



ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES ANTHOCYANES DANS DES PRODUITS NATURELS

Constanta Sava¹, Rodica Sirbu², Cristina Dumitrescu³

¹Université «Ovidius», Faculté de Médecine Dentaire et Pharmacie;
Département de Chimie Analytique, Constanta, Roumanie

E-mail cta@tonka.ro

²Université «Ovidius», Faculté de Médecine Dentaire et Pharmacie;
Département de Chimie Physique, Constanta, Roumanie

E-mail sirbu@alpha.rmri.ro

³Institut de l'Igiene et de la Sante Publique, Bucuresti, Roumanie

E-mail iispv@b.astral.ro

Abstract: The objective of the research was the extraction of anthocyanes from natural products using several specific solvents. The study was necessary due to the fact that many works reported the benefit effect of these antioxidant compounds on the human health. Much more, there is a growing interest for replacing synthetic colorants with natural pigments, the anthocyanes being second to none, due to their live and various colors, combined with their protective effect [1].

Keywords: *anthocyanine, natural antioxidants, Hibiscus rosa-sinensis, Paeoniae officinalis*

INTRODUCTION

Les **anthocyanes** ou **anthocyanines** (du grec anthos = fleur, kyáneos = pourpre) sont des pigments naturels solubles dans l'eau allant tout les couleur du rouge au bleu. Les anthocyanes apparaissent principalement dans les fruits mais aussi dans les feuilles et

les racines. Elles sont principalement localisées dans les cellules des couches extérieures tel que l'épiderme. Les quantités sont assez importantes: un kg de mûres en contient par exemple 1,15 g, les légumes rouges et noirs en contiennent environ 20 mg/g. Environ 2 % de tous les hydrocarbures fixés par la photosynthèse sont transformés en flavonoïdes et leurs dérivés tels que les anthocyanes. Ce qui fait environ 10 milliards de tonnes par an [2].

Les anthocyanes sont des pigments présents uniquement dans le cytoplasme des plantes terrestres mais absents des plantes aquatiques et des animaux. En effet, la biosynthèse des anthocyanes nécessite des éléments chimiques de base dérivés de la photosynthèse. Toutes les plantes terrestres ne contiennent pas d'anthocyane. Chez les Caryophyllales, les Cactus et les Galium, ils sont remplacés par les bêtacyanines [3].

Les anthocyanines sont caractérisées par leurs propriétés antioxydants favorables à la santé et notamment contre le vieillissement cellulaire. Toutefois, il faut noter que la majorité des antioxydants (et d'autres éléments intéressants comme les vitamines par exemple) sont localisés dans la peau du fruit. Les anthocyanines permettent aux plantes de se protéger des radiations ultraviolettes [4].

Une attention accrue a été portée sur le rôle des radicaux libres et autres oxydants, puis dans les mécanismes d'action de plusieurs phytotoxines et leur implication dans la plupart des maladies chroniques (cancers, maladie de Parkinson, arthrite, artériosclérose, etc.). Une des hypothèses émises est que les mécanismes de défense diminuent avec l'âge et de ce fait la neutralisation de ces radicaux libres devient moins efficace [21].

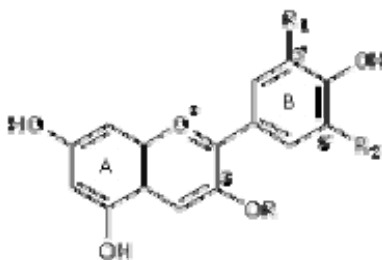


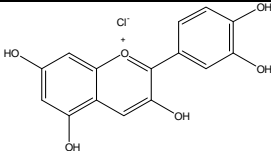
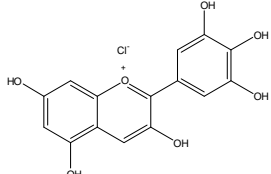
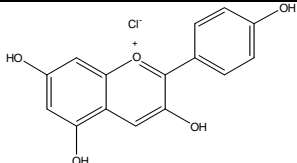
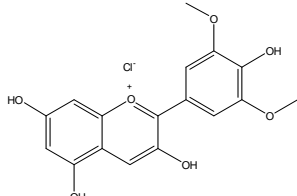
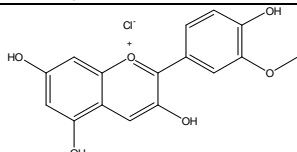
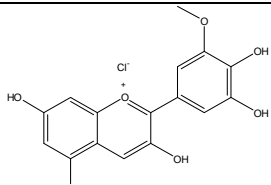
Figure 1. Structures chimiques d'anthocyanes.

Il a été démontré que les peuples utilisant une alimentation riche en antioxydants sont moins exposés à des maladies cardiovasculaires [20] ou à certaines formes de cancer. De ce fait, l'ingestion de polyphénols peut aider à la prévention de certaines maladies [2].

Leur structure de base est caractérisée par un noyau flavone généralement glucosylé en position C-3 (Figure 1). Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation (Tableau 1), par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment.

Beaucoup d'espèces présentent des teneurs importantes en anthocyanes diglucosylées en position C-3' et C-5' (Figure 1). L'espèce *Vitis vinifera*, par exemple se caractérise par la présence majoritaire de 3-monoglucosides d'anthocyanidines, en particulier de la malvidine 3-O-glucoside et de ses dérivés acylés [5].

Tableau 1. Structures chimiques de quelques anthocyanidines

No.	Anthocyanidine Formule moléculaire Masse molaire	Structure
1	Cyanidine $C_{15}H_{11}ClO_6$ 322,701	
2	Delphinidine $C_{15}H_{11}ClO_7$ 338,701	
3	Pélargonidine $C_{15}H_{11}ClO_5$ 306,702	
4	Malvidine $C_{17}H_{15}ClO_7$ 366,754	
5	Péonidine $C_{16}H_{13}ClO_6$ 336,728	
6	Pétunidine $C_{16}H_{13}ClO_7$ 352,728	

Le pH est un facteur important dans le changement de couleur des anthocyanes. La forme flavylium, de couleur rouge, est stable en milieu acide et se transforme, en milieu basique, soit en base carabinol (incolore), en chalcone (jaune) ou base quinonique (bleue). Pour la malvidine-3-*O*-glucoside, la forme hémiacétal (AOH) est largement majoritaire (Figure 2). Toutefois, le cation flavylium est en quantité suffisante pour que sa couleur rouge prédomine.

MATERIAUX ET METHODES D'ANALYSE

Instruments et appareils

Les anthocyanines totales ont été déterminé a l'aide d'un spectromètre d'absorption moléculaire GBC CINTRA10e caractérisé par la longueur d'onde 190-1200 nm, la

bande spectrale 0,2 - 1 nm, le chemin optique 10 mm; mode opératoire: absorbance, transmittance, reflectance; application: exploration du spectre, analyse quantitative, analyse de la couleur, cinétique enzymatique.

Les échantillons ont été pesés à l'aide d'une balance Mettler Toledo.

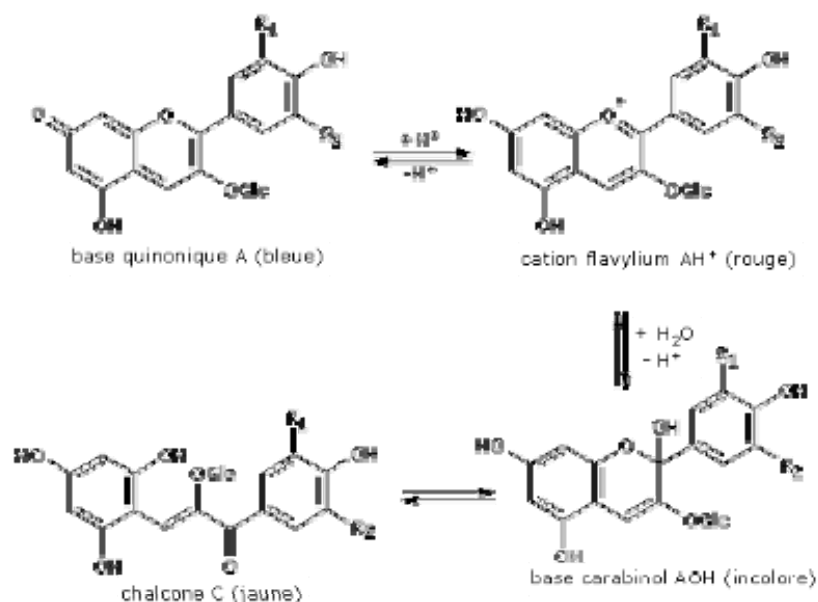


Figure 2. Transformation de la structure de la malvidine-3-O-glucoside en milieu aqueux fonction du pH

Réactifs

Les réactifs, les solvants organiques utilisés pour la solubilisation, dilution et extraction sont de pureté analytique. La pureté de l'eau distillée a été vérifiée en mesurant la conductance.

Echantillons

Les produits végétales analysés ont été: les fleurs de *Hibiscus rosa-sinensis* (Malvaceae) et *Paeonia officinalis* (Paeoniaceae), les fruits de *Rosa canina*, *Rubus idaeus* (Rosaceae) et *Sambucus nigra*. Les produits végétales analysés ont été: les fleurs de *Hibiscus rosa-sinensis* (Malvaceae) et, *Paeonia officinalis* (Paeoniaceae), les fruits de *Rosa canina* et *Rubus idaeus* (Rosaceae) et aussi les fruits des *Sambucus nigra*. Dans cette étude sont présenté les résultats obtenus par l'analyse de fleurs de *Hibiscus rosa-sinensis* (Malvaceae) versus les autres.

Méthodes

Ont a été analysé les solutions extractives obtenues en utilisant deux solvants différents et trois méthodes spectrométrique d'analyse.

Les solvants utilisés sont:

Solvant 1: acide formique 3 % aq. / méthanol = 1/1 (pH = 2)

Solvant 2: acide citrique 0,1 M / éthanol 20 % (pH = 3)

Les produits végétales fleurs de *Hibiscus rosa-sinensis* provenant de Chine et Egypte ont été séchés et après le broyage dans un mortier, pesés exactement au balance

analytique. L'extraction a été réalisée par macération 18 h à la température de la chambre, à faible lumière.

Les solutions extractives obtenues ont été analysées par la méthode spectrophotométrique différentiateur de pH, la méthode substrative et le rapport des absorbances [6]. La spectrophotométrie a été appliquée aussi pour l'analyse de la couleur par la méthode validée de Commission Internationale d'Eclairage.

La méthode spectrophotométrique différentiateur de pH

Les anthocyanes se transforment reversiblement sous l'influence du pH. Le changement structural associé avec la modification des chromophores détermine la couleur différente des solutions des anthocyanes fonction du pH (Figure 2).

La méthode spectrophotométrique différentiateur de pH est basée sur la détermination de l'absorbance des solutions extractives diluées avec des solutions tampon de pH = 1 et de pH = 4,5 à une seule longueur d'onde ($\lambda_{vis-max}$). Pour cette raison, l'analyse a parcouru quelques étapes. Cette différence correspond aux anthocyanes monomères, non condensés.

1. On a préparé deux séries de solutions: une, par dilution l'extrait avec solution tampon pH = 1 (KCl/HCl), l'autre, par dilution l'extrait avec solution tampon pH = 4,5 (H₃C-COOH/H₃C-COONa). Pour obtenir le pH nécessaire, la solution tampon doit être en excès vers la solution d'analyse.

2. On a étudié le spectre d'absorption pour les deux séries des solutions dans le domaine visible (300-750 nm) pour identifier $\lambda_{vis-max}$ et la dilution optimale.

3. On a mesuré l'absorbance de chaque solution à $\lambda_{vis-max}$ et à 700 nm, dans un intervalle de 15-60 min de la préparation parce que les anthocyanes sont instable.

4. On a calculé l'absorbance des solutions diluées:

$$A = (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700})_{pH\ 4.5} \quad (1)$$

5. On a calculé le contenu total en anthocyanes à partir de la loi d'absorption Lambert-Beer, pour une cuvette de 1 cm:

$$A = C * a = C * \frac{\epsilon}{M} \quad (2)$$

$$C = A * \frac{M}{\epsilon} \quad (3)$$

$$C_{\text{echantillon}} \% = A * \frac{M}{\epsilon} * F * \frac{V_s * 10^{-3}}{m_{\text{echantillon}}} * 100 \dots \dots \dots \frac{g.\text{cyanidine-3-glucozyde}}{100 g.\text{produit}} \quad (4)$$

La signification des paramètres:

A – l'absorbance des solutions diluées (calculé dans l'étape 4) ; M – la masse molaire de l'anthocyane de la quelle on exprime le contenu (M = 485 g/mol pour cyanidin-3-glucoside); ϵ – l'absorptivité molaire pour cyanidine-3-glucozyde ($\epsilon = 25,740 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 520 nm) [6]; F – facteur de dilution; $m_{\text{echantillon}}$ – la masse de produit végétal séché (g) ; V_s – le volume de la solution obtenue par l'extraction (100 mL); 10^{-3} – transforme mL en L pour l'homogénéité de la relation ; 100 – multiplié pour calculé le contenu total en anthocyanidine exprimé en g cyanidine-3-glucozyde par 100 g produit végétal.

Remplacent les valeurs constantes:

$$C_{\text{echantillon}} \% = A \cdot \frac{485 \text{ g/mol}}{25.740 \text{ L/(mol} \cdot \text{cm)}} \cdot F \cdot \frac{100 \text{ mL} \cdot 10^{-3}}{m_{\text{echantillon}}} \cdot 100 \dots \frac{\text{g cyanidine-3-glucoside}}{100 \text{ g produit}}$$

$$C_{\text{echantillon}} \% = 0,1884 \cdot \frac{A \cdot F}{m_{\text{echantillon}}} \dots \frac{\text{g cyanidine-3-glucoside}}{100 \text{ g produit}} \quad (5)$$

La méthode du rapport des absorbances

Le rapport entre l'absorbance a 420 nm et 520 nm est une méthode de quantifié les anthocyanes dans un échantillon de produit végétales. On a diminué les valeurs d'absorbance a 420 nm et 520 nm avec la valeur d'absorbance a 700 nm pour eliminer les composé interférant. Le plus grand est le rapport, le moins est le contenue en anthocyanes non transformés.

$$\Delta A = \frac{A_{420\text{nm}} - A_{700\text{nm}}}{A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}}} \quad (6)$$

Le principe de la **méthode spectrophotométrique de substruction** est basé sur la détermination de l'absorbance des solutions extractives diluées avec une solution tampon de pH = 3 à deux longueurs d'onde ($\lambda_{\text{vis-max}}$ et 420 nm) avant et après la décoloration avec le methabisulfite. Cette méthode est utile pour déterminée la stabilité des anthocyanes exprimé par la valeur d'indice de dégradation. Pour cette raison, l'analyse a parcourue quelques étapes.

1. On a préparé quelques solutions par dilution de l'extrait avec la solution tampon pH = 3 (KCl/HCl). Pour obtenir le pH nécessaire la solution tampon doit être en excès vers la solution d'analyse.
2. On a préparé deux séries de solutions: une par dilution les solutions précédents avec l'eau distillé (solution de comparaison), l'autre par addition de la même volume de solution de methabisulfite (200 mg/mL aq.). Touts le solutions restes en repos 15 min.
3. On a mesuré l'absorbance de chaque solution a 420 nm, $\lambda_{\text{vis-max}}$ et a 700 nm dans un intervalle de 1 h de la préparation.
4. On a calculé la densité de la couleur (DC) de la solution de comparaison (dilué avec l'eau distillée)

$$\text{Densité de la couleur} = [(A_{420 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) + (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700 \text{ nm}})] \times F \quad (7)$$

5. On a calculé la couleur polymérique (CP) de la solution traité avec solution de methabisulfite:

$$\text{Couleur polymérique} = [(A_{420 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) + (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700 \text{ nm}})] \times F \quad (8)$$

6. On a calculé l'indice de dégradation pourcent:

$$\text{Indice de dégradation, \%} = \frac{\text{Couleur polymérique}}{\text{Densité de la couleur}} \cdot 100 \quad (9)$$

$$ID, \% = \frac{CP}{DC} \cdot 100 \quad (10)$$

Analyse de la couleur est basé sur le système élaboré en 1931 de Commission International d'Eclairage (CIE). Cet model a défini mathématique un system tricoordonné nommé "les valeurs X, Y, Z tristimulus". Cette valeurs faits les corrélations entre la

source de la lumière, l'observateur précisé et la géométrie de l'illumination. Les valeurs tristimulus X, Y, Z se déterminent en mesurant la transmittance T d'un échantillon dans l'intervalle 380-780 nm. Les coordonnées trichromatiques x, y, z représentent le rapport entre les valeurs tristimulus X, Y, Z et leurs somme. Le plus usuel est le système CIE L*a*b*, ou:

L est la luminosité, le domaine du blanc a noir. Quand L = 100 s'est le blanc et quand L = 0 s'est noir;

*a est le domaine du rouge aux verte. Quand *a = +100 s'est rouge, et quand *a = - 100 s'est verte;

*b est le domaine du jaune au bleu. Quand *b = +100 s'est jaune et quand *b = -100 s'est bleu.

La nuance et la couleur peut être exprimer dans les termes *a et *b.

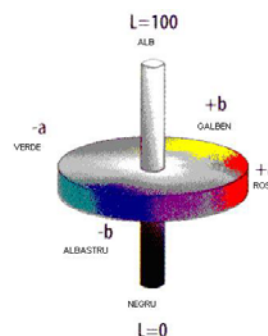


Figure 3. Le système CIE L*a*b* pour l'analyse de la couleur

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les dates expérimentales ont été dirigé pour exprimer le contenu total en anthocyanes et la stabilité des composants obtenue par l'extraction.

Tableau 2. L'extraction des anthocyanes

Solvant	Produit végétal PV	Code	Masse g	V _s mL	Concentration mg PV/mL
Acide formique 3 % aq./méthanol = 1/1 (pH = 2)	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Chine	HCH	5,0805	100	50,805
	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Egypte	HEG	5,0402	100	50,402
Acide citrique 0,1M/éthanol 20 % (pH = 3)	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Chine	HCH	4,9939	100	49,939
	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Egypte	HEG	4,9895	100	49,895



Figure 4. Les fleurs rouges de *Hibiscus rosa-sinensis*



Figure 5. Les fleurs séché de *Hibiscus rosa-sinensis*

L'étude spectrophotométrique des solutions extractives de anthocyanes dans des fleurs de Hibiscus Chine et Hibiscus Egypte avec le solvant acide formique 3% aq./méthanol = 1/1 (pH = 2) par la méthode spectrophotométrique différentiateur de pH

On a préparé par dilution de l'extraits avec des solutions tampons de pH = 1 et pH = 4,5 deux séries des solutions avec le même facteur de dilution $F = 20; 10; 6,66; 5$. Dans un intervalle de 1 h on a mesuré l'absorbance de chaque solution à 520 nm et 700 nm. La différence s'utilise pour calculer le contenue en anthocyanes exprimés en cyanidine-3-glucoside conformément à relation (4).

Les spectres d'absorption des solutions étalon préparés par dilution avec la solution tampon pH = 1 (Tableau 3) dans les Figure 6 et Figure 7 présentent des bandes d'absorption en VIS ayant le maximum a 520 nm ($\lambda_{vis-max}$), prouvent la présence des anthocyanes dans la solution extractive obtenue dans des fleurs de *Hibiscus* Chine et *Hibiscus* Egypte. Les spectres ne s'entrecroisent pas du tout, le mélange des anthocyanes ayant homogène.

Tableau 3. La préparation des solutions étalons par dilution de l'extrait de *Hibiscus* Chine (HCH) et *Hibiscus* Egypte (HEG) avec la solution tampon pH = 1 et les valeurs des absorbances a 520 et 700 nm

Code	$V_{S,tampon}$ pH = 1 mL	$V_{i,filtrat}$ mL	$V_{S,final}$ mL	C_f mg/mL	F V_f/V_i	A_{520nm}	A_{700nm}	$\Delta A_{pH=1}$ $A_{520nm} - A_{700nm}$
HCH1101	9,50	0,50	10	2,5402	20/1	0,5815	0,0438	0,5377
HCH1102	9,00	1,00	10	5,0805	20/2	1,1345	0,0454	1,0891
HCH1103	8,50	1,50	10	7,6283	20/3	1,6702	0,0436	1,6266
HCH1104	8,00	2,00	10	10,161	20/4	2,2086	0,0494	2,1592
HEG1101	9,50	0,50	10	2,5201	20/1	0,4296	0,0398	0,3898
HEG1102	9,00	1,00	10	5,0402	20/2	0,8238	0,0442	0,7796
HEG1103	8,50	1,50	10	7,5679	20/3	1,2154	0,0490	1,1664
HEG1104	8,00	2,00	10	10,080	20/4	1,5775	0,0491	1,5284

Tableau 4. La préparation des solutions étalons par dilution de l'extrait de *Hibiscus* Chine (HCH) et *Hibiscus* Egypte (HEG) avec la solution tampon pH = 4,5 et les valeurs des absorbances a 520 et 700 nm

Code	$V_{S,tampon}$ pH = 4,5 mL	$V_{i,filtrat}$ mL	$V_{S,final}$ mL	C_f mg/mL	F V_f/V_i	A_{520nm}	A_{700nm}	$\Delta A_{pH=4,5}$ $A_{520nm} - A_{700nm}$
HCH1401	9,50	0,50	10	2,5402	20/1	0,1420	0,0549	0,0871
HCH1402	9,00	1,00	10	5,0805	20/2	0,2009	0,0546	0,1463
HCH1403	8,50	1,50	10	7,6283	20/3	0,3061	0,0613	0,2448
HCH1404	8,00	2,00	10	10,161	20/4	0,3726	0,0615	0,3726
HEG1401	9,50	0,50	10	2,5201	20/1	0,1074	0,0499	0,0575
HEG1402	9,00	1,00	10	5,0402	20/2	0,1751	0,0568	0,1183
HEG1403	8,50	1,50	10	7,5679	20/3	0,2399	0,0626	0,1773
HEG1404	8,00	2,00	10	10,080	20/4	0,3003	0,0658	0,2345

Tableau 5. Le contenue en anthocyanes des échantillons analysés de *Hibiscus* Chine et *Hibiscus* Egypte, solvant acide formique 3 % aq./méthanol = 1/1 (pH = 2)

Code	Code	F	A = $\Delta A_{pH=1} -$ $\Delta A_{pH=4,5}$	C ₁ = 18,84.A.F mg/L	C ₂ = C ₁ /10 mg/100 mL	C ₃ = C ₂ /m _{pv} .100 mg/100 g pv	C ₄ = C ₃ .10 ⁻³ /10 ⁻¹ g/kg pv
HCH1101	HCH1401	20/1	0,4506	169,786	17,372	341,93	3,42
HCH1102	HCH1402	20/2	0,9428	177,623			
HCH1103	HCH1403	20/3	1,3818	173,380			
HCH1104	HCH1404	20/4	1,8481	174,091			
HEG1101	HEG1401	20/1	0,3323	125,211	12,395	245,92	2,46
HEG1102	HEG1402	20/2	0,6613	124,589			
HEG1103	HEG1403	20/3	0,9891	124,107			
HEG1104	HEG1404	20/4	1,2939	121,885			

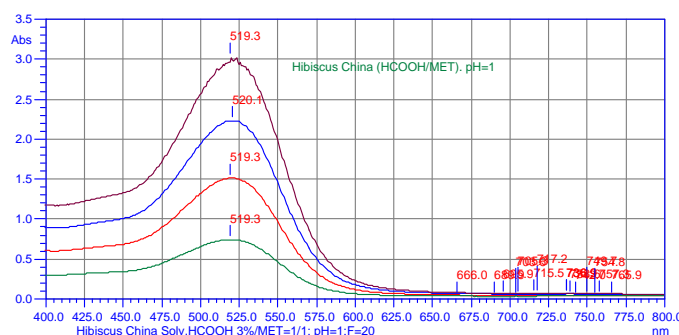


Figure 6. Les spectres d'absorption des solutions étalons préparés par dilution avec la solution tampon (pH = 1) de l'extrait de *Hibiscus* Chine, dans l'intervalle 400-800 nm

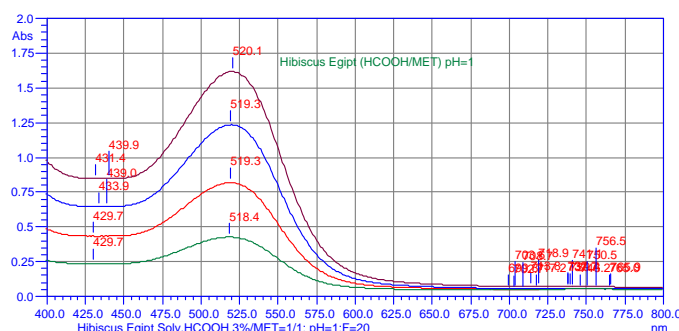


Figure 7. Les spectres d'absorption des solutions étalons préparés par dilution avec la solution tampon (pH = 1) de l'extrait de *Hibiscus* Egypte, dans l'intervalle 400-800 nm

Les spectres d'absorption des solutions étalons préparés par dilution avec la solution tampon pH = 4,5 (Tableau 4) dans les Figure 8 et Figure 9 présentent aussi des bandes d'absorption en VIS, mais l'absorbance est diminuée à cause de la transformation chimique illustrée dans la Figure 2, déterminée du changement du pH.

Les spectres superposés des extraits (solvant acide formique 3% aq./méthanol = 1/1) obtenues dans des fleurs de *Hibiscus* Chine et *Hibiscus* Egypte, dilués avec des solutions tampon pH = 1 et pH = 4,5 s'entrecroisent et prouvent la présence en solutions de deux espèces chimiques de la même composé. La transformation structurale dépendant de

pH, (Figure 2) est spécifique pour les anthocyanes. Le changement du pH de 1 à 4,5 détermine la diminution majeure de l'absorption en VIS et le déplacement vers des longueur d'onde un peu plus long, associé avec le changement de la couleur rouge vivant vers le violet (Figure 10).

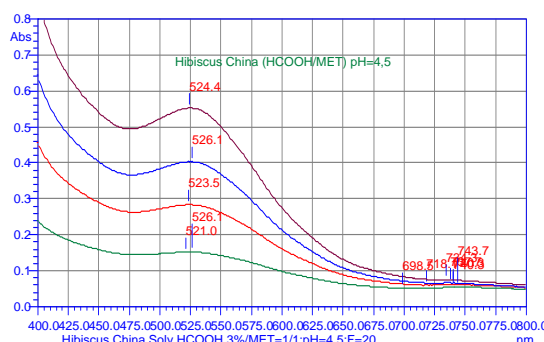


Figure 8. Les spectres d'absorption des solutions étalon préparés par dilution avec la solution tampon (pH = 4,5) de l'extrait de Hibiscus Chine, dans l'intervalle 400-800 nm

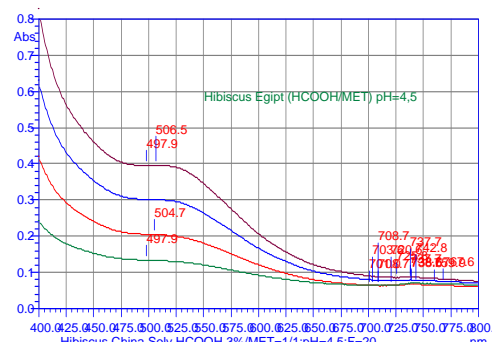


Figure 9. Les spectres d'absorption des solutions étalon préparés par dilution avec la solution tampon (pH = 4,5) de l'extrait de Hibiscus Egypte, dans l'intervalle 400-800 nm

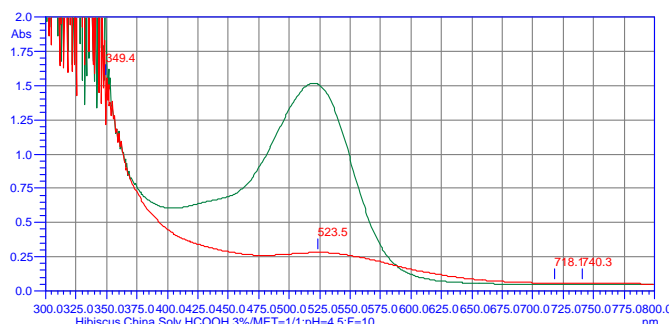


Figure 10. Les spectres d'absorption superposés des solutions étalons préparés par dilution avec la solution tampon pH = 1 et pH = 4,5 de l'extrait de Hibiscus Chine (F=10), dans l'intervalle 300-800 nm. L'intersection des spectres a 590 nm

L'étude spectrophotométrie des solutions extractives de anthocyanes dans des fleurs de Hibiscus Chine et Hibiscus Egypte avec le solvant acide citrique 0,1 M aq./éthanol (pH = 3) par la méthode spectrophotométrique différentiateur de pH
On a procédé de la même manière et avec les mêmes facteurs de dilution pour analyser l'extrait dans le solvant acide citrique 0,1 M aq./éthanol (pH = 3). Les résultats sont présentés dans le Tableau 6.

La méthode du rapport des absorbances

On a mesuré l'absorbance des solutions extractives dilués avec la même solution tampon pH = 1 a trois longueurs d'onde: 420 nm, $\lambda_{\text{vis-max}} = 520$ nm et 700 nm (Tableau 7). Le rapport entre l'absorbance a 420 nm (diminué avec la valeur d'absorbance a 700 nm pour éliminer les composés interférents) et sel a 520 nm (aussi diminué pour la même raison) exprime la prévalence des anthocyanes transformés versus les anthocyanes en forme de cation flavylum (relation 6).

Tableau 6. Le contenu en anthocyanes des échantillons analysés de *Hibiscus* Chine et *Hibiscus* Egypte, solvant acide citrique 0,1 M aq./éthanol (pH = 3)

Code	Code	F	A = $\Delta A_{pH=1}-$ $\Delta A_{pH=4,5}$	C ₁ = 18,84.A.F mg/L	C ₂ = C ₁ /10 mg/100 mL	C ₃ = C ₂ /m _{pv} .100 mg/100 g pv	C ₄ = C ₃ .10 ⁻³ / 10 ⁻¹ g/kg pv
HCH2101	HCH2401	20/1	0,4745	178,792	17,846	357,36	3,57
HCH2102	HCH2402	20/2	0,9738	183,464			
HCH2103	HCH2403	20/3	1,4010	175,789			
HCH2104	HCH2404	20/4	1,8665	175,824			
HEG2101	HEG2401	20/1	0,3348	126,153	12,371	247,94	2,48
HEG2102	HEG2402	20/2	0,6641	125,116			
HEG2103	HEG2403	20/3	0,9757	122,425			
HEG2104	HEG2404	20/4	1,2859	121,132			

Tableau 7. Les valeurs des absorbances de l'extraite de *Hibiscus* Chine et *Hibiscus* Egypte a 420, 520 et 700 nm solvant acide citrique 0,1 M aq./éthanol (pH = 3);
Dilution avec des solutions tampon pH = 1

Code	F	A _{420nm}	A _{520nm}	A _{700nm}	$\Delta A_1 =$ A ₄₂₀ - A ₇₀₀	$\Delta A_2 =$ A ₅₂₀ - A ₇₀₀	$\Delta A =$ $\Delta A_1/\Delta A_2$	ΔA_{moyen}
HCH2101	20/1	0,2568	0,5912	0,0389	0,2179	0,5523	0,3945	0,3944
HCH2102	20/2	0,4939	1,1823	0,0450	0,4489	1,1373	0,3947	
HCH2103	20/3	0,6937	1,6949	0,0446	0,6491	1,6503	0,3933	
HCH2104	20/4	0,9193	2,2537	0,0482	0,8711	2,2055	0,3950	
HEG2101	20/1	0,2184	0,4349	0,0397	0,1787	0,3952	0,4522	0,4508
HEG2102	20/2	0,3948	0,8324	0,0417	0,3531	0,7907	0,4465	
HEG2103	20/3	0,5695	1,2134	0,0418	0,5277	1,1716	0,4504	
HEG2104	20/4	0,7525	1,6003	0,0474	0,7051	1,5529	0,4540	

Le même rapport (relation 6) calculé pour les solutions extractives diluées avec des solutions tampons pH = 4,5 (Tableau 8) prouve le déplacement de l'équilibre à cause du changement du pH, transformation spécifique aux anthocyanes.

Tableau 8. Les valeurs des absorbances de l'extraite de *Hibiscus* Chine et *Hibiscus* Egypte a 420, 520 et 700 nm solvant acide citrique 0,1 M aq./éthanol (pH = 3);
Dilution avec des solutions tampon pH = 4,5

Code	F	A _{420nm}	A _{520nm}	A _{700nm}	$\Delta A_1 =$ A ₄₂₀ - A ₇₀₀	$\Delta A_2 =$ A ₅₂₀ - A ₇₀₀	$\Delta A =$ $\Delta A_1/\Delta A_2$	ΔA_{moyen}
HCH2401	20/1	0,1494	0,1200	0,0422	0,1072	0,0778	1,3779	1,3318
HCH2402	20/2	0,2730	0,2167	0,0532	0,2198	0,1635	1,3443	
HCH2403	20/3	0,3838	0,3056	0,0563	0,3275	0,2493	1,3137	
HCH2404	20/4	0,5011	0,4024	0,0634	0,4377	0,3390	1,2912	
HEG2401	20/1	0,1406	0,1017	0,0413	0,0993	0,0604	1,6440	1,5896
HEG2402	20/2	0,2509	0,1749	0,0483	0,2026	0,1266	1,6003	
HEG2403	20/3	0,3642	0,2527	0,0568	0,3074	0,1959	1,5692	
HEG2404	20/4	0,4722	0,3267	0,0597	0,4125	0,2670	1,5449	

La méthode spectrophotométrique de substruction

A l'aide de relation (7) on a calculé densité de la couleur qui exprime le contenu en anthocyanes des extraits dilués avec la solution tampon pH = 3,5 et l'eau distillée (Tableau 9). A l'aide des relations (8) - (10) on a calculé la couleur polymérique et l'indice de dégradation pour les extraits dilués avec la solution tampon pH=3,5 et traité avec la solution de methabisulfite (Tableau 10).

Tableau 9. Les valeurs de la densité de la couleur pour les solutions de comparaison (diluées avec l'eau distillée) de Hibiscus Chine (HCH) et Hibiscus Egypte (HEG)

Code	F	A _{420nm}	A _{520nm}	A _{700nm}	Densité de couleur (DC) = [(A ₄₂₀ -A ₇₀₀) + (A ₅₂₀ -A ₇₀₀)].F	DC moyenne
HCH3302	24	0,1520	0,2394	0,0371	7,613	7,881
HCH3303	16	0,2202	0,3659	0,0383	8,150	
HEG3302	24	0,1417	0,1925	0,0376	6,216	6,316
HEG3303	16	0,2007	0,2818	0,0407	6,417	

Tableau 10. Les valeurs de la couleur polymérique et l'indice de dégradation pour les solutions traité avec methabisulfite de Hibiscus Chine (HCH) et Hibiscus Egypte (HEG)

Code	F	A _{420nm}	A _{520nm}	A _{700nm}	Couleur polymérique CP[(A ₄₂₀ -A ₇₀₀) + (A ₅₂₀ -A ₇₀₀)].F	CP moyenne	Indice de dégradation % CP/DC*100
HCH4302	24	0,0932	0,0593	0,0411	1,687	1,640	20,81
HCH4303	16	0,1120	0,0634	0,0379	1,594		
HEG4302	24	0,0859	0,0501	0,0372	1,478	1,498	23,72
HEG4303	16	0,1119	0,0606	0,0388	1,518		

Analyse de la couleur

Source de la lumière D65, le nombre des observateurs standard 2°, $\lambda_{\text{explorée}} = 380-780$ nm. Les résultats sont présentés dans le Tableau 11.

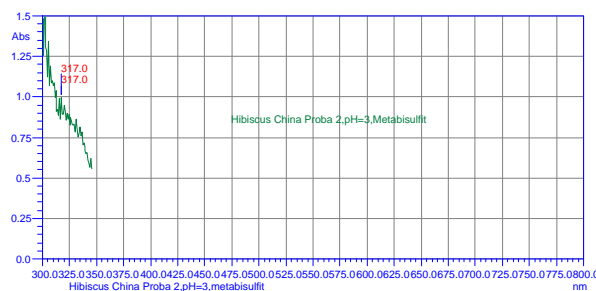


Figure 11. Le spectre d'absorption de la solution étalon de l'extrait de Hibiscus Chine (F = 24) préparé par dilution avec la solution tampon pH = 3,5 et traité avec la solution de methabisulfite, dans l'intervalle 300-800 nm

Tableau 11. Résultats de l'analyse de la couleur de l'extrait des fleurs *Hibiscus* Chine et Egypte

Analyse de la couleur			Solvant acide formique 3 % aq./méthanol = 1/1		Solvant éthanol 20 % /acide citrique 0,1 M	
Paramètres			HCH 1	HEG 1	HCH 2	HEG 2
1	Les valeurs tristimulus	X	7,580	12,190	9,253	11,740
2		Y	3,297	5,776	4,117	5,485
3		Z	0,005	0,040	0,007	0,039
4	Les coordonnants chromatiques	x	0,697	0,677	0,692	0,680
5		y	0,303	0,321	0,308	0,318
6		z	0,000	0,002	0,001	0,002
7	Les valeurs CIEL *a*b	L	21,194	28,839	24,054	28,074
8		*a	54,898	58,877	57,362	59,028
9		*b	36,453	49,144	41,351	47,833

CONCLUSIONS

Les dates d'analyse montre que les fleurs de *Hibiscus rosa-sinensis* Chine sont plus riches en anthocyanes que les fleurs de *Hibiscus rosa-sinensis* Egypte et les deux solvants testés ont donné des résultats comparables (Tableau 12).

Tableau 12. Les résultats de l'analyse spectrophotométrique des fleurs *Hibiscus*

Produit végétal	Solvant	Anthocyane mg/100 g pv	$\Delta A = \frac{A_{420nm} - A_{700nm}}{A_{520nm} - A_{700nm}}$	DC	ID %
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Chine	Acide formique 3 % aq./méthanol = 1/1	341,93	0,3944	7,881	20,81
	Acide citrique 0,1M aq./éthanol	357,36			
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Egypte	Acide formique 3 % aq./méthanol = 1/1	245,92	0,4508	6,316	23,72
	Acide citrique 0,1 M aq./éthanol	247,94			

Densité de la couleur et la stabilité des anthocyanes sont plus grand pour les fleurs de *Hibiscus rosa-sinensis* Chine que pour les fleurs de *Hibiscus rosa-sinensis* Egypte.

Les même méthodes appliqués pour l'analyse des anthocyanes des myrtilles (*Myrtillus fructus*)-fruits noir, ont démontré un contenu deux fois moins que les fleurs de *Hibiscus*, ce qui fait de cet fleurs une très bon source de anthocyanes. En plus, on doit ajouter que ce plant est bien connu en Roumanie comme plant ornementale dans les parcs et les jardins. Les fleurs de *Paeonia officinalis* analysés de la même manière ont démontré un contenu deux fois plus grand que les fleurs de *Hibiscus*, prouvant que les fleurs rouge représentent une source beaucoup plus riche en anthocyanes que les fruits.

La littérature de spécialité ne contient pas des dates en ce qui concerne les anthocyanes dans des fleurs de *Hibiscus rosa-sinensis* pour faire une comparaison entre différent espèces ou région de végétation.

Il y a plus que 200 anthocyanes connus, mais a cause de leurs instabilités il manque des substances en état pur. Pour cette raison les chercheurs ont élaborés des diverses

méthodes pour déterminé le contenue totales en anthocyanes [6], colorant naturel qui va remplacer les colorant de synthèse.



Figure 12. *Hibiscus rosa-sinensis* du jardin



Figure 13. *Paeoniae* flores

La richesse des fleurs *Hibiscus* en anthocyanes est beaucoup plus important a cause du contenu en β -carotène déterminé par la méthode chromatographique de haute performance (5,035 g/100 g produit végétal séché) [7].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Banque Internationale pour Reconstruction et Développement/Banque Mondiale: *Enrichir la vie en surmontant la malnutrition liée aux carences en vitamines et minéraux dans les pays en développement*, Washington DC, **1995**.
2. Clugston, G. Smith, T.: Global nutrition problems and novel foods, *Asia Pacific J. Clin. Nutr.*, **2002**.
3. Lacaille-Dubois, M.-A., Wagner, H.: Importance pharmacologique des dérivés phénoliques, *Acta Botanica Gallica*, **1996**, **143**(6), 555-62
4. <http://sylva.for.ulaval.ca/foret/coloration/>
5. Giusti, M.M., Rodriguez-Saona, L.E., Wrolstad, R.E.: Spectral characteristics, molar absorptivity and color of pelargonidin derivatives, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, **47**, 4631-4637.
6. Francis, F.J.: Food colorants: Anthocyanins, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1989**, **28**, 273-314.
7. Sava, C., Bucur, L., Fodorea, C.Ş.: *Ovidius University Annals of Medical Science-Pharmacy*, **2005**, **III**(1),135-142