

Удмуртская Республика

Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение
Июльская средняя общеобразовательная школа

Муниципальное бюджетное учреждение дополнительного образования
"Районный центр детского творчества"

**Всероссийский конкурс юных исследователей окружающей среды
«Открытия 2030»**

Номинация «Прикладная химия и биотехнология»

Исследовательская работа

**«Сравнительный анализ содержания антоцианов в
растительных объектах и их свойств»**

Автор: Аникина Ксения Дмитриевна,
ученица 9 класса МБОУ Июльской СОШ
Руководитель: Загребина Анастасия
Павловна, учитель химии, педагог
дополнительного образования МБОУ ДО
РЦДТ на базе МБОУ Июльской СОШ

2022 год

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
1.Обзор литературы	4
2.Методика исследования	7
3. Результаты исследования	10
Выводы	15
Заключение	16
Список литературы	17

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении долгих лет идет изучение группы водорастворимых пигментов – антоцианов, которые окрашивают фрукты и овощи в яркие тона (фиолетовый, красный, желтый, синий). Известно, что данные соединения благотворно влияют на человеческий организм, поскольку проявляют антиоксидантные, бактерицидные, противовоспалительные свойства. Ягодные источники пигментов являются отличными природными красителями, широко используемыми в медицине, в пищевой промышленности (при изготовлении кондитерских изделиях. Зависимость молекул этих пигментов от pH, делает их прекрасными натуральными индикаторами, это свойство также используется технологами в пищевой промышленности.

Меня заинтересовали эти удивительные вещества. Классическими примерами растений, содержащих антоцианы – краснокочанная капуста и черноплодная рябина. Считаю, что изучение темы актуально, т.к. эти пигменты используются в пищевой промышленности, их свойства изучаются, но селекция и генетика создают новые сорта растений, содержащих антоцианы. Их изучение придает работе новизну, т.к. ранее не проводились научные работы по изучению современных сортов. Зная, количество пигмента в разных сортах растений, можно выбрать тот, который будет содержать максимум молекул антоцианов для нужд народного хозяйства или домашнего приготовления блюд. Использование антоцианов и как антиоксидантов, делает их незаменимыми в производстве БАДов и в функциональном питании.

Была выдвинута гипотеза, что количество антоцианов отличается у разных растений и даже сортов одного вида, а также их свойства.

Целью данной работы является качественный анализ и количественное определение содержания антоцианов в ягодах черноплодной рябины и листьях краснокочанной капусты и изучение их свойств.

Задачи:

1. Провести качественный химический анализ растворов антоцианов, полученных из ягод черноплодной рябины и листьев краснокочанной капусты.
2. Провести количественный анализ содержания антоцианов в ягодах черноплодной рябины и листьях краснокочанной капусты трех сортов с помощью цифрового датчика оптической плотности.
3. Провести количественный анализ содержания антоцианов в ягодах черноплодной рябины и листьях краснокочанной капусты трех сортов с помощью цифрового датчика оптической плотности при нагревании.

Объект исследования: листья краснокочанной капусты трех сортов («Фаберже», «Бенефис F1», «Редма F1»), ягоды черноплодной рябины.

Предмет исследования: содержание антоцианов в листьях краснокочанной капусты и ягодах черноплодной рябины.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Антоцианы (от греч. *anthos* – цветок и *kyanos* – синий, лазоревый) – широко распространенные в природе водорастворимые пигменты растений, придающие цвет различным плодам, овощам, цветам. В статье исследователей Бутенко Л.И., Подгорной Ж.В. утверждается, что антоцианы составляют одну из групп флавоноидов, которые не только обеспечивают многообразие окраски, но и повышают стрессоустойчивость растений, предотвращают повреждение фотолabileльных молекул и фотосинтетического аппарата растительной клетки от избыточного солнечного излучения. [4]

Исследования, проведенные в течение последних нескольких десятилетий, показали, что антоцианы обладают укрепляющими здоровье свойствами. Считается, что в дополнение к обеспечению цвета, который привлекает опыляющих животных, пигменты способны защитить растение, функционируя в качестве антиоксиданта. [7]

Антоцианы относятся к флавоноидной группе полифенолов. Они имеют С3-С6-С3 скелет типичный для флавоноидов. Антоцианы являются гликозилированными полигидрокси- и полиметокси- производными 2-фенилбензопирилиевого катиона, т.е. флавилиевого катиона, рис. 1.2 []. Главная часть антоцианов – его агликон, катион флавилия, который содержит обширную систему сопряженных двойных связей, ответственную за поглощение света в интервале около 500 нм, заставляя пигменты выглядеть красными для человеческого глаза. Агликоны называются антоцианидинами, которые чаще всего являются тетра- (3,5,7,4'), пента- (3,5,7,3',4') или гекса-замещенными (3,5,7,3',4',5'). [9]

Особенностью строения антоцианидинов является наличие свободной валентности у кислорода в пирановом кольце. Благодаря положительному заряду антоцианидины в кислом растворе ведут себя как катионы и образуют соли с кислотами, в щелочном растворе — как анионы и образуют соли с основаниями. В зависимости от pH среды изменяется и окраска раствора антоцианов.

Антоцианидины обычно встречаются в природе в виде гликозидов — антоцианов, причем наиболее типичным и распространенным является цианидин (3, 5, 7, 3', 4'-пентагидроксиантоцианидин). В растениях встречаются также и другие антоцианы – дельфинидин (3, 5, 7, 3',4', 5'-гексагидроксиантоцианидин), мальвидин (3, 5, 7, 4'-тетрагидрокси- 3', 5'-диметоксиантоцианидин) (черника) и др.[7]

Только шесть антоцианидинов из всех известных, являются наиболее значимыми и распространенными в различных природных источниках – пеларгонидин (Pg), цианидин (Cy) (рис.1), пеонидин (Pn), дельфинидин (Dp), мальвидин (Mv) и петунидин (Pt).

В состав растений входит не один антоциан, а несколько, их комбинация и обеспечивает разнообразие цветов в природе. Так черноплодная рябина содержит: цианидин-3-галактозид, цианидин-3-арабинозид, цианидин-3-ксилозид, цианидин-3-глюкозид, цианидин-3,5-диглюкозид. Краснокочанная

капуста содержит около шестнадцати различных антоцианов на основе цианидина (Рис.1). Одним из антоцианов, как и в случае с черноплодной рябиной является цианидин-3-глюкозид (рис.2).[8]

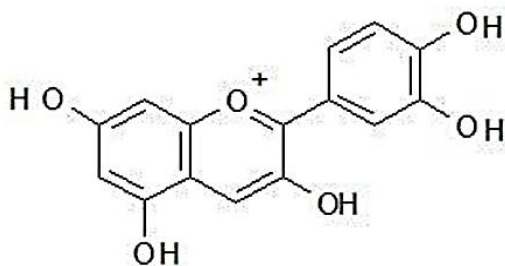


Рис.1 Формула цианидин[5]

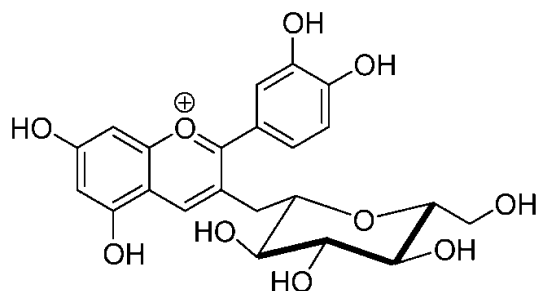


Рис.2 Формула цианидин-3-глюкозида [9]

Свободные основания антоцианов и антоцианидов окрашены в фиолетовый цвет. Таким образом, красная, синяя и фиолетовая окраска некоторых цветов и ягод может вызываться наличием одного и того же типа антоцианидина в зависимости от реакции клеточного сока. В синих частях растений он находится в виде калиевой или иной щелочной соли, в красных - в виде оксониевых солей органической кислоты (например, щавелевой кислоты), а в фиолетовой - в виде основания красящего вещества или внутренней соли. [9]

Свет, рН, температура и окислительно-восстановительные условия – все эти параметры влияют на стабильность антоцианов. При этом антоцианидины всегда менее стабильны, чем гликозилированные по положению 3 антоцианы, которые, в свою очередь, менее стабильны по сравнению с некоторыми ацилированными антоцианами. Цвет антоцианидинов является рН зависимым. Антоцианидиновая система претерпевает различные молекулярные преобразования, связанные с изменением рН. В водных растворах существует пять молекулярных видов химического равновесия антоцианидинов: красная пирилиевая соль, бесцветное псевдооснование, синяя хиноидная форма, пурпурный фенолят хиноидной формы, жёлтый халкон (Рис.3).[7]

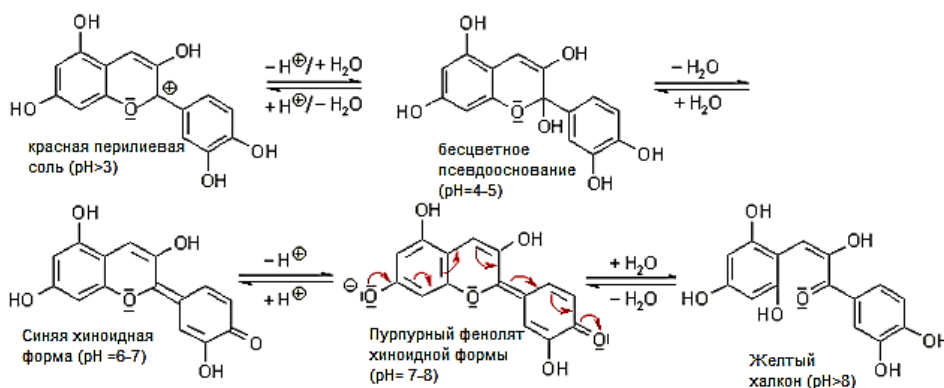


Рис. 3 Пять молекулярных видов химического равновесия антоцианидинов[6]

Хорошо известно, что некоторые металлы, такие как Fe^{3+} и Al^{3+} образуют стабильные глубоконасыщенные цветные координационные комплексы с антоцианами. Комплексы тоже являются рН зависимыми. Они принимают участи как в образовании цветных, так и бесцветной формы. Таким образом, различные факторы, включая концентрацию и природу антоцианидинового равновесия, формы, степени гликозилирования антоцианов, ацилирование, природа и концентрация пигментов, металлические комплексы, внутри- и межмолекулярные механизмы ассоциации – влияют на изменение цвета и его насыщенность. [9]

Как показал анализ литературы, информации об антоцианах, их производных и свойствах очень много. В литературе упоминается краснокочанная капуста, но не приводятся данные по всем антоцианам, которые входят в ее состав, лишь упоминаются вскользь некоторые антоцианидины в ее составе. Совсем отсутствует информация по изучению антоцианового состава и его количеству в зависимости от сорта растений.

2. МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Методы исследования: качественный химический анализ и количественный химический анализ, с помощью цифрового датчика оптической плотности Relion (РФ).

Сроки и место исследования: сентябрь 2022г, с. Июльское на базе МБОУ Июльской СОШ.

Для исследования мы взяли листья краснокочанной капусты трех сортов («Фаберже», «Бенефис F1», «Редма F1»), а также ягоды черноплодной рябины (Рис.4). Все эти растения содержат в своем составе антоцианиды на основе цианидина.



Рис. 4. Объекты исследования

Качественный химический анализ

Проводим качественные химические реакции на содержание антоцианов. (Рис.5)

Для проведения реакций с участием антоцианидинов используем раствор сока краснокочанной капусты и ягод черноплодной рябины.



Рис.5 Проведение качественных реакций

Ход работы:

- a) Лист краснокочанной капусты измельчаем и насыпаем в стаканчик;
- b) Черноплодную рябину перетираем в ступке.
- c) Измельчённую капусту заливаем тёплой водой и перемешиваем, фильтруем полученный раствор в колбу, тоже самое проделываем с растертой черноплодной рябиной;
- d) Полученные растворы разводим дистиллированной водой в 10 раз. Отмеряем пипеткой 2

– 3 мл отфильтрованные растворы, помещая в отдельные пробирки;

Для изучения химических свойств антоцианидинов проводим следующие реакции:

1. Взаимодействие с кислотами. Для изучения взаимодействия с кислотами были выбраны три кислоты: уксусная, лимонная, яблочная. Данные кислоты выбраны не случайно, т.к. именно их используют в пищевой промышленности и домашних заготовках.

К каждой пробе антоцианов (1 мл.) приливаем по 1 мл. соответствующей кислоты с концентрацией 6%.

2. Реакция с алюминием хлоридом. 1%-ого спиртового раствора алюминия хлорида 1 мл. приливаем к раствору пигментов.

3. Реакция с треххлорным железом. К пробам растворов антоцианидинов (1 мл) краснокочанной капусты и ягод черноплодной рябины добавляем по 0,5 мл. 1% спиртовой раствор $FeCl_3$;

4. Реакция с 1%-ным раствором основного ацетата свинца. К пробам растворов антоцианидинов (1 мл) краснокочанной капусты и ягод черноплодной рябины добавляем по 1 мл. 1% раствором основного ацетата свинца.

5. Реакция с гидрокарбонатом натрия; К пробам растворов антоцианидинов (1 мл) краснокочанной капусты и ягод черноплодной рябины добавляем по 1 мл. раствора гидрокарбоната натрия с массовой долей 10%.

6. Реакция с 10% спиртовым раствором гидроксида натрия. К пробам растворов антоцианидинов (1 мл) краснокочанной капусты и ягод черноплодной рябины добавляем по 0,5 мл. раствора гидроксида натрия

Количественный анализ

Количественное содержание пигмента антоцианинов определяем с помощью цифрового датчика оптической плотности (Relion Lite) (Рис.6). Датчик измеряет количество пропускаемого света через исследуемый раствор на определенной длине волны 525нм (зеленый свет) (Рис. 7). Что оптимально для пурпурного цвета цианидина-3-гликозида. Диапазон измерения оптической плотности: от 0-2 D.

Растворы заливали в пластиковые ударопрочные кюветы с длиной оптического пути 1,0 см в диапазоне 525 нм. В качестве раствора сравнения использовался 0.1 М HCl. На электронных весах взвешивали навеску растительного сырья 1,0 г., заливали 100 мл 0,1 М HCl, перемешивали и помещали в водяную баню (40°C) на 10 мин. Отфильтровывали и полученный фильтрат доводили до метки (100 мл) в мерной колбе 0,1 М HCl. Экстракцию проводили трижды.

Суммарное содержание антоцианов в растительном сырье рассчитывали в г/100 г исходного сырья по формуле (1).

Массовую концентрацию суммы антоцианинов рассчитываем в пересчете на цианидин-3-глюкозид по формуле:

$$c(e/100_2) = \frac{D * M * P * V * 100}{\epsilon * l * 1000 * m}, \quad (1.)$$

где D – оптическая плотность раствора; M – молярная масса хлорида цианидин-3-глюкозида (484 г/моль); P – разбавление; V – объем экстрагента, мл; ϵ - молярный коэффициент поглощения (26900); l – толщина кюветы, см; m – масса навески сырья, г/

Масса навески 0,3 г.,

За окончательный результат определения принимаем среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений.



Рис.6 Измерение оптической плотности растворов



Рис. 7 Нагревание растворов антоцианов растений

Измерение изменения оптической плотности при нагревании;

Нагревание проводили в несколько этапов. Для определения температуры раствора используем цифровой платиновый датчик температуры Relion. Нагревание раствора проводим до 50°C, до 70°C и до 100°C. (Рис.7). После доведения до нужной температуры проводим замеры на датчике оптической плотности.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные растворы представлены на фото (Рис 8):

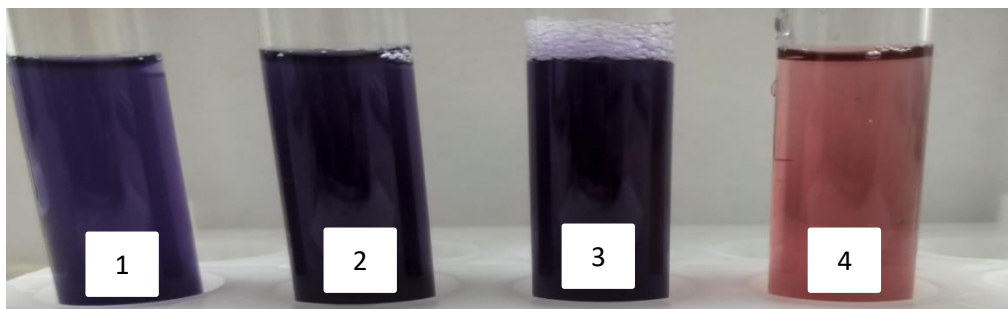


Рис. 8. Исходные опытные растворы

- 1- сок краснокочанной капусты сорта «Фаберже»;
- 2- сок краснокочанной капусты сорта «Редма F1»;
- 3- сок краснокочанной капусты сорта «Бенефис F1»;
- 4- сок черноплодной рябины.

Качественные химические реакции

1. Во всех пробах с кислотами наблюдаем покраснение раствора от темного красного до оранжевого в пробе с черноплодной рябиной (Рис.8-10).

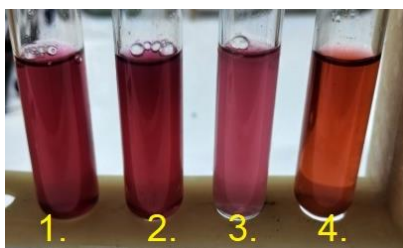


Рис. 9 Результат взаимодействия с лимонной кислотой

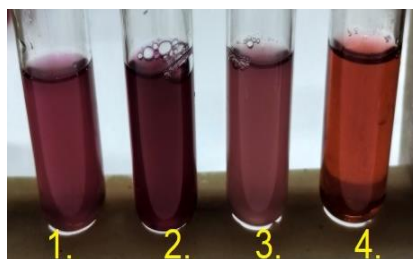


Рис. 10 Результат взаимодействия с яблочной кислотой

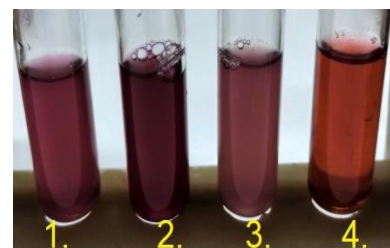
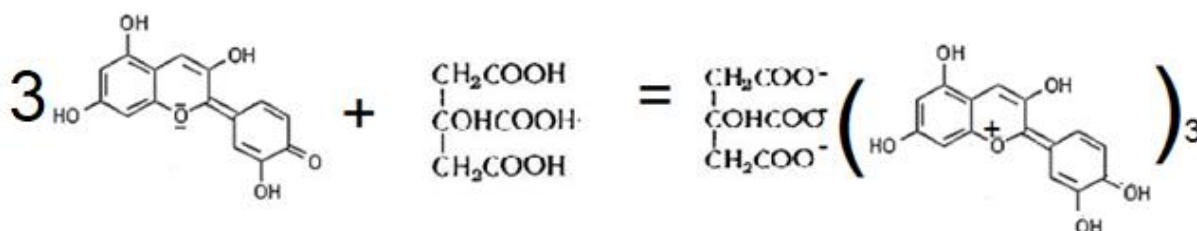
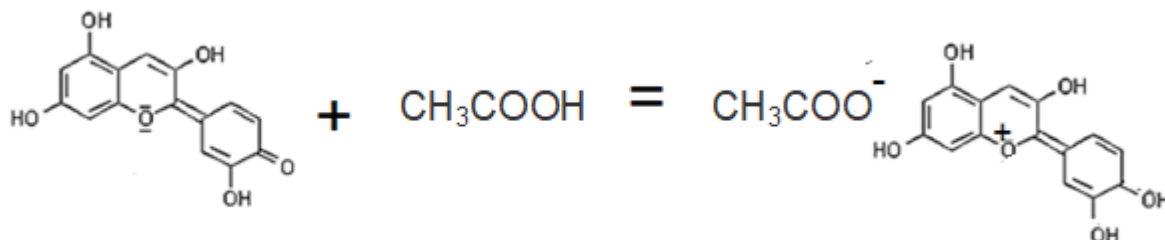
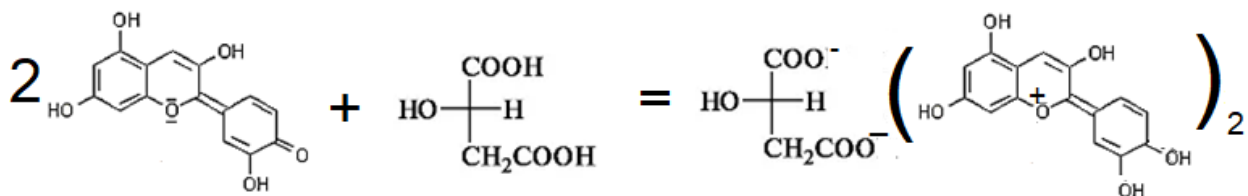


Рис. 11 Результат взаимодействия с уксусной кислотой

Рис. 9-11 Качественные реакции с кислотами

При кислых рН = 1-3, антоцианидин существует преимущественно в виде красной пирилиевой соли. Образование красной пирилиевой соли можно представить в следующих химических реакциях:





2. В реакции с хлоридом алюминия образуется ярко-синий осадок.

Структуры, содержащие ионы металлов, по-видимому, очень стабильны в широком диапазоне pH, и их цвет смещен в сторону синего цвета спектра.

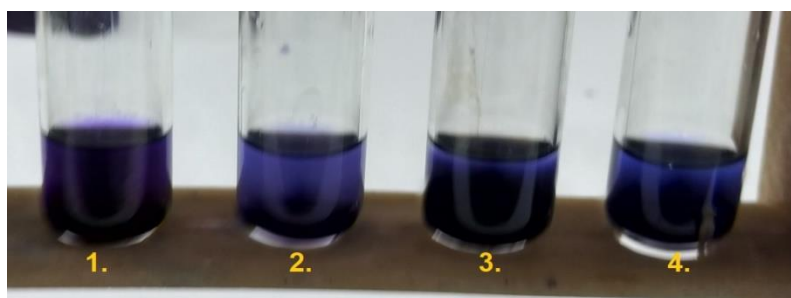


Рис. 12. Результат взаимодействия с хлоридом алюминия

Одна из возможных реакций при этом, представлена ниже:

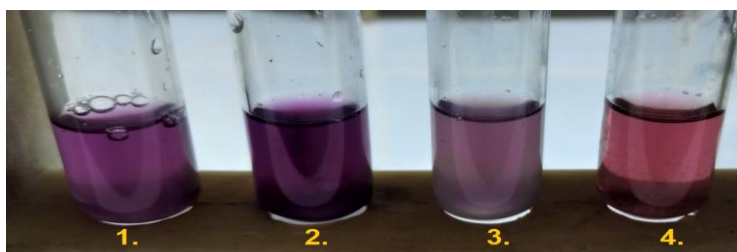
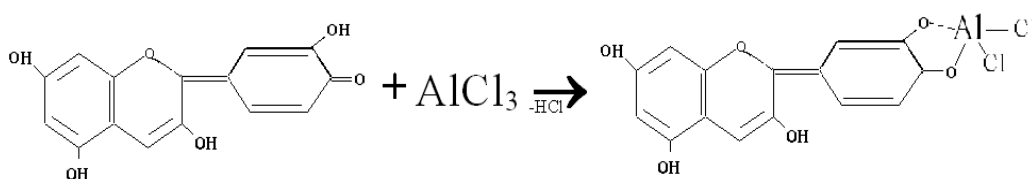
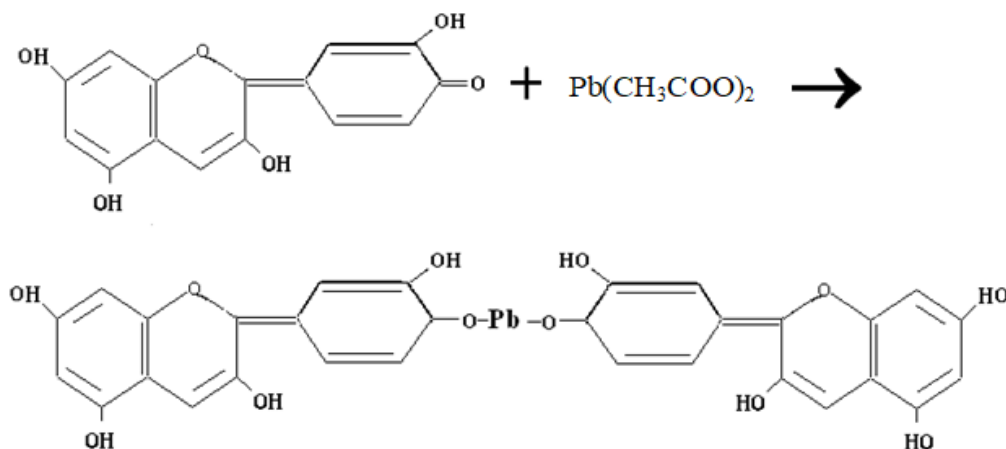


Рис. 13. Результат взаимодействия с ацетатом свинца

Антоцианы дают синий аморфный осадок частично растворимый в кислотах, при этом раствор приобретает розовую или красную окраску (плоды черноплодной рябины). Структуры, содержащие ионы металлов, по-

видимому, стабильны в широком диапазоне pH, и их цвет смещен в сторону синего цвета спектра. При этом, возможно, происходит следующая химическая реакция:



После добавления раствора соды NaHCO_3 происходит снижение концентрации протонов и повышение концентрации гидроксил-анионов OH^- , из-за чего цвет пигментов меняется на изумрудный (Рис 13). В щелочной среде антоцианы неустойчивы, поэтому постепенно происходит частичное разрушение «синей» формы молекулы красителя. Известно, что интенсивность окраски антоцианов в щелочных растворах увеличивается вблизи pH 10, раствор соды показал значение pH=9;

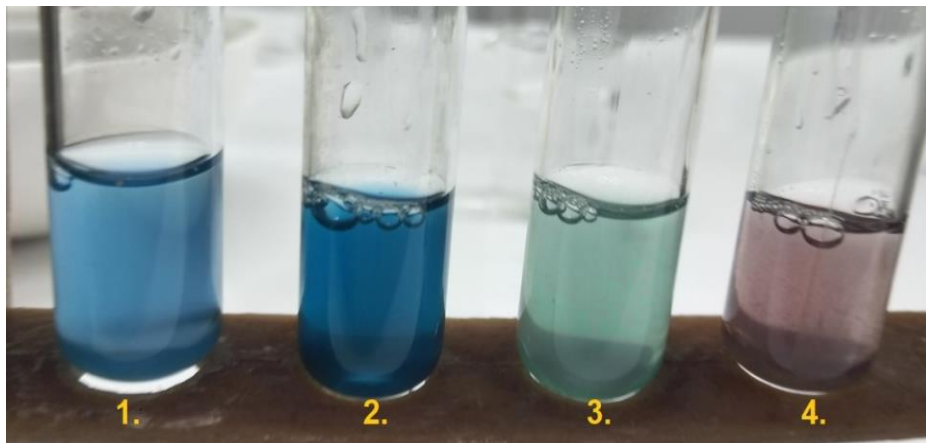
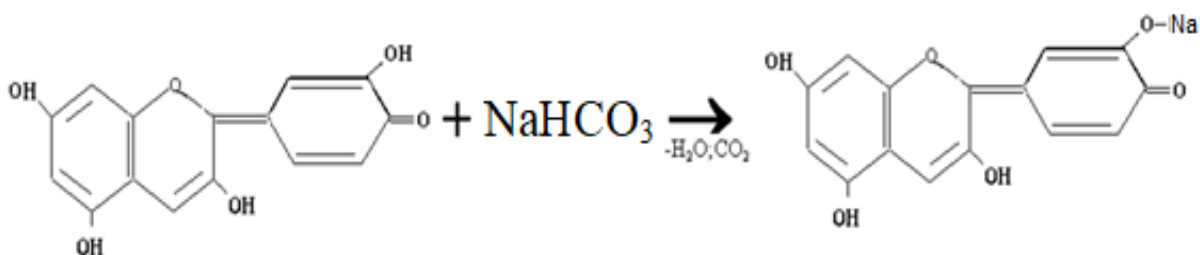


Рис. 14. Результат взаимодействия с гидрокарбонатом калия

Реакция, протекающая при этом, представлена ниже:



При использовании слабых растворов щелочей (1-2%) реакция идет с образованием халконов. Цвет растворов меняется на желто-бурый (рис. 14);

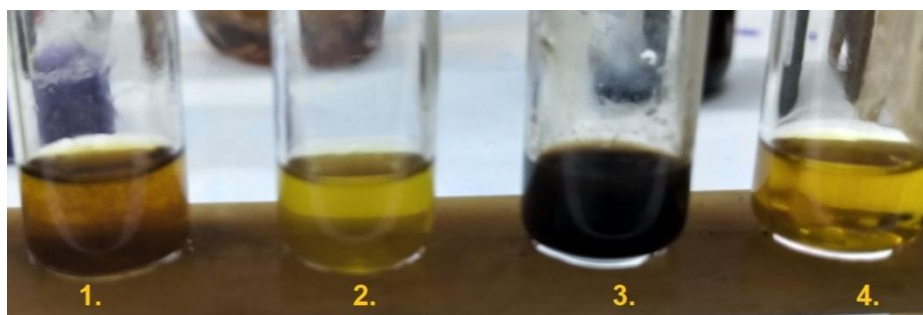
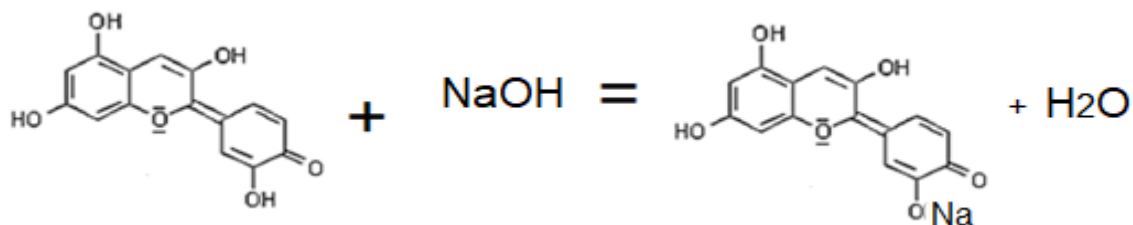


Рис. 15. Результат взаимодействия с гидроксидом натрия

Как видно из реакции, представленной далее, антоцианидин ведет себя как анион в реакции со щелочью.



Качественные реакции на антоцианидины являются общими для класса пигментов и демонстрируют их чувствительность к pH растворов. Данное качество пигментов позволяют использовать их как индикаторы.

Количественный анализ содержания антоцианидинов

Изначальное измерение концентрации антоцианов показало, что раствор сорта «Редма» содержит больше антоцианов, что видно и невооруженным глазом по интенсивности раствора (рис.8.). Из диаграммы видно, что больше всего антоцианидов содержит сорт «Редма» (Рис.16).

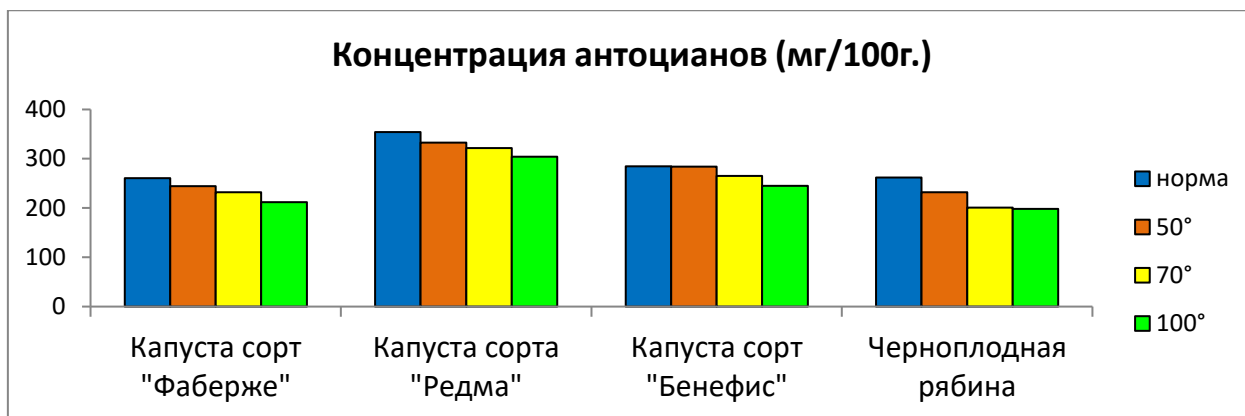


Рис. 16. Концентрация антоцианов в опытных растворах

Содержание пигмента в ягодах черноплодной рябины меньше, чем в листьях краснокочанной капусты. Цвет раствора черноплодной рябины отличается по цвету от пробы с капустным соком, что связывают с другим составом антоцианового ряда. Однако и тот и другой содержат в своем составе преобладающий цианидин-3-гликозид, который определяется при диапазоне зеленого света (525нм).

Количественный анализ содержания антоцианидинов при нагревании

Стоит отметить, что при повышении температуры, происходит незначительное снижение концентрации антоцианидов. Скорость распада антоцианов возрастает при обработке с повышением температуры.

Сок краснокочанной капусты сорта «Бенифис» показал устойчивость к небольшому нагреванию до 50° С. Визуально мы не заметили изменения цвета при нагревании до 100°С, что говорит об устойчивости пигмента к нагреванию.

ВЫВОДЫ

На основе полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Опытные растворы, полученные из сока листьев краснокочанной капусты и ягод черноплодной рябины, содержат антоцианы. Об этом говорят проведенные качественные реакции. Окраска растворов зависит от водородного показателя рН.
2. Количественный анализ показал, что больше всего антоцианидинов содержится в краснокочанной капусте сорта «Редма F1», меньше среди сортов капусты в сорте «Фаберже».
3. Повышение температуры приводит к снижению концентрации антоцианов. Скорость распада антоцианов возрастает при обработке с повышением температуры. Сорт краснокочанной капусты «Бенифис» показал устойчивость к небольшому нагреванию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение антоцианов актуально и встречается множество научных работ посвященных изучению молекул этого пигмента. В настоящее время доказан терапевтический эффект антоцианов: они обладают антиканцерогенным действием, уменьшают риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, улучшают остроту зрения, а также проявляют антиоксидантную активность. Их используют в пищевой промышленности, медицине и фармакологии. Применение и роль антоцианов трудно переоценить, поэтому важно знать содержание их в растениях, источником которых они являются.

Наша гипотеза подтвердилась, содержание антоцианов разное, даже у одного вида, но разных сортов, выращенных в одинаковых условиях с применением одинаковым агротехнологических приемов, оказанных на них. Таким образом, содержание антоцианов зависит не только от окружающей среды и вида растения, но и от сорта. Мы выяснили это, изучив три сорта краснокочанной капусты. Зависимость антоцианов от pH, делает их отличным источником для создания индикаторов, чтобы определять кислотность. Антоцианы имеют характерный цвет в растворах солей, кислот и щелочей. По этим реакциям можно судить о присутствии антоцианов в растворах. Эти опыты были для меня интересны, но требовали время для приготовления растворов с заданной концентрацией.

Количественное определение с помощью цифровых датчиков, облегчает изучение, но все равно остается трудоемким процессом, требующим времени и терпения. Требуется провести много математических расчётов, для достоверности полученных данных. Это было самым трудным для меня.

Работу хочу продолжить и изучить экстракцию антоцианов в разных растворителях.

Мне хотелось бы поблагодарить научного руководителя: Загребину Анастасию Павловну, учителя химии, за помощь и поддержку в проведении исследовательской работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баженова О.А. Химия растений. Антоцианы.г. Тамбов, 2018г., 75с.
2. Биохимия. 10-11 классы: учеб. Пособие для общеобразоват. Организаций/ [Н.В. Антипова, Л.К. Даянова, А.А. Пахомов, Д.С. Третьякова]- М.: Просвещение, 2019-129с.
3. Болотов В. М., Полухин Н. А., Черепнин В. С., Петухова С. Г. Ацилированный антоциановый краситель черноплодной рябины // Известия вузов. Пищевая технология. 1997. №4-5. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/atsilirovannyy-antotsianovyy-krasitel-chnernoplodnoy-ryabiny> (дата обращения: 01.10.2022).
4. Бутенко Л.И., Подгорная Ж.В. Исследования антоцианового комплекса ягод, прошедших криообработку// Успехи современного естествознания № 11, 2016, С.14-16.
5. Жигульский Роман Олегович Исследование структуры и спектров антоцианов // Academy. 2019. №6 (45). С. 11-15
6. Колдаев Владимир Михайлович, Кропотов А.В. Антоцианы в практической медицине // ТМЖ. 2021. №3 (85). С.24
7. Саласина Я. Ю., Калинин Д. А. Дейнека В. И., Дейнека Л. А. Некоторые закономерности экстракции антоцианов из растительных источников // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. №4 (35). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/nekotorye-zakonomernosti-ekstraktsii-antotsianov-iz-rastitelnyh-istochnikov> (дата обращения: 01.10.2022).
8. Соломинова Л. В., Онина С. А., Козлова Г. Г. Извлечение и исследование антоцианов растительного сырья // Бюллетень науки и практики. 2019. №4 С. 14-15
9. Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды»: методическое пособие по фармакогнозии/ Федосеева Г. М., Горячкина Е. Г., Переломова М. В.- Иркутск. ИГМА, 2009г. 67с.
10. Андреева В. Ю., Ангаскиева А. С., Исайкина Н. В. Определение содержания антоцианов в плодах аронии черноплодной // Здоровье и образование в XXI веке. 2012. №2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/opredelenie-soderzhaniya-antotsianov-v-plodah-aronii-chnernoplodnoy> (дата обращения: 18.10.2022).
11. Дейнека Л. А., Блинова И. П., Чулков А. Н., Саенко И. И., Дейнека В. И., Сорокопудов В. Н. Метод экстракции и очистки антоцианов из плодов аронии черноплодной // Актуальные проблемы медицины. 2012. №10 (129). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/metod-ekstraktsii-i-ochistki-antotsianov-iz-plodov-aronii-chnernoplodnoy> (дата обращения: 18.10.2022).