УДК 543.421/.424 EDN: ZFIRQL DOI: 10.31429/vestnik-20-4-71-78

Анализ содержания антоцианов цианидина, дельфинидина, мальвидина и пеларгонидина в пищевой продукции методом ИК-спектроскопии

Е. Ю. Степанович ✉, **П. Н. Алиев**

Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева, ул. Татищева, 20а, Астрахань, 414056, Россия

✉ Степанович Екатерина Юрьевна; ORCID 0000-0002-6656-8278; e-mail: stepekyr1@mail.ru

Аннотация. В статье исследуются особенности химического строения наиболее распространённых в природе антоцианов — цианидина, дельфинидина, мальвидина и пеларгонидина. Приведены структурно-динамические модели приведённых молекул, а также соответствующие им теоретические ИК-спектры. Обозначены характерные для каждого из данных антоцианов пики, позволяющие отличить один антоциан от другого в составе вещества. Теоретические расчёты подтверждаются экспериментом, заключающемся в исследовании практически полученных ИК-спектров плодов граната, клубники, голубики, красного лука и краснокочанной капусты.

Ключевые слова: антоцианы, ИК-спектр, цианидин, дельфинидин, мальвидин, пеларгонидин.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Цитирование: Степанович Е. Ю., Алиев П. Н. Анализ содержания антоцианов цианидина, дельфинидина, мальвидина и пеларгонидина в пищевой продукции методом ИК-спектроскопии // Экологический вестник научных центров Черноморского экономического сотрудничества. 2023. Т. 20, № 4. С. 71–78. EDN: ZFIRQL. DOI: 10.31429/vestnik-20-4-71-78

Поступила 2 июня 2023 г. После доработки 29 сентября 2023 г. Принято 13 октября 2023 г. Публикация 31 декабря 2023 г.

Вклад авторов: Е.Ю. Степанович — идея/концепция работы, анализ данных, внесение правок в статью, утверждение окончательного варианта. П.Н. Алиев — проведение экспериментов, вычислений, анализ данных, написание статьи, утверждение окончательного варианта. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

© Автор(ы), 2023. Статья открытого доступа, распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (CC BY).

Analysis of Cyanidin, Delphinidin, Malvidin and Pelargonidin Anthocyanins in Food Products by Infrared Spectroscopy

E. Y. Stepanovich ✉, **P. N. Aliyev**

Astrakhan State University named after V.N. Tatishchev, 20a Tatishcheva Str., Astrakhan, 414056, Russia

✉ Ekaterina Yu. Stepanovich; ORCID 0000-0002-6656-8278; e-mail: stepekyr1@mail.ru

Abstract. In the present work investigated peculiarities of chemical structure of most common in nature anthocyanins, namely, cyanidin, delphinidin, malvidin, and pelargonidin. Represented structural and dynamic models of these molecules, as well as their corresponding theoretical IR-spectrum calculated within the framework of the quantum model DFT/RB3LYP/6-31G(d,p). Marked the characteristic peaks for each of these anthocyanins, allowing one anthocyanin to be distinguished from another in the composition of the substance: for cyanidin – 1223 cm^{-1}, delphinidin – 1176 cm^{-1}, malvidin – 1480 cm^{-1}, and pelargonidin – 1197 cm^{-1}. Theoretical calculations confirmed by an experiment consisting in investigation of practically obtained IR-spectrum of pomegranate fruits (*Punica granatum*), strawberry (*Fragaria viridis*), blueberry (*Vaccinium uliginosum*), red onion (*Allium cepa*) and red cabbage (*Brassica oleracea*). Obtained results have wide possibilities for approbation and implementation in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: anthocyanins, IR-spectrum, cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin.

Funding. The study did not have sponsorship.

Cite as: Stepanovich, E. Y., Aliyev, P. N., Analysis of cyanidin, delphinidin, malvidin and pelargonidin anthocyanins in food products by infrared spectroscopy. *Ecological Bulletin of Research Centers of the Black Sea Economic Cooperation*, 2023, vol. 20, no. 4, pp. 71–78. DOI: 10.31429/vestnik-20-4-71-78

Received 2 June 2023. Revised 29 September 2023. Accepted 13 October 2023. Published 31 December 2023.

Authors' contribution: Ekaterina Yu. Stepanovich — idea/concept of the work, data analysis, editing the article, approval of the final version. Piri N. Aliyev — conducting experiments, calculations, data analysis, writing the article, approval of the final version. The authors declare no competing interests.

© The Author(s), 2023. The article is open access, distributed under Creative Commons Attribution 4.0 (CC BY) license.

Введение

Методы инфракрасной спектроскопии ранее утвердили себя как эффективные для исследования качественного химического состава веществ [1–6]. Так, например, в работе [5] исследовался состав препаратов гуминовых кислот, что говорит о широких возможностях применения ИК-спектроскопии при изучении и обнаружении жизненно необходимых веществ. Одними из таких веществ являются антоцианы.

Антоцианы — это одни из пигментов растений, дающие им тот или иной окрас [7]. Благодаря такому полезному для пищевой индустрии свойству, в наши дни из антоцианов в промышленных масштабах получают натуральные красители [8]. Также антоцианы нашли применение в медицине — они являются биологически активными добавками (БАД), потребление которых в умеренных количествах положительно сказывается на здоровье человеческого организма. Например, российской фармацевтической кампанией «Экомир» и американской «Bauch+Lomb» выпускается БАД для улучшения зрения «Антоциан форте», активным веществом которого является комплекс антоцианов черники и чёрной смородины [9]. Также отмечены антиоксидантные свойства антоцианов [10].

Из всего вышесказанного можно понять, что каждый антоциан обладает уникальным свойством, поэтому актуальным является вопрос о возможности идентификации антоцианов в составе потребляемой продукции. Для исследования упомянутым методом содержания антоцианов в плодах, луковицах или листьях растений были выбраны гранат обыкновенный (*Punica granatum*) сорта Нар-Ширин, клубника (*Fragaria viridis*) сорта Вима Занта, голубика обыкновенная (*Vaccinium uliginosum*) сорта Дрейпер, лук репчатый (*Allium cepa*) сорта Салатный красный, капуста краснокочанная (*Brassica oleracea*) сорта Калибос.

1. Теоретическая часть

С точки зрения химии антоцианы представляют собой вещества, состоящие из соединённых между собой одинарной связью нафталиновой и бензольной функциональных групп, имеющих семь отличных радикалов, комбинации которых и образуют множество уникальных по химическим и биологическим свойствам веществ. Согласно номенклатуре ИЮПАК для антоцианов индексацией 1–8 обозначаются внешние звенья цепи нафталина, а $1'$–$6'$ — бензольного кольца. При упоминании замещающего радикала R^i последний сопровождается соответствующим индексом i.

Для антоцианов цианидин, дельфинидин, мальвидин, пеларгонидин радикалы цепи нафталина идентичны: R^3,R^5, R^7представлены OH-группой, а R^6— водородом. На рис. 1 приведены структурно-динамические модели молекул данных соединений, построенные в графическом редакторе «GaussView» версии 5.0.8.

Из данных моделей видно, что характерные отличия имеются в радикалах бензольного кольца. Для пеларгонидина — это единственная в цепи бензольного кольца OH-группа — радикал $R^{4'}$. Для цианидина — аналогичный радикал $R^{3'}$, вторая OH-группа. Для дельфинидина — радикал $R^{5'}$, а для мальвидина — замена радикалов $R^{3'}$ и $R^{5'}$ на метокси-группы O–CH_3.

По данным структурно-динамическим моделям с использованием ПО «Gaussian» версии 09 [11] согласно квантовой модели DFT/RB3LYP/6-31G(d,p) были рассчитаны фундаментальные частоты колебаний функциональных групп молекул, а также соответствующие им теоретические ИК-спектры, приведённые на рис. 2.

Стоит заметить, что суммарный заряд молекул антоцианов равен +1 элементарному заряду в виду отсутствия одного электрона на внешнем слое атома кислорода в звене 1 цепи нафталина.

Теоретические спектры приведены в диапазоне 1000–1750 см$^{-1}$, так как наиболее интенсивные пики встречаются именно в этой частотной области.

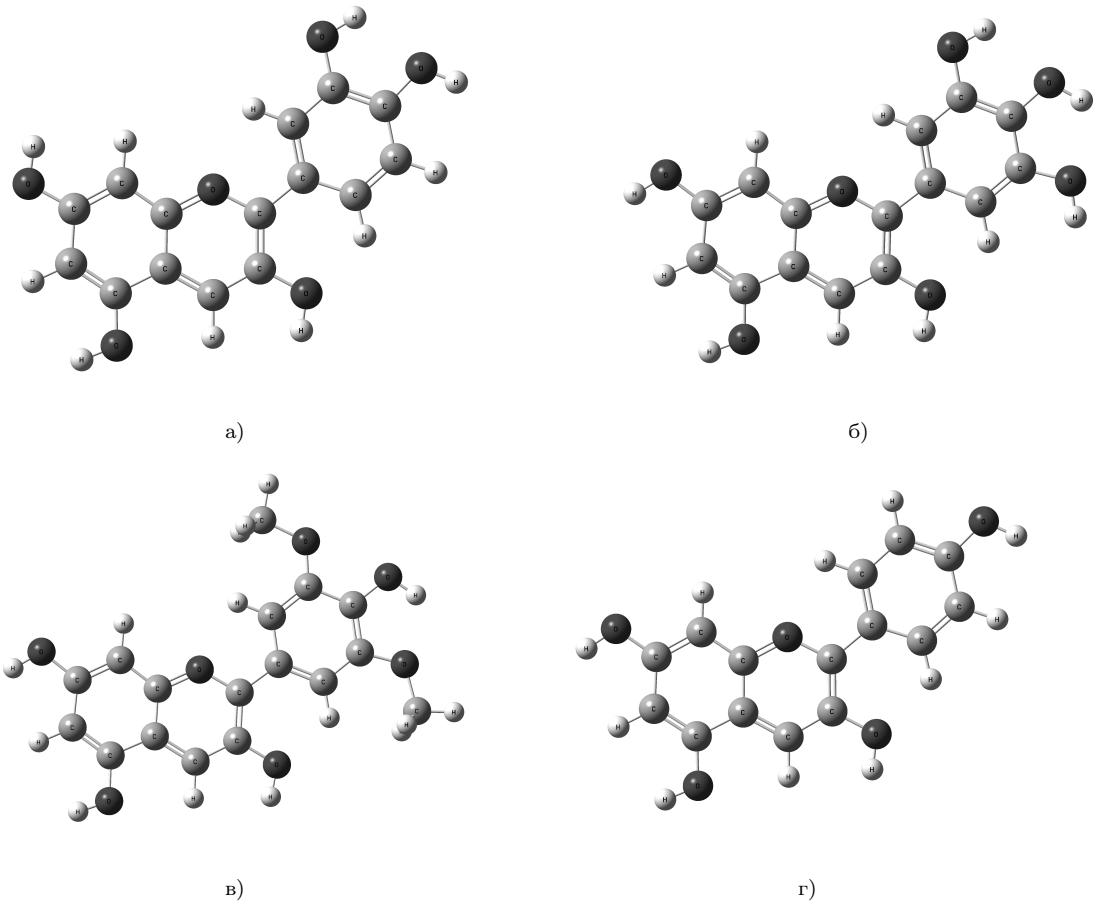

Рис. 1. Структурно-динамические модели: а) цианидин, б) дельфинидин, в) мальвидин, г) пеларгонидин

Fig. 1. Structural-dynamic models: а) cyanidin, б) delphinidin, в) malvidin, г) pelargonidin

Наша задача состоит в нахождении пиков теоретических ИК-спектров данных молекул, благодаря которым возможна однозначная идентификация каждого из четырёх антоцианов. Для этого рассмотрим структурно-динамические модели из рис. 1, и вновь упомянем, что отличия в структуре данных веществ имеются только в радикалах бензольного кольца, причём для каждого из рассматриваемого антоциана можно выделить индивидуальное отличие. Таким образом, зная фундаментальные частоты колебаний характерных функциональных групп, можно также найти и характерные пики на теоретических спектрах.

Исходя из данных, полученных в программе Gaussian, было выяснено, что у молекулы цианидина имеются деформационные ножничные колебания водорода OH-группы, которая является радикалом $R^{3'}$, с частотой 1223 см$^{-1}$. Стоит отметить, что аналогичный радикал имеется и у молекулы дельфинидина, но в виду наличия ещё одной гидроксильной группы в позиции $R^{5'}$ происходит значительное смещение частоты именно этого колебания. Поэтому ранее упомянутая частота может быть качественной при идентификации цианидина.

Аналогичные рассуждения справедливы и для всех рассматриваемых молекул. Для дельфинидина — деформационные ножничные колебания водорода OH-группы (радикал $R^{5'}$) с частотой 1176 см$^{-1}$; для мальвидина — деформационные веерные колебания водородов CH_3-групп (радикалы $R^{3'}$ и $R^{5'}$) с приблизительно равной частотой 1480 см$^{-1}$; для пеларгонидина — деформационные ножничные колебания водорода OH-группы (радикал $R^{4'}$) с частотой 1197 см$^{-1}$.

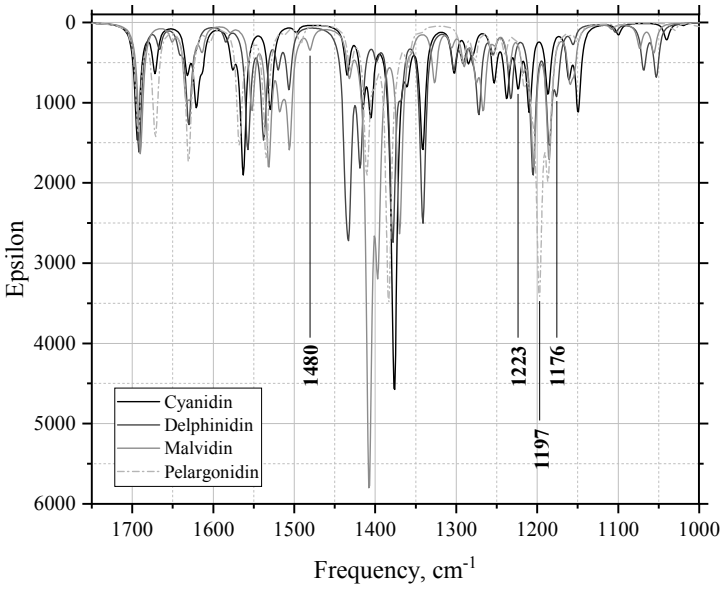

Рис. 2. Теоретические ИК-спектры

Fig. 2. Theoretical IR spectra

Подтверждение нашим рассуждениям можно найти при анализе конкретных графиков зависимости частоты от относительного показателя интенсивности и выделении пиков теоретических спектров данных веществ. На рис. 2 указаны пики с ранее упомянутыми частотами.

Несложно заметить, что данные пики соответствуют двум важнейшим требованиям к качественным на вещество пикам — это достаточно высокая интенсивность, которая позволяет данному пику не перекрываться остальными, а также индивидуальность частоты, то есть отсутствие любого другого пика, даже небольшого, на этой же частоте.

Вновь упомянем, что данные спектры получаются при исследовании колебаний функциональных групп, входящих в состав молекулы, лишь в рамках математической модели. Погрешность измерений тем ниже, чем выше количество рассчитываемых гауссовых орбиталей на каждый энергетический уровень электрона. В рамках квантовой модели DFT/RB3LYP/6-31G(d,p) погрешность пика интенсивности составляет порядка 15 см$^{-1}$ в зависимости от полученного результата оптимизации геометрии молекулы [11].

2. Результаты эксперимента и их обсуждение

Экспериментальные исследования проводились на ИК-Фурье-спектрометре Frontier фирмы Perkin Elmer в диапазоне 1000–1750 см$^{-1}$. Инфракрасные спектры были сняты на приставке нарушенного полного внутреннего отражения, разрешение прибора — 4 см$^{-1}$, режим — 32 scan. Максимальное отклонение частоты рассматриваемого пика по абсолютной величине составляет 30 см$^{-1}$.

Экспериментальный ИК-спектр плода граната обыкновенного сорта Нар-Ширин приведён на рис. 3.

На приведённом спектре можно заметить наличие пика пропускания на частоте 1176 см$^{-1}$, что говорит о наличии в гранате дельфинидина, а также на частоте 1240 см$^{-1}$, что говорит о наличии цианидина, с учётом погрешности измерений спектрометра. Пики на характерных для остальных антоцианов частотах отсутствуют. Подтверждением наличия цианидина является красный окрас плодов, качественный для данного антоциана. Для подтверждения предположения о наличии в плодах граната дельфинидина приметим в теоретических ИК-спектрах (рис. 2) пики с наибольшей интенсивностью — 1139, 1366 и 1419 см$^{-1}$ — и проанализируем экспериментальный спектр на наличие тех же пиков.

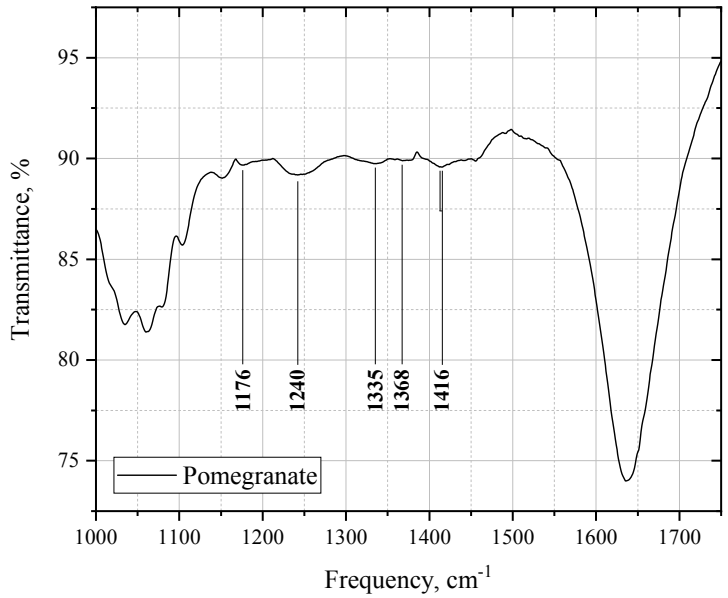

Рис. 3. Экспериментальный ИК-спектр плода граната обыкновенного

Fig. 3. Experimental IR spectrum of common pomegranate fruit

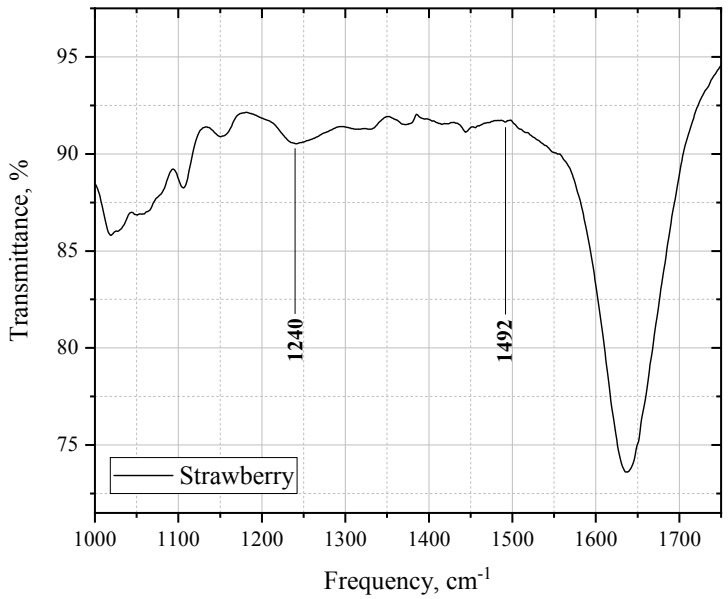

Рис. 4. Экспериментальный ИК-спектр плода клубники

Fig. 4. Experimental IR spectrum of strawberry fruit

На экспериментальном спектре были обнаружены пики пропускания на частотах 1135, 1368 и 1416 см$^{-1}$, что отмечено на рис. 3. Также можно заметить характерное расщепление пика на 1416 см$^{-1}$ на две компоненты, одна из которых обладает меньшей интенсивностью, чем другая. Таким образом, можно сказать, что данный метод является достоверным для определения наличия в составе продукта того или иного антоциана.

Экспериментальный ИК-спектр плода клубники сорта Вима Занта приведён на рис. 4.

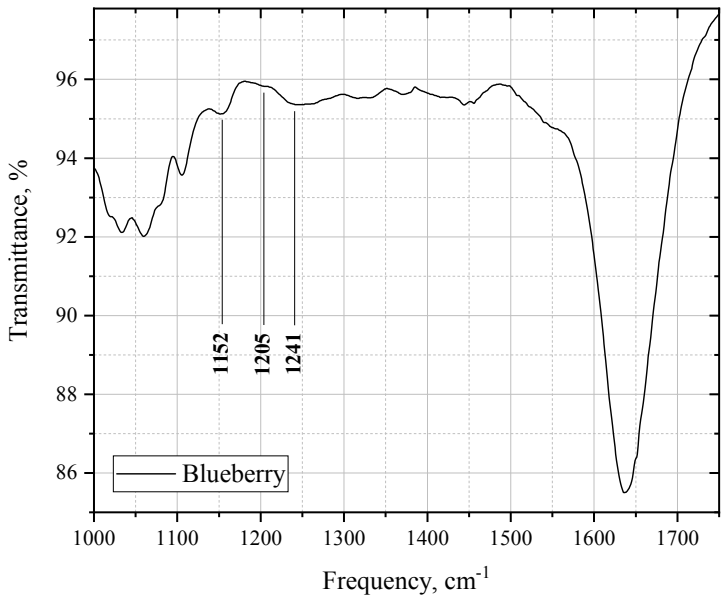

Рис. 5. Экспериментальный ИК-спектр плода голубики обыкновенной

Fig. 5. Experimental IR spectrum of blueberry fruit

На данном ИК-спектре из характерных можно обнаружить пики на 1240 и 1492 см$^{-1}$, что говорит о наличии в плодах клубники цианидина и мальвидина соответственно. Большая интегральная интенсивность пика на 1240 см$^{-1}$ говорит о содержании в продукте достаточно высокой концентрации цианидина относительно мальвидина.

Экспериментальный ИК-спектр плода голубики обыкновенной сорта Дрейпер приведён на рис. 5.

На приведённом спектре было обнаружено три характерных пика на частотах 1152, 1205 и 1241 см$^{-1}$. Это говорит о наличии в плодах голубики дельфинидина, цианидина и пеларгонидина. Стоит отметить, что интегральная интенсивность пика на частоте 1205 см$^{-1}$, соответствующего пеларгонидину, крайне мала, что говорит о малой концентрации данного антоциана в плодах. Интенсивность пика, соответствующего цианидину, меньше всех остальных рассматриваемых в данной работе образцов, что визуально подтверждается отсутствием цветов красных оттенков в плодах голубики. Относительное содержание дельфинидина велико.

Экспериментальный ИК-спектр луковицы лука репчатого сорта Салатный красный приведён на рис. 6.

По экспериментальному ИК-спектру было определено, что репчатый лук красного окраса является источником цианидина, дельфинидина и мальвидина. При этом можно заметить, что содержание мальвидина в красном луке больше, нежели в других образцах, судя по интегральной интенсивности пика на 1493 см$^{-1}$.

Экспериментальный ИК-спектр листа кочана капусты краснокочанной сорта Калибос приведён на рис. 7.

Проведя аналогичный анализ, можно понять, что в краснокочанной капусте содержатся в относительно больших концентрациях цианидин и дельфинидин, а также присутсвует мальвидин, уже в сравнительно меньшних концентрациях.

Заключение

В ходе теоретических расчётов ИК-спектров структурно-динамических моделей молекул антоциан в рамках квантовой модели DFT/RB3LYP/6-31G(d,p) удалось определить качественные пики интенсивности для наиболее распространённых в природе антоцианов: цианидин —

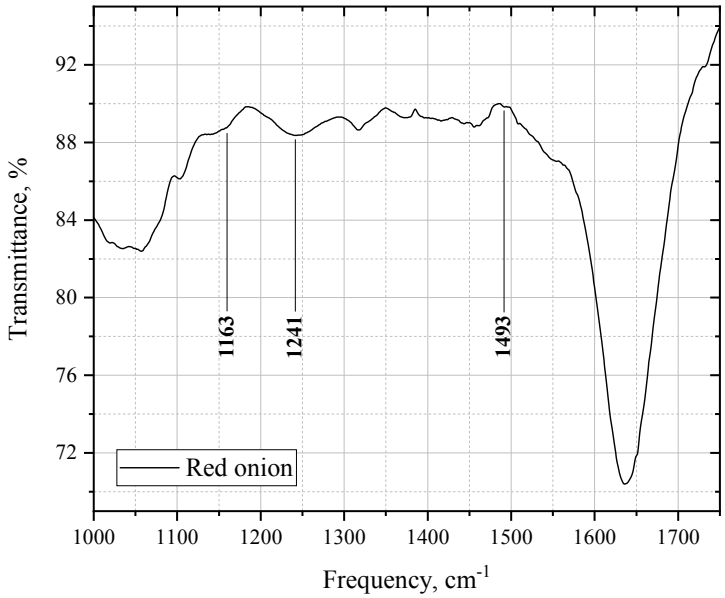

Рис. 6. Экспериментальный ИК-спектр луковицы красного лука

Fig. 6. Experimental IR spectrum of a red onion bulb

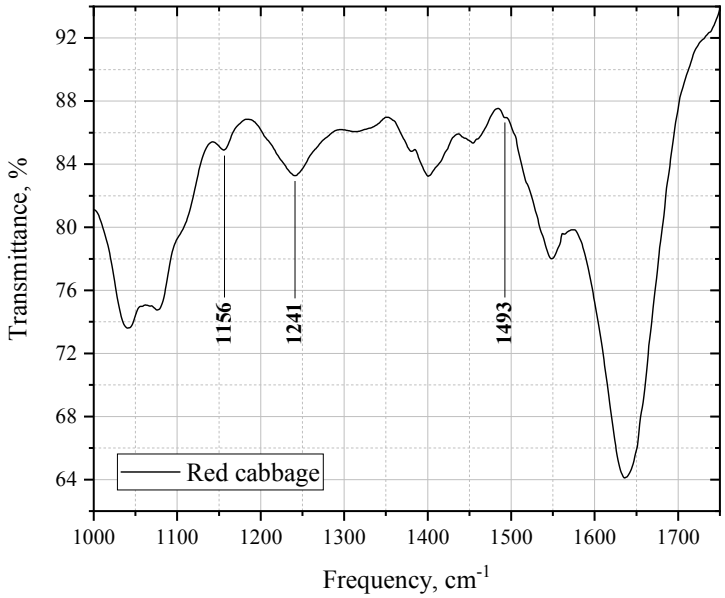

Рис. 7. Экспериментальный ИК-спектр листа кочана краснокочанной капусты

Fig. 7. Experimental IR spectrum of a red cabbage head leaf

1223 см$^{-1}$, дельфинидин — 1176 см$^{-1}$, мальвидин — 1480 см$^{-1}$, пеларгонидин — 1197 см$^{-1}$. Благодаря выделенным характерным полосам, а также по экспериментально полученным ИК-спектрам было обнаружено, что цианидин в относительно больших концентрациях содержится в плодах граната обыкновенного (*Punica granatum*) сорта Нар-Ширин, клубники (*Fragaria viridis*) сорта Вима Занта, голубики обыкновенной (*Vaccinium uliginosum*) сорта Дрейпер, в луковице лука репчатого (*Allium cepa*) сорта Салатный красный и в листьях кочана капусты краснокочанной (*Brassica oleracea*) сорта Калибос. Источниками дельфинидина

являются, согласно ранее приведённой таксономии, гранат, голубика, красный лук и краснокочанная капуста; источниками мальвидина — клубника, красный лук и краснокочанная капуста; а источником пеларгонидина — голубика. Полученные в ходе исследования методами инфракрасной спектроскопии результаты имеют широкие возможности апробации и внедрения в пищевую и фармацевтическую промышленности.

Литература [References]

1. Węglińska, M., Szostak, R., Kita, A., Nemś, A., Mazurek, S., Determination of nutritional parameters of bee pollen by Raman and infrared spectroscopy. *Talanta*, 2020, vol. 212, p. 120790. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.120790
2. Liu, N., Cheng, S., Wang, X., Li, Z., Zheng, L., Lyu, Ya., Ao, X., Wu, H., Characterization of microplastics in the septic tank via laser direct infrared spectroscopy. *Water Research*, 2022, vol. 226, p. 119293. DOI: 10.1016/j.watres.2022.119293
3. Zhuang, J., Li, M., Pu, Y., Ragauskas, A.J., Yoo, C.G., Observation of Potential Contaminants in Processed Biomass Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Appl. Sci.*, 2020, vol. 10, no. 12, p. 4345. DOI: 10.3390/app10124345
4. Веснин, В.Л., Мурадов, В.Г., Применение инфракрасной спектроскопии для анализа углеводородных смесей. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*, 2014, т. 16, № 4, с. 63–68. [Vesnin, V.L., Muradov, V.G., Application of infrared spectroscopy for the analysis of hydrocarbon mixtures. *Izvestiya samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk = Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2014, vol. 16, no. 4, p. 63–68. (in Russian)]
5. Неханов, Д.В., Котов, В.В., Стекольников, К.Е., Селеменев, В.Ф., Карпов, С.И., Лукин, А.Н., Определение состава препаратов гуминовых кислот различной чистоты методами спектроскопии. *Сорбционные и хроматографические процессы*, 2009, т. 9, № 5, с. 665–670. [Nekhanov, D.V. Kotov, V.V., Stekolnikov, K.E., Selemenev, V.F., Karpov, S.I., Lukin, A.N., Determination of the composition of humic acid preparations of various purity by spectroscopy methods. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy = Sorption and Chromatography Processes*, 2009, vol. 9, no. 5, p. 665–670. (in Russian)]
6. Barth, A., Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Bioenergetics*, 2007, vol. 1767, no. 9, p. 1073–1101. DOI: 10.1016/j.bbabio.2007.06.004
7. Halbwirth, H., The Creation and Physiological Relevance of Divergent Hydroxylation Patterns in the Flavonoid Pathway. *International journal of molecular sciences*, 2010, vol. 11, no. 2, p. 595–621. DOI: 10.3390/ijms11020595
8. Alappat, B., Alappat, J., Anthocyanin Pigments: Beyond Aesthetics. *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 23, p. 5500. DOI: 10.3390/molecules25235500
9. Московская глазная клиника (дата обращения 27.05.2023) [Moscow eye clinic (accessed 27.05.2023)]. URL: https://mgkl.ru/patient/aptechka/antozian-forte
10. Tena, N., Martín, J., Asuero, A.G., State of the Art of Anthocyanins: Antioxidant Activity, Sources, Bioavailability, and Therapeutic Effect in Human Health. *Antioxidants*, 2020, vol. 9, no. 5, p. 451. DOI: 10.3390/antiox9050451
11. Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H.P., Izmaylov, A.F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J.L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, Jr., J.A., Peralta, J.E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J.J., Brothers, E., Kudin, K.N., Staroverov, V.N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J.C., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J.M., Klene, M., Knox, J.E., Cross, J.B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R.E., Yazyev, O., Austin, A.J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J.W., Martin, R.L., Morokuma, K., Zakrzewski, V.G., Voth, G.A., Salvador, P., Dannenberg, J.J., Dapprich, S., Daniels, A.D., Farkas, O., Foresman, J.B., Ortiz, J.V., Cioslowski, J., Fox, D.J., *Gaussian 09, Revision A.02*. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.