پایداری آنتوسیانینها دارد. نتایج به دست آمده از این پژوهش نیز بر این امر تأکید دارد.

بحثی در نتایج حاصل از اثر آسکوربیک اسید: یکی از عمومی ترین روشهای مقابله با اکسیداسیون و افزایش ارزش غذایی یک محصول غذایی، غلیظ کردن عصاره میوه ها با آسکوربیک اسید است. به نظر می رسد که آسکوربیک اسید در پایداری رنگ آنتوسیانین چندین نقش داشته باشد . آسکوربیک اسید ومشتقات آن در بسیاری از غذا ها به کار می روند. آنها به غذاها به خصوص به عصاره میوه ها، جهت بهبود کیفیت غذایی و مهار واکنشهای قهوه ای شدن اضـــافه می شوند (۱۴و۴۲). آسکوربیک اسید دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی بالقوه به عنوان یک جمع آوری کننده اکسیژن یکتایی است (۱۱). بعد ها مشخص شد که پایداری آنتوسیانینهای آسیله شده در حضور آسکوربیک اسید افزایش می یابد و نیز مشخص شد که آنتوسیانینها توسط آسکوربیک اسید از تخریب آنزیمی محافظت می شوند (۴۳). تشکیل H_2O_2 حاصل از اکسیداسیون آسکوربیک اسید روی پایداری آنتوسیانینها مؤثر است (۲۶و۴۳). به علاوه Shrikhande و Francis در ۱۹۷۴ گزارش کردند کـــه حضور فلاونولها (در حضور آسکوربیک اسید) اثر حافظتی در مقابل تجزیه آنتوسیانین

Archive of SID

www.SID.ir

نشان می دهد که شاید این امر به دلیل رقابت آنها با آنتوسیانین طی واکنشهای تغلیظ باشد (۳۹). در این واکنشها عصاره های آنتوسیانینی به دست آمده از گیاهان مختلف، جهت نگهداری طولانی مدت و استفاده های بعدی به صورت غلیظ شده در می آید که برای انجام این کار از آسکوربیک اسید استفاده می گردد. Poei-Langston و Wrolstad در ۱۹۸۱ مشاهده کردند که اضافه کردن آسکوربیک اسید به سیستم مدل آنتوسیانین موجب کاهش پایداری رنگیزه ها شد (۳۳). Skrede و همکاران در ۱۹۹۲ گزارش کردند که آسکوربیک اسید موجب کاهش پایداری رنگیزه ها می شود (۴۰). آسکوربیک اسید تشکیل رنگیزه های پلیمری را افزایش داده و رنگیزه های آنتوسیانین را بی رنگ می کند. Duangmal و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که تیمار با ویتامین C (آسکوربیک اسید) میزان نیمه عمر رنگیزه را کاهش می دهد (۱۰). آنها مشاهده کردند که ویتامین C موجب افزایش تجزیه آنتوسیانین می شود و نشان دادند که تخریب قابل ملاحظه ای در مخلوط آنتوسیانین وآسکوربیک اسید در عصاره Maoطی ذخیره سازی اتفاق می افتد. آنالیزهای آماری نشان دادند که میانگین جذب آنتوسیانین در حضور غلظتهای مختلف آسکوربیک اسید، اختلاف معنی داری دارند. همچنین Garzon و Wrolstad در۲۰۰۲ الگوی مشابهی از تجزیه ویتامین C در عصاره توت فرنگی حاوی آسکوربیک اسید (۱۵) و Iversen در ۱۹۹۹ در نکتار Blackcurrant (*Ribes nigrum*) گزارش کردند (۱۸). حضور آسکوربیک اسید اثر منفی بر پایداری آنتوسیانین نشان می دهد که منجر به تجزیه متقابل این ترکیبات می شود (۱۵،۹و۳۴). مکانیسم پیشنهاد شده جهت تجزیه آنتوسیانین در حضور آسکوربیک اسید توسط Jurd در۱۹۷۲ که بعدها توسط Poei Langstone و Wrolstad در سال ۱۹۸۱ تأیید شد، این است که ادغام مستقیم آسکوربیک اسید روی کربن ۴ مولکول آنتوسیانین، موجب تخریب هر دو می شود (۲۰و۳۳). با انجام آزمایشهای اندازه گیری رنگ، اثر منفی ایجاد شده توسط واکنش اضافه شدن آسکوربیک اسید به مولکول آنتوسیانین، در مورد رنگ آنتوسیانینهای انگور انجام شده و نتایج نشان داده اند که رنگ قرمز کاهش یافته و روشن تر می گردد (۲). در نهایت با توجه به مطالعات انجام یافته ونتایج حاصل از این پژوهش می توان چنین نتیجه گیری کرد که می توان از آسکوربیک اسید در غلظت مناسب به عنوان نگهدارنده، جهت افزایش پایداری آنتوسیانینها استفاده نمود ولی شرایطی که موجب اکسیداسیون آسکوربیک اسید و ایجاد پر اکسید هیدروژن می شود، مثلا آنزیمهایی که موجب اکسیداسیون آسکوربیک اسید می شوند، باعث ایجاد اثر منفی در پایداری آنتوسیانین می گردد.



ascorbic acid dehydroascorbic acid hydrogen peroxide

در نهایت با توجه به نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، مشاهده می شود که مواد مورد آزمایش، در غلظتهای مختلف اثرات متفاوتی بر پایداری آنتوسیانینها دارند، چنانکه، در غلظتهای خاصی حضور قند موجب پایداری آنتوسیانین گردیده و در غلظتهای بالاتر اثر منفی دارد. در کل قند و آسکوربیک اسید به میزان کم موجب پایداری رنگ آنتوسیانین می گردند ولی چنانچه اشاره شد اگر عواملی مانند اکسیداسیون موجب تخریب آنها گردند محصولات جانبی حاصل از تخریب مانند پر اکسید هیدروژن اثر منفی بر پایداری رنگ آنتوسیانین خواهد داشت. اثر تخریبی پراکسید هیدروزن نیز طی این آزمایشات به وضوح مشخص گردید. با اینکه دی اکسید

www.SID.ir

گوگرد نیز موجب کاهش رنگ آنتوسیانینها می گردد ولی گاهی استفاده از آن غیر قابل اجتناب است. به همین منظور و نیز از آنجا که این مواد جزء مواد با استفاده بالا در صنایع غذایی به عنوان نگهدارنده هستند، بنابراین بایستی غلظتهای مناسب جهت استفاده از این مواد در مورد هر کدام تعیین گردیده و نیز از سایر روشها (ازجمله انجماد در مورد قندها) استفاده شود و یا اینکه مواد مناسب دیگری جایگزین آنها گردد.

منابع

1. Berke B , Cheze C, Vercauteren J and Deffieux G. 1998. Bisulfite addition to anthocyanins: revisited structures of colourless adducts. Tetrahedron Letters. 39: 5771-5774.
2. Brenes CH, Del Pozo-Insfran D and Talcott S. 2005.Stability of co pigmented anthocyanins and ascorbic acid in a grape juice model system. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 49-56.
3. Brouillard R. 1982. Chemical structure of anthocyanins. In: Anthocyanins as Food Colors. Pericles Markakis (ed.), Academic Press Inc., New York, 1-38.
4. Buchert J, Koponen JM, Suutarinen M, Mustranta A, Lille M, Torronen R and Poutanen K. 2005.Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices. Journal of the Science of Food and Agriculture. 85:2548–2556.
5. Burroughs LF. 1975. Determining free sulfur dioxide in red wine. American Journal of Enology and Viticulture. 26:25-29.
6. Chiriboga C and Francis FJ. 1970. An anthocyanin recovery system from cranberry pomace. Journal of the American Society for Horticultural Science. 9: 223.23
7. Daravingas G and Cain RF. 1968. Thermal degradation of black raspberry anthocyanin pigments in model systems. Journal of Food Science. 33: 138-142.
8. De Ancos B, Gonzalez E and Cano MP. 1999. Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition. Food Research and Technology. 208: 33-38.
9. Del Pozo-Insfran D, Brenes CH and Talcott ST. 2004. Phytochemical composition and pigment stability of acai (*Euterpe oleracea Mart*.). Journal of Agriculture and Food Chemistry. 52: 1539-1545.
10. Duangmal K, Wongsiri S and Sueeprasan S. 2004. Colour appearance of fruit juice affected by vitamin C. AIC 2004 Color and Paints, Interim Meeting of the International Color Association, Proceedings.121-124.
11. Elliott JG. 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. Food Technology. 53(2), 46–48.
12. Fraisse JL, Lamaison C and Rémés Y.2002. Blackberry anthocyanins are slightly bioavailable in rats. Journal of Nutrition. 132: 1249–1253.
13. Francis FJ.1989.Food colorants:Anthocyanins.Critical Reviews in food Science and Nutrition. 28: 273-314.
14. Freedman L and Francis FJ. 1984. Effect of ascorbic acid on color of jellies. Journal of Food Science, 49(4), 1212–1213.
15. Garzon GA and Wrolstad ER. 2002. Comparison of the stability of pelargonidin-based anthocyanins in strawberry juice and concentrate. Journal of Food Science 67 (4): 1288-1299.
16. Huang DJ, LIN CD, Chen HG and LIN YH. 2004. Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas [L.] Lam 'Tainong 57'*) constituents. Botany Bulletin Academic Sin. 45: 179-186.
17. Huang HT. 1956. The kinetics of the decolorization of anthocyanins by fungal anthocyanase. Journal of the American Chemical Society. 78: 2390-2393.
18. Iversen CK. 1999. Black current nectar: effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid content. Journal of Food Science 64 (1): 37-41.
19. Jungmin L, Durst RW and Wrolstad RE. 2005. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. Journal of AOAC International. 88(5): 1269-1278.
20. Jurd L.1972. Some advances in the chemistry of anthocyanins-type plant pigments. In: Chichester CO. ed. The chemistry of plant

Archive of SID
www.SID.ir

pigments .New York:Academic Press: pp. 123–142.

21. Kähkönen MP, Heinämäki J, Ollilainen V and Heinonen M. 2003. Berry anthocyanins: Isolation, identification and antioxidant activities. Journal of the Science of Food and Agriculture. 83: 1403-1411.

22. Kamei H, Kojima T, Hasegawa M, Koide T, Umeda T, Yukawa T and Terabe K. 1995. Suppresion of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. Cancer Investigation.13:590-594.

23. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T and Aromaa A. 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. American Journal of Clinical Nutrition. 76: 560-568.

24. Kong J, Chia L, Goh N, Chia T and Brouillard R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry. 64: 923-933.

25. Krifi B, Chouteau F, Boudrant J and Metche M. 2000. Degradation of anthocyanins from blood orange juices**.** International Journal of Food Science and Technology. 35: 275-283. 79

26. Markakis P. 1982. Stability of anthocyanins in foods. In: Markakis P.ed. Anthocyanins as food colors. Academic Press, New York: pp. 163–180.

27. Meschter EE. 1953. Effects of carbohydrates and other factors on color loss in strawberry products. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1: 574-579.

28. Netzel M, Strass G, Herb M, Dietrich H, Bitsch R , Bitsch I and Frank T .2005. The excretion and biological antioxidant activity of elderberry antioxidants in healthy humans. Food Research International. 38: 905–910.

29. Őzkan M,Yemenicioglu A, Asef N and Cemeroglu B. 2002. Degradation kinetics of anthocyanins from sour cherry, pomegranate and strawberry juices by hydrogen peroxide. Journal of Food Science. 67(2): 525-529.102

30. Őzkan, M, Yemenicioglu A,Citak B and Cemeroglu B. 2000. Effect of hydrogen peroxide on sour cherry anthocyanins.J Food Quality. 23(4): 421-428.

31. Panovsaka TK, Kulevanova S and Stefova M. 2005. In vitro antioxidant activity of some Teucrium species (*Lamiaceae*). Acta Pharmaceutica. 55: 207–214.

32. Paul R. 2002 . Micro-Oxygenation – Where Now? Australian Society of Viticulture and OenologyUse of Gases in Winemaking Seminar,Wine Network Australia Pty Ltd.

33. Poei-Langston MS and Wrolstad RE. 1981. Color degradation in an ascorbic acid-anthocyanin-flavanol model system. Journal of Food Science. 46: 1218, 1222, 1236.

34. Rodriguez-Saona LE, Giusti MM and Wrolstad RE. 1999. Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems. Journal of Food Science. 64: 451–456.

35. Rossi A, Serraino I, Dugo P, Di Paola R, Mondello L, Genovese T, Morabito D, Dugo G, Sautebin L, Caputi AP and Cuzzocrea S. 2003. Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation. Free Radical Research. 37: 891-900.

36. Rosso VV and Mercadante AZ. 2007. Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 8: 347-352.

37. Sapers GM, Miller RL, Choi SW and Cooke PH. 1999. Structure and composition of mushrooms as affected by hydrogen peroxide wash. Journal of Food Science. 64(5): 889-892.

38. Sapers GM and Simmons G. 1998. Hydrogen peroxide disinfection of minimally processed fruits and vegetables. Food Technology. 52(2): 48–52.

39. Shrikhande AJ and Francis FJ. 1974. Effect of flavonols on ascorbic acid and anthocyanin stability in model systems. Journal of Food Science. 39: 904-906.

40. Skrede G, Wrolstad RE, Lea P and Enersen G. 1992. Color stability of strawberry and black currant syrups. Journal of Food Science. 57: 172-177.

41. Sondheimer S and kertes Z. 1952.The kinetics of the oxidation of strawberry anthocyanin by hydrogen peroxide. Food Research. 17(3):288-298.

42. Starr MS and Francis FJ. 1968. Oxygen and ascorbic acid effect on the relative stability of four anthocyanin pigments in cranberry juice. Food Technology 22(10): 91–93.

43. Talcott ST, Brenes CH, Pires DM and Del Pozo-Insfran D. 2003. Phytochemical stability and color retention of copigmented and processed

Archive of SID

www.SID.ir

muscadine grape juice. Journal of Agricultural Food Chemistry. 51: 957-963.

44. Thakur BR and Arya SS. 1989. Studies on stability of blue grape anthocyanins. Int. Journal of Food Science and Technology. 24: 321-326.

45. Timberlake CF and Bridle P. 1967. Flavylium salts, anthocyanidins and anthocyanins. II. Reactions with sulfur dioxide. Journal of the Science of Food and Agriculture. 18:479-85.

46. Tsai PG, Hsieh YY and Huang TC. 2004. Effect of sugar on anthocyanin degradation and water mobility in a Roselle anthocyanin model system using O NMR. Journal of Agricultural Food Chemistry. 52(10):3097-3099.

47. Viljanen K, Kivikari R and Heinonen M. 2004. Protein-lipid interactions during liposome oxidation with added anthocyanin and other phenolic compounds. J. Agric .Food Chemistry. 52: 1104-1111.

48. Von Elbe JH and Schwartz SJ. 1996. Colorants. In O. R. Fennema (Ed.), Food chemistry, 3rd ed (pp. 651–722). New York: Marcel Dekker.

49. Wrolstad RE, Skrede G, Lea P and Enersen G. 1990. Influence of sugar on anthocyanin pigment stability in frozen strawberries. Journal of food science. 55(4):1064-1066.

50. Youdim KA, Spencer JPE, Schroeter H and Rice-Evans C. 2002. Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. Biological Chemistry. 383: 503-519.

51. Zhonggao C, Felgines O, Texier C, Besson D Jiao, Liu J and Wang S. 2005. Antioxidant Activities of Total Pigment Extract from Blackberries. Food Technology and Biotechnology. 43 (1): 97–102.

Effect of some chemicals on stability of anthocyanins from blackberry *(Morus nigra)*

Nikkhah E.[1], Khayyami M.[2] and Heidari R.[2]

[1] Pharmacognosy Dept., Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Science, Tabriz, I.R. of IRAN

[2]Biology Dept., Faculty of Science, University of Uremia, Uremia, I.R. of IRAN

Abstract

Anthocyanins are a subclass of flavonoids and are responsible for red, purple, and blue colors of many flowers, fruits and vegetables. Fruits and berries are the most sample sources of anthocyanins in nature. Anthocyanins are considered to contribute to the healthiness of fruits and berries for their antioxidant, anti-carcinogenic, anti-inflammatory, and anti-angiogenic properties for example. The intensity and stability of anthocyanin pigments are depend on various factors including structure and concentration of pigments, pH, temperature , light, intensity, quality and presence of other pigments together, metal ions, enzymes, oxygen, hydrogen peroxide, ascorbic acid, sugar, sulfur oxide, etc. At present study the extracted anthocyanin pigments were exposed to different concentrations of sugar, H_2O_2, SO_2 and Ascorbic Acid and effects of these materials on stability of anthocyanin were determined. In the case of treatment with sugar, H_2O_2, SO_2 and Ascorbic acid, anthocyanins were represented different effects.

Keywords: Anthocyanins, blackberry, stability

Archive of SID

www.SID.ir