

ФОРМИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКРАШИВАНИЯ D-ЛАКТОЗЫ В ПРИСУТСТВИИ *p*-ТОЛУИДИНА В ЩЕЛОЧНЫХ ВОДНО-ЭТАНОЛЬНЫХ СРЕДАХ

И.С. Черепанов

*Представлены результаты исследований по изучению поведения D-лактозы в реакции с *p*-толуидином щелочных водно-этанольных средах методами УФ- и ИК-спектроскопии, а также тонкослойной хроматографии. Показано, что на начальных стадиях происходит распад лактозы и продуктов ее изомеризации и дегидратации с образованием активных редуктонов, способных к дальнейшей альдольно-кетоновой конденсации с образованием циклических дезоксигексодиулоз, трансформирующихся в окрашенные продукты, в структуре которых доказано наличие сопряженных систем кратных связей и карбоксилатных групп. На основании данных элементного анализа установлено, что азот ароматического амина практически не включается в состав конечных продуктов. Отмечено ускорение деструкции D-лактозы в присутствии *p*-толуидина в сравнении с реакцией ее карамелизации, при этом структура конечных продуктов в обоих случаях является близкой, что говорит о непосредственном участии амина в начальных стадиях «браун»-процессов, но механизм их действия остается не до конца ясным. Предполагается, что более интенсивное образование всех типов продуктов в присутствии амина может быть объяснено реакциями карбонильных интермедиатов, приводящими к более реакционноспособным редуктонам, кроме того, присутствие в системе амина может облегчать ретро-альдольный или другие виды распада углеводов и их производных.*

*Ключевые слова: D-лактоза, неферментативное окрашивание, *p*-толуидин, водно-этанольные среды, «браун»-продукты, альдольно-кетоновая конденсация, ретро-альдольный распад, редуктоны, спектрофотометрия, ИК-спектроскопия, тонкослойная хроматография.*

ВВЕДЕНИЕ

Реакции неферментативного окрашивания углеводов являются одними из наиболее важных биологически важных процессов, изучение которых ведется уже более ста лет, достигнут ряд существенных успехов в понимании их закономерностей в части исследования механизмов, кинетики образования и структуры формирующихся продуктов. Сложность изучения процессов неферментативного окрашивания в значительной степени связана с множественностью последовательно и параллельно протекающих реакций, результатом которых являются различные по составу, строению и молекулярной массе вещества, объединенные общим термином «браун»-продукты. В совокупности с влиянием внешних условий варьирование внутренних параметров позволяют развивать новые направления исследований, в частности применение в качестве реагентов перспективные в фармакологии ариламинопроизводные, а также использования смешанных растворителей,

поскольку большинство исследований по данной проблеме отражают результаты для водных растворов и алифатических аминокислот в качестве реагентов.

Анализ литературных источников показывает [1-7], что внимание исследователей в большей степени сосредоточено на механизмах и составе продуктов фрагментации углеводов и их производных, в частности для дисахаридов описаны механизмы образования различных дезоксоенонов, в том числе посредством элиминирования второго углевода [5,7], в то время как структура конденсированных «браун»-продуктов описана в значительно меньшей степени, что показывает актуальность настоящего исследования.

Целью настоящей работы является изучение закономерностей формирования структуры окрашенных продуктов «браун»-процессов в модельной водно-этанольной системе D-лактоза – *p*-толуидин в щелочной среде.

ФОРМИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ
НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКРАШИВАНИЯ *D*-ЛАКТОЗЫ В ПРИСУТСТВИИ *p*-ТОЛУИДИНА
В ЩЕЛОЧНЫХ ВОДНО-ЭТАНОЛЬНЫХ СРЕДАХ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовались реактивы марок «ч.д.а» и «х.ч.», процессы проводились термостатированием (80–90°C) водно-этанольных растворов (62% EtOH, pH = 8,0–8,5), содержащих заданные количества реагентов (0.002 моль) в колбах с обратным холодильником в течение 1,5 часа. Тонкослойная хроматография проводилась на пластинках «Silufol» с использованием элюентной системы бутанол–этанол–вода (5:2:1) с проявлением в йодной камере, отбор проб проводился через 10, 20 и 50 минут после начала процесса. Электронные спектры отбираемых и предварительно разбавленных проб регистрировались в кварцевых кюветках на спектрофотометре СФ-2000 через те же временные интервалы, что и при получении хроматограмм. Выделение продуктов проводилось вакуумным удалением растворителя и промывкой безводным эфиром; колебательные спектры высушенных твердых веществ снимались в таблетках бромида калия на ИК-Фурье спектрометре ФСМ-2201, дополнительно выполнялся элементный анализ твердых продуктов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Электронные спектры, регистрируемые при нагревании щелочного водно-этанольного раствора лактозы в присутствии толуидина (рисунок 1), показывают быстрое нарастание поглощения в УФ-области, что говорит о высокой скорости начальных стадий и образовании высоко реакционноспособных интермедиатов.

При этом уже через 20 минут после начала реакции формируется максимум поглощения при 360 нм, относящийся к слабоокрашенным продуктам. Кроме того, наблюдается симбатное увеличение поглощения в областях 275-290 нм (можно отнести к карбонильным группам), 350-360 нм (формирование хромофора), отмечается также наличие слабой инфлексии в области > 420 нм, что может свидетельствовать о начале трансформации неокрашенных промежуточных продуктов в окрашенные вещества.

Образование ряда продуктов различной молекулярной массы по мере протекания процессов подтверждено методом тонкослойной хроматографии (рисунок 2): отмечается увеличение числа продуктов на более поздних (начиная с $t = 20$ мин) хроматограммах.

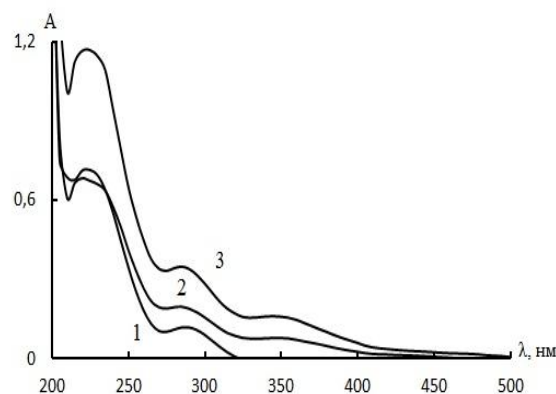


Рисунок 1 - Спектры поглощения реакционной системы *D*-лактоза (0.002 моль) – *p*-толуидин (0.002 моль) в щелочной водно-этанольной среде при различной продолжительности нагревания ($l = 1$ см, 62% EtOH): 1 – 10 мин; 2 – 20 мин; 3 – 50 мин

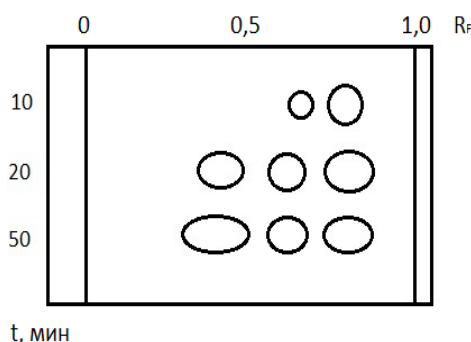


Рисунок 2 - Хроматограммы «браун»-процессов в системе *D*-лактоза–*p*-толуидин при различной продолжительности нагревания

ИК-спектр продукта (47,0%С; 8,5%Н; 45,5%О), выделенного по окончании реакции из системы углеводов – амин (рисунок 3, спектр 2), имеет достаточно простую структуру, при этом интенсивная составная полоса в области 1590-1610 cm^{-1} может быть отнесена к колебаниям ионизированного карбоксила ($\nu^{\text{as}}_{\text{COO}^-}$), а также кратным связям ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$); обращает на себя внимание отсутствие характеристических полос карбонильной группы и гетероциклов.

Кроме того, можно отметить отсутствие полос колебаний ароматического кольца толуидина, а также характеристических частот карбонильных групп, при этом ИК-спектр продукта, выделенного из системы без амина, имеет практически аналогичную структуру (рисунок 3 спектр 1).

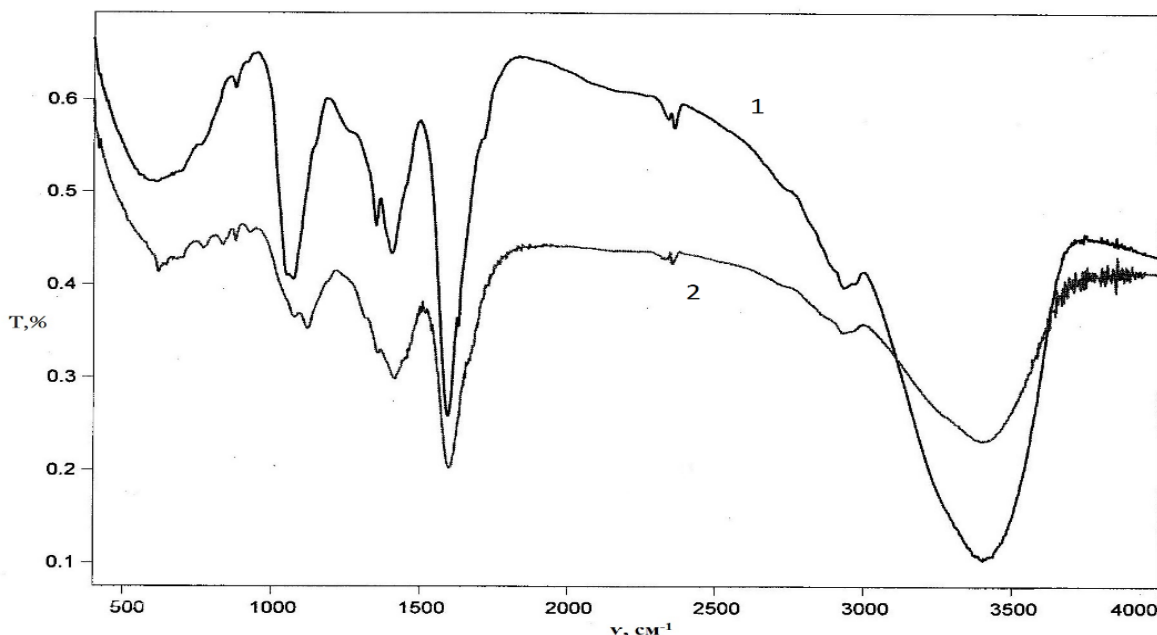
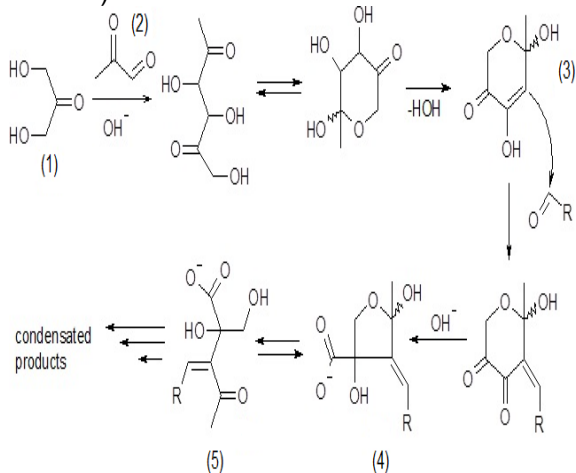


Рисунок 3 - ИК-спектры «браун»-продуктов, выделенных из водно-этанольных растворов *D*-лактозы (1) и системы *D*-лактоза–*l*-толуидин (2) (КВг, 1:200)

Формирование указанных структурных фрагментов по одному из возможных направлений может быть представлено следующим образом: на начальном этапе происходит альдольная конденсация низкомолекулярных продуктов распада – дигидроксиацетона (1) и метилглиоксаля (2), сопровождающаяся циклизацией и кротонизацией с образованием промежуточного енола (3) [9], способного к дальнейшей альдольно-кротоновой конденсацией с карбонильными компонентами (продуктами углеводной деструкции, редуктонами):



Образовавшаяся α-дикетонная структура в щелочном растворе, вероятно, претерпевает бензильную перегруппировку, характерную

для циклических форм производных углеводов [10], в продукт (4), что является возможным объяснением трансформации карбонильных групп в карбоксильные и формирования сопряженной системы кратных связей, чем обуславливается поглощение в УФ-области. Подтверждением этому может служить известный экспериментальный факт образования из дисахаридов изосахариновых кислот в щелочной среде [10]. Следует отметить, что аналогичные структурные элементы карамелей описаны авторами [9,11], но механизм их формирования в данных работах не приводится.

Циклическая форма (4) может находиться в равновесии в реакционноспособной открытой форме (5), для которой возможны дальнейшие процессы конденсации, приводящие к образованию сопряженных хромофорных систем. Следует отметить, что присутствие в системе этанола дополнительно стабилизирует ациклическую форму [12], увеличивая ее содержание, вероятно за счет сольватационных эффектов.

Механизм образования редуктонов (1) и (2) активно дискутируется [1-4], но независимо от принятого подхода их присутствие в реакционных системах как основных продуктов распада подтверждено экспериментально [1,2] и можно с достаточной уверенностью предположить их образование в выбранных условиях. Следует также отметить, что пред-

ФОРМИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКРАШИВАНИЯ *D*-ЛАКТОЗЫ В ПРИСУТСТВИИ *l*-ТОЛУИДИНА В ЩЕЛОЧНЫХ ВОДНО-ЭТАНОЛЬНЫХ СРЕДАХ

ложенная схема взаимодействий не претендует на универсальность и демонстрирует лишь один из подходов к решению проблемы, поскольку уже в рассматриваемом случае возможен ряд параллельных процессов, в частности самоконденсация (5) и другие реакции, приводящие к образованию C_1 – C_3 -продуктов.

Диализ растворов «браун»-продуктов относительно водного этанола позволяет описать ранние и поздние диализаты (рисунок 4).

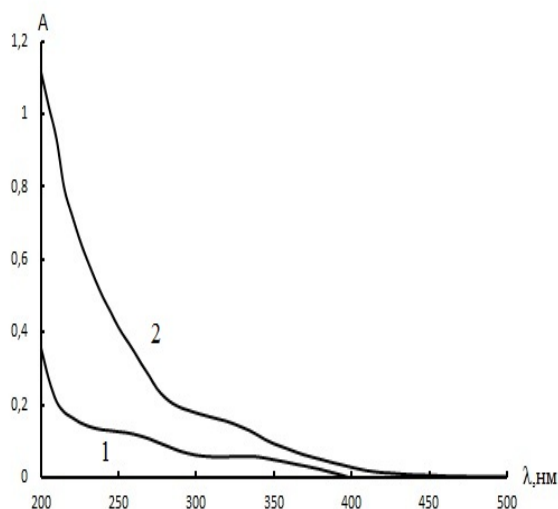


Рисунок 4 - Спектры поглощения диализатов водно-этанольных растворов «браун»-продуктов при различной продолжительности диализа (62% EtOH): 1 – 12 часов; 2 - 24 часа

Ранние диализаты характеризуются двумя слабыми полосами поглощения при 270 и 350 нм, поздние характеризуются инфлексией при 320 нм и областью непрерывного поглощения при $\lambda < 280$ нм. В первом случае можно говорить о низкомолекулярных продуктах, содержащих сопряженные хромофорные группы, во втором случае поглощение, вероятно, обусловлено олигомерными структурами с изолированными хромофорами. Можно также предположить наличие в структуре лабильных связей [8], способных к расщеплению в процессе диализа.

Как было отмечено выше (рис. 3), ИК-спектры конечного «браун»-продукта в системе в отсутствие амина показывают те же структурные особенности, что и в случае аминок-карбонильных взаимодействий. Термостатирование щелочного водно-этанольного раствора лактозы в отсутствие амина показывает гиперхромный сдвиг полосы поглощения при 280 нм на ранних этапах

(рис.5), который сменяется со временем гипохромным смещением антибатно с формированием пологого максимума поглощения в видимой области $\lambda_{\max} = 420$ – 480 нм, что говорит об отличии характера протекания процессов в системах с толуидином и при его отсутствии; аналогичный эффект отмечается авторами [1,7].

Сопоставляя данные рис. 1 и рис. 5 можно прийти к выводу о том, что в обоих случаях происходит образование «браун»-продуктов, но, вероятно, по несколько различным механизмам.

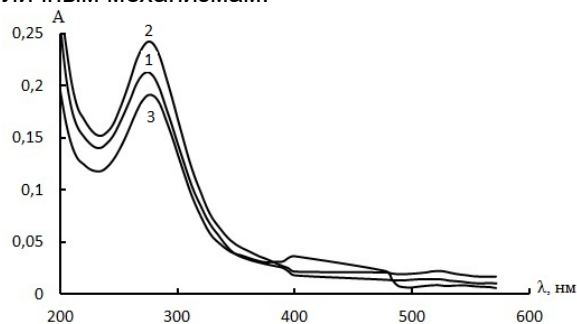


Рисунок 5 - Спектры поглощения щелочного водно-этанольного раствора *D*-лактозы (0.002 моль) при различной продолжительности нагревания ($l = 1$ см, 62% EtOH): 1- 10 мин; 2- 20 мин; 3 – 50 мин

Предполагается, что более интенсивное образование всех типов продуктов в присутствии амина может быть объяснено взаимодействием карбонильных интермедиатов с ариламином с образованием более реакционноспособных конъюгатов [9], кроме того, присутствие в системе амина может облегчать ретро-альдольный [1] или другие виды распада углеводов и их производных [3]. Поскольку толуидин, являясь низкоосновным ароматическим амином, почти не образует в щелочных средах устойчивых N -гликозиламинов с углеводами, в то время как более реакционноспособные C_3 -редуктоны способны к конденсации, то аминоконъюгаты, вероятно, имеют тенденцию к различного рода быстрым перегруппировкам [13], в том числе с элиминированием амина.

ВЫВОДЫ

1. Представлены результаты исследований по изучению поведения *D*-лактозы в реакции с *l*-толуидином щелочных водно-этанольных средах методами УФ- и ИК-спектроскопии, а также тонкослойной хроматографии. Показано, что на начальных стади-

ях происходит распад лактозы и продуктов ее изомеризации и дегидратации с образованием активных редуктонов, способных к дальнейшей альдольно-кетоновой конденсации с образованием циклических дезоксигексодиулоз, трансформирующихся в окрашенные продукты, структура которых по данным спектроскопии включает сопряженные системы кратных связей и карбоксилатные группы.

2. На основании данных элементного анализа установлено, что азот ароматического амина практически не включается в состав конечных продуктов, при этом также показано, что конечные «браун»-продукты являются диализуемыми системами, формирование последних начинается уже на ранних стадиях взаимодействия. Способность к диализу вероятно связана с наличием в структуре склонных к сольволитическому расщеплению лабильных связей.

3. На основании анализа УФ-спектров отмечено также ускорение деструкции D-лактозы в присутствии *п*-толуидина по сравнению с реакцией карамелизации, при этом структура конечных продуктов в обоих случаях является близкой, что говорит о непосредственном участии амина в начальных стадиях «браун» -процессов, но механизм их действия остается не до конца ясным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cammerer B., Wedzicha B., Kroh L.W. Nonenzymatic browning reactions of retro-aldol degradation products of carbohydrates // Eur. Food Res. Technol. 1999. – Vol. 209. – P. 261–265.
2. Weneen H. Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry // Food Chem. 1998. – Vol. 62. – P.393–401.
3. Smuda M., Glomb M. Fragmentation pathways during Maillard-induced carbohydrate degradation // J. Agric. Food Chem. 2013. – Vol. 61. – P. 10198–10208.

4. Smuda M., Glomb M. Novel insights into the Maillard catalyzed degradation of maltose // J. Agric. Food Chem. 2011. – Vol. 59. – P. 13254–13264.
5. Kramholler B., Pischetsrieder M., Severin T. Maillard reaction of maltose and lactose // J. Agric. Food Chem. 1993. – Vol. 41. – P. 347–351.
6. Kroh L.W. Caramelisation in food and beverages // Food Chem. 1994. – Vol. 51. – P. 373–379.
7. Hollnagel A., Kroh L. Degradation of oligosaccharides in nonenzymatic browning by formation of α -dicarbonyl compounds via a “peeling off” mechanism // J. Agric. Food Chem. 2000. – Vol. 48. – P. 6219–6226.
8. Yaylayan V.A., Kaminsky E. Isolation and structural analysis of Maillard polymers: caramel and melanoidin formation in glycine/glucose model systems // Food Chem. 1998. – Vol. 63. – P. 25–31.
9. Руденко В.Н., Бобровник Л.Д. Влияние азотсодержащих соединений на образование красящих веществ в модельной системе D-глюкоза – аминокомпонент // Изв. Вузов. Пищевая технология. 1996. – № 5-6. – С. 23–28.
10. Carbohydrate Chemistry. Vol.19. Part.1: Monosaccharides, Disaccharides and Specific Oligosaccharides. London: Royal Soc. Chem. 1987. 291 p.
11. Agarwal S.K.D., Johary P.C., Misra D.S. Infrared spectrophotometric characteristics of caramels and melanoidins // Proc. Int. Soc. Sug. Cane Technol. 1974. – Vol. 15. – P. 1388–1392.
12. Shen S.-C., Wu J.S.-B. Maillard browning in ethanolic solution // J. Food Sci. 2004. – Vol. 69. – P. 273–279.
13. Abul Haider Shipar M. Formation of methyl glyoxal in dihydroxyacetone and glycine Maillard reaction: a computational study // Food Chem. 2006. – Vol. 98. – P. 395–402.

Черепанов И. С. - к.х.н., доцент кафедры фундаментальной и прикладной химии ФБГОУ ВО «Удмуртский государственный университет», 426034, Россия, Удмуртская республика, г.Ижевск, ул. Университетская, 1. Тел.: 8(3412)916-437. e-mail: cherchem@mail.ru