



## DETERMINATION QUANTITATIVE DES ANTHOCYANES POUR LEUR UTILISATION DANS L'INDUSTRIE ALIMENTAIRE ET PHARMACEUTIQUE♦

Gabriela Stanciu<sup>1</sup>, Mirela Mihaiesi<sup>2</sup>, Simona Lupsor<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université "Ovidius" Constanța; Département du Chimie,  
124 Bd. Mamaia, Constanța, Roumanie, E-mail: [gstanciu66@yahoo.com](mailto:gstanciu66@yahoo.com)

<sup>2</sup>Université "Ovidius" Constanța; Département du Biochimie,  
124 Bd. Mamaia, Constanța, Roumanie

**Abstract:** The work presents the study over several types of wines as: Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot noir, Burgund and Blauerzweigelt through out a period of three years. Also in this paper are presented the results of quantitative determination of anthocyanins from five kinds of black grapes containing important quantities of anthocyanins in fresh condition as well as grape spirits – sub product of the wine preparation process and as well the dynamics of anthocyanins accumulation during maturation in order to establish the optimum moment to reap the grapes for wine preparation process as well as to utilize the grape spirits as a source of anthocyanins for the food industry and pharmacy. The determinations were carried out using a UV-VIS CAMSPEC 330 Spectrometer.

**Keywords:** *anthocyanins, natural pigments, flavonoides, flavylum cation*

---

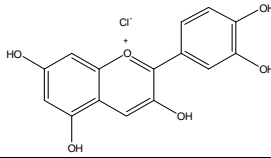
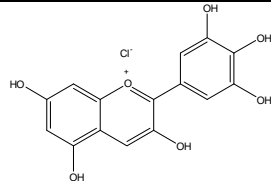
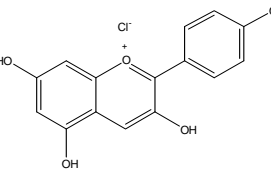
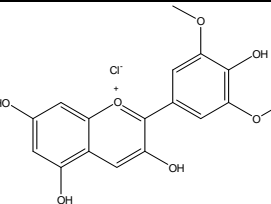
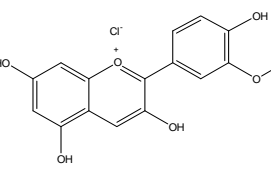
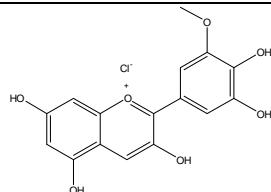
♦ Paper presented at COFrRoCA 2006: Quatrième Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée, 28 June – 2 July, Clermont-Ferrand, France

## INTRODUCTION

Les anthocyanes sont des pigments naturels du groupe des flavones quasi présents dans toutes les parties de la plante, mais surtout dans les fruits et les fleurs qu'ils colorent en rouge, violet ou bleu. La variation des couleurs est imprimée par le pH du suc cellulaire et les micro-éléments de l'organisme végétal avec lesquels ils se combinent [1].

Ces colorants naturels sont glucosés. Après la hydrolyse il résulte des aglycone anthocyanidines et la partie glucidique. Les anthocyanidines ont un squelette sous forme de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> flavonoïdique, ce sont des dérivés hydroxylés et méthoxilés du 2-phenylbenzopyril ou des sels de flavylium [2].

**Tableau 1.** Anthocyanidine naturels (cation de flavylium)

No.	Anthocyanidine Formule moléculaire Masse molaire	Structure
1	Cyanidine C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClO <sub>6</sub> 322,701	
2	Delphinidine C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClO <sub>7</sub> 338,701	
3	Pelargonidine C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClO <sub>5</sub> 306,702	
4	Malvidine C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> ClO <sub>7</sub> 366,754	
5	Péonidine C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> ClO <sub>6</sub> 336,728	
6	Pétunidine C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> ClO <sub>7</sub> 352,728	

Ces anthocyanines se différencient par le nombre des groupes hydroxyle, le degré de méthylation de ceux-ci, ainsi que par leur nature, le nombre et la position des sucres attachés à la molécule. Il existe 17 anthocyanidines naturelles, mais 6 d'entre eux sont assez répandues dans la nature contribuant à la pigmentation des plantes (Tableau 1) [3, 4]. Pour les colorants artificiels, dont la plupart sont toxiques pour l'organisme humaine, les anthocyanes sont un bon substitut qui a une série d'avantages: pas d'effets secondaires, couleur intense, étant hydrosoluble, ce qui simplifie leur incorporation dans les systèmes alimentaires liquides [5]. Les dernières recherches montrent que les pigments naturels ont aussi des effets thérapeutiques, étant utilisés pour combattre l'artériosclérose [6, 7].

Après les expérimentés de déterminer les anthocyanes quantitatives de 11 espèces des plants alimentaires et aussi en considérant l'aspect économique, on a choisi des catégories différentes de raisins comme matériel brut pour les obtenir.

Le but du projet consiste en:

- détermination quantitative des anthocyanes de cinq catégories de raisins noirs contenant des quantités importantes des anthocyanes frais tout comme des raisins spiritueux – sou produits du procès de vinification.
- la dynamique de l'accumulation des anthocyanes pendant la maturation en vue d'établir le moment optimum pour récolter les raisins pour la vinification et aussi utiliser les raisins spiritueux comme une source d'anthocyanes pour l'industrie alimentaire et pharmacie [8].

En solution aqueuse les anthocyanines subissent des modifications structurales qui dépendent du pH. En solutions fortement acides au pH en dessous de 2 il prédomine le cation flavylium rouge. En solution acide faible, neutre et alcaline il prédomine la forme carabinol et la base quinonique, tandis que la couleur devient bleue. L'identification des anthocyanes se base sur le virage des couleurs à la modification du pH. Le changement des couleurs est aussi accompagné de modifications structurales. La solution aqueuse acide à une couleur rouge, au pH = 7 elle passe au violet, tandis que en milieu alcalin au bleu ou vert.

## **MATERIAUX ET METHODES D'ANALYSE**

Des études ont été effectuées en utilisant des raisins noirs de l'assortiment vignoble Murfatlar des variétés suivantes : Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Burgund et Blauerzweigelt sur un période de trois ans, 2003 - 2005. La récolte des échantillons a été effectuée chaque année de cinq en cinq jours en commençant par le moment de mûrissement et jusqu'à la maturité technologique (récolte). De la pulpe, on a déterminé le contenu total des sucres tandis que sur la peau le contenu total en anthocyanes :

1. Détermination du poids des graines (G) ;
2. Détermination qualitative des sucres par la méthode refractométrique (Refractomètre Digit 036) ;
3. Détermination qualitative des anthocyanes (méthode Poissant Leon). Les petites peaux de 50 graines de raisins se nettoie avec de l'eau distillée des restes des pulpes on sèche sur papier filtre après on écrase avec du sable. On passe le contenu dans un ballon, en utilisant 50 mL HCl, en lavant la capsule, le pistil et la spatule. On laisse

l'extraction à température ambiante pendant 24 h. Les petites peaux se lavent en répétant, de 2-3 fois avec une solution HCl 1% jusqu'à ce qu'il présente une couleur rose claire afin que le liquide extractif obtenu soit de 200 mL. L'extrait filtré se lit au spectrophotomètre dans une cuve de 1 cm, à 520 nm (spectrophotomètre UV-VIS, CAMSPEC 330) [9].

$$\text{mg/kg raisins} = \frac{DO_{520} \cdot 22.76 \cdot 0.4}{G} \cdot 1000$$

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

L'état de maturité des raisins s'apprécie selon plusieurs critères. La maturité complète se définit par analyse des principaux constituants des graines – la variation du poids des graines et la variation du contenu en glucides. La richesse, en sucres et en substances colorantes dépend spécialement de la composition et des propriétés du sol et des conditions climatiques (température, insolation, précipitations).

De l'analyse des données expérimentales il résulte que l'augmentation du poids, des graines au moment de mûrissement jusqu'à la maturité complète peut varier entre 25-80 %, en fonction de l'espèce et c'est une augmentation continue. Les graines atteignent un poids maximal qui se maintient constant de 3 à 5 jours après que les raisins se diminuent en poids grâce à la supra maturation. L'accumulation des glucides dans les graines au moment de mûrissement jusqu'à la maturité complète a lieu rapidement et en quantité relativement grande. L'augmentation est plus rapide durant les 2-4 premières semaines après du mûrissement et puis elle est lente, pour qu'on enregistre, après un certain période, une stagnation de 3-5 jours. Dans la graine du raisin les anthocyanes apparaissent au moment de mûrissement et l'accumulation continue sur toute la durée de la maturation.

Dans les tableaux 2 et 3 sont présentées les conditions météorologiques de la période de mûrir et le cycle végétatif des variétés suivies, 2003 – 2005.

**Tableau 2.** Les conditions météorologiques de la période de mûrir, 2003-2005

Mois	Décade	Températures moyennes (°C)			Temps d'insolation (h)			Précipitations (L/m <sup>2</sup> )		
		2003	2004	2005	2003	2004	2005	2003	2004	2005
Juillet	I		24,1	22,6		100,3	98,8		-	65,2
	II		22,8	22,7		99,4	70,2		10,4	142,0
	III		27,1	30,0		106,2	118,9		27,3	-
Août	I	25,0	22,8	25,5	115,5	53,4	63,8	-	61,6	12,0
	II	23,7	23,5	24,5	88,1	81,7	67,5	0,6	12,5	0,3
	III	27,7	24,5	25,9	112,8	61,4	81,4	15,5	109,9	12,3
Septembre	I	17,0	19,0	21,8	56,4	69,0	65,4	44,2	0,6	-
	II	14,2	17,2	21,9	39,3	62,4	68,7	12,31	-	36,5
	III	17,7	19,2	17,8	74,2	58,1	13,7	-	12,9	106,3
Octobre	I	15,6		16,2	38,7		57,9	25,2		12,0
	II	10,3			31,3			40,0		
	III	9,8			14,9			6,5		

*Tableau 3. Cycle végétatif des variétés suivies, 2003 - 2005*

Variété	Le moment de mûrissement			Maturité complète			Maturité technologique (récoltée)		
	2003	2004	2005	2003	2004	2005	2003	2004	2005
Cabernet Sauvignon	30.08	19.08	3.09	30.09	25.09	25.09	10.10-15.10	30.09	30.09-5.10
Merlot	26.08	17.08	1.09	30.09	20.09	25.09	10.10-15.10	30.09	30.09-5.10
Pinot noir	20.08	16.08	22.08	20.09	15.09	15.09	25.09	25.09	25.09
Burgund	21.08	20.08	4.09	25.09	25.09	25.09	1.10-5.10	30.09	30.09
Blauer-zweigelt	24.08	22.08	8.09	25.09	20.09	25.09	30.09	25.09	30.09

Dans les tableaux 4 - 6 sont présentées la variation des concentrations en glucides et l'évolution de l'accumulation des anthocyanes pour les raisins des cinq variétés étudiées sur le parcours des trois années 2003 - 2005.

Dans les figures 1 - 5 sont présentés les dynamiques d'accumulation des anthocyanes pour les raisins des variétés étudiés sur le parcours de ces trois ans.

Pour les raisins de la variété Cabernet Sauvignon (Fig.1) on constate une augmentation des quantités en anthocyanes jusqu'à la récolte. La récolte en 2003 - 2005 a commencé après 10 jours d'atteinte de maturité complète, tandis qu'en 2004 après 5 jours parce qu'il y avait le risque de supra maturation.

Pour les raisins de la variété Merlot (Fig. 2) on constate une augmentation de la concentration des anthocyanes même après la maturité complète.

Pour la variété Pinot Noir (Fig. 3) en 2003 la quantité d'anthocyanes a commencé à baisser immédiatement après la maturité complète, cette variété étant très sensible aux précipitations.

Pour la variété Burgund (Fig. 4) le contenu en anthocyanes se diminue après la maturité, à l'exception de l'année 2004 quand il a continu d'augmenter grâce aux conditions météorologiques très bonnes. Pour la variété Blauerzweigelt (Fig. 5) on constate un comportement similaire à la variété Burgund.

L'année 2004 a été bénéfique pour le contenu en anthocyanes pour toutes les variétés analyses. L'année 2003 a offert des conditions non favorables dans la période de mûrissement tant que sur la maturation, un fait concrétisé par les quantités réduites d'anthocyanes enregistrées. L'année 2005 est caractérisée par des conditions moins favorables dans la période de mûrissement, l'abondance et la persistance des pluies ainsi que l'apparition et l'extension des sources de moisissures.

La période de maturation s'est caractérisée par un régime thermique favorable, avec une bonne insolation qui a réussi à contrecarrer dans une certaine mesure les conditions moins propices dans la phase de mûrissement. Après la maturité complète, le contenu en pigments anthocyaniques peut augmenter (variété Cabernet et Merlot) ou diminuer, ce qui illustre un comportement individuel de l'espèce lié aux qualités qui déterminent la formation des substances colorantes.

Les données des Tableaux 1-3 indiquent l'existence évidente d'une liaison entre le poids le plus petit des graines et le plus grand contenu en anthocyanes. L'explication consiste

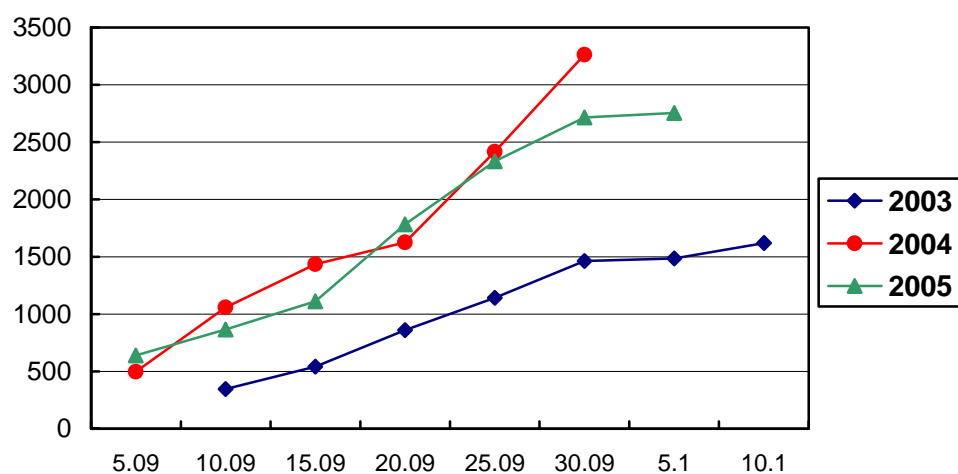
au fait que les raisins du biotype avec plus petites graines utilisent mieux les disponibilités climatiques pour réaliser la synthèse des anthocyanes.

**Tableau 4.** *Evolution du poids des graines, du contenu en anthocyanes en 2003*

<b>Variété</b>	<b>Date</b>	<b>Sucres (g/L)</b>	<b>Poids de 100 graines (g)</b>	<b>Anthocyanes (mg/kg raisins)</b>
Cabernet Sauvignon	10.09	119	99	347
	15.09	134	104	542
	20.09	143	105	859
	25.09	158	109	1143
	30.09	166	112	1465
	5.10	173	115	1486
	10.10	182	113	1620
Merlot	10.09	123	100	318
	15.09	140	107	429
	20.09	149	112	691
	25.09	161	115	1029
	30.09	169	117	1285
	5.10	177	115	1432
	10.10	188	114	1541
Pinot noir	10.09	137	117	547
	15.09	154	120	819
	20.09	161	116	1095
	25.09	173	118	981
	30.09	179	115	836
Burgund	10.10	146	146	484
	15.09	153	153	625
	20.09	156	156	803
	25.09	160	160	1055
	30.09	163	163	975
	5.09	160	160	913
Blauerzweigelt	10.10	141	141	401
	15.09	147	147	559
	20.09	155	155	783
	25.09	158	158	960
	30.09	159	159	870

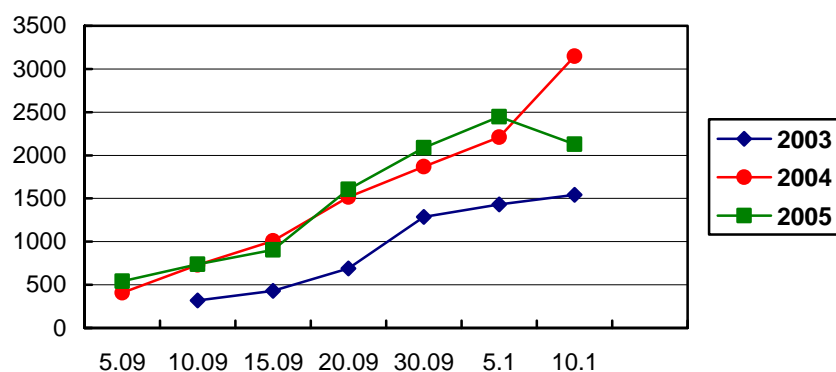
*Tableau 5. Evolution du poids des graines, du contenu en anthocyanes en 2004*

Variété	Date	Sucres (g/L)	Poids de 100 graines (g)	Anthocyanes (mg/kg raisins)
Cabernet Sauvignon	5.09	155	91	498
	10.09	163	95	1059
	15.09	174	98	1435
	20.09	185	102	1627
	25.09	194	104	2416
	1.10-5.10	210	102	3263
Merlot	5.09	156	103	416
	10.09	161	108	796
	15.09	170	109	1488
	20.09	182	111	1871
	25.09	196	106	2210
	1.10	219	104	3148
Pinot noir	5.09	169	105	224
	10.09	176	109	583
	15.09	189	107	875
	20.09	200	109	1271
	25.09	220	104	1044
Burgund	5.09	145	153	408
	10.09	151	158	750
	15.09	163	161	1084
	20.09	172	166	1515
	25.09	183	167	2144
	1.10	190	164	2435
Blauerzweigelt	5.09	127	128	307
	10.09	145	132	771
	15.09	159	140	1267
	20.09	171	146	1571
	25.09	181	149	1984

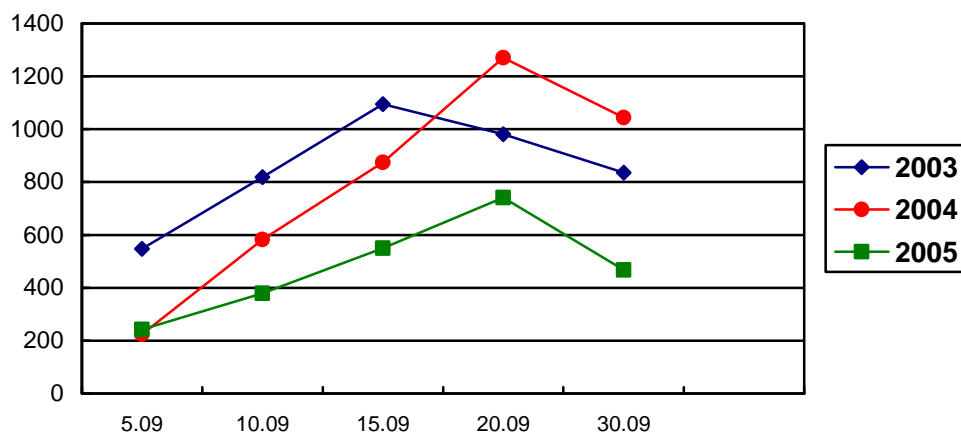
*Figure 1. Dynamique d'accumulation des anthocyanes de la variété Cabernet Sauvignon*

*Tableau 6. Evolution du poids des graines, du contenu en anthocyanes en 2005*

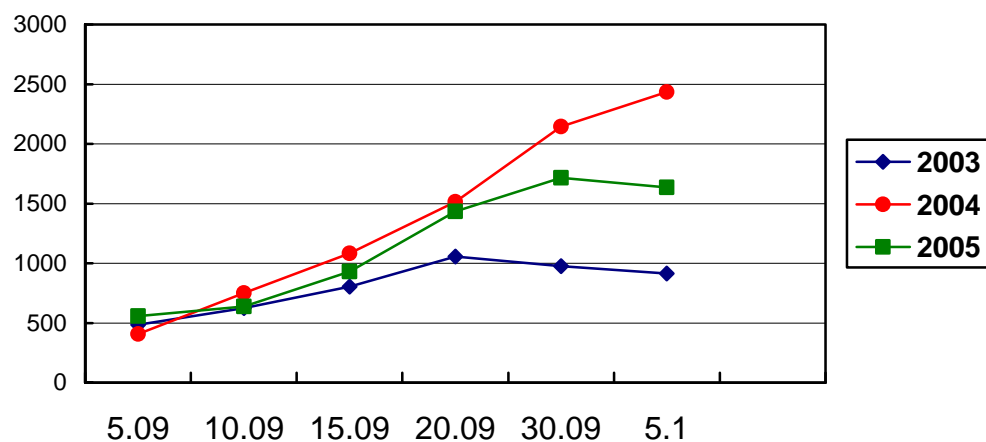
Variété	Date	Sucres (g/L)	Poids de 100 graines (g)	Anthocyanes (mg/kg raisins)
Cabernet-Sauvignon	5.09	135	106	641
	10.09	147	110	867
	15.09	160	113	1113
	20.09	173	115	1781
	25.09	182	114	2332
	30.09	190	112	2715
	5.10	210	110	2755
Merlot	5.09	140	114	543
	10.09	155	117	737
	15.09	167	119	903
	20.09	180	120	1604
	25.09	189	118	2086
	30.09	195	116	2448
	5.10	205	113	2129
Pinot noir	5.09	168	135	242
	10.09	180	138	379
	15.09	189	139	550
	20.09	198	137	741
	25.09	212	135	613
	30.09	224	131	468
Burgund	5.09	128	143	557
	10.09	150	147	638
	15.09	161	149	929
	20.09	171	150	1435
	25.09	180	148	1717
	30.09	190	145	1635
Blaverzweigelt	5.09	167	157	456
	10.09	175	164	559
	15.09	181	165	604
	20.09	188	166	729
	25.09	197	164	1023
	30.09	202	160	859

*Figure 2. Dynamique d'accumulation des anthocyanes de la variété Merlot*

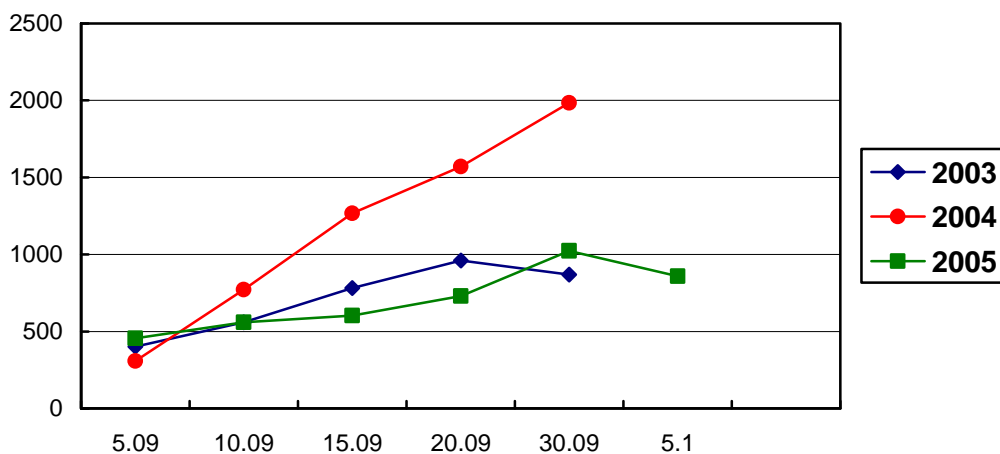




**Figure 3.** *Dynamique d'accumulation des anthocyanes de la variété Pinot noir*



**Figure 4.** *Dynamique d'accumulation des anthocyanes de la variété Burgund*



**Figure 5.** *Dynamique d'accumulation des anthocyanes de la variété Blauerzweigelt*

## CONCLUSIONS

La réalisation de ces expériences en trois ans différents en ce qui concerne les conditions du milieu (température, insolation, précipitations) nous donne la possibilité d'établir le moment de récolte des raisins en vue de la vinification, mais aussi pour l'utilisation de l'eau de vie pour extraire les anthocyanes.

Les conclusions de l'expérimentés sont ;

1. Pendant la maturation des catégories différentes de raisins, les anthocyanes s'accumulent dans des peltes de graines en commençant avec le moment de mûrissement, l'augmentation étant maintenue jusqu'à la maturation totale, quelques fois en la prolongeant jusqu'à la maturation technologique.
2. Augmenter où réduire les anthocyanes, après la maturation totale montre un comportement individuel de la catégorie lié directement des caractéristiques qui détermine la formation des substances colorées.
3. La récolte s'impose quand la quantité des anthocyanes est maximum et différente d'une catégorie à l'autre.

Les anthocyanes extraits des raisins spiritueux, étant plus établis dans le medium acide, sont recommandées d'être plus utilisés pour améliorer la couleur des aliments et des boissons acides: fruits jus et sirop, fruit gelée, fruits sèches, bombons de fruit, etc.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bohm, H., Boeing, H., Hempel, J. : Flavonols, flavones and anthocyanins as natural antioxidants in food and their possible role in the prevention of chronic diseases, *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* **1998**, 37(2), 147-163.
2. Su, C.T., Singleton, V.L. : Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry*, **2001**, 8, 153-158.
3. Strack, D., Wray, V. : *Antocyanins*, in : *Methods in Plants Biochemistry*, Vol I, Plant Phenolics (P.M. Dey and J.B. Harborne. Eds) Academic Press, San Diego, **1989**.
4. Huglin, P, Schneider, C. : *Biologie et écologie de la vigne*, Technique et Documentation, Paris, **1998**.
5. Francis, F.J. : Food colorants, Antocyanins, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1982**, 28, 273-341.
6. Singleton, V.L., Timberlake, C.F., Lea, A.G.H. : The phenolic cinnamates of white grapes and wine, *Journal of Sciences and Food Agriculture*, **1978**, 29, 403-410.
7. Lacaille-Dubois, M.-A., Wagner, H. : Importance pharmacologique des dérivés phénoliques. *Acta Botanica Gallica*, **1996**, 143(6), 555-562.
8. Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Van de Putte, B. : Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wine and fruit juices, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41, 1242-1246.
9. Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. : *Characterisation and Measurement of Antocyanins by UV-Visible Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc., **2000**.