

## ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ НА АВТООКИСЛЕНИЕ КАРОТИНОИДОВ ПАПРИКИ

Мишарина Т.А., Киселёва В.И.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН  
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: tmish@rambler.ru

Поступила в редакцию: 08.06.2018

**Аннотация.** Разработан спектрофотометрический метод оценки антиоксидантных свойств препаратов, основанный на ингибировании авто-окисления смеси каротиноидов экстракта красной паприки в присутствии этих препаратов. Каротиноиды наносятся на пористый инертный полисахарид, благодаря этому процесс автоокисления проходит быстрее, чем в любом другом методе определения эффективности антиоксидантов. Показана эффективность метода для сравнительной оценки антиоксидантной активности эфирных масел и экстрактов пряно-ароматических растений, ионола и аскорбил пальмитата. Важнейшим преимуществом метода является то, что каротиноиды практически идентичны полиненасыщенным жирным кислотам по способности взаимодействовать с кислородными радикалами, поэтому полученные результаты хорошо отражают поведение антиоксидантов в реальных липид содержащих модельных системах и пищевых продуктах.

**Ключевые слова:** спектрофотометрия, антиоксиданты, паприка, каротиноиды, эфирные масла и экстракты пряно-ароматических растений, ионол и аскорбил пальмитат.

Известно, что окисление полиненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов, проходит с участием эндогенных ферментов, а также под действием кислорода и активных форм кислородсодержащих радикалов, присутствующих в воздухе. Перекисное окисление липидов относится к цепным реакциям, в которых активные кислородсодержащие радикалы, а также образующиеся продукты окисления могут продлевать или обрывать реакционные цепи [1, 2]. Для снижения степени окисления полиненасыщенных жирных кислот необходимо сводить к минимуму контакты липидов с воздухом и светом, выдерживать оптимальный температурный режим хранения, а также использовать пищевые антиоксиданты.

Ключевым термодинамическим свойством веществ, отражающим их способность окисляться или восстанавливаться, то есть быть оксидантом или антиоксидантом, является редокс потенциал ( $E^\circ$ ). Величины  $E^\circ$  для каротиноидов и полиненасыщенных жирных кислот близки и составляют около 800 мВ и 600 мВ, соответственно [3, 4]. Это означает, что оба класса этих веществ практически одинаково подвергаются авто-окислению и антиоксиданты будут ингибировать автоокисление и полиненасыщенных жирных кислот, и каротиноидов с близкой эффективностью. Поэтому мы предположили, что для изучения автоокисления кислот можно использовать системы на основе каротиноидов паприки. Каротиноиды – растительные тетратерпиноиды, они имеют интенсивную окраску от желтой до темно-красной благодаря наличию в их молекулах системы сопряженных двойных связей. При окислении активными радикалами из воздуха разрушается система сопряженности связей и каротиноиды быстро обесцвечиваются [5-8]. Наличие факторов защиты в виде антиоксидантов приводит к ингибированию обесцвечивания каротиноидов, которое фиксируют фотометрически.

Цель работы – на основе изучения кинетических характеристик процесса авто-окисления каротиноидов паприки по скорости их обесцвечивания разработать метод для оценки способности различных природных и синтетических антиоксидантов ингибировать автоокисление полиненасыщенных жирных кислот.

В работе использовали коммерческий препарат экстракта паприки («Plant Lipids», Индия), содержащий в качестве основных компонентов капсантин и капсорубин (красные каротиноиды),  $\beta$ -каротин, зеаксантин и  $\beta$ -криптоксантин (желтые каротиноиды) [9-11]. В качестве носителя был выбран нативный крахмал восковидной кукурузы («ROQUETTE», Франция). Исследовали антиоксиданты: ионол (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол), аскорбил пальмитат, три дезодорированных экстракта розмарина компании “AKAY Flavours & Aromatics Pvt. Ltd.” (Индия), коммерческие эфирные масла гвоздики, орегано, чеснока и кориандра компании “Plant Lipids Ltd.” (Индия) и смеси антиоксидантов, состав которых и основные характеристики приведены в таблице 1.

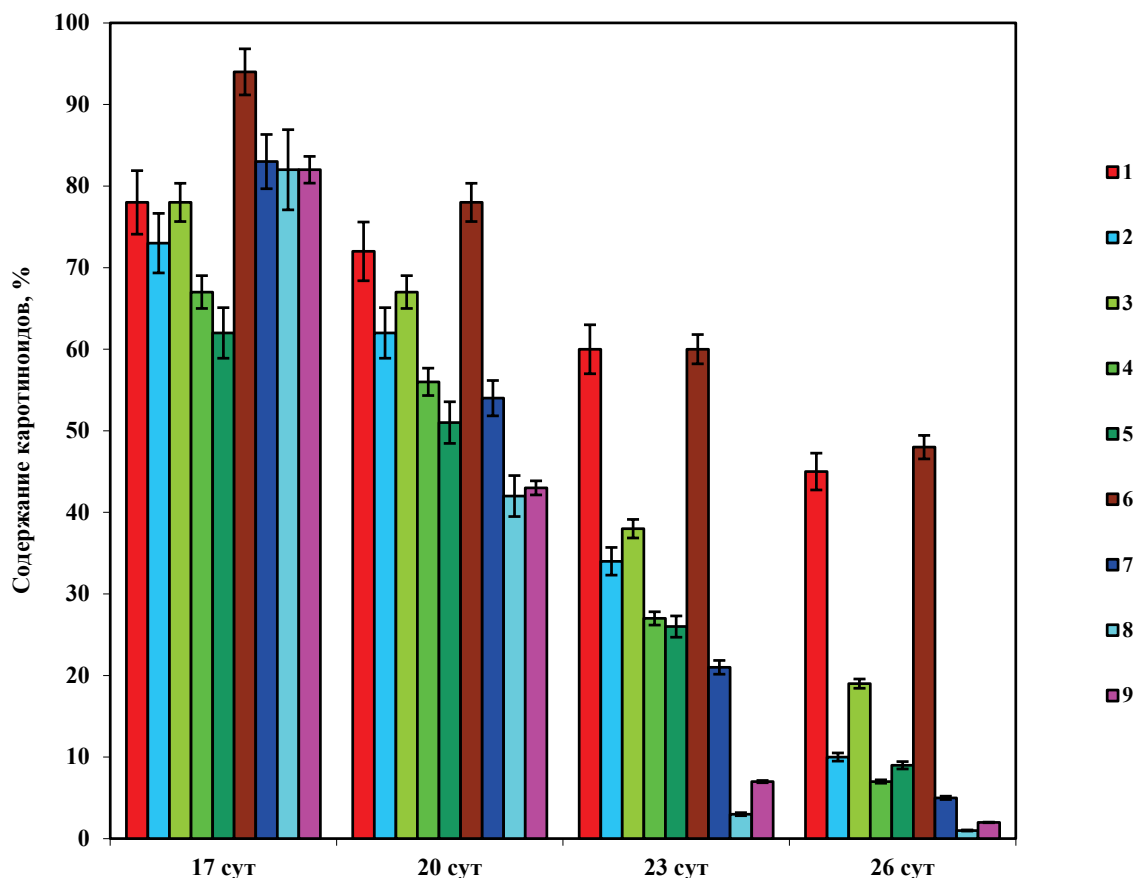
Предлагаемый в настоящей работе метод является модификацией хорошо известного и часто используемого метода оценки антиоксидантных свойств веществ в модельной системе на основе окисления смеси линолевой кислоты и  $\beta$ -каротина [2]. Преимуществом этого метода, а также предлагаемой нами его модификации, является то, что кинетический подход позволяет определить общую ингибирующую способность индивидуальных антиоксидантов или их смесей и обеспечивает точную оценку антиоксидантной защиты [6, 12]. Недостатком метода является окисление модельной системы в неконтролируемых условиях, что затрудняет воспроизведение полученных ранее данных, но это не мешает проводить сравнение активности нескольких антиоксидантов в одном эксперименте при одинаковых условиях авто-окисления [2, 12].

Таблица 1. Основные характеристики изученных препаратов

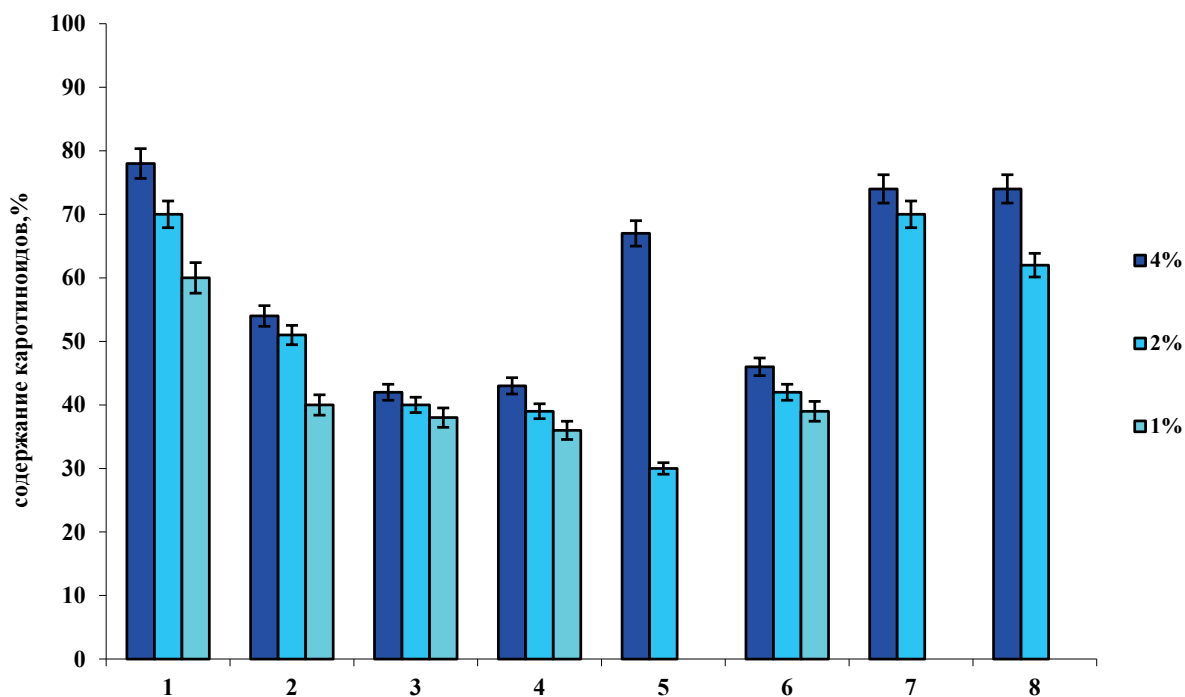
Состав образца	Основные характеристики
Экстракт паприки	Вязкая маслянистая жидкость темно-красного цвета. Содержит основные красные каротиноиды капсантин и капсорубин, желтые $\beta$ -каротин, зеаксантин и $\beta$ -криптоксантин.
Эфирное масло гвоздики	Основные компоненты - эвгенол, метилэвгенол, эвгенил ацетат и $\beta$ -кариофиллен
Эфирное масло орегано	Основные компоненты - карвакрол, $\gamma$ -терпинен и тимол
Эфирное масло кориандра	Основные компоненты - линалоол, лимонен, $\gamma$ -терпинен
Эфирное масло чеснока	Основные компоненты - диаллилди-, три- и тетрасульфиды
Экстракт красного перца	Маслянистая жидкость темно-красного цвета. Содержит каротиноиды и 6.6% капсаицина.
Экстракты розмарина P-126, P-127 и P-128	Дезодорированные экстракты розмарина EWSL4DF REL-126, EWSL4DFDS REL-127, EOSL4DF REL-128. Содержат 4% карнозиновой кислоты, флавоноиды, дитерпены и фенольные кислоты
Ионол	Синтетический антиоксидант ионол (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол)
Аскорбил пальмитат	Синтетический антиоксидант
Смеси эфирных масел, экстрактов и антиоксидантов	
Эфирные масла гвоздики и орегано	1 : 1
Эфирные масла гвоздики и кориандра	1:1
Эфирные масла гвоздики, орегано и кориандра	1:2:1
Эфирные масла гвоздики, кориандра, чеснока и экстракт красного перца	1:1:1:1
Экстракт розмарина P-126 и ионол	1:1
Экстракт розмарина P-126 и аскорбил пальмитат	1:1
Экстракт розмарина P-126 и эфирное масло орегано	1:1

Раствор 100 мг экстракта паприки в 3 мл ацетона с добавлением 1, 2 или 4 % к массе экстракта антиоксидантов наносили на крахмал, после высушивания в вытяжном шкафу образцы имели ярко оранжевый цвет, их оставляли при комнатной температуре и естественном освещении для авто-окисления каротиноидов. Периодически отбирали навески по 30 мг, не окисленные каротиноиды экстрагировали 4 мл ацетона и регистрировали спектры поглощения в интервале длин волн 320-580 нм. Содержание каротиноидов в образцах рассчитывали как отношение оптической плотности хранившихся образцов к плотности свежеприготовленных (%). Метод имел хорошую воспроизводимость, стандартное относительное отклонение для 9 параллельных образцов составляло 5,7-8,3%.

В разработанном нами методе каротиноиды являются и субстратом для окисления, и индикатором этого процесса. Как видно из рисунка 1, в течение 17 суток самыми эффективными антиоксидантами были все эфирные масла. При дальнейшем авто-окислении масла орегано, кориандра и чеснока быстрее других теряли эффективность и через 26 суток только ионол и эфирное масло гвоздики сохраняли 50-60 % каротиноидов. Один из трёх розмариновых экстрактов (P-126) был более эффективен, чем два других препарата и имел активность близкую к активности аскорбил пальмитата. Экстракты розмарина содержали одно и то же количество (4 %) карнозиновой кислоты, основного антиоксиданта, но содержание флавоноидов и фенольных кислот, которые присутствуют в экстрактах [11, 12], вероятно, было разным, поэтому их эффективность значительно различалась. Самыми эффективными ингибиторами автоокисления каротиноидов были эфирное масло гвоздики и ионол. В эфирном масле гвоздики антиоксидантом был эвгенол, механизм реакций эвгенола и ионола с радикалами приведен в работах [13, 14].



**Рисунок 1.** Относительное содержание каротиноидов при автоокислении образцов в присутствии антиоксидантов: ионола (1), аскорбил пальмитата (2), трех дезодорированных экстрактов розмарина Р-126 (3), Р-127 (4) и Р-128 (5), эфирных масел гвоздики (6), орегано (7), чеснока (8) и кориандра (9)



**Рисунок 2.** Влияние концентрации антиоксидантов (4, 2 или 1 % к массе экстракта паприки) на степень ингибирования автоокисления каротиноидов (20 дней). Антиоксиданты: 1 – эфирное масло гвоздики, 2 – эфирное масло орегано, 3 – эфирное масло кориандра, 4 – эфирное масло чеснока, 5 – экстракт розмарина Р-126, 6 – экстракт красного перца, 7 – ионол, 8 – аскорбил пальмитат

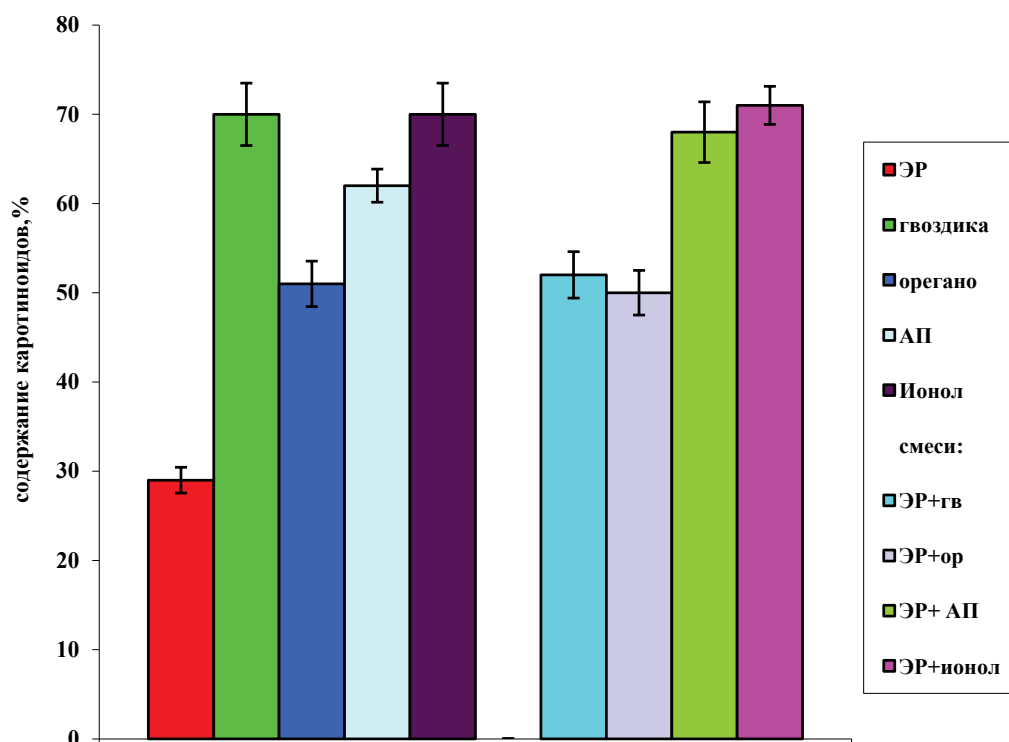
Из рисунка 2 видно, что эффективность ингибирования автоокисления каротиноидов зависела от концентрации сложным образом. Она снижалась не пропорционально снижению концентрации антиоксидантов с 4 до 2 и до 1 %. Так, для эфирных масел гвоздики и орегано двукратное снижение содержания масла с 4 до 2 % приводило к снижению степени окисления каротиноидов всего лишь на 4-6 %, а дальнейшее снижение с 2 до 1 % – на 8-10 %. Для эфирных масел кориандра и чеснока эти различия были еще меньше и составляли 2-4 %. Аналогичное поведение найдено и для аскорбил пальмитата и ионола. Только экстракт розмарина ингибировал автоокисление пропорционально его концентрации: при 4 % содержании степень ингибирования составляла 67 %, при 2 % – 29 %. Это означает, что компоненты эфирных масел, отвечающие за антиоксидантные свойства, присутствуют в достаточно больших количествах, и возможно продукты их окисления также обладают антиоксидантными свойствами. В экстрактах розмарина компоненты с антиоксидантными свойствами при взаимодействии с кислородными радикалами давали не активные продукты.

Пряности и продукты их переработки – эфирные масла и экстракты широко используют в пищевой промышленности в виде смесей для придания аромата продуктам, одновременно они способствуют снижению в них окислительных процессов и улучшению микробиологического статуса. Важным и малоизученным вопросом является взаимное влияние масел и экстрактов на их суммарную антиоксидантную активность. Мы приготовили несколько смесей эфирных масел и экстрактов и сравнили их свойства с индивидуальными составляющими этих смесей (табл. 2). В состав всех смесей входило эфирное масло гвоздики, которое при концентрации 2 % ингибировало окисление каротиноидов на 70 %, а при 1 % – на 60%. Добавление к этому маслу эфирного масла орегано не увеличивало суммарную активность смеси. Таким же образом вели себя смеси эфирных масел гвоздики и кориандра, гвоздики, орегано и кориандра. В смеси эфирных масел гвоздики, кориандра, чеснока и экстракта красного перца суммарная активность была на 8% меньше, чем активность одной гвоздики (табл. 2). Однако все эти различия были незначительны, можно уверенно утверждать, что при снижении концентрации ЭМ гвоздики и добавлении масел орегано, кориандра, чеснока и экстракта красного перца суммарная активность практически не изменялась и смеси сохраняли антиоксидантные свойства системы, близкие к свойствам самого активного компонента смеси – ЭМ гвоздики, при этом становилось возможным получение пищевых продуктов с большим разнообразием органолептических характеристик. Для изученных смесей эфирных масел мы не обнаружили ни аддитивных, ни синергетических эффектов. Аналогичные результаты были получены нами для смесей ЭМ гвоздики и орегано при изучении ингибирования этими маслами автоокисления полиненасыщенных жирных кислот [15, 16].

На рисунке 3 приведены величины степени ингибирования окисления каротиноидов паприки индивидуальными антиоксидантами (2 %, 20 дней) и их смесями с экстрактом розмарина Р-126. Как видно, экстракт розмарина в смеси 1:1 с эфирным маслом гвоздики на 18 % снижал активность масла гвоздики, но практически не изменял активность эфирного масла орегано, аскорбил пальмитата и ионола. Так же, как и для смесей эфирных масел (табл. 2) для смесей экстракта розмарина с другими антиоксидантами ни аддитивные, ни синергетические эффекты не были обнаружены.

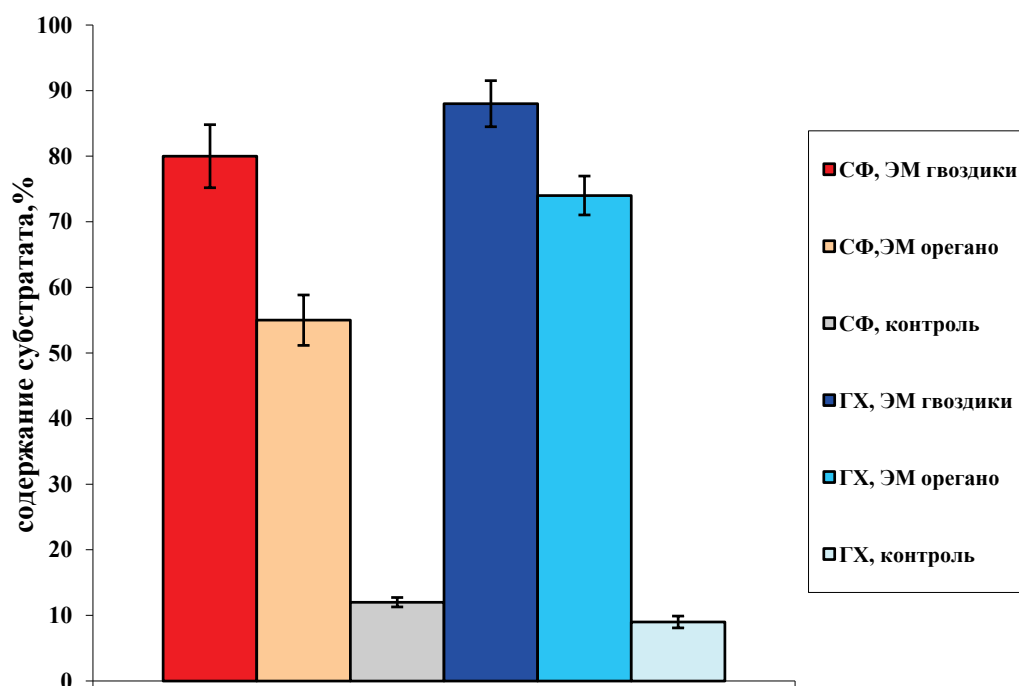
**Таблица 2.** Степень ингибирования окисления каротиноидов паприки индивидуальными эфирными маслами (2 % и 1 %, 20 дней) и их смесями

Эфирное масло	Степень ингибирования при содержании			Смеси эфирных масел и их содержание, % к каротиноидам	Степень ингибирования
	4%	2%	1%		
ЭМ гвоздики	78 ± 5	70 ± 6	60 ± 5	ЭМ гвоздики (2 %) и орегано(2 %)	73 ± 6
ЭМ орегано	54 ± 4	51 ± 2	42 ± 2	ЭМ гвоздики (2 %) и кориандра (2 %)	66 ± 5
ЭМ кориандра	42 ± 3	40 ± 4	38 ± 4	ЭМ гвоздики (1 %), орегано (2 %) и кориандра (1 %)	69 ± 4
ЭМ чеснока	43 ± 5	40 ± 5	36 ± 2	ЭМ гвоздики (1 %), кориандра (1 %), чеснока (1 %) и экстракта красного перца (1 %)	52 ± 4



**Рисунок 3.** Степень ингибирования окисления каротиноидов паприки индивидуальными антиоксидантами (2 %, 20 дней) и их смесями с экстрактом розмарина P-126

Сравнение антиоксидантной активности эфирного масла гвоздики и орегано в методе с каротиноидами паприки с результатами прямого определения ингибирования этими маслами автоокисления полиненасыщенных жирных кислот [15, 16] показало, что результаты, получаемые этими двумя методами, были близки. На рисунке 4 приведены данные по ингибированию окисления самой ненасыщенной кислоты в натуральном рыбьем жире – докозагексаеновой. Как видно, эфирные масла гвоздики и орегано через 3 месяца авто-окисления сохранили 88 % и 74 % этой кислоты, а также 78 % и 54 % каротиноидов, но за 20 дней автоокисления. Однако прямое определение окисления полиненасыщенных жирных кислот проводится дорогим и длительным методом, включающим получение метиловых эфиров кислот, затем периодически, с интервалом в 1 месяц в течение 6 месяцев их анализируют газохроматографически.



**Рисунок 4.** Сравнение антиоксидантной активности эфирных масел гвоздики и орегано спектрофотометрическим методом (СФ) с каротиноидами и ингибирования этими маслами автоокисления докозагексаеновой кислоты в рыбьем жире газохроматографическим методом (ГХ)

Каротиноиды окисляются намного быстрее и требуют простого спектрофотометрического анализа и, как видно из приведенных данных, получаемые результаты по ингибированию автоокисления каротиноидов эфирными маслами хорошо совпадают с антиоксидантным действием этих масел на полиненасыщенные жирные кислоты. Аналогичный результат был получен нами для линоленовой кислоты из льняного масла. Степень ингибирования автоокисления этой кислоты эфирными маслами гвоздики, орегано и кориандра в течение 4 месяцев соответствовала ингибированию каротиноидов паприки этими маслами в течение 20 дней [15, 16].

Таким образом, важнейшим преимуществом разработанного метода оценки антиоксидантных свойств природных и синтетических препаратов в системе на основе каротиноидов паприки является то, что каротиноиды практически идентичны ненасыщенным жирным кислотам по способности взаимодействовать с кислородными радикалами окислителями, поэтому полученные результаты хорошо отражают поведение антиоксидантов в реальных липид содержащих модельных системах и пищевых продуктах. За счет того, что каротиноиды (субстрат для окисления) нанесены на пористый нейтральный сорбент, процесс автоокисления проходит быстрее в данном методе исследования, чем в любом другом прямом методе определения ингибирующих свойств антиоксидантов.

#### Список литературы / References:

1. Shahidi F. Antioxidant in food and food antioxidants. *Nahrung*, 2000, vol. 44, no. 1, pp. 158-163.
2. Prior R.L., Wu X., Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, vol. 53, no. 8, pp. 3101-3113.
3. Han R.-M., Chen C.-H., Tian Y.-X., Zhan, J.-P., Skibsted L. H. Fast regeneration of carotenoids from radical cations by isoflavonoid dianions: Importance of the carotenoid ketogroup for electron Transfer. *J. Phys. and Chem. A*, 2009, vol. 114, pp. 126-132.
4. Skibsted L. H. Vitamin and non-vitamin antioxidants and their interaction in food. *J. Food and Drug Analysis*, 2012, vol. 20, pp. 355-358.
5. Miguel M. G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules*, 2010, vol. 15, pp. 9252-9287.
6. Roginsky V., Lissi E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.*, 2005, vol. 92, pp. 235-254.
7. Mortensen, A., Skibsted, L. H. Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxyl radicals. A real time kinetic study of antioxidant hierarchy. *FEBS Letters*, 1997, vol. 417, pp. 261-266.
8. El-Agamey A., Lowe G. M., Mcgarvey D. J., Mortensen A., Phillip D. M., Truscott T. G. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, vol. 430, pp. 37-48.
9. Deli J., Toth G. Carotenoid composition of the fruits of *Capsicum annum* cv. Bovet 4 during ripening. *Zeitschrift. Lebensm. Unters. Forschung*, 1997, vol. 205, no. 5, pp. 388-391.
10. *Chemistry of Spices*. Eds. V.A. Parthasarathy, B. Chempakam, T.J. Zachariah. Oxfordshire: CAB Int., 2008, pp. 260-286.
11. Charles D.J. *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*. New York: Springer, 2013, 610 p.
12. Frankel E.N., Huang S.W., Aeschbach R., Prior E. Antioxidant activity of rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, vol. 44, no. 1, pp. 131-135.
13. Bondet V., Brand-Williams W., Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 1997, vol. 30, pp. 609-615.
14. Hogg J. S., Lohmann D. H., Andrussell K. E. The kinetics of reaction of 2,2-Diphenyl-1 picrylhyrazyl with phenols. *Canadian J. Chem.*, 1961, vol. 39, pp. 1588-1594.
15. Мишарина Т.А., Алинкина Е.С., Теренина М.Б., Крикунова Н.И., Киселева В.И., Семенова М.Г. Ингибирование автоокисления льняного масла эфирными маслами и экстрактами пряно-ароматических растений. *Прикл. биохимия и микробиология*, 2015, т. 51, № 4, с. 417-423. [Misharina T.A., Alinkina E.S., Terenina M.B., Krikunova N. I., Kiseleva V. I., Semenova M. G. Inhibition of Linseed Oil Autooxidation by Essential Oils and Extracts from Spice Plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2015, vol. 51, no. 4, pp. 455-461. (In Russ.)]
16. Мишарина Т.А., Алинкина Е.С., Воробьева А.К., Теренина М.Б., Крикунова Н.И. Ингибирование окисления метиловых эфиров ненасыщенных жирных кислот эфирными маслами. *Прикл. биохимия и микробиология*, 2016, т. 52, № 3, с. 339-345. [Misharina T.A., Alinkina E.S., Vorobjeva A.K., Terenina M.B., Krikunova N.I. Inhibition of oxidation of unsaturated fatty acids methyl esters by essential oils. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2016, vol. 52, no. 3, pp. 339-345. (In Russ.)]

## EFFECT OF PLANT ANTIOXIDANTS ON AUTOOXIDATION OF PAPRICA CAROTENOIDS

Misharina T.A., Kiseleva V.I.

N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS

*Kosygina str., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: tmish@rambler.ru*

**Abstract.** A spectrophotometric method for the estimation of antioxidant properties of preparations has been developed on the base of inhibition of paprika carotenoids auto-oxidation. Carotenoids as paprika extract were coated on the porous inert polysaccharide as a support. In such case, the process of auto-oxidation developed faster than in any other method for estimation of antioxidants efficiency. It was shown that developed method was effective for comparison of the antioxidant activity of essential oils and extracts of spices, ionol and ascorbyl palmitate. The most important advantage of the method is that carotenoids are almost identical to polyunsaturated fatty acids in ability to interact with oxygen radicals. Therefore, the results obtained are in good accordance with behavior of antioxidants in real lipid-containing model systems and food products.

**Key words:** *spectrophotometry, antioxidants, paprika, carotenoids, essential oils and extracts of spices, ionol and ascorbyl palmitate.*