



УДК 541.61.614

Н.Ю. Колбас

МЕХАНИЗМЫ КОПИГМЕНТАЦИИ АНТОЦИАНОВ

Приведен анализ данных о влиянии pH среды на структуру антоцианов. Рассматриваются механизмы четырех типов копигментации антоцианов (внутримолекулярная, конденсационная, за счет образования хелатных комплексов, за счет циклизации с органическими кислотами). На основании литературных и собственных данных показано, что стабильность антоцианов сохраняется путем смещения равновесия в сторону их окрашенных форм, либо за счет поддержания целостности структуры флавилиум-катиона.

Применение экстрактов антоцианосодержащего растительного сырья в качестве красителей соответствует современным тенденциям развития пищевой, косметической и фармацевтической промышленности. Антоцианы не только определяют органолептические свойства продукции, но и являются фитонутриентами. Благодаря антиоксидантной способности природные антоцианы снижают окисляемость других ингредиентов продукции и тем самым продлевают сроки ее годности [1].

Другим направлением применения антоцианов в качестве красителей является производство «био»текстиля. В данной отрасли, по сравнению с пищевой и косметической, используют более дешевое антоцианосодержащее растительное сырье.

Существенным недостатком антоцианов как красителей является довольно низкая их стабильность. При деструкции антоцианов полностью разрушается их химическая структура, а, следовательно, и хромофорная способность [2]. Если в пищевой промышленности эта проблема решается за счет создания кислой среды, то для косметической и фармацевтической продукции этот способ неприемлем, так как их pH должен быть близок к нейтральному. В данных видах продукции высокой стабильности антоцианов можно добиться путем копигментации.

Химическое строение

Антоцианы – это гетероциклические, полифункциональные соединения, которые могут находиться в негликозидированном состоянии (антоцианидины) либо в виде гликозидов и ацилгликозидов (антоцианиды). По химической структуре агликаны антоцианов являются полигидрокси- и полиметокси- производными катиона 2-фенилбензопирилюма (флавилиум-катион или 2-фенилхромен-катион) [3]. Однако, под общим термином «антоцианы» понимают целую группу соединений: антоцианидины, 3-дезоксидантоцианидины, *O*-метилат-антоцианидины, а также и их гликозиды.

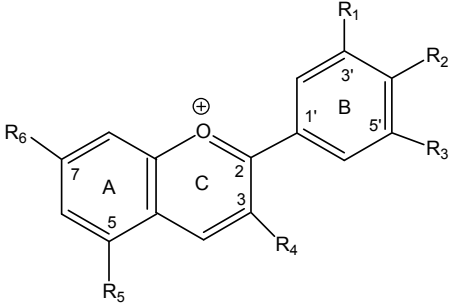
В настоящее время выявлено около 600 антоцианов из них в растительных объектах обнаружены производные 17 антоцианидинов. При этом наиболее часто в биохимический состав растений входят производные дельфинидина (*Dp*), мальвидина (*Mv*), пеларгонидина (*Pg*), пеонидина (*Pn*), петунидина (*Pt*) и цианидина (*Cy*) [3]. Согласно химическому строению *Pn* можно рассматривать как метилпроизводное *Cy*, а *Mv* и *Pt* – дельфинидина. Как и у большинства флавоноидов кольцо *A* этих шести антоцианидинов гидроксильно в положениях C-5 и C-7, эти OH-группы не подвергаются метилированию (таблица 1).

Метил-производными антоцианидинов является целая группа соединений – *O*-метилат-антоцианидины (таблица 1), которые были обнаружены в химическом составе цветков некоторых растений [4]. В отличие от *Mv*, *Pn* и *Pt*, метилирование этих



молекул затрагивает гидроксогруппы любого положения, кроме С–3, так как эта ОН-группа участвует в образовании гликозидной связи.

Таблица 1 – Химическая структура антоцианов

|  Флавилиум-катион | | | | | | | |
|--|---------------|------------------|------------------|------------------|----------------|------------------|------------------|
| Группа | Название | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | R ₆ |
| Антоцианидины | Пеларгонидин | H | OH | H | OH | OH | OH |
| | Цианидин | OH | OH | H | OH | OH | OH |
| | Дельфинидин | OH | OH | OH | OH | OH | OH |
| | Пеонидин | OCH ₃ | OH | H | OH | OH | OH |
| | Петунидин | OCH ₃ | OH | OH | OH | OH | OH |
| | Мальвидин | OCH ₃ | OH | OCH ₃ | OH | OH | OH |
| 3-дезоксид-антоцианидины | Апигенинедин | H | OH | H | H | OH | OH |
| | Лутеолинедин | OH | OH | H | H | OH | OH |
| | Трицетинедин | OH | OH | OH | H | OH | OH |
| | Колумбидин | H | OH | OH | H | OH | OH |
| | Диосметинидин | H | OH | OCH ₃ | H | OH | OH |
| О-метилат-антоцианидины | Розинидин | OCH ₃ | OH | H | OH | OH | OCH ₃ |
| | Пульчелидин | OH | OH | OH | OH | OCH ₃ | OH |
| | Европинидин | OCH ₃ | OH | OH | OH | OCH ₃ | OH |
| | Капенсинидин | OCH ₃ | OH | OCH ₃ | OH | OCH ₃ | OH |
| | Гирсутинидин | OCH ₃ | OCH ₃ | OH | OH | OCH ₃ | OH |

Другими производными антоцианидинов являются 3-дезоксидантоцианидины, которые отличаются строением трехуглеродного связующего фрагмента (кольцо С). Эти соединения не содержат гидроксогрупп в положении С–3 (таблица 1) [4].

Еще один антоцианидин – аурантинидин, является производным Pg. Он имеет дополнительную гидроксогруппу в положении С–6 кольца А [5, с. 459].

Отмечено, что *in vivo* антоцианы, как и многие флавоноиды, чаще находятся в виде гликозидов. В реакциях гликозидирования участвуют ОН-группы С–3 и/или С–5 положений шести основных антоцианидинов и О-метилат-антоцианидинов, образуя моно- и дигликозиды. Представители группы 3-дезоксидантоцианидинов в растениях были обнаружены только как С–5-гликозиды [4], что связано с особенностями строения этих соединений.

Углеводная составляющая антоцианов может быть представлена как моносахаридами: пентозами (арабинозой и ксилозой), гексозами (глюкозой, галактозой и рамнозой), так и дисахаридами (рутинозой, самбубиозой и софорозой) [5].



Некоторые антоцианы имеют ацильный компонент, который соединен с кислородом ОН-группы остатка глюкозы или галактозы. Ацильный компонент образован остатками моно- и дикарбоновых кислот (уксусной, пропионовой, щавелевой, малоновой и янтарной), а также гидроксикоричных кислот (*p*-кумаровой, кофейной, феруловой и синапиновой) [5]. Гидрофильность органических кислот не может уменьшить способность самих антоцианов растворяться в воде.

Установлено, что чем выше степень гидроксирования антоцианидинов, тем ниже их устойчивость к действию температуры, света, экзогенных окислителей, в то время как при метилировании наблюдается обратная зависимость [2; 6]. Гликозильные формы более стабильны, чем их агликоны [2; 6; 7], при этом арабинозиды проявляют большую устойчивость по сравнению с соответствующими им галактозидами [5]. С-3 производные антоцианов устойчивее, чем их С-5 и С-7 аналоги [6; 7]. Отмечено, что в процессе переработки и хранения продукции ацилированные антоцианы более стабильны, чем их неацелированные аналоги [2; 7].

Изменение строения антоцианов при различных значениях рН среды

Высокая электрофильность бензопирилиевого цикла определяет зависимость структуры антоцианов от величины рН среды (рисунок 1). При $\text{pH} < 2$ антоцианы существуют в форме флавилиум-катиона (A^+), либо в виде пирилиевых солей, в частности хлоридов. В данной форме электрон атома кислорода трехуглеродного звена антоциана принимает участие в образовании π -связей. Гидроксогруппы, несущие свободные электроны, увеличивают степень делокализации и стабилизируют возбужденное состояние электронов молекул [8].

С увеличением значения рН концентрация форм A^+ уменьшается (рисунок 1), так как происходит присоединение ОН-группы в положение С-4 и уже при $\text{pH} = 4-5$ антоцианы находятся в форме бесцветного псевдооснования (карбинол). Образование и накопление псевдооснований происходит при дальнейшем повышении рН до нейтральной среды. Затем при $\text{pH} = 7-8$ происходит отщепление воды от молекулы псевдооснования с образованием хиноидного основания, которое приобретает пурпурный или синий цвет. Кроме того, при величине $\text{pH} > 8$ происходит таутомерная изомеризация псевдооснования и образуется цис- или транс-халкон светло-желтого цвета [9].

Отмечено, что именно хиноидные формы антоцианов, которые в водных растворах довольно не устойчивы, но стабильны *in vivo*, могут придавать ярко синюю окраску различным органам растений (чаще лепесткам и листьям) [8].

Копигментация антоцианов

Равновесие между различными формами антоцианов может быть смещено в сторону образования окрашенных флавилиум-катионов и хиноидных форм за счет копигментации, что сводит до минимума образование бесцветных псевдооснований. Копигментация зависит от структуры, концентрации пигмента, соотношения пигмент/копигмент, а также от рН среды, природы растворителя, ионной силы и температуры [2; 7; 10]. Факт наличия копигментации необходимо учитывать при производстве красителей, выделяемых из растительного сырья.

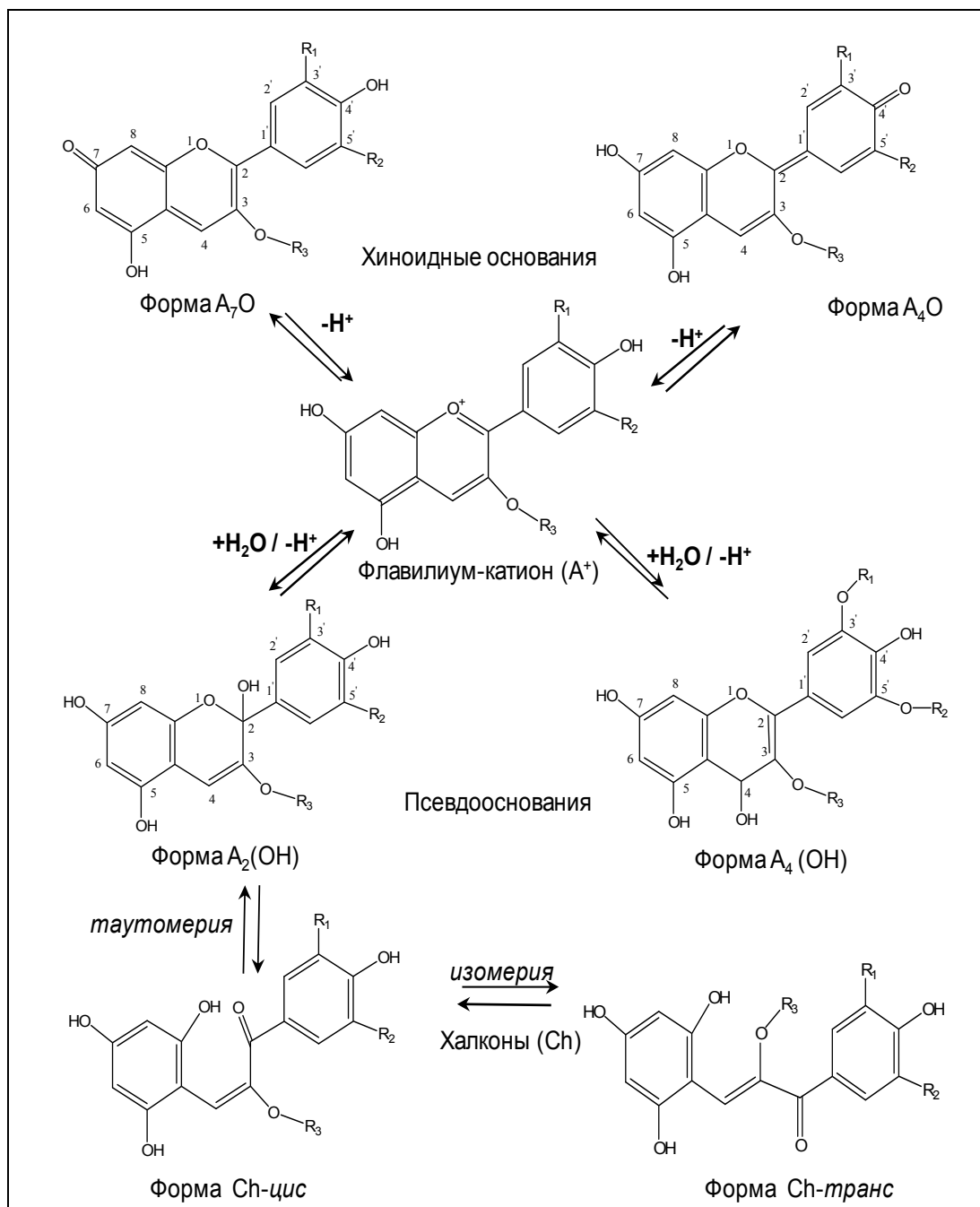
Копигментами могут выступать катионы металлов, гидроксикоричные кислоты, соляная кислота, флавонолы, гидролизованные танины, алкалоиды, аминокислоты, пурины и пиримидины.

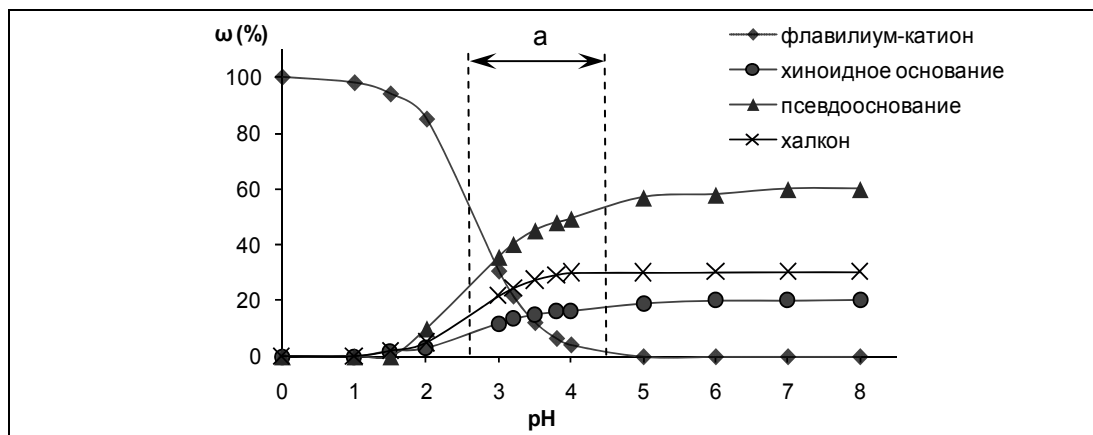
Различают следующие виды копигментации антоцианов:



1. *Внутримолекулярная копигментация ацилированных антоцианов.*

При изучении устойчивости антоцианов *in vitro* [11] и *in vivo* [12] установлено, что при повышении pH среды ацилированные антоцианы менее подвержены обесцвечиванию, чем их неацилированные аналоги. В случае если ацильные компоненты образованы остатками дикарбоновых кислот, pH среды снижается благодаря наличию свободных карбоксильных групп, тем самым равновесие различных

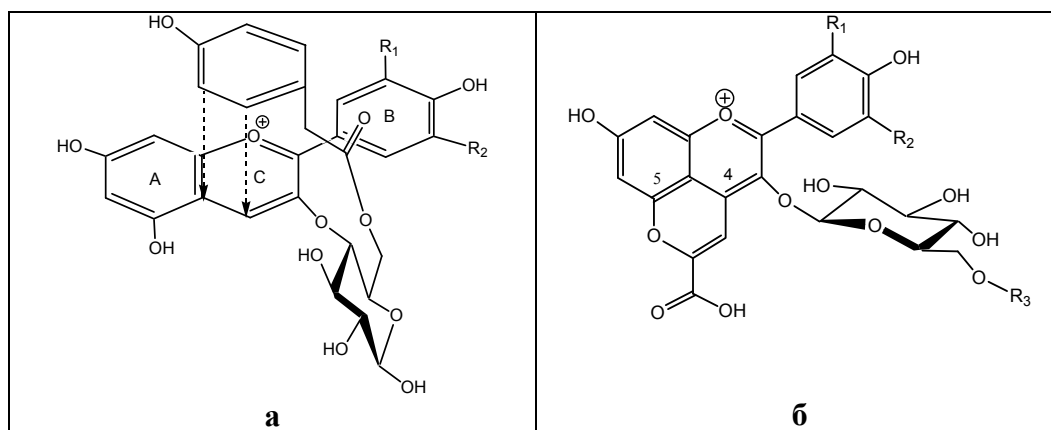




R_1 и R_2 – H, –OH, –OCH₃; R_3 – H или углеводный остаток; а – область значений pH сочных плодов содержащих антоцианы

Рисунок 1 – Различные формы антоцианов в зависимости от значений pH среды
[адаптировано по 9, 10]

форм антоцианов смещается в сторону образования окрашенных форм [12]. Свой вклад в сохранение окраски антоцианов вносят и ароматические ацильные компоненты. За счет стэкинг π - π взаимодействия между бензопирилевым кольцом антоциана и бензольным кольцом остатка гидроксикоричной кислоты (рисунок 2а) образуется внутримолекулярный комплекс и флавилюм-катион не может подвергнуться нуклеофильной атаке молекул воды, а, следовательно, бесцветное псевдооснование не образуется [13]. В своей статье К. Yoshida с соавторами (2002) [14] отмечают большую устойчивость комплексов, в которых ацилированным является кольцо В, по сравнению с комплексами, ацилированными в кольце А.



а – внутримолекулярная копигментация [15]; б – циклизация антоцианов с органическими кислотами [22]

Рисунок 2 – Копигментация антоцианов

2. Копигментация за счет хелатирования.

Образование хелатных комплексов с металлами осуществляется за счет использования нековалентных Ван-дер-Ваальсовых связей и гидрофобного стэкинг π - π взаи-



модействія [9]. Хелатирование металлов может происходить с участием кислорода ОН-группы кольца *B*, которая находится в орто-положении (рисунок 3), при этом ион металла лежит в одной плоскости с кольцом *B* антоциана [16].

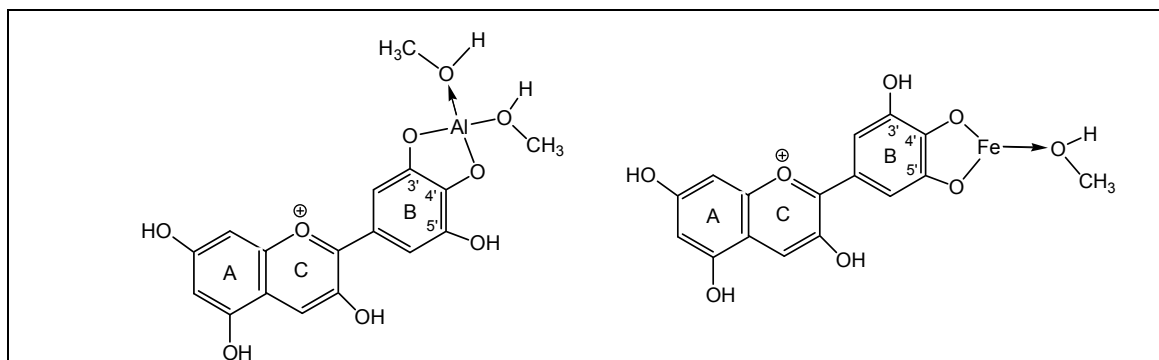


Рисунок 3 – Хелатные комплексы дельфинидина с Al (III) и Fe (II) в водно-метанольной среде [16]

Природные пигменты имеют довольно сложную пространственную структуру, как, например, коммелинин – пигмент лепестков *Commelina communis* L. var. *hortensis*. Авторами [17] установлено, что пигмент образуют молекулы дельфинидин 3-*O*-(6''-*O*-*p*-кумароилглюкозид)-5-*O*-(6''-*O*-малонил-глюкозида), флавоно гликозида и 4 иона магния (Mg^{2+}). При этом один ион Mg^{2+} образует хелатный комплекс с тремя молекулами антоциана, формируя одну субъединицу. Две такие субъединицы объединяются с аналогичными субъединицами, образованными молекулами флавоно гликозидов, формируя, таким образом, сложную геометрическую структуру, центром которой является октаэдр, с четырьмя ионами Mg^{2+} . Таким образом, в хелатировании металлов одновременно может участвовать не одна, а несколько молекул антоцианов.

3. Копигментация за счет конденсации с полифенолами.

В результате конденсации с полифенолами (кумаринами, фенольными кислотами, флавонолами и танинами) становятся невозможными реакции замещения в положениях С-2 и С-4 кольца *B* антоцианов, а равновесие смещается в сторону образования их окрашенных форм [3; 10].

Конденсация антоцианов с флаван-3-олами происходит по электрофильному механизму. Различают прямую и непрямую конденсации [18].

Прямая конденсация флаван-3-олов и антоцианов ($A^+ \rightarrow F$ и $F \rightarrow A^+$) происходит в направлении от С-4 электрофильной частицы к С-8 или С-6 нуклеофильной частицы, однако преобладающим является С-4 \rightarrow С-8 путь [19]. На предварительной стадии в молекуле флавилиум-катиона (форма A_1^+) происходит перераспределение положительного заряда бензопирилиевого цикла из положения С-1 в положение С-4 (форма A_4^+), затем в результате авто-ассоциации с флаван-3-олом образуется бесцветное соединение фловен, в результате депротонирования которого получается димер красной или розовато-лиловой окраски [20]. В случае взаимодействия антоцианов с флаван-3-олами ($A^+ \rightarrow F$) электрофильной частицей является флавилиум-катион, а молекула флаванола – нуклеофильной. При прямой конденсации флавонолов и антоцианов ($F \rightarrow A^+$) бесцветные вещества (карбокатион флаван-3-ола, псевдооснование антоциана и их комплекс) преобразуются в димер $F-A^+$, имеющий красный цвет [21].



Принцип реакции непрямой конденсации флаван-3-олов с антоцианами сходен с прямой конденсацией. Однако процесс непрямой конденсации протекает через образование промежуточных соединений с низкомолекулярными органическими веществами: этаналем, фурфуролом, глиоксиловой кислотой или их производными [10].

При изучении биохимического состава антоцианосодержащего сырья целесообразно рассчитывать соотношение антоцианов и флаван-3-олов [18]. Для получения более стабильных натуральных красителей необходимо создание поликомпонентных систем на основе антоцианов и катехинов.

4. Копигментация с органическими кислотами.

Другими копигментами антоцианов могут быть пировиноградная и гидроксикоричные кислоты. Моноциклизация антоцианов с кислотами происходит посредством двух связей: первая O–C связь формируется с участием кислорода гидроксогруппы C-5 кольца A, вторая связь C–C образуется в положении C-4. Полученные таким образом пираноантоцианы (рисунок 2б) имеют в своем строении дополнительный гетероцикл [22]. Пираноантоцианы могут быть образованы и в результате дициклизации: первое кольцо его скелета соответствует дополнительному кольцу пираноантоцианов, второе кольцо сформировано реакцией этерификации между гидроксогруппой C-3 флавилиум-катиона и карбоксильной группой галловой кислоты [23]. Несмотря на изменения в структуре, целостность флавилиум-катиона сохраняется, а полученные таким образом комплексы являются достаточно стабильными.

Пираноантоцианы были выделены именно в растительных объектах: 5-карбоксопираноцианидины в листовых чешуях луковиц фиолетовых сортов *Allium cepa* L. [22], 5-карбоксопиранопеларгонидин 3-O-глюкозид – в плодах *Fragaria ananassa* [24], 5-карбоксопираномальвидины – в ягодах красноплодных сортов *Vitis vinifera* [14], производные 5-метилпираноцианидина и 5-метилпиранодельфинидина – в семенах *Ribes nigrum* L. [23]. Пираноантоцианы имеют окраску от желтой и красно-оранжевой до синей, что зависит от pH среды, строения антоциана и кислоты [25]. Так Pg 3-O-glu и 5-карбоксопиранопеларгонидин 3-O-глюкозид плодов *Fragaria ananassa* при pH=1,1 имеют желтую окраску, а при pH=6,9 – красную, слабые различия для двух этих соединений отмечены лишь в цветовой контрастности [24].

Таким образом, стабильность антоцианов и сохранение их окрашивающей способности может быть достигнута двумя механизмами:

- за счет смещения равновесия в сторону образования хиноидных форм антоцианов (конденсация с полифенолами и внутримолекулярная копигментация с дикарбонным ацильным компонентом);
- за счет поддержания целостности структуры хромофора – флавилиум-катиона (комплексобразование с ионами металлов, циклизация с органическими кислотами и внутримолекулярная копигментация с ароматическим ацильным компонентом).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rymbai, H. Biocolorants and its implications in Health and Food Industry - A Review / H. Rymbai, R.R. Sharma, M. Srivastav // International Journal of PharmTech Research. – 2011. – Vol.3, № 4. – P. 2228–2244.
2. Thermal degradation of grape marc polyphenols / K. Sólyom [et al.] // Food Chemistry. – 2014. – Vol. 159. – P. 361–366.
3. Mazza, G. In Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains / G. Mazza, E. Miniati. – CRC Press : Boca Raton. – 1993. – P. 149–199.



4. Harborne, J.B. Comparative biochemistry of flavonoids – II: 3-Desoxyanthocyanins and their systematic distribution in ferns and gesnerads / J.B. Harborne // *J. Phytochem.* – Vol. 5, № 4. – 1966. – P. 589–600.
5. Andersen, Ø.M. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and application / Ø.M. Andersen, K.R. Markham. – Boca Raton, FL : CRC Press, 2006. – 480 p.
6. Von Elbe, M. Colorants. In: *Food Chemistry* / M. Von Elbe, R. Shwartz, ed. O.R. Fennema. – New York : Marcel Dekker, Inc., 1996. – P. 681–694 p.
7. Wallace, T.C. Determination of Color, Pigment, and Phenolic Stability in Yogurt Systems Colored with Nonacylated Anthocyanins from *Berberis boliviana* L. as Compared to Other Natural/Synthetic Colorants / T.C. Wallace, M.M. Giusti // *J. Food Sci.* – 2008. – Vol. 73, № 4. – P. 241–248.
8. Prior, R.L. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities / R.L. Prior, X. Wu // *J. Free Rad. Res.* – 2006. – Vol. 40. – P. 1014–1028.
9. Brouillard, R. Flavonoids and flower colour. In *The Flavonoids: Advances in Research Since* / R. Brouillard, O. Dangles, ed. J.B. Harborne. – London : Chapman and Hall, 1994. – P. 565–588.
10. *Handbook of enology [Traité d'oenologie. English]* / P. Ribéreau-Gayon [et al.] – West Sussex : John Wiley & Sons Ltd., 2006. – Vol. 2: *The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments.* – 444 p.
11. Giusti, M. M. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems / M.M. Giusti, R.E. Wrolstad // *Biochem. Eng. J.* – 2003. – № 14. – P. 217–225.
12. Cevallos-Casals, B.A. Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants / B.A. Cevallos-Casals, L. Cisneros-Zevallos // *J. Food Chem.* – 2004. – Vol. 86, № 1. – P. 69–77.
13. Prevention of UV-light induced E,Z-isomerization of caffeoyl residues in the diacylated anthocyanin, gentiodelphin, by intramolecular stacking / K. Yoshida [et al.] // *Tetrahedron Lett.* – 2002. – № 43. – P. 6181–6184.
14. Detection and partial characterization of new anthocyanin-derived pigments in wine / J.P. Cameira dos Santos [et al.] // *J. Sci. Food Agric.* – 1996. – Vol. 70, № 2. – P. 204–208.
15. Bąkowska-Barczak, A.M. Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants – a review / A.M. Bąkowska-Barczak // *Pol. J. Food Nutr. Sci.* – 2005. – Vol. 14/55, № 2. – P. 107–116.
16. Delphinidin–Aluminum(III) Complexes in Aqueous and Non-Aqueous Media: Spectroscopic Characterization and Theoretical Study / J.M. Dimitrić Marković [et al.] // *Monatshefte für Chemie.* – 2007. – № 138. – P. 1225–1232.
17. Shiono, M. Structure of commelinin, a blue complex pigment from the blue flowers of *Commelina communis* / M. Shiono, N. Matsugaki, K. Takeda // *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* – 2008. – Vol. 84, № 10. – P. 452–456.
18. Колбас, Н.Ю. Повышение стабильности антоцианов путем конденсации с полифенолами / Н.Ю. Колбас // «Менделеевские чтения 2014 г.» : сб. матер. межвуз. науч.-методич. конф., Брест, 28 февраля 2014 г. / БрГУ им. А.С. Пушкина; под общ. ред. Н.С. Ступень. – Брест : БрГУ, 2014. – С. 39–43.
19. Fossen, T. Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols / T. Fossen, S. Rayyan, Ø.M. Andersen // *J. Phytochem.* – 2004. – Vol. 65. – P. 1421–1428.



20. Characterization of a colorless anthocyanin-flavan-3-ol dimer containing both carbon-carbon and ether interflavanoid linkages by NMR and mass spectrometry / S. Remy-Tanneau [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2003. – Vol. 51, № 12. – P. 3592–3597.

21. Demonstration of the occurrence of flavanol-anthocyanin adducts in wine and in model solutions / E. Salas [et al.] // *Analytica Chimica Acta* – 2004. – № 513. – P. 325–332.

22. Lu, Y. Novel pyranoanthocyanins from black currant seed / Y. Lu, Y.S. Sun, L.Y. Foo // *Tetrahedron Letters*. – 2000. – № 41. – P. 5975–5978.

23. Structure of rosacyanin B, a novel pigment from the petals of *Rosa hybrida* / Y. Fukui [et al.] // *Tetrahedron Letters*. – 2002. – № 43. – P. 2637–2639.

24. Anthocyanin from strawberry (*Fragaria ananassa*) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelargonidin / Ø. M. Andersen [et al.] // *Phytochemistry*. – 2004. – Vol. 65. – P. 405–410.

25. Gauche, C. Effect of pH on the copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts with organic acids / C. Gauche, E. da Silva Malagoli, M.T. Bordignon Luiz // *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)* – 2010. – Vol. 67, № 1. – P. 41–46.

N.Y. Kolbas Anthocyanin Copigmentation Mechanisms

Aspects of the copigmentation phenomenon are suggested in this review. The anthocyanins indicate sensibility to pH changes. The condensation with polyphenols and intramolecular copigmentation with dicarboxylic acyl component shift the equilibrium to the quinonic base of anthocyanins. The complexation with metal ions, cyclization with organic acids and intramolecular copigmentation aromatic acyl component stabilized flavilium cation form. These are two ways of stabilization anthocyanin.