



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



Violeta P. Rakić

**PROUČAVANJE EFEKTA pH NA STRUKTURU, BOJU I
SPEKTRALNE KARAKTERISTIKE CIJANIDINA I
CIJANIDIN 3-O- β -GLUKOPIRANOZIDA I ISPITIVANJE
NJIHOVE INTERAKCIJE SA MODELIMA LIPIDNIH
MEMBRANA**

Doktorska disertacija

Niš, 2014



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCE AND
MATHEMATICS
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



Violeta P. Rakić

**THE INVESTIGATION OF pH EFFECTS ON THE
STRUCTURE, COLOUR AND SPECTRAL
CHARACTERISTICS OF CYANIDIN AND CYANIDIN 3-O- β -
GLUCOPYRANOSIDE AND THE EXAMINATION OF THEIR
INTERACTIONS WITH LIPID MODEL MEMBRANES**

PhD thesis

Niš, 2014

Mentor:

Dr Milena N. Miljković,

redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu

Članovi komisije:

1. Dr Danijela Kostić,

redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu

2. Dr Nataša Poklar Ulrich,

redovni profesor Biotehničkog fakulteta Univerziteta u Ljubljani

3. Dr Dušan Sokolović,

vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerzitetu u Nišu

Datum odbrane:

Izrada ove doktorske disertacije je realizovana kao sastavni deo bilateralnog projekta, u okviru naučno-tehničke saradnje između Republike Srbije i Republike Slovenije (ev.br. 651-03-1251/2012-09/15).

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru dr Mileni N. Miljković, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu, na nesebičnoj pomoći i sugestijama u toku izrade i pisanja ove disertacije. Posebno joj se zahvaljujem zbog pomoći, podrške i korisnih saveta u celokupnom dosadašnjem školovanju i životu.

Najiskrenije se zahvaljujem dr Nataši Poklar Ulrih, redovnom profesoru Biotehničkog fakulteta, Univerziteta u Ljubljani, na podršci, razumevanju i vremenu koje mi je posvetila u toku eksperimentalnog rada ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr Danijeli Kostić, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu, na pomoći, saradnji i učešću u komisiji za ocenu i odbranu ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Dušanu Sokoloviću, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu, na pomoći u radu, savetima, sugestijama i učešću u komisiji za ocenu i odbranu ove doktorske disertacije.

Neizmerno se zahvaljujem svojoj porodici na podršci, razumevanju i pomoći. Izvinjavam se za sve propuštene trenutke.

Zahvaljujem se svojim prijateljima, koji su mi, svako na svoj način, pomagali tokom svih ovih godina.



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Виолета П. Ракић
Ментор, МН:	Милена Н. Миљковић
Наслов рада, НР:	Проучавање ефекта рН на структуру, боју и спектралне карактеристике цијанидина и цијанидин 3-О-β-глукопиранозид и испитивање њихове интеракције са моделима липидних мембрана
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	српски и енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2014.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: <small>(поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)</small>	11 поглавља, 298 страна, 11 табела, 91 слика, 93 референци
Научна област, НО:	хемија
Научна дисциплина, НД:	примењена хемија и биохемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	антоцијанидини, антоцијанини, цијанидин, цијанидин 3-О-β-глукопиранозид, модели мембрана, UV-Vis апсорпциони спектри, HPLC-ESI/MS, флуоресцентни емисијски спектри, диференцијална скенирајућа калориметрија, флуоресцентна емисиона поларизациона спектрометрија, CIELAB параметри, боја
УДК	66-915 : 547.973 547.973 : 66.081-6
Ћува се, ЋУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	

Извод, ИЗ:

Испитана је веза између структуре, спектралних карактеристика и боје агликона - цијанидина и утицај 3-глукозидне супституције до облика цијанидин 3-О-β-глюкопиранозида (Cu3Glc) у функцији рН вредности, уз коришћење комбинације техника (UV-Vis спектрофотометрије, колориметрије и HPLC-ESI/MS). Проучени су апсорпциони и флуоресцентни емисиони спектари цијанидина и Cu3Glc на рН 5,5 у воденом раствору. Испитани су варијација и интензитет боје и стабилност цијанидина и Cu3Glc на различитим рН вредностима (2,0; 4,0; 7,0 и 9,0) на $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$, у периоду од 8 сати и воденом раствору на рН 7,0 у условима повишене температуре ($55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$), који симулирају убрзано старење хране. Интеракције цијанидина и Cu3Glc са моделима липидних мембрана који се међусобно разликују у површинском наелектрисању и фазном стању испитане су помоћу DSC и флуоресцентне емисионе поларизационе спектрометрије.

Датум прихватања теме, ДП:

08.07.2014.

Датум одбране, ДО:

Ћланови комисије, КО:

Председник:

Ћлан:

Ћлан, ментор:

}
}

Образац Q4.09.13 - Издање 1



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Violeta P. Rakić
Mentor, MN :	Milena N. Miljković
Title, TI :	The investigation of pH effects on the structure, colour and spectral characteristics of cyanidin and cyanidin 3-O-β-glucopyranoside and the examination of their interactions with lipid model membranes
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	Serbian and English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2014.
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	11 chapters, 298 pages, 11 tables, 91 figures, 93 references
Scientific field, SF :	chemistry
Scientific discipline, SD :	applied chemistry and biochemistry
Subject/Key words, S/KW :	anthocyanidins, anthocyanins, cyanidin, cyanidin 3-O-β-glucopyranoside, model membranes, UV-Vis absorption spectra, HPLC-ESI/MS, fluorescence emission spectra, differential scanning calorimetry, fluorescence emission polarization spectrometry, CIELAB parameters, colour
UC	66-915 : 547.973 547.973 : 66.081-6
Holding data, HD :	library
Note, N :	

Abstract, AB :	<p>The relationships between structure, spectral characteristics, and colour of the aglycone moiety of cyanidin and its 3-glucosidic substitution in cyanidin 3-O-β-glucopyranoside were studied as a function of pH, using a combination of techniques (UV-Vis spectrophotometry, colorimetry, and HPLC-ESI/MS). The absorption and fluorescence emission spectra of cyanidin and Cy3Glc at pH 5.5 in aqueous solution have been studied. The colour variation, colour intensity and stability at various pH values (2.0, 4.0, 7.0 and 9.0) of cyanidin and Cy3Glc were investigated during a period of 8 hours storage at $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$, as well as, in the aqueous solution at pH 7.0 and under the conditions of the elevated temperature ($55.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$) which simulate the rapid food ageing. The interactions of cyanidin and Cy3Glc with model lipid membranes differing in surface charge and phase state were investigated using DSC and fluorescence emission polarization spectrometry.</p>
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	08.07.2014.
Defended on, DE :	
Defended Board, DB :	
President:	
Member:	
Member, Mentor:	

Образац Q4.09.13 - Издање 1

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	9
2.1. Fenolna jedinjenja.....	10
2.2. Flavonoidi.....	11
2.3. Antocijanini	13
2.3.1. Derivati antocijanina	14
2.3.2. Antocijanidini.....	16
2.3.3. Strukturne transformacije antocijanina u vodi.....	19
2.3.4. Kiselinsko-bazna ravnoteža i prototropni tautomerizam	26
2.3.5. Kovalenta hidratacija pirilijum jezgra	33
2.3.6. Prsten-lanac tautomerija	35
2.3.7. Auto-asocijacija.....	37
2.4. Efekti stabilizacije boje.....	38
2.4.1. Uticaj pH vrednosti na strukturu, boju i stabilnost antocijana	38
2.4.2. Strukturni efekti.....	41
2.4.3. Uticaj koncentracije.....	46
2.4.4. Kopigmentacioni efekti	46
2.4.5. Kompleksiranje metalima.....	51
2.4.6. Ostali faktori.....	52
2.5. Biosinteza	52
2.6. Funkcije antocijanina.....	55
2.7. Antocijanini kao prehrambene boje	55
2.8. Antocijanini u biljnim organima.....	58
2.9. Boja i njene dimenzije	59
2.9.1. Definicija boje	59
2.9.2. Dimenzije boje	60
2.9.3. Numeričko vrednovanje boje.....	61
2.9.4. Opšti obračun razlike boja.....	66
2.10. Plazma membrana - opšti koncept	69
2.10.1. Sastav plazma membrana	69
2.10.2. Modeli membrana.....	70
2.10.3. Izbor lipida za modele membrana	72
2.10.4. Biofizičke metode (izbor biofizičkih metoda).....	73

3. EKSPERIMENTALNI DEO	77
3.1. Hemikalije i reagensi	78
3.2. pH-titracija cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida praćena UV-Vis spektrometrijom	78
3.3. Merenje boje rastvora cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida	79
3.4. HPLC-DAD-ESI/MS analiza cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida	80
3.5. Proučavanje fluorescentnih osobina cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida na pH 5,5.....	81
3.5.1. Fluorescentni emisioni spektri cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida na pH 5,5	81
3.5.2. Apsorpcioni spektari cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida na pH 5,5.....	82
3.6. Stabilnost cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida na 25,0°C, na različitim pH vrednostima.....	83
3.7. Kinetička stabilnost cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β glukopiranozida na 55,0°C i na pH 7,0	84
3.8. Priprema lipozoma.....	84
3.9. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrijska (DSC) merenja	85
3.10. Merenja fluorescentne emisije polarizacije.....	86
4. REZULTATI I DISKUSIJA	88
4.1. pH-titracija cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida praćena UV-Vis spektrometrijom	89
4.1.1. UV-Vis spektralne osobine cijanidina na različitim pH vrednostima.....	89
4.1.2. UV-Vis spektralne osobine cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida na različitim pH vrednostima.....	95
4.2. Merenje boje rastvora cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida	100
4.2.1. Uticaj pH vrednosti na ugao tona boje (h_{ab}) cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida	101
4.2.2. Uticaj pH vrednosti na hromu (C^*) cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida.....	106
4.2.3. Uticaj pH vrednosti na svetlinu boje (L^*) cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida	108
4.2.4. Uticaj pH vrednosti na ukupnu razliku boja (ΔE^*_{ab}) cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida	109
4.3. HPLC-DAD-ESI/MS analiza cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida	115
4.3.1. Uticaj pH vrednosti na vremensku stabilnost različitih oblika cijanidina	115
4.3.2. Uticaj pH vrednosti na vremensku stabilnost različitih oblika cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida.....	120
4.4. Proučavanje fluorescentnih osobina cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida na pH 5,5.....	124
4.4.1. Apsorpcione i fluorescentne emisije osobine cijanidina.....	124
4.4.2. Apsorpcione i fluorescentne emisije osobine cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida	128
4.6. Stabilnost cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β glukopiranozida na 25,0°C, na različitim pH vrednostima	133
4.7.1. Varijacija boje cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida na 25,0°C, na različitim pH vrednostima	134
4.7.2. Intenzitet boje cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida na 25,0°C, na različitim pH vrednostima	135

4.7.3. Stabilnost boje cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida na 25,0°C, na različitim pH vrednostima	140
4.6.4. Braon indeks cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida na 25,0, na različitim pH vrednostima	151
4.5. Stabilnost cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β glukopiranozida na 55,0°C, na pH 7,0.....	156
4.5.1. Varijacija boje cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β glukopiranozida na 55,0°C, na pH 7,0.....	156
4.5.2. Intenzitet boje cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β glukopiranozida na 55,0°C, na pH 7,0.....	158
4.5.3. Stabilnost boje cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β glukopiranozida na 55,0°C, na pH 7,0.....	159
4.5.4. Braon indeks cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β glukopiranozida na 55,0°C, na pH 7,0	160
4.5.5. Kinetička stabilnost cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β glukopiranozida na 55,0°C, na pH 7,0.....	162
4.6. Energetski uticaj cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida na fazni prelaz DPPC-a i DPPG-a	165
4.7. Efekti cijanidina i cijanidin 3- <i>O</i> - β -glukopiranozida na DPH i TMA-DPH polarizaciju u modelima DPPC i DPPG lipidnih membrana.....	170
5. ZAKLJUČAK	180
6. SUMMARY	189
7. LITERATURA	199
8. PRILOG I	209
9. PRILOG II	223
10. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM	288
11. IZJAVE AUTORA	294

Skraćenice korišćene u tezi

Skraćenica	Značenje na srpskom	Značenje na engleskom
A	hinonoidalna baza	quinonoidal base
AH ⁺	flavilijum katjon	flavylium cation
B	hemiacetalni oblik	hemiacetal form
BI	braon indeks	brown index
h_{ab}	uglom tona boje, nijansa	hue angle
L^*	svetlina boje	lightness
ΔE^*_{ab}	ukupna razlika u boji	colour differences
C	halkonski oblik	chalcone form
C^*	zasićenost boje, hroma	chroma, colour saturation
ϵ	molarna absorptivnost	molar absorptivity
$\lambda_{max-vis}$	talasna dužina apsorpcionog maksimuma u vidljivom delu spektra	wavelength of absorbance maximum in the visible range
λ_{max-uv}	talasna dužina apsorpcionog maksimuma u ultraljubičastom delu spektra	wavelength of absorbance maximum in the ultraviolet range
UV-Vis	ultraljubičasta i vidljiva spektrofotometrija	ultraviolet and visible spectrophotometry
CIELAB	Laboratorija međunarodne komisije za rasvetu	Commission Internationale de l'Eclairage Lab
P	fluorescentna polarizacija	fluorescence polarization
m/z	odnos masa/naelektrisanje	
DPH	1,6-difenil-1,3,5-heksatrien	1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene
DPPC	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DPPG	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo glicerol	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
DSC	diferencijalna skenirajuća kalorimetrija	differential scanning calorimetry
ESI/MS	elektrosprej jonizaciona/masena spektrometrija	electrospray ionisation mass spectrometry
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC-DAD	visoko efikasna tečna hromatografija sa diode array deteckcijom	high-performance liquid chromatography with diode array detection
TMA-DPH	N,N,N-trimetil-4-(6-fenil-1,3,5-heksatrien-1-il)fenilamonijum p-toluensulfonat	N,N,N-trimethyl-4-(6-phenyl-1,3,5-hexatrien-1-yl)phenylammonium p-toluenesulfonate
MLV	multilamelarne vezikule	multilamellar vesicles
ΔH_{cal}	entalpija prelaza	transition enthalpy
T_m	temperatura glavnog faznog prelaza	main phase-transition temperature
T_{pre}	temperatura pre-tranzicije	pre-transition temperature
SUV	male unilamelarne vezikule	small unilamellar vesicles

1. UVOD

Antocijanidini su hidrosilovani i metoksilovani derivati 2-fenilbenzopirilijum ili flavilijum soli (slika 2.2, cijanidin) (Brouillard, 1982). Cijanidin je jedan od najrasprostranjenijih antocijandina. Struktura cijanidina je prikazana je na slici 2.2 (Macheix, Fleuriet, & Billot, 1990).

Antocijanini su glikozilovani polihidroksi i polimetoksi derivati 2-fenilbenzopirilijum (flavilijum) soli, u kojima je 3-hidroksilna grupa aglikona - antocijanidina, zamenjena glukozom ili drugim šećerom. Cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je predstavnik jednostavnih antocijanina, koji se mogu naći u različitim bobičastim plodovima, kao što su: bobice zove, borovnice, brusnice, crne ribizle i crne aronije (Brouillard, 1982; Fossen, Cabrita, & Andersen, 1998; Mazza & Miniati, 1993). To su prirodni, u vodi rastvorljivi, ne toksični pigmenti koji mogu pokazivati niz boja, od naradžaste do plave (Bridle & Timberlake, 1997; Clifford, 2000; Torskangerpoll & Andersen, 2005). Danas postoji veliko interesovanje za razvoj prehrambenih boja iz prirodnih izvora, koje bi zamenile sintetičke prehrambene boje (Brouillard, 1982; Heredia, Francia-Aricha, Rivas-Gonzalo, Vicario, & Santos-Buelga, 1998; Mazza & Miniati, 1993). Razlog za to je razvijanje bezbednih, ekonomičnih i efikasnih prehrambenih boja, koje mogu zameniti zabranjene azo i boje iz katrana kamenog uglja. (Brouillard, 1982; Del Carpio Jiménez et al., 2011; Mazza & Miniati, 1993). Obojeni antocijanini ovde imaju određene prednosti: bezbedni su, obojeni, pogotovu u crvenom regionu i relativno rastvorljivi, što pojednostavljuje njihovu inkorporaciju u vodene sisteme hrane (Brouillard, 1982; Mazza & Miniati, 1993).

Međutim, postoje određena ograničenja u upotrebi antocijanina kao prehrambenih boja, koja se pre svega odnose na njihovu hemijsku nestabilnost, potrebu za prečišćavanjem i moć bojenja, koja je skoro 100 puta niža nego kod boja iz katrana kamenog uglja. U prehrambenim proizvodima pH vrednost, kao i brojne reakcije koje se mogu dogoditi, imaju uticaj na boju, mada je glavni problem vezan za upotrebu antocijanina kao prehrambenih boja njihova temperaturna, svetlosna, enzimaska nestabilnost i nestabilnost u prisustvu kiseonika (Bordignon-Luiz, Gauche, Gris, & Falcão, 2007; Brouillard, 1982; Downham & Collins, 2000; Laleh, Frydoonfar, Heidary, Jameei, & Zare, 2006; Mazza & Brouillard, 1987; Mazza & Miniati, 1993; Torskangerpoll & Andersen, 2005).

Slično drugim antocijaninima i antocijanidinima, cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid postoje u različitim strukturnim oblicima u zavisnosti od pH vrednosti. Spektralna istraživanja su otkrila koegzistenciju flavilijum katjona (AH⁺), hinonoidalnih baza (A), dva hemiacetalna oblika (B) i dva halkonska oblika (C). Ravnoteža između ovih struktura jako zavisi od pH vrednosti, i osim za *cis-trans* halkonsku izomerizaciju, sve ove transformacije su potpuno reverzibilne, sa reakcionim poluvremenom od nekoliko minuta ili manje (Brouillard, Iacobucci, & Sweeny, 1982; Brouillard, 1982; Drabent et al., 2007; Figueiredo et al., 1994; Figueiredo, Elhabiri, Saito, & Brouillard, 1996; George, Figueiredo, & Brouillard, 1999).

Pojedini antocijanini pokazuju merljivu fluorescenciju, ali u literaturi ima malo informacija o ovoj temi (Drabent, Pliszka, & Olszewska, 1999). Fluorescentna emisija antocijanina obično je ispitivana ekscitacijom molekula u vidljivoj i bliskoj UV oblasti, odnosno, pri $\lambda_{exc} > 270$ nm (Cherepy, Smestad, Grätzel, & Zhang, 1997; Drabent et al., 1999; Drabent et al., 2007; Figueiredo, Pina, Vilas-Boas, & Macanita, 1990). Fluorescentne tehnike su visoko osetljive i ne destruktivne. Mogu dati korisne informacije o sadržaju antocijanina u hrani i piću (Agati, Matteini, Oliveira, de Freitas, & Mateus, 2013; Agati, D'Onofrio, et al., 2013).

Antocijanini pripadaju grupi flavonoida, koji imaju različite biološke aktivnosti, uključujući, antioksidativnu (Bornsek et al., 2012; Sarić et al., 2009; Shih, Chan, Liao, Wang, & Yen, 2010), antihepatokancerogenu (Bishayee et al., 2011), antiinflamatornu (Sarić et al., 2009; Wang et al., 1999), antitumornu (Sun et al., 2012), neuroprotektivnu (Tremblay, Waterhouse, Nason, & Kalt, 2013), antihemolitičku (Chaudhuri, Banerjee, Basu, Sengupta, & Sengupta, 2007), antidijabetičku (Grace et al., 2009), hipolipidemijsku (Yang, Yang, & Zheng, 2010; Zawistowski, Kopec, & Kitts, 2009), kancer hemoprotektivnu (Bishayee et al., 2011; Marczylo, Cooke, Brown, Steward, & Gescher, 2009) i deluju preventivno u pojavi Alchajmerove bolesti (Shih et al., 2010; Tarozzi et al., 2010) i Uveitisa (Yao, Lan, He, & Kurihara, 2010). Epidemiološke studije su pokazale da antocijanini imaju kardioprotektivnu funkciju kod ljudi (Chong, Macdonald, & Lovegrove, 2010), dok su druge studije pokazale da antocijanini inhibiraju rast tumorskih ćelija *in vitro* i suzbijaju rast tumora *in vivo* (Chen et al., 2005).

U ćelijskim membranama, slobodnoradikalna peroksidacija lipida remeti strukturne i protektivne funkcije lipida, što može dovesti do više patoloških poremećaja (Abuja & Albertini, 2001). Molekularni mehanizam antioksidativnog delovanja polifenola je slabo proučen, mada je sugerisano da antioksidativne osobine polifenola leže u njihovoj sposobnosti da se insertuju u ćelijske membrane i da modifikuju redosled pakovanja lipida i njihovu fluidnost. Flavonoidi i izoflavonoidi mogu da se insertuju u hidrofobno jezgro membrana i izazovu dramatično opadanje fluidnosti lipida u ovom regionu membrane (Arora, Byrem, Nair, & Strasburg, 2000; Arora, Nair, & Strasburg, 1998). Lokalizacija flavonoida i izoflavonoida u unutrašnjosti membrane i rezultirajuće ograničenje fluidnosti komponenata membrane može sterno ometati difuziju slobodnih radikala, i time smanjiti kinetiku slobodnoradikalnih reakcija (Arora et al., 2000, 1998).

Nakon unošenja u organizam, antocijanini su detektovani netaknuti u krvi (McGhie & Walton, 2007; Prior & Wu, 2006), u znatno kraćem vremenu od onog koje je utvrđeno za ostale flavonoide (Manach, Williamson, Morand, Scalbert, & Rémésy, 2005). Njihovo prisustvo je takođe otkriveno u plazmi u obliku intaktnih glikozilovanih jedinjenja. Brza difuzija antocijanina preko gastrointestinalne barijere odvija se preko membranskih transportera, koji podstiču njihovu specifičnu, sekvencijalnu translokaciju iz gastrointestinalnog lumena u epitelijalne ćelije, i iz epitelijalnih ćelija u krv (Keller, 2009). Bilitranslokaza je membranski transporter koji je relativno specifičan za antocijanine (Passamonti et al., 2009; Passamonti, Vrhovsek, Vanzo, & Mattivi, 2003). Izgleda da se slaba biodostupnost antocijanina javlja kad se oni transportuju u intestinalne ćelije preko nosač-posredovanog mehanizma, koji ima visok afinitet, ali niski kapacitet transporta. Nasuprot mnogim drugim organskim anjonima, antocijanini se očigledno ne transportuju drugim crevnim membranskim nosačima, osim bilitranslokaze (Keller, 2009). Pri upotrebi bioloških i model membrana, interakcije između nekih flavonoida i lipidnih dvostrukih slojeva rezultiraju ili u njihovom vezivanju za lipidno-vodenu međufazu ili u njihovoj distribuciji u hidrofobno jezgro membrane, pri čemu je ova različita lokalizacija određena hemijskim osobinama flavonoida (Oteiza, Erlejman, Verstraeten, Keen, & Fraga, 2005).

Da bi se bolje razumela antioksidativna aktivnost i transport cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida kroz membranu, važno je odrediti njihovu lokalizaciju u membranama i njihov uticaj na redosled pakovanja lipida, a samim tim i na fluidnost membrane.

U poslednjih nekoliko godina, interesovanje za osobine i stabilnost ekstrakata antocijanina je znatno poraslo. Međutim u literaturi ima malo podataka koji se odnose na osobine i stabilnost čistih antocijanina i pogotovu antocijanidina. Glavni razlog za to je, da je većinu antocijanina teško prečistiti i da imaju ograničenu komercijalu dostupnost, posebno u velikim količinama.

Predmet rada ove doktorske disertacije predstavlja ispitivanje spektralnih osobina i strukturnih transformacija aglikonskog dela - cijanidina i uticaja njegove 3-glukozidne supstitucije (do oblika cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida) na spektralne parametre sa promenom pH vrednosti. Takođe, ispitivanje obuhvata apsorpcione i fluorescentne spektroskopske osobine aglikonskog dela i uticaj njegove 3-glukozidne supstitucije (do oblika cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida) na spektralne parametre, kao i određivanje talasnih dužina pri kojima je ekscitacija molekula cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida najefikasnija, kao i talasnih dužina pri kojima se javljaju maksimumi u njihovim fluorescentnim emisionim spektrima. Učinjen se pokušaj da se dovedu u vezu apsorpcioni i emisioni spektri. Dodatno, ispitivanje obuhvata analizu veza između strukture i boje cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida. Takođe, ispitivana je interakcija cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida sa lipidnim model membranama, koje se međusobno razlikuju u površinskom naelektrisanju i faznom stanju (gel ili tečno).

Osnovni ciljevi ove doktorske disertacije su, da se utvrdi mogućnost primene cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida kao prehrambenih boja, da se ispita mogućnost primene fluorescentnih tehnika za utvrđivanje prisustva antocijanina u hrani i piću i da se obezbediti razumevanje efekata cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na biofizičke osobine membrane, što može pomoći u određivanju mehanizma njihovog delovanja kao antioksidanasa i njihovog transporta kroz ćelijske membrane.

Uzimajući u obzir sve napred navedene relevantne faktore, u okviru ove doktorske disertacije postavljeni su sledeći ciljevi:

- utvrđivanje veze između strukture, spektralnih karakteristika i boje cijanidina i uticaja njegove supstitucije do 3-*O*-glikozida na navedene parametre u funkciji pH vrednosti;
- ispitivanje uticaja 3-glukozidne supstitucije cijanidina na strukturnu ravnotežu između različitih strukturnih oblika koji su prisutni pri različitim pH vrednostima;
- merenje, izračunavanje i poređenje CIELAB parametara (L^* , a^* , b^* , C^* , h_{ab} , ΔE^*_{ab}) rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida kao funkcije pH vrednosti i njihovo razmatranje sa aspekta mogućnosti primene ispitivanih jedinjenja kao prehrambenih boja;
- ispitivanje mogućnosti primene fluorescentnih tehnika, kao visoko osetljivih i nedestruktivnih metoda za utvrđivanje prisustva i sadržaja cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u hrani i piću;
- pručavanje termičke stabilnosti, varijacije boje, intenziteta boje i braon indeksa cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u uslovima koji simuliraju ubrzano starenje hrane, sa aspekta primene ovih jedinjenja kao prehrambenih boja;
- razmatranje uticaja cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na biofizičke osobine membrana koje se međusobno razlikuju u površinskom naelektrisanju i faznom stanju u cilju određivanja mehanizma njihovog delovanja kao antioksidanasa i njihovog transport kroz ćelijske membrane.

Imajući u vidu predmetni problem i ciljeve ove doktorske disertacije, predviđen je sledeći program i metodologija istraživanja:

- ispitivanje efekata pH vrednosti na spektralne parametre cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u području pH vrednosti od 1 do 13;

- utvrđivanja uticaja 3-glukozidne supstitucije cijanidina do cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na spektralne parametre i strukturnu ravnotežu između različitih strukturnih oblika koji su prisutni pri različitim pH vrednostima;
- merenje i poređenje CIELAB parametara (L^* , a^* , b^* , C^* , h_{ab}) rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida pri sukcesivnim pH skokovima od oko 0,5 jedinica, u oblasti pH vrednosti od 1 do 13 i izračunavanje ukupne razlike u boji ΔE^*_{ab} pomoću Euclidean-ove distance između dve bojene tačke;
- određivanje kinetičke stabilnosti cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u puferima sa pH vrednostima 2,0 (amonijum-formijat/mravlja kiselina); 4,0 (natrijum-acetat/sirćetna kiselina); 7,0 (natrijum-citrat/limunska kiselina) i 9,0 (amonijum-acetat/amonijum hidroksid);
- određivanje korelacije između apsorpcionih i fluorescentnih emisionih spektara cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na pH 5,5; određivanje talasnih dužina na kojima je ekscitacija molekula cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida najefikasnija, kao i talasnih dužina na kojima se javljaju maksimumi u njihovim fluorescentnim emisionim spektrima;
- određivanje varijacije boje, intenziteta boje, termičke stabilnosti i braon indeksa cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u vodenom rastvoru na pH 7,0 i u uslovima povišene temperature ($55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$) koji simuliraju ubrzano starenje hrane;
- priprema multilamelarnih vezikula (MLV) od cviterjonskog 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoholina (DPPC-a) i negativno naelektrisanog 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-*rac*-glicerol) (DPPG-a) i priprema malih unilamelarnih vezikula (SUV);
- ispitivanje uticaja cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na fazni prelaz (L_α - L_β fazni prelaz) lipidnih model membrana koje se međusobno razlikuju u površinskom naelektrisanju;
- utvrđivanje lokalizacije cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u lipidnim model membranama, koje se međusobno razlikuju u površinskom naelektrisanju i ispitivanje efekta ovih jedinjenja na fluidnost membrana koje se nalaze u različitom faznom stanju (gel ili tečno).

Predviđena ispitivanja su sprovedena korišćenjem sledećih metoda:

- efekat pH vrednosti na spektralne parametre cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida i strukturu ravnotežu između različitih strukturnih oblika koji su prisutni pri različitim pH vrednostima biće ispitivan pH-titracijom praćenom UV-Vis spektrofotometrijom;
- merenje i poređenje CIELAB parametara (L^* , a^* , b^* , C^* , h_{ab}) rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida biće izvedeno merenjem boje rastvora pomoću kolorimetra;
- kinetička stabilnost cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u puferima sa pH vrednostima: 2,0; 4,0; 7,0 i 9,0 biće određena HPLC- sa diode array detekcijom - elektrosprej jonizaciona/maseno spektrometrijskom analizom (HPLC-DAD-ESI/MS) u periodu od 1090 min, sa merenjima u vremenskim intervalima od 218 min;
- fluorescentni emisioni spektri, talasne dužine najefikasnije ekscitacije molekula cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, i talasne dužine pri kojima se javljaju maksimumi u njihovim fluorescentnim emisionim spektrima biće praćeni pomoću fluorescentne spektrofotometrije;
- varijacija boje, intenzitet boje i termička stabilnost cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u vodenom rastvoru pri pH 7,0 i u uslovima povišene temperature ($55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$) biće ispitani UV-Vis spektrometrijom;
- uticaj cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na fazni prelaz lipidnih model membrana koje se međusobno razlikuju u površinskom naelektrisanju biće utvrđen primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC);
- utvrđivanje lokalizacije cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u lipidnim model membranama, koje se međusobno razlikuju u površinskom naelektrisanju i ispitivanje efekta ovih jedinjenja na fluidnost membrana koje se nalaze u različitom faznom stanju (gel ili tečno) biće izvršena upotrebom fluorescentne emisije polarizacione spektrometrije pomoću dve hromofore 1,6-difenil-1,3,5-heksatriena (DPH) i N,N,N-trimetil-4-(6-fenil-1,3,5-heksatrien-1-il)fenilamonijum p-toluensulfonata (TMA-DPH) u lipozomima koji se nalaze u gel i tečnom stanju.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Fenolna jedinjenja

Pored primarnih metabolita, koji su zajednički svim biljkama, analizom je utvrđeno prisustvo brojnih, različitih, sekundarnih metabolita koji pripadaju različitim hemijskim grupama. Među njima, fenolna jedinjenja obuhvataju široku klasu supstanci, čije je zajednička karakteristika da sadrže aromatičan prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Ova jedinjenja su prisutna u svim biljnim tkivima i često čine najzastupljenije sekundarne metabolite u plodovima, gde ponekad mogu dostići visoke koncentracije (Macheix et al., 1990).

Nekoliko hiljada polifenolnih jedinjenja, koliko ih je opisano u biljkama može se podeliti u nekoliko klasa, od kojih je većina prisutna u voću (tabela 2.1). Klasifikacija se zasniva pre svega na broju konstitutivnih ugljenikovih atoma, a zatim na strukturi osnovnog skeleta. Osim toga, pored jednostavnih rastvorljivih oblika, koji se uglavnom nalaze u vakuolama, postoje i polimerizovani oblici različite rastvorljivosti (tanini) ili potpuno nerastvorni (lignini) (Macheix et al., 1990).

Tabela 2.1: Glavne klase fenolnih jedinjenja u plodovima (Macheix et al., 1990)

Broj ugljenikovih atoma	Osnovni skelet	Klasa	Primer	Plod (primer)
7	C ₆ -C ₁	Hidroksibenzojeve kiseline	p-hidroksibenzojeva	Jagoda
9	C ₆ -C ₃	Hidroksicimetne kiseline	Kafeinska	Jabuka
		Kumarini	Skopolin	Citrus
10	C ₆ -C ₄	Naftohinoni	Juglon	Orah
13	C ₆ -C ₁ - C ₆	Ksantoni	Mangiferin	Mango
14	C ₆ -C ₂ - C ₆	Stibeni	Rezveratrol	Vinova loza
15	C ₆ -C ₃ - C ₆	Flavonoidi	Kvercetin, cijanidin	Višnja
		Izoflavonoidi	Daidzein	Francuski pasulj
n		Lignini		Koštunica
		Tanini		Urma

U tabeli 2.1. za svaku od klasa jedinjenja dat je primer ploda u kome su sastojci te klase naročito zastupljeni, što ne isključuje prisustvo drugih fenolnih jedinjenja u istim plodovima. Kao što je to čest slučaj sa svim sekundarnim metabolitima, distribucija sastojaka različitih klasa nije homogena u svim plodovima. Neka jedinjenja, kao što su hidroksicimetne kiseline i flavonoidi su veoma široko zastupljeni, dok se drugi mogu naći samo u plodovima određenog roda i vrste. Raznovrsnost koja je primećena u plodovima, u vezi sa distribucijom fenolnih jedinjenja, takođe je nađena i u pogledu količine (Macheix et al., 1990).

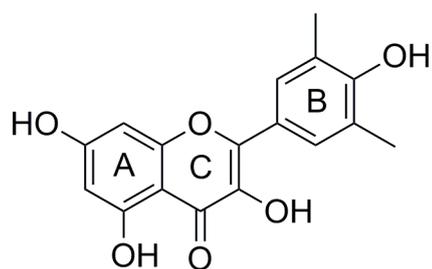
2.2. Flavonoidi

Flavonoidi su jedinjenja koja poseduju isti C_{15} ($C_6-C_3-C_6$) osnovni skelet. Različite klase flavonoida razlikuju se u nivou oksidacije centralnog piranskog prstena, osim kod halkona gde je prsten otvoren. Ova jedinjenja su u biljkama izuzetno brojna i raznovrsna. (Macheix et al., 1990).

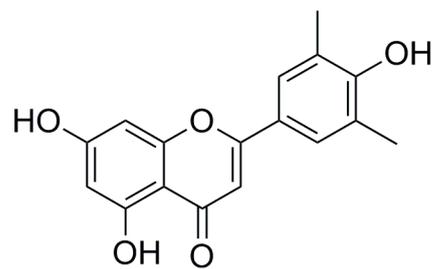
Flavonoidi se prema njihovim molekulskim strukturama dele u šest klasa: flavoni, flavanoni, flavonoli, izoflavoni, antocijanidini i flavanoli (ili katehini) (slika 2.1) (Tripoli, Guardia, Giammanco, Majo, & Giammanco, 2007).

Od brojnih klasa flavonoida, tri klase su široko rasprostranjene i kvantitativno dominantne u plodovima: antocijanidini, flavonoli i flavanoli. Flavanoli mogu biti prisuni kao monomeri i u kondenzovanom obliku (tanini). Ostale klase flavonoida, naročito flavoni, flavanoni, flavanonoli ili dihidroflavonoli, halkoni i dihidrohalkoni, su manje zastupljeni osim u nekim posebnim slučajevima, kao što je rod *Citrus*. Neka od ovih jedinjenja, na primer flavanoni i flavanonoli su intermedijeri u biosintezi drugih flavonoida. Ovo može objasniti zašto su prisutni samo u tragovima. Pored toga postoje određene klase flavonoida (npr, izoflavonoidi i C-glikozilflavonoidi), koji se nalaze samo u određenim grupama biljaka (Macheix et al., 1990).

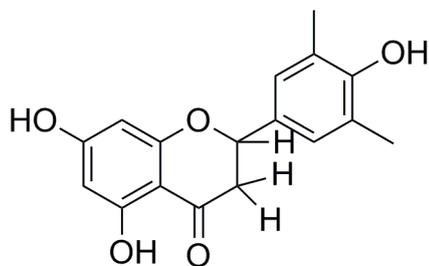
Raznovrsnost i složenost flavonoida zavisi najmanje dva faktora: prvo, raznovrsnosti aglikona i velikog broja mogućih glikozida, ponekad u acilovanom obliku, i drugo, mogućnosti kondenzacije u kompleksne molekule, na primer, kondenzovane tanine (Macheix et al., 1990).



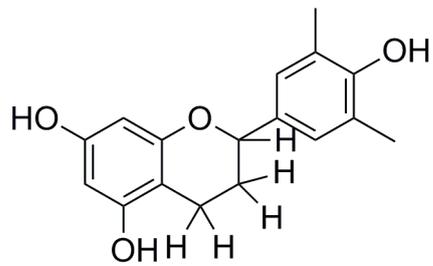
Flavonoli



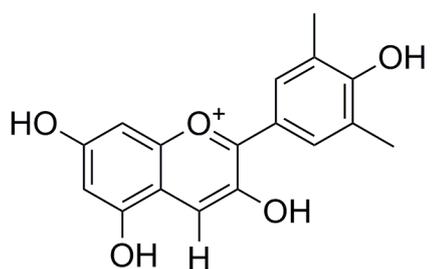
Flavoni



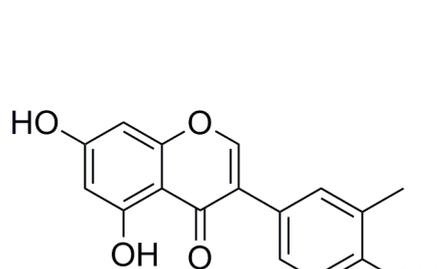
Flavanoni



Katehini



Antocijanidini



Izoflavoni

Slika 2.1: Molekulske strukture flavonoida (Tripoli et al., 2007).

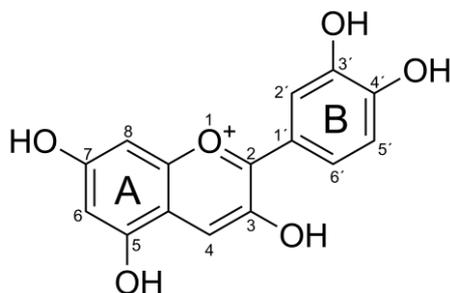
2.3. Antocijanini

Antocijanini (grčki *anthos*, cvet i *kyanos*, plavo) su deo veoma velike i široko rasprostranjene grupe biljnih sastojaka, koji su poznati pod zajedničkim nazivom flavonoidi. Antocijanini spadaju u jednu od najvažnijih grupa biljnih pigmenata. Oni su prisutni u skoro svim biljkama i mogu se naći u svim delovima biljke. Ipak, oni su najuočljiviji u cvetovima i plodovima. Antocijanini čine najveću grupu prirodnih pigmenata rastvorljivih u vodi, odgovornih za atraktivne boje većine plodova, cvetova i listova, počev od crvene, preko ljubičastocrvene, ljubičaste do plave. Poznato je više od 270 individualnih jedinjenja (Brouillard, 1982; Mazza & Miniati, 1993; Timberlake & Henry, 1986).

Antocijanini imaju isto biosintetsko poreklo kao i ostala prirodna flavonoidna jedinjenja, i kao i ostali flavonoidi, strukturno su okarakterisani prisustvom ugljeničnog skeleta koji se sastoji od C₆-C₃-C₆ jedinice. Za razliku od ostalih flavonoida, antocijanini snažno apsorbuju vidljivu svetlost i time generalno daju beskonačno mnogo različitih boja sredinama u kojima su prisutni. U biljnim ćelijama, oni su locirani u vakuolama u obliku vodenog rastvora. Utvrđeno je, da je bez obzira na vrstu cveta, vakuolarni sok uvek blago kiseo ili neutralan. Da bi se bolje razumela uloga koju antocijanini imaju u pigmentaciji biljaka, najznačajnije je proučavanje njihovih strukturnih transformacija u kiselom vodenom rastvoru, na sobnoj temperaturi, jer su ovi fizički uslovi najbliži uslovima u prirodi. Pored toga, pošto se ovi pigmenti koriste kao prehrambene boje, potreban je bolji uvid u njihove hemijske i biohemijske interakcije sa ostalim supstancama prisutnim u ljudskoj hrani. Takvo sveobuhvatno znanje može biti veoma korisno u očuvanju prirodne boje plodova tokom skladištenja i prerade (Brouillard, 1982).

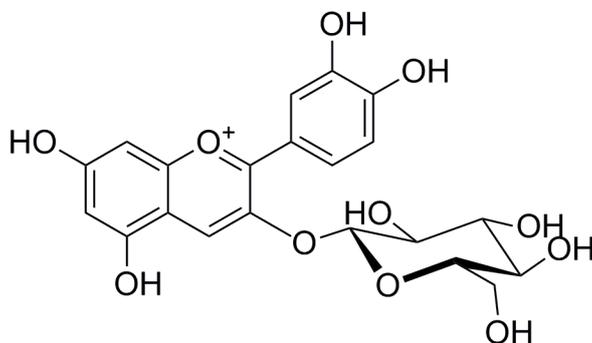
2.3.1. Derivati antocijanina

Antocijanidini su hidroksilovani i methokilovani derivati 2-fenilbenzopirilijum ili flavilijum soli (slika 2.2, cijanidin) (Brouillard, 1982).



Slika 2.2: Struktura cijanidina (Brouillard, 1982).

Antocijanini su glikozidi antocijanidina (slika 2.3, cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid).



Slika 2.3: Struktura cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida

Pojedinačni antocijanini se međusobno razlikuju po broju hidroksilnih grupa, prirodi i broju šećera koji su vezani za molekul i po položaju vezivanja, kao i prirodi i broju alifatičnih ili aromatičnih kiselina koje su vezane za šećer u molekulu. U biljkama se najčešće javlja šest aglikona ili antocijanidina. To su pelargonidin, cijanidin, peonidin, delfinidin, petunidin i malvidin. U crvenim cvetovima nekih vrsta roda *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) pronađen je 6-hidroksicijanidin, koji se u njima se javlja u obliku 3-glukozida i 3-rutiniozida. Pored toga, delimično je opisano i nekoliko drugih antocijanidina (karajurin iz roda *Arrabidaea*, kareksidin iz roda *Carex*, kolumnidin iz roda *Columnnea*, purpurinidin iz roda *Salix*, i margikazidin iz roda *Cassia*).

Pošto svaki antocijanidin može biti glikozilovan i acilovan različitim šećerima i kiselinama, u različitim položajima, broj antocijanina je 15 do 20 puta veći od broja antocijanidina. Za antocijanidine su najčešće vezani šećeri: glukoza, galaktoza, ramnoza, i arabinoza. Di- i trisharidi, formirani kombinacijom ova četiri monosaharida, mogu takođe glikozilovati neke antocijanidine. 3-hidroksilna grupa aglikona je uvek zamenjena šećerom. Kada je prisutan drugi šećer, on je generalno vezan za C-5 atom aglikona. Najčešće su sledeće četiri klase antocijanidin glikozida: 3-monozidi, 3-biozidi, 3,5-diglikozidi, i 3,7-diglikozidi. Poznati su 3,5-diglukozidi svakog od 6 aglikona. Takođe se javljaju i trisaharidi koji nastaju kombinovanjem monosaharida. Identifikovani su i antocijanini sa više od dva glikozidna ostatka. Triglikozidi nisu brojni, niti su široko rasprostranjeni. Takođe je utvrđena i glikozilacija 3', 4' i 5'-hidroksil grupa. U mnogim slučajevima, šećerni ostaci su acilovani *p*-kumarnom, kafenom, ferulnom, sinapičnom, *p*-hidroksibenzojevom, malonskom, oksalnom, jabučnom, ćilibarnom, ili sirćetnom kiselinom. Acil supstituent je obično vezan za C-3 atom šećera. U slučaju nekoliko pigmentata, utvrđeno je da je acil supstituent vezan za 6-hidroksilnu i ređe 4-hidroksilnu grupu šećera. Međutim, ne postoje prirodni antocijanini u kojima su sve tri hidroksilne grupe u 5, 7, i 4' položajima istovremeno supstituisane. Slobodna hidroksilna grupa u jednom od 5, 7 ili 4' položaja je od suštinskog značaja za *in situ* generisanje boje odgovorne za pigmentaciju biljaka. Ovo se uglavnom dešava zbog gubitka kiselog hidroksilnog vodonika iz flaviljumske strukture. Degradacione reakcije daju tri fragmenta antocijanina, tj. antocijanidin ili aglikon, šećer(e) i kada je pigment acilovan, organske kiseline (Brouillard, 1982; Macheix et al., 1990; Mazza & Miniati, 1993; Timberlake & Henry, 1986)

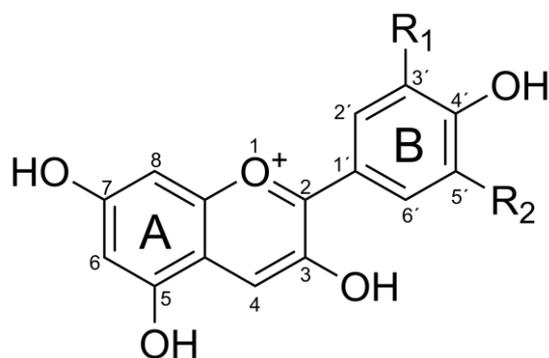
Najveći monomerni antocijanin poznat do danas je pigment ternatin A1 iz plavih latica vrste *Clitoria ternatea* L. (Leguminosae). To je poliacilovani derivat delfinidin 3,3',5'-triglukoziida sastavljen od delfinidina sa sedam molekula glukoze, četiri molekula *p*-kumarne kiseline i jednog molekula malonske kiseline. On ima molekulsku težinu 2 107 i javlja se sa pet drugih derivata delfinidin 3,3',5'-triglukoziida koji su poznati pod imenima ternatin A2, B1, B2, D1 i D2. Ostali antocijanini acilovani fenolnim i alifatičnim kiselinama obuhvataju monardaenin i cinerin. Antocijanini acilovani sa dva ili više aromatične kiseline su platikonin, kinerarin i gentiodelfin (Mazza & Miniati, 1993).

Boja rastvora antocijanina zavisi od strukture pigmenta. Veza između položaja apsorpcionog maksimuma u vidljivoj oblasti i strukture antocijanina dobro je proučena samo za slučaj kada se pigment nalazi u flavilijum formi. U samoj biljci, međutim, s obzirom na slabo kisele uslove, antocijanini se češće javljaju kao hinonoidalne baze nego kao flavilijum soli. Da bi se objasnila pigmentacija takve sredine, od velikog značaja su mehanizmi pomoću kojih nastaju i stabilizuju se hinonoidalne baze (Brouillard, 1982).

2.3.2. Antocijanidini

Antocijanidini su hidroksilovani i metoksilovani derivati 2-fenilbenzopirilijum ili flavilijum soli. Uz svega nekoliko izuzetaka (3-dezoksiantocijanidini), osnovna struktura antocijanidina je struktura 3,5,7,4'-tetrahidroksiflavilijum katjona (slika 2.4) (Brouillard, 1982). Pozitivno naelektrisanje flavilijum katjona delokalizovano je preko celog heteroaromatičnog sistema, i utvrđeno je da se najveće parcijalno pozitivno naelektrisanje javlja na C-2 i C-4 atomu. Jedna od najupadljivijih karakteristika hemije flavilijum katjona leži u stabilnosti ovog organskog katjona u vodenim rastvorima. Ipak, ova stabilnost je samo relativna, i može se predvideti da će se nukleofilna adicija (i možda nukleofilna supstitucija) odigravati na C-2 i C-4 atomu i da se protoni sa hidroksilnih grupa u položajima 5, 7 i 4' mogu lako ukloniti, čak i slabim bazama (Brouillard, 1982). Neke od specifičnih osobina antocijanina (boja, stabilnost i formiranje metalnih kompleksa) povezane su sa ovom strukturom (Macheix et al., 1990).

U principu, antocijanidini se ne akumuliraju u biljkama i pigmenti se javljaju u cveću i voću uglavnom u glikozilovanom obliku. Pošto je utvrđeno da su antocijanidini nestabilni u vodi i da su mnogo manje stabilni od antocijanina, pretpostavlja se da glikozilacija doprinosi rastvorljivosti i stabilnosti pigmenta. Metoksilacija se obično javlja na C-3' i C-5' atomima. Poznati su i retki antocijanini koji imaju metoksil grupu umesto hidroksilne grupe na C-7 ili C-5 atomu. Važno je napomenuti da nisu otkriveni prirodni antocijanini kod kojih su svi položaji 5, 7 i 4' glikozilovani ili metoksilovani. U stvari, slobodna hidroksilna grupa u jednom od ovih položaja je apsolutno neophodna za formiranje hinonoidalne strukture. Ova struktura, koja je u velikoj meri odgovorna za pigmentaciju cveta i voća, izvodi se od flavilijumske strukture, gubitkom kiselog hidroksilnog vodonika (Brouillard, 1982).



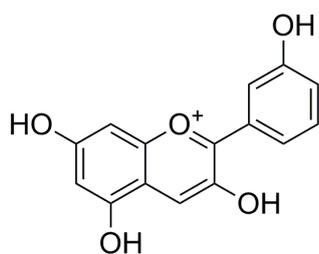
R ₁ = H	R ₂ = H	Pelargonidin (Pg)
R ₁ = OH	R ₂ = H	Cijanidin (Cy)
R ₁ = OH	R ₂ = OH	Delfinidin (Dp)
R ₁ = OCH ₃	R ₂ = H	Peonidin (Pn)
R ₁ = OCH ₃	R ₂ = OH	Petunidin (Pt)
R ₁ = OCH ₃	R ₂ = OCH ₃	Malvidin (Mv)

Slika 2.4: Hemijska struktura antocijanidina (Macheix et al., 1990).

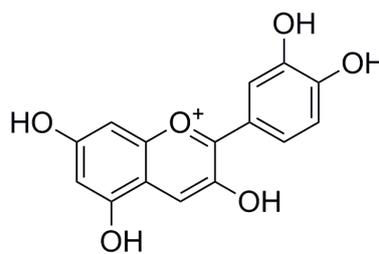
Danas je poznato 15 antocijanidina, ali samo 6 je široko rasprostranjeno i obično

doprinosi pigmentaciji biljnih organa. U voću se nalazi samo ovih šest antocijanidina i oni su 3, 5, 7 i 4' hidroksilovani derivati flavilijum katjona (slika 2.4). Ovih šest aglikona međusobno se razlikuju u 3' i 5' hidroksilaciji i methokilaciji prstena B (slika 2.5) (Macheix et al., 1990).

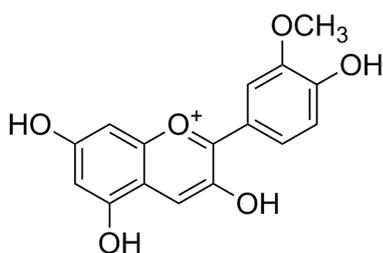
Hemijske strukture najčešćih antocijanidina prikazane su na slici 2.5.



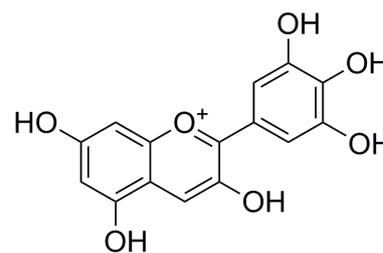
Pelargonidin



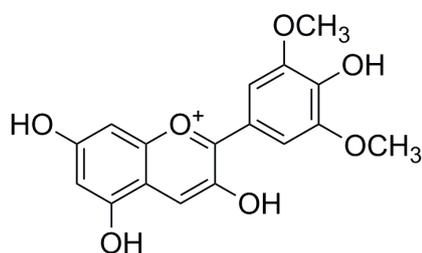
Cijanidin



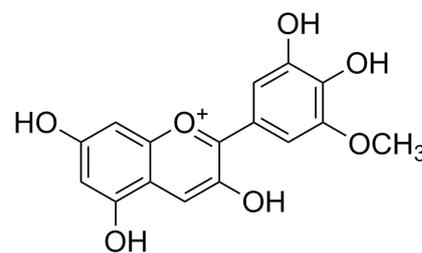
Peonidin



Delfinidin



Malvidin



Petunidin

Slika 2.5: Najčešći antocijanidini. Imena antocijanidina potiču od biljne vrste iz koje su odgovarajući 3,5-diglukozidi izolovani po prvi put (Brouillard, 1982).

Ispitivanja svežeg voća pokazala su da je cijanidin najzastupljeniji antocijanidin (sadržalo ga je 90% ispitivanih plodova), a zatim u opadajućem redu slede: delfinidin (35%), peonidin (30%), pelargonidin (20%), i na kraju petunidin i malvidin (15%). U samo nekoliko slučajeva crvenog voća i povrća utvrđeno je da nije prisutan cijanidin (npr. mango i plavi patlidžan) (Macheix et al., 1990).

Studija o antocijanskim pigmentima u plodovima, koja je obuhvatala 44 vrste i 25 familija skrivenosemenica dovela je do istog zaključka: cijanidin je bio prisutan u 82% ispitivanih plodova. Od ispitivanih plodova, desetak uobičajnih vrsta sadržalo je samo cijanidin: jabuka, kruška, breskva, kupina, crna malina, crvena ribizla, ogrozd, dud i zova. U ovim vrstama se izgleda ne odigrava reakcija metilovanja koja omogućava formiranje ostalih antocijanidina iz cijanidina. Slična situacija uočena je i u većini listova u kojima se sintetišu antocijanini. Samo delfinidin je bio je prisutan u plavom patlidžanu, dok ne postoje uobičajne vrste koje u plodovima sadrže samo petunidin, malvidin ili pelargonidin. Plodovi najčešće sadrže dva aglikona (u 15 od 40 ispitanih slučajeva). Cijanidin se uglavnom sreće u kombinaciji sa peonidinom, delfinidinom ili pelargonidinom. U veoma malom broju ispitivanih vrsta prisutna su tri aglikona, i to cijanidin i delfinidin u kombinaciji sa pelargonidinom (npr. nar i *Solanum betaceum*) ili peonidinom (npr. brusnica). U najstroženijem slučaju, prisutno je pet aglikona, pri čemu je samo pelargonidin odsutan, a u nekim slučajevima prisutne su samo vrlo niske količine cijanidina, kao što je kod borovnice i vinove loze (Macheix et al., 1990).

2.3.3. Strukturne transformacije antocijanina u vodi

Strukturne modifikacije antocijanina u vodi posledica su visoke reaktivnosti glikonskog dela. Šećeri, acilovani šećeri i metoksi grupe imaju značajan uticaj na reakcije, izazivajući njihovu modifikaciju, ali u principu, same ne reaguju. Utvrđeno je da pod uslovima koji su u potpunosti slični prirodnim uslovima (sobna temperatura i slabo kisela vodena sredina), uobičajni antocijani brzo i skoro u potpunosti prelaze u bezbojne oblike. Izuzetci su nađeni za neke pigmente acilovane kafenom ili ferulnom kiselinom, koji zadržavaju stabilnu boju sve do blizu neutralne sredine (Brouillard, 1982).

U vodenoj sredini, većina prirodnih antocijanina ponaša se kao pH indikator, menjajući boju od crvene pri niskim pH vrednostima, preko plavkaste pri srednjim pH vrednostima, do bezbojne pri visokim pH vrednostima (Mazza & Miniati, 1993).

Slično drugim antocijanidinima i antocijaninima, cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid u vodenim rastvorima postoje u različitim strukturnim oblicima, u zavisnosti od pH vrednosti rastvora. Pomoću kinetičkih, termodinamičkih i spektroskopskih ispitivanja, utvrđena je koegzistencija flavilijum katjona (slika 2.6, AH⁺), hinonoidalnih baza (slika 2.6, A), dva hemiacetalna oblika (slika 2.6, B) i dva halkonska oblika (slika 2.6, C). Ravnoteža između ovih struktura je izuzetno zavisna od pH vrednosti, i osim *cis-trans* halkonske izomerizacije, sve ove transformacije su potpuno reverzibilne, sa reakcionim polu vremenom od nekoliko minuta ili manje. Pri pH < 2, antocijanini se uglavnom javljaju u obliku narandžastih, crvenih ili ljubičastih flavilijum katjona, koje karakteriše produženi π -elektronski sistem, i kao posledica toga pokazuju elektronsku apsorpciju u vidljivom delu spektra (Brouillard, Iacobucci, & Sweeny, 1982; Brouillard, 1982; da Silva, Lima, Quina, & Maçanita, 2004; Drabent, Pliszka, Huszcza-Ciołkowska, & Smyk, 2007; Figueiredo et al., 1994; Figueiredo, Elhabiri, Saito, & Brouillard, 1996; George, Figueiredo, & Brouillard, 1999; Mazza & Brouillard, 1987).

Sa povećanjem pH vrednosti javlja se kinetička i termodinamička konkurencija između reakcije hidratacije u položaju 2, flavilijum katjona (AH⁺) i proton transfer reakcija u kojima učestvuju kisele hidroksilne grupe aglikona. Prva reakcija, hidratacija uz nukleofilni napad, dovodi do formiranja bezbojnog hemiacetalnog oblika (B) (hidrataciona ravnoteža, šema 2.1), koji kasnije može da podleže otvaranju prstena, formirajući blede žuti *cis*-halkon (C_{*cis*}) sa restituisanim produženim π -elektronskim sistemom (prsten-lanac ravnoteža, šema 2.1), uz mogućnost dalje (obično spore) izomerizacije do *trans*-halkona (C_{*trans*}). Druga reakcija, brza deprotonacija flavilijum katjona (AH⁺) dovodi do formiranja tautomernih ljubičastih hinonoidalnih baza (A) (prototropna tautomerna ravnoteža - kiselinsko - bazna ravnoteža, šema 2.1). Dalja deprotonacija hinonoidalnih baza (A) može se desiti pri pH vrednostima između 6 i 7 uz formiranje ljubičastih rezonantno stabilizovanih hinonoidalnih anjona (A⁻). Opšte je prihvaćeno da antocijanini pokazuju najintenzivniju boju kada se nalaze u svom flavilijum katjonskom obliku. Relativne količine flavilijum katjona, hinonoidalnih formi, hemiacetalnog oblika, i halkona u ravnoteži variraju u zavisnosti od strukture antocijanina i od pH vrednosti. Pri pH vrednostima tipičnim za sveže i prerađeno voće i

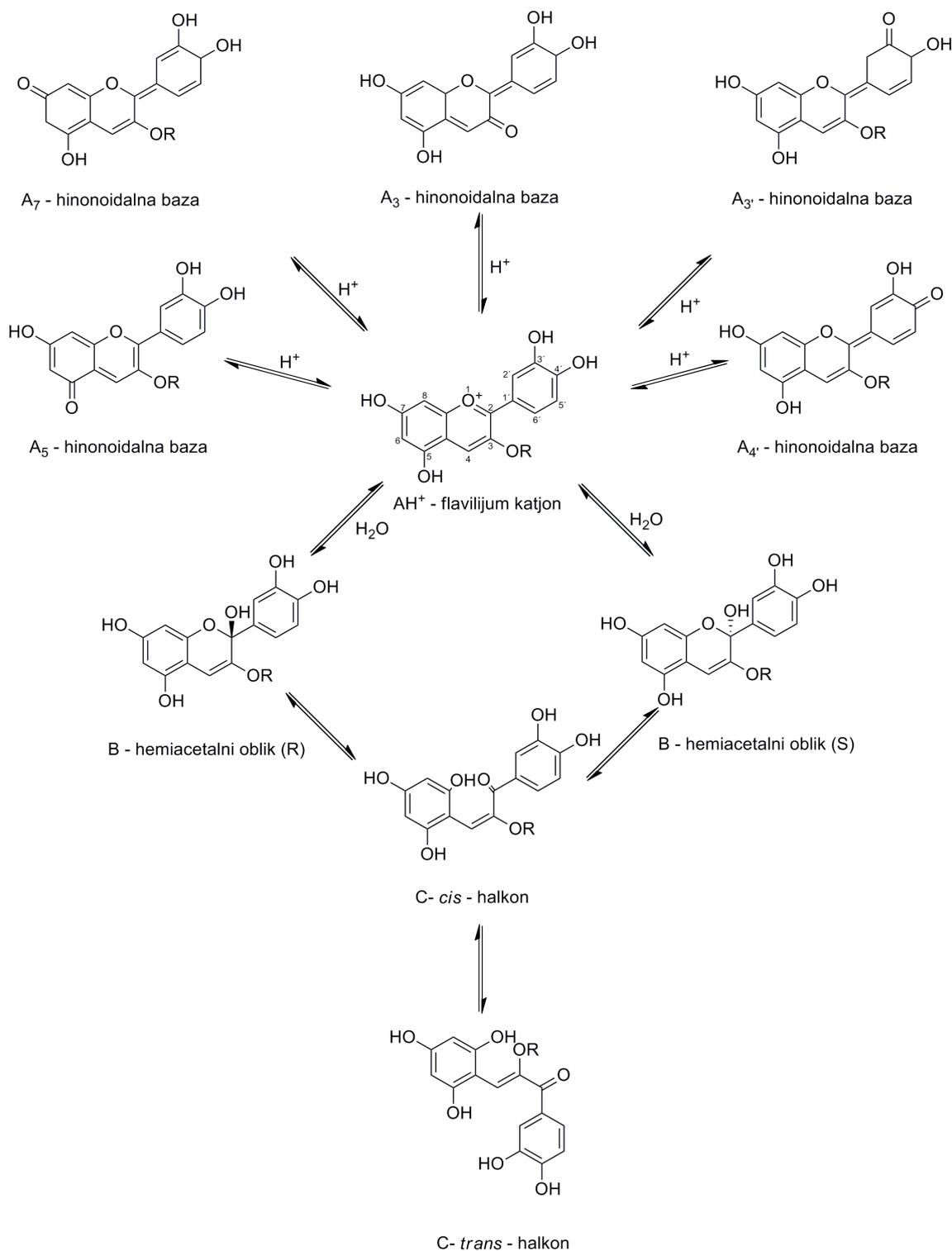
povrće, svaki antocijanin će zbog toga najverovatnije biti predstavljen mešavinom ravnoteže oblika (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982; Fossen et al., 1998; Mazza & Brouillard, 1987; Mazza & Miniati, 1993; Torskangerpoll & Andersen, 2005).

Flavilijum katjon prirodnih antocijanina ponaša se kao slaba kiselina, dok se neutralne hinonoidalne baze (A) u isto vreme ponašaju i kao slabe kiseline i kao slabe baze. Gubitak protona može se javiti na bilo kojoj od hidrosilnih grupa na C-4', C-5, ili C-7. Ako su u flavilijum katjonu prisutne dve kisele hidrosilne grupe, jonizovana hinonoidalna baza (A⁻) formira se pri pH vrednostima iznad 6. Formiranje jonizovanih hinonoidalnih baza, praćeno je velikim batohromnim i hiperhromnim pomeranjem (Mazza & Miniati, 1993).

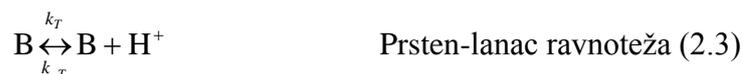
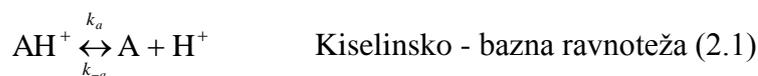
Hidratacija flavilijum katjona (AH⁺) većine antocijanina do bezbojnog hemiacetalnog oblika (B) javlja se pri pH vrednostima u području od 3 do 6. Adicija vode najčešće se odvija na C-2 (B₂) atomu. Mehanizam ove reakcije uključuje prenos protona i istovremeno raskidanje ili formiranje C-O veze. U odsustvu 3-glikozil supstituenta, hidratacija je manje efikasna i hemiacetalni oblik je jedini oblik koji se formira pri pH vrednostima od 4 do 5 (Mazza & Miniati, 1993).

Cis- (C_E) i *trans*-halkoni (C_Z), formiraju se iz hemiacetalnog oblika (B) brzom reakcijom u kojoj dolazi do otvaranja prstena i sporim izomerizacionim procesom. Oba halkona razlikuju se od uobičajenih halkona po tome što imaju karbonilnu funkcionalnu grupu u neposrednom susedstvu B-prstena, dok je kod normalnih halkona karbonilna grupa u susedstvu A-prstena. Pri dovoljno visokim pH vrednostima, pojavljuje se anjonski *cis*-halkon, koji ima bleđozutu boju (Mazza & Miniati, 1993).

Transformacije kojima u vodenoj sredini podležu cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid ilustrovane na slici 2.6. (Brouillard et al., 1982; Drabent et al., 2007; Figueiredo et al., 1994; Mazza & Brouillard, 1987; Santos et al., 1993).



Slika 2.6: Transformacije cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u vodenom rastvoru pri različitim pH vrednostima (Brouillard et al., 1982; Drabent et al., 2007; Figueiredo et al., 1994; Mazza & Brouillard, 1987; Santos et al., 1993). Na C-3 atomu za cijanidin R = H, za Cy3Glc R = Glc.



Šema 2.1: Transformacije antocijanina u vodenom rastvoru pri različitim pH vrednostima.

K_a' , K_h' i K_T su ravnotežne konstante za kiselinsko-baznu, hidratacionu i prsten-lanac tautomernu ravnotežu (Brouillard, 1982).

$$K_a' = \frac{[\text{A}]}{[\text{AH}^+]} \cdot a_{\text{H}^+} \quad (2.4)$$

$$K_h' = \frac{[\text{B}]}{[\text{AH}^+]} \cdot a_{\text{H}^+} \quad (2.5)$$

$$K_T = \frac{[\text{C}]}{[\text{B}]} \quad (2.6)$$

Koncentracija vrste X u daljem tekstu je označena sa [X]. Koncentracije se odnose na ravnotežne koncentracije, a a_{H^+} je aktivitet hidronijum jona ($\text{pH} = -\log a_{\text{H}^+}$). Koncentracije AH^+ , A, B i C mogu se izraziti u funkciji ravnotežnih konstanti K_a' , K_h' i K_T , kiselosti sredine a_{H^+} , i ukupne koncentracije pigmenta C_0 , kao što je prikazano jednačinama (2.9 do 2.12) (Brouillard, 1982).

$$C_0 = [\text{AH}^+] + [\text{A}] + [\text{B}] + [\text{C}] \quad (2.7)$$

$$C_0 = [\text{AH}^+] \frac{K_a' + K_h' + K_h' K_T + a_{\text{H}^+}}{a_{\text{H}^+}} \quad (2.8)$$

Prema tome,

$$[\text{AH}^+] = \left(\frac{a_{\text{H}^+}}{\delta} \right) \cdot C_0 \quad (2.9)$$

$$[\text{A}] = \left(\frac{K_a'}{\delta} \right) \cdot C_0 \quad (2.10)$$

$$[\text{B}] = \left(\frac{K_h'}{\delta} \right) \cdot C_0 \quad (2.11)$$

$$[\text{C}] = \left(\frac{K_h' \cdot K_T}{\delta} \right) \cdot C_0 \quad (2.12)$$

gde je:

$$\delta = K_a' + K_h' + K_h' K_T + a_{\text{H}^+} \quad (2.13)$$

Poznavajući K_a' , K_h' , K_T i kiselost, može se uzračunati relativna količina $[\text{X}]/C_0$ (gde je X AH^+ , A, B, ili C) za određeni antocijanin na datoj temperaturi. Koristeći van't Hoff jednačinu, Brouillard i Delaporte izmerili su promenu entalpije i entropije vezanu za tri ravnoteže prikazane na šemi 2.1, u slučaju malvidin 3-glukozida. Sve reakcije $\text{A} \rightarrow \text{AH}^+$, $\text{AH}^+ \rightarrow \text{B}$, i $\text{B} \rightarrow \text{C}$ su endotermne, zbog toga će svaki porast temperature jako favorizovati halkon (C) sa otvorenim prstenom na račun AH^+ , A i B. Zbog toga će sadržaj halkona biti veći na povišenim temperaturama (60 do 100°C) nego na sobnoj temperaturi i zbog toga ne iznenađuje da je njegovo postojanje postulirano u studijama proizvoda termalne razgradnje antocijanina mnogo pre nego što je mogao biti otkriven na sobnoj temperaturi. Naravno, snižavanje temperature ima suprotan efekat i snažno favorizuje nastajanje hinonoidalne baze (A). Pad temperature (od 25 do 5°C) ne može nikada biti dovoljno velik da značajno stabilizuje hinonoidalnu bazu (A), pošto je njena ravnotežna koncentracija na 25°C veoma niska za uobičajne antocijanine.

Pozitivne vrednosti promene entropije izmerene za transformacije $AH^+ \rightarrow B$ i $B \rightarrow C$ su u dobroj saglasnosti sa povećanjem stepena slobode aglikonskog dela; za flavilijum katjon (AH^+), ugljenikov atom u položaju 2 je sp^2 hibridizovan, i aglikonski ugljenični skelet je verovatno planaran. Za hemiacetalni oblik (B), C-2 atom je sp^3 hibridizovan, i aglikonski skelet u ovom slučaju karakteriše fenil prsten (B-prsten) koji je izvan ravni benzopiranolnog sistema. Pri prelazu od hemiacetalnog oblika (B) do halkonskog oblika (C), rigidan heterociklični prsten se narušava i postaje moguće dodatno kretanje aglikonskog ugljeničnog skeleta (Brouillard, 1982).

Za cijanidin 3,5-diglukozide, na primer, crveni flavilijum katjon (AH^+) je jedina struktura samo kada pH rastvora manja od 0,5. Sa povećanjem pH vrednosti njegova koncentracija opada kako hidratacija do bezbojnog hemiacetalnog oblika (B) raste. Ravnotežu karakteriše pK_h' vrednost $2,23 \pm 0,10$ kada su prisutne jednake količine oba oblika. Na ovoj pH vrednosti, međutim, takođe su prisutne i male količine bezbojnih halkona (C) i plavih hinonoidalnih baza (A), a njihove količine i količina bezbojnog hemiacetalnog oblika rastu sa povećanjem pH vrednosti, na račun crvenog flavilijum katjona (AH^+) do pH vrednosti od oko 4,5. Rastvor antocijanina na pH 4 do 6 je vema slabo obojen, jer su koncentracije obojenih oblika, flavilijum katjona (AH^+) i hinonoidalnih baza (A) veoma niske. Ravnotežu između ovih vrsta karakteriše pK_a' vrednost $3,38 \pm 0,15$ (Mazza & Miniati, 1993).

Variranjem supstitucionog obrasca flavilijum prstena antocijanidina, mogu se dobiti antocijanidini koji mogu postojati u obojenom hinonoidalnom obliku (A). Kao primer mogu poslužiti 4-metil-7-hidroksiflavilijum i 4'-metoksi-4-karboksil-7-hidroksiflavilijum hlorid. Ova jedinjenja su u suštini stabilna u obliku flavilijum katjona koji se nalazi u brznoj ravnoteži sa hinonoidalnom bazom. U ravnoteži i u skoro neutralnim rastvorima (pH 6), obojeni hinonoidalni oblici čine oko 83 i 67% od analitičkih koncentracija 4-metil-7-hidroksiflavilijum i 4'-metoksi-4-karboksil-7-hidroksiflavilijum hlorid, respektivno (Mazza & Miniati, 1993).

2.3.4. Kiselinsko-bazna ravnoteža i prototropni tautomerizam

U slabo kiselom rastvoru (pH od 4 do 6) dolazi do deprotonacije hidroksilovanog flavilijum katjona (jednačina 2.1, šema 2.1). Obično postoje dve ili čak tri hidroksilne grupe na C-4', C-5 i C-7 atomima, na kojima može doći do gubitka protona. Prema tome jednačina 2.1, koja opisuje proces prenosa jednog protona, važeća je samo kada je prisutna jedna slobodna hidroksilna grupa i mora biti zamenjena mnogo komplikovanijim sistemom kada su prisutne tri hidroksilne grupe koje mogu da se jonizuju, kao što je to prikazano na slici 2.7. Gubitkom protona sa hidroksilnih grupa u položajima 5, 7 i 4', nastaju tri prototropna tautomera A_5 , A_7 i $A_{4'}$. Ranije je sugerisano da se napad baze prvenstveno dešava na C-7 hidroksilnoj grupi. Međutim, na osnovu izmerenih konstanti kiselosti različito hidroksilovanih flavilijum soli, utvrđeno je da se A_5 , A_7 i $A_{4'}$ formiraju u reakcijama okarakterisanim pomoću konstanti kiselosti $K_{a5'}$, $K_{a7'}$ i $K_{a4'}$. Ove konstante su definisane kao (Brouillard, 1982):

$$K_{a5'} = \frac{[A_5]}{[AH^+]} \cdot a_{H^+} \quad (2.14)$$

$$K_{a7'} = \frac{[A_7]}{[AH^+]} \cdot a_{H^+} \quad (2.15)$$

$$K_{a4'} = \frac{[A_{4'}]}{[AH^+]} \cdot a_{H^+} \quad (2.16)$$

gde su $[A_5]$, $[A_7]$, $[A_{4'}]$ i $[AH^+]$, ravnotežne koncentracije A_5 , A_7 , $A_{4'}$ i AH^+ , i a_{H^+} je aktivitet hidronijum jona ($pH = -\log a_{H^+}$).

Sve tri reakcije imaju difuziono kontrolisane brzine, i kao posledica toga, one se uravnotežuju pri veoma sličnim i ekstremno visokim brzinama. Pošto nije moguće rezlikovati ih kinetički, svaka procedura za određivanje koncentracije flavilijum katjona daće samo opštu ravnotežnu konstantu K_a' . Konstanta K_a' povezana je sa individualnim ravnotežnim konstantama $K_{a5'}$, $K_{a7'}$ i $K_{a4'}$, jednačinom 2.17.

$$K_a' = K_{a5'} + K_{a7'} + K_{a4'} \quad (2.17)$$

$$[A] = [A_5] + [A_7] + [A_4] \quad (2.18)$$

Ako su međutim, jedna ili dve hidroksilne grupe metoksilovane ili glikozilovane, kao što je čest slučaj, izraz za K_a' biće redukovan u $K_{a5'} + K_{a4'}$ (kada nema slobodne hidroksilne grupe na C-7) ili u $K_{a4'}$ (jedna hidroksilna grupa u položaju C-4'), na primer.

Vrednosti K_a' za neke antocijanine i neke sintetičke flavilijum soli sa različitim obrascem hidroksilacije, metoksilacije i glikozilacije date su u tabeli 2.2. Sa izuzetkom dva jedinjenja (kafeoilferuloil cijanidin 3,7,3'-triglukoizid i 4'-metoksi-4-metil-7-hidroksiflavilijum katjon), vrednosti K_a' se kreću od $5 \cdot 10^{-5}$ ($pK_a' = 4,30$) do 10^{-4} mol·dm⁻³ ($pK_a' = 4,0$), bez obzira na broj i položaj hidroksil, metoksil i glikozil grupa. Ovaj rezultat jasno pokazuje da su elementarne konstante kiselosti istog reda veličine i da slika 2.6 ispravno opisuje strukturne transformacije kojima podležu antocijanini odmah nakon rastvaranja u slabo kiseloj vodenoj sredini.

Tabela 2.2: Opšte konstante kiselosti za reakcije deprotonacije flavilijum oblika za neke antocijanine i srodna jedinjenja u vodi (Brouillard, 1982)

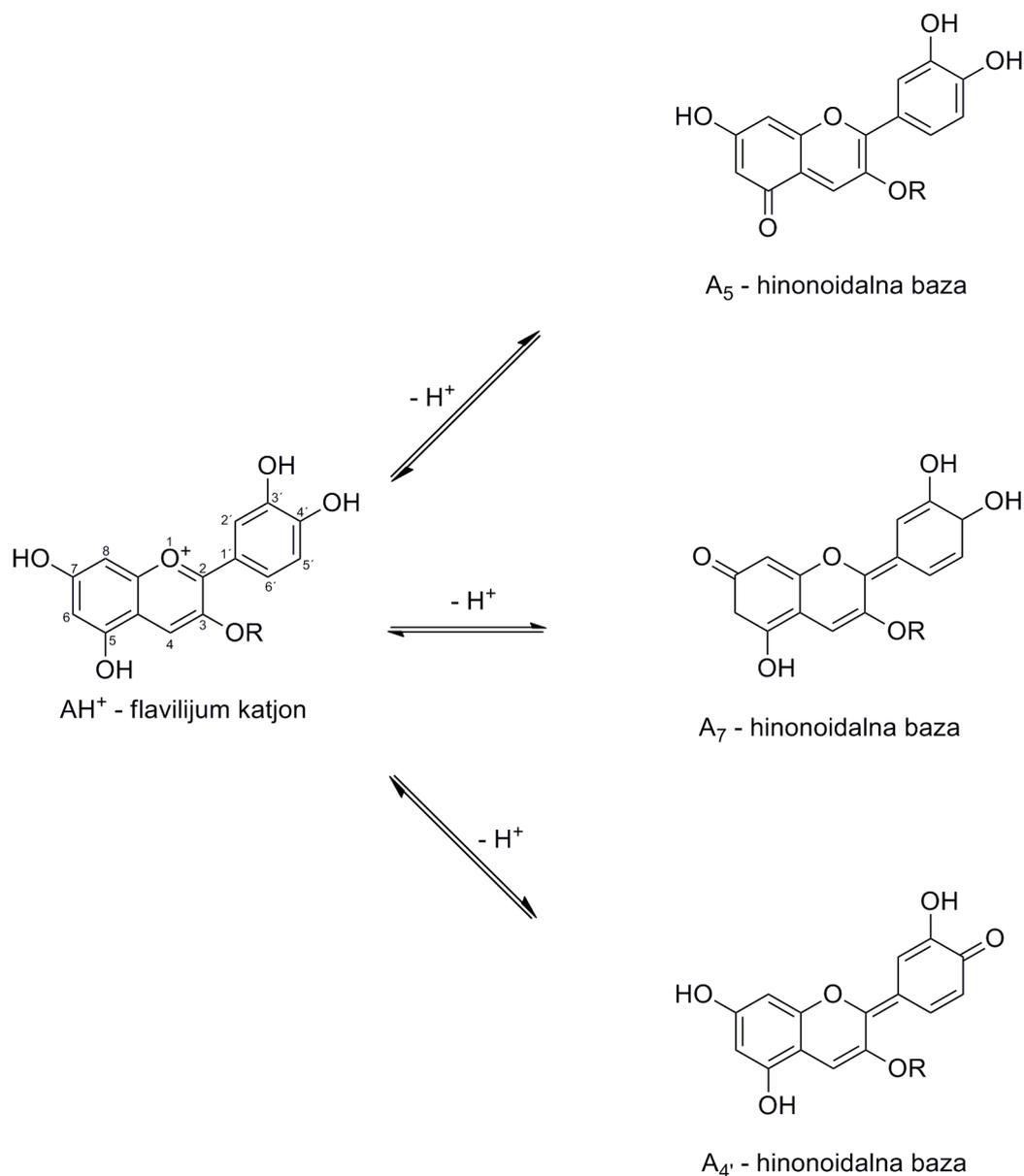
Jedinjenje	K_a' (mol·dm ⁻³)	pK_a'
Malvin hlorid	$K_{a4'} + K_{a7'} = 10^{-4}$	4,00
Malvidin 3-glukoizid hlorid	$K_{a4'} + K_{a5'} + K_{a7'} = 7,9 \cdot 10^{-5}$	4,10
Kafeoilferuloil cijanidin 3,7,3'-triglukoizid	$K_{a4'} + K_{a5'} = 3,1 \cdot 10^{-4}$	3,50
4',7-dihidroksiflavilijum hlorid	$K_{a4'} + K_{a7'} = 5,0 \cdot 10^{-5}$	4,30
4'-metoksi-4-metil-7-hidroksiflavilium hlorid	$K_{a7'} = 1,4 \cdot 10^{-5}$	4,85
Apigeninidin hlorid	$K_{a4'} + K_{a5'} + K_{a7'} = 6,3 \cdot 10^{-5}$	4,20
4'-metoksi-4-metil-5,7-dihidroksiflavilium hlorid	$K_{a4'} + K_{a7'} = 5,0 \cdot 10^{-5}$	4,30

Strukturne modifikacije, zahvaljujući elektronskim i sternim efektima, kao i efektu rastvarača i efektu soli, mogu biti dovoljno značajne da izazovu značajnu promenu u vrednostima elementarnih konstanti kiselosti od jednog do drugog jedinjenja. Relativne količine tautomera A₅, A₇ i A₄ ne zavise od pH, kao što to prikazuju jednačine (2.19 do 2.21) (Brouillard, 1982).

$$\frac{[A_7]}{[A_5]} = \frac{K_{a7}}{K_{a5}} \quad (2.19)$$

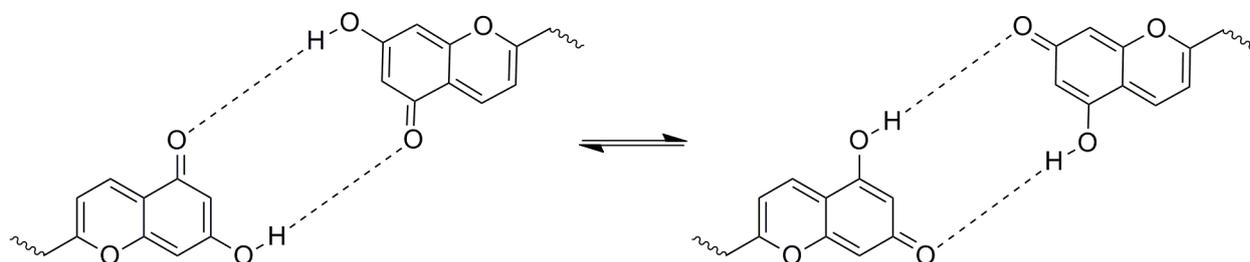
$$\frac{[A_7]}{[A_4]} = \frac{K_{a7}}{K_{a4}} \quad (2.20)$$

$$\frac{[A_5]}{[A_4]} = \frac{K_{a5}}{K_{a4}} \quad (2.21)$$



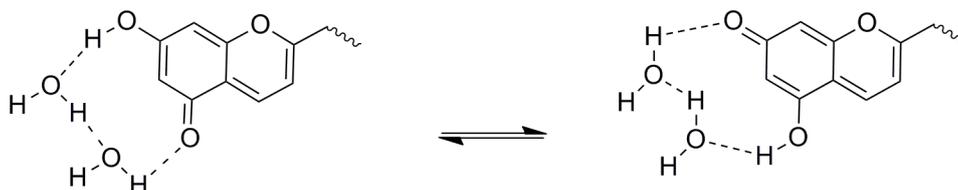
Slika 2.7: Kiselinsko-bazna prototropna ravnoteža koja se uspostavlja u slabo kiseloj vodenoj sredini (pH 4-6) između flavilijum katjona i hinonoidalnih baza (Brouillard, 1982).

Interkonverzija od jednog do drugog tautomera ne mora se neophodno odigravati preko flavilijum stukture. U nekoliko slučajeva otkriven je "nedisocijativan" mehanizam prenosa protona. On se uglavnom odvija preko autoasociranih vrsta supstrata koje formiraju mostove između proton-donor i proton-akceptor mesta (slika 2.8). Međutim, u razblaženim vodenim rastvorima antocijanina ovaj put je malo verovatan.



Slika 2.8: "Nedisocijativni" mehanizam prenosa protona između prototropnih tautomera (Brouillard, 1982).

Drugi direktan interkonverzioni put može se postići uz učešće dva ili više molekula rastvarača, kao što je to prikazano na slici 2.9. Strukturni zahtevi su veoma strogi i izgleda da relativna pozicija atoma između kojih se prenosi proton značajno utiče na doprinos ovog mehanizma. Međutim, treba naglasiti: među brojnim ispitivanim tautomernim sistemima, ovaj mehanizam se retko dešava, a čak i u slučajevima u kojima se dešava, njegova efikasnost je veoma niska u poređenju sa mehanizmom ultrabrzog prenosa protona koja se odigrava u difuziono-kontrolisanim međumolekulskim reakcijama (Brouillard, 1982).



Slika 2.9: Direktan interkonverzioni mehanizam prenosa protona (Brouillard, 1982).

U neutralnim ili slabo baznim rastvorima, kada je prisutno više od jedne hidroksilne grupe, dolazi do druge deprotonacije koja dovodi do formiranja negativno naelektrisanih vrsta (jednačina 2.22) (Brouillard, 1982).



Kada su prisutne dve hidroksilne grupe u neutralnim tautomerima, kao što je to slučaj kod 3-monozida, situacija je veoma složena. Postoje tri negativno naelektrisanu prototropna tautomera, A_{75}^- , A_{74}^- , i A_{54}^- , i šest konstanti kiselosti, (Brouillard, 1982):

$$K_{a75}^{\cdot} = \frac{[A_{75}^-]}{[A_7]} \cdot a_{H^+} \quad (2.23)$$

$$K_{a74}^{\cdot} = \frac{[A_{74}^-]}{[A_7]} \cdot a_{H^+} \quad (2.24)$$

$$K_{a57}^{\cdot} = \frac{[A_{75}^-]}{[A_5]} \cdot a_{H^+} \quad (2.25)$$

$$K_{a54}^{\cdot} = \frac{[A_{54}^-]}{[A_5]} \cdot a_{H^+} \quad (2.26)$$

$$K_{a45}^{\cdot} = \frac{[A_{54}^-]}{[A_4]} \cdot a_{H^+} \quad (2.27)$$

$$K_{a47}^{\cdot} = \frac{[A_{74}^-]}{[A_4]} \cdot a_{H^+} \quad (2.28)$$

Postojanje jednog ili više neutralnih tautomera (A) i jednog ili više negativno naelektrisanih tautomera (A^-) uočava se na osnovu velikog batohromnog pomeranja koje se javlja u vidljivom delu spektra prirodnih antocijanina kada se pH povećava od 2 do 10. Treba napomenuti da se formiranje i neutralnih i negativno naelektrisanih tautomera odigrava u oblasti kiselosti, koja odgovara kiselosti čelijskog soka. Sve ove vrste su visoko konjugovani sistemi koji jako apsorbuju vidljivu svetlost i snažno boje sredinu u kojoj se nalaze.

Ispitivanjem cvetova velikog broja biljnih vrsta, utvrđeno je da se kiselost ćelijskog soka kreće od 2,5 do 7,5. Kod ćelija sa najnižom pH vrednošću, pigmentacija se verovatno javlja zbog same flavilijumske forme. U oblasti pH vrednosti od 3 do 4 i flavilijum katjon (AH^+) i neutralni tautomeri (A) daju doprinos boji. U oblasti pH vrednosti od 4 do 6, dominiraju neutralni tautomeri (A), međutim idući prema neutralnoj sredini negativno naelektrisane vrste (A^-) postaju stabilne kao i neutralni tautomeri (A). To pokazuje da je pH jedan od najvažnijih faktora u fenomenu pigmentacije cvetova i plodova antocijaninima (Brouillard, 1982).

Kada su prisutne tri hidroksilne grupe, na C-4', C-5 i C-7 atomima u flavilijum obliku, i kada je sredina dovoljno bazna, može se formirati dianjon (A^{2-}) gubitkom trećeg protona. Zapažanje ove finalne deprotonacije zamagljeno je činjenicom da se u jako baznoj sredini, pigment brzo konvertuje u ono što je, verovatno, jonizovani halkon. Kod antocijanina koji imaju tri hidroksilne grupe, kao što je to slučaj kod 3-monozida, uspostavlja se 12 ravnoteža prenosa protona. Sa izuzetkom flavilijum katjona (AH^+) i hinonoidalnog dianjona (A^{2-}), sve ostale strukture aglikona antocijanina prisutne su u slabo kiselim ili neutralnim rastvorima. To ukazuje da flavilijum oblik antocijanina može dati sedam različitih struktura aglikona u slučaju 3-monozida i tri različite strukture aglikona u slučaju 3,5 i 3,7-dimonozida. Nažalost, za obične antocijanine u vodenoj sredini, ove strukture su nestabilne, i u zavisnosti od kiselosti rastvora, nestaju brže ili sporije sve dok se rastvor skoro u potpunosti ne obezboji. Glavni faktor u procesu obezbojavanja je visoka reaktivnost flavilijum katjona prema nukleofilnim reagensima, uključujući molekule vode i hidroksilne jone (Brouillard, 1982).

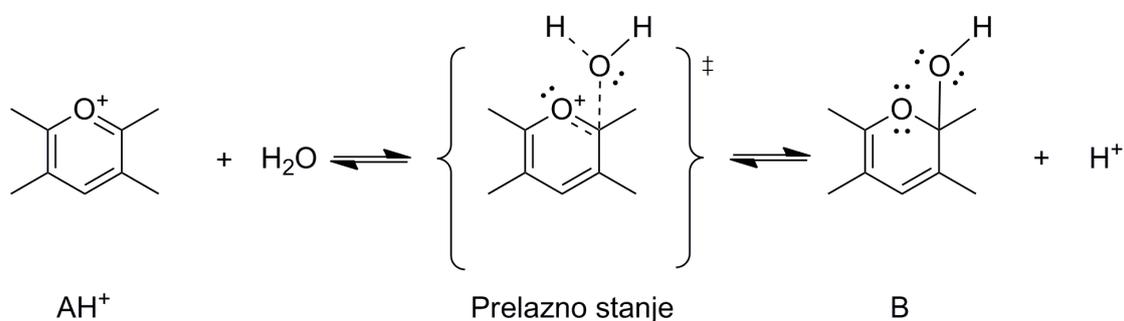
2.3.5. Kovalenta hidratacija pirilijum jezgra

Kovalenta hidratacija pirilijum jezgra je reverzibilna pH zavisna reakcija (jednačina 2.2) čija je konstanta ravnoteže data jednačinom 2.29:

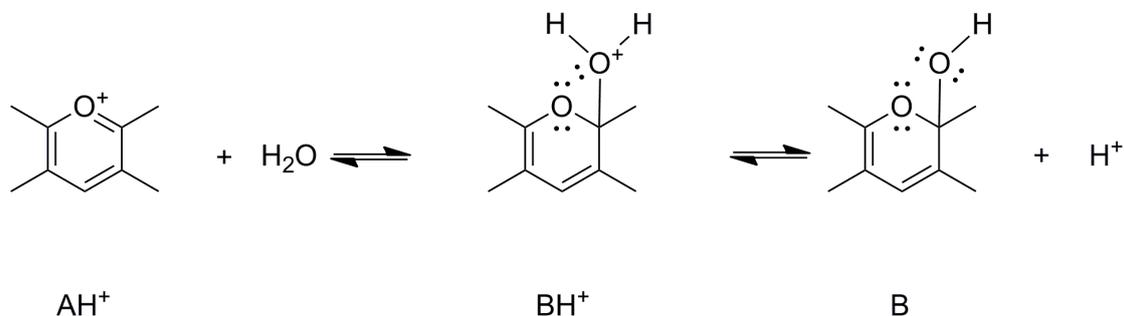
$$K_h = \frac{[B]}{[AH^+]} \cdot a_{H^+} \quad (2.29)$$

Kovalentna adicija vode odvija se na C-2 atomu. Ova reakcija se verovatno odigrava mehanizmom udruženog procesa u kome se prenos protona i raskidanje ili nastajanje C-O veza dešava u isto vreme, kao što je to prikazano na slici 2.10. Takođe, ova reakcija bi mogla da se odigrava mehanizmom u kome se posle nukleofilne adicije vode formira intermedijer BH^+ (slika 2.11). Ova protonovana vrsta bila bi veoma nestabilna u pH području koje se obično ispituje, i davala bi hemiacetalni oblik prenosom protona na molekul rastvarača.

Za prirodne antocijane, reakcija hidratacije pirilijum jezgra odgovorna je za gubitak boje u slabokiselom rastvoru. Pošto u hemiacetalnom obliku (B) prstenovi A i B nisu konjugovani, ne dolazi ni do apsorpcije svetlosti u vidljivom delu spektra. Na osnovu rečenog, moglo bi se izvesti generalno pravilo da nukleofilna adicija vode na antocijanine dovodi do gubitka boje (Brouillard, 1982).



Slika 2.10: Kovalentna hidratacija pirilijum jezgra mehanizmom udruženog procesa uz istovremeni prenos protona i raskidanje ili nastajanje C-O veza (Brouillard, 1982).



Slika 2.11: Kovalentna hidratacija pirilijum jezgra mehanizmom u kome se posle nukleofilne adicije vode formira intermedijer BH⁺ (Brouillard, 1982).

Brzina uspostavljanja ravnoteže reakcije hidratacije je oko 10^6 puta manja od brzine uspostavljanja ravnoteže kiselinsko-baznih reakcija koje daju prototropne tautomere. Ovi rezultati ukazuju da se, bez obzira na pH vrednost, prototropni tautomeri uvek prvi formiraju ili nestaju u eksperimentima sa skokom pH vrednosti (Brouillard, 1982).

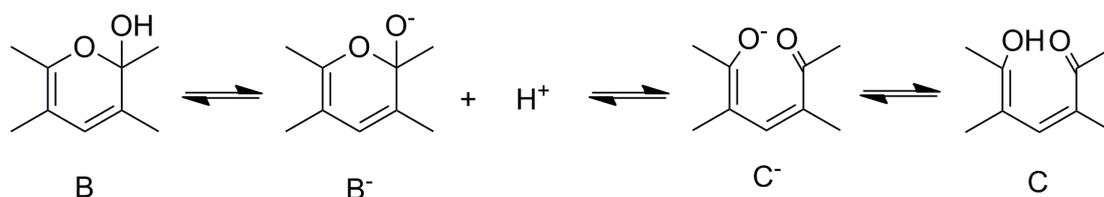
Pored toga, da bi se razumela izuzetna reaktivnost antocijanina sa vodom, neophodno uporediti K_h' i K_a' vrednosti. Za najčešće antocijane (3,5-dimonozide i 3-monozide), K_h' je reda veličine $\sim 10^{-2}$ - 10^{-3} na 25°C, i mnogo je viša nego K_a' . Lako se može pokazati da je, u stanju ravnoteže, odnos koncentracija hemiacetalnog oblika (B) prema koncentraciji hinonoidalnih baza (A) jednak odnosu K_h'/K_a' i nezavisan je od kiselosti sredine. Za malvidin 3-glukozid, ovaj odnos je 43 na 25°C. Hemiacetalni oblik je dakle, 43 puta zastupljeniji od hinonoidalnih struktura A₄, A₅, i A₇. Njegovo formiranje je pod termodinamičkom kontrolom. Izuzetak su sintetičke flavilijum soli i prirodni acilovani antocijanini, kod kojih su nađene K_h' vrednosti znatno niže od K_a' vrednosti. Jedinjenja ovog tipa daju rastvore koji su obojeni bez obzira na pH vrednost (Brouillard, 1982).

Adicija bi trebalo da se dešava i na C-2 i C-4 atomu, pošto su parcijalna pozitivna naelektrisanja ovih atoma skoro ista. Laboratorijske studije međutim navode na zaključak da se u slučaju malvina, cijanina i malvidin 3-glukozida, 4-adukt ne formira. Ovaj zaključak zasnovan je na dve činjenice: (a) nije detektovan relaksacioni signal koji bi odgovarao 4-

aduktu, i (b) odlično slaganje između teorijskih i eksperimentalnih amplituda pokazuje da je zbir koncentracija četiri strukture AH^+ , A, B i C jednak analitički izmerenoj koncentraciji. Za antocijanine, C-2 atom je uvek supstituisan fenil grupom (B-prsten), a C-4 atom je uvek ne supstituisan. Vrlo je verovatno da se formiranje 2-adukta i formiranje 4-adukta dešava različitim brzinama i u različitom obimu. Ovaj zaključak baziran je na kinetičkim i termodinamičkim studijama koje se odnose na konkurentno formiranje σ -adukata kada postoje dva različito supstituisana mesta adicije (Brouillard, 1982).

2.3.6. Prsten-lanac tautomerija

Neko vreme smatralo se da prirodni antocijanini ne formiraju halkone. Međutim, 1977. god. Brouillard i Delaporte su otkrili male količine halkona kod prirodnih antocijanina prilikom povećanja temperature vodenog rastvora malvidin 3-glukozida na pH 4. Povećanje temperature za oko 30°C, počevši od sobne temperature, dovodi do značajnog povećanja apsorbance u blizini apsorpcionog maksimuma halkona (350 nm). Ovo povećanje apsorbancije ukazuje na postojanje prsten-lanac prototropnog tautomerizma između cikličnog hemiacetalnog oblika (B) i halkona (C) sa otvorenim prstenom (slika 2.12).



Slika 2.12: Prsten-lanac prototropna tautomerija između cikličnog hemiacetalnog oblika (B) i halkona (C) sa otvorenim prstenom (Brouillard, 1982).

Ova transformacija je bazno katalizovana i veoma je slična bazno katalizovanom keto-enol tautomerizmu β -dikarbonilnih jedinjenja. U kiseljoj sredini, jonizovane forme hemiacetalnog oblika (B⁻) i halkona (C⁻) su nestabilne i ne mogu se detektovati, a brzina interkonverzije dva neutralna tautomera (B i C) je zbog toga spora. U slabo baznoj sredini,

jonizovane forme hemiacetalnog oblika (B⁻) i halkona (C⁻) se brzo formiraju. U odsustvu supstituenta u položaju 3, ravnoteža između hemiacetalnog oblika (B) i halkonskog oblika (C) je skoro u potpunosti pomerena prema otvorenoj halkonskoj formi. U prisustvu supstituenta u položaju 3, favorizovana je ciklična hemiacetalna forma. Ovaj rezultat je u dobroj saglasnosti sa efektima supstituenta uočenim za prsten-lanac tautomerizam, uopšte (Brouillard, 1982).

Reakcija zatvaranja prstena pri prelazu halkonskog u hemiacetalni oblik $C \rightarrow B$ je verovatno važan korak u biosintezi antocijanina. Aglikon se verovano prvo formira kao halkonska struktura (C). Uvođenje glikozilne grupe na C-3 atom je od suštinskog značaja za dobar prinos hemiacetalnog oblika (B). Pod odgovarajućim uslovima, hemiacetalni oblik koji je upravo formiran se brzo i kvantitativno pretvara u obojeni flavilijum oblik (AH⁺). Važno je napomenuti da, sa izuzetkom retkih 3-dezoksiantocijanina, svi prirodni antocijanini imaju nizak sadržaj halkona zbog prisustva 3-glikozidnog ostatka. Za flavilijum soli bez supstituenta na C-3 atomu, detekcija hemiacetalnog oblika (B) je teška, pogotovu kad su prisutne kisele hidroksilne frupe (Brouillard, 1982).

Utvrđeno je, da je kod nekih sintetičkih flavilijum soli položaj hemiacetal-halkon ravnoteže zavistan od svetla i da je halkon uglavnom u *trans*- formi. Konverzija *trans*- u *cis*-halkon je korak koji ograničava brzinu za proces ciklinizacije i dešava se brže na svetlu nego u tami. Za 4',5,7-trimetoksiflavilijum perhlorat i 3'-metoksi-4',7-dihidroksiflavilium perhlorat, uspostavljanje ravnoteže između flavilijum jona i *trans*-halkona zahteva nekoliko sati u mraku na sobnoj temperaturi. Postulirano je, da je pri svim pH vrednostima, osim možda u najkiselijim rastvorima (tj., pH \approx 1), *trans*-halkon jedina stabilna struktura za sam flavilijum katjon i za njegove 4'-metil i 4'-metoksi derivate. Međutim, zakišeljavanje rastvora *trans*-halkona ovih soli u mraku na oko pH 1 ne regeneriše katjonsku formu. Ovi rezultati objašnjeni su pretpostavkom da u mraku, odgovarajuća konstanta kiselosti za flavilium-*trans*-halkon ravnotežu snažno favorizuje neutralne vrste čak i pri pH 1, ili da je poluživot za regeneraciju katjona u mraku, na sobnoj temperaturi veći od dve godine. Utvrđeno je da sadržaj halkona kod prirodnih antocijanina značajno raste sa temperaturom zbog visoke endotermnosti reakcije otvaranja pirilijum prstena. Veliki deo takozvanog termičkog razlaganja antocijanina može se pripisati povećanju koncentracije halkona sa temperaturom (Brouillard, 1982).

2.3.7. Auto-asocijacija

U nekim slučajevima, uočeno je da se intenzitet boje antocijanina povećava više od linearnog prilikom povećanja koncentracije pigmenta. O ovom odstupanju od Beer-Lambertovog zakona prvi je izvestio Asen et al. (1972), koji je na pH 3,16 uočio da se apsorbanca cijanidin 3,5-diglukozida na apsorpcionom maksimumu u vidljivoj oblasti spektra, povećava 300 puta kada se koncentracija pigmenta poveća od 10^{-4} do 10^{-2} mol·dm⁻³, ili 100-puta. Malvidin 3-glukozid pokazuje slično ponašanje na pH 3,5. Auto-asocijacija se takođe javlja u koncentrovanim "neutralnim" rastvorima, a zavisi od vrste i koncentracije antocijana (Brouillard, 1982; Mazza & Miniati, 1993).

Upotrebom jednačina 2.9 i 2.10 može se pokazati da za datu pH vrednost, apsorbanca (A) treba da bude direktno proporcionalna koncentraciji pigmenta C_0 (jednačina 2.30) (Brouillard, 1982).

$$A = \frac{(\varepsilon_{AH^+} + a_{H^+} + \varepsilon_A K_a') \cdot l}{K_a' + K_h' + K_h' K_T + a_{H^+}} C_0 \quad (2.30)$$

ε_{AH^+} i ε_A su molarne apsorptivnosti katjonske forme AH^+ i hinonoidalnih baza A na apsorpcionom maksimumu u vidljivoj oblasti spektra (Brouillard, 1982).

U skladu sa navedenim podacima može se zaključiti da se pri dovoljno visokim koncentracijama, dešava proces koji nije prikazan na šemi 2.1. Odstupanje od Beer-Lambertovog zakona pripisuje se auto-asocijaciji pigmenta. U ispitivanoj pH oblasti, cijanidin 3,5-diglukozid se uglavnom nalazi u hemiacetalnom obliku (B), ali su prisutne i male količine katjonskog oblika (AH^+) i halkonske forme (C), kao i hinonoidalnih baza (A). Jedna ili više od ove četiri vrste može biti uključena u proces koji dovodi do anomalnog povećanja apsorbanca. Tačna priroda formiranog kompleksa i auto-asocijacije antocijanina na pH 3 do 4 nije u potpunosti razjašnjena, ali ispitivanja izvedena na pH 7 pružaju dokaze da se na ovoj pH vrednosti odvija vertikalno slaganje hinonoidalnih baza (A) antocijanina. Pokretačka snaga za ovo slaganje pripisuje se hidrofobnim interakcijama između aromatičnih jezgara pre nego vodoničnim vezama. Nije u potpunosti jasno da li auto-asocijacija zapravo dovodi do

stabilizacije boje, jer u uravnoteženim rastvorima na pH 7, samo 3 do 5% pigmenta ostaje u obojenom obliku. Ipak, mali gubitak analitičke koncentracije pigmenta može rezultirati u proporcionalno velikom gubitku boje, pogotovu pri visokim koncentracijama antocijanina (Brouillard, 1982; Mazza & Miniati, 1993).

2.4. Efekti stabilizacije boje

Boja rastvora antocijanina zavisi od više faktora kao što su: koncentracija pigmenta, rastvarača, temperature, pH vrednosti, strukture pigmenta, prisustva kopigmenta, metalnih jona, enzima, kiseonika, askorbinske kiseline, šećera i njihovih proizvoda razgradnje, sumpor dioksida i drugih faktora (Brouillard, 1982; Mazza & Miniati, 1993).

Na primer, sumpor dioksid i askorbinska kiselina u prisustvu kiseonika imaju efekat beljenja. Nasuprot tome, kvercetin i rutin povećavaju intenzitet boje. Povećanje intenziteta boje je u direktnoj vezi sa povećanjem stabilnosti hinonoidalnih struktura (A). Metalni joni kao što su Al^{3+} i Fe^{3+} formiraju jako obojeni koordinacioni kompleks sa antocijaninima koji poseduju *o*-dihidroksilnu grupu u svom B-prstenu (Brouillard, 1982).

2.4.1. Uticaj pH vrednosti na strukturu, boju i stabilnost antocijana

Rastvaranjem antocijanina u vodenim rastvorima čije se pH vrednosti kreću od 1 do 14 mogu se dobiti sve dugine boje. Na osnovu takvih vizualnih zapažanja, može se zaključiti da u pojavi kao i u nestajanju tako velikog broja obojenih oblika, mora biti uključen veliki broj elementarnih reakcija. Veoma je bitno, da su sve tri vrste prisutne u vodi tj., H^+ , OH^- , i H_2O , visoko reaktivne prema antocijaninima. Pored čisto kovalentnih interakcija, voda igra važnu ulogu i kao rastvarač, utičući na stabilnost i reaktivnost, kao i na spektralne osobine, brojnih i različitih struktura antocijanina koje su prisutne u vodi. Na sobnoj temperaturi, boja antocijanina je stabilna samo u kiseloj sredini. U baznoj sredini, dolazi do bržeg ili sporijeg otvaranja pirilijum prstena. To se može ilustrovati eksperimentima zakišeljavanja, u kojima je finalna pH vrednost ~ 1 . Iz kiselih rastvora se uvek kvantitativno regeneriše flavilijum katjon, čak i u slučajevima kada se radi o rastvorima koji su dugo stajali. Sa druge strane, samo sveže pripremljeni alkalni rastvori kvantitativno regenerišu flavilijum strukturu pri zakišeljavanju.

Ovaj rezultat ima veliki praktični značaj, jer to praktično znači da prilikom prerade obojene hrane koja sadrži antocijanine treba izbegavati alkalne uslove. Visoka stabilnost prirodnih antocijanina u kiselim vodenim rastvorima na sobnoj temperaturi dobro se slaže sa činjenicom da je sok biljne ćelije uvek slabo kiseo. Ukoliko se krene od flavilijum soli, pod kinetičkom kontrolom dolazi do formiranja mnogih obojenih oblika antocijanina, koji se zatim preuređuju u stabilnije strukture, koje u nekim slučajevima mogu da rezultiraju razaranjem pigmenta.

Za obične antocijanine, jedina stabilna obojena forma u vodi je flavilijum katjon, koji generalno postoji pri pH vrednostima nižim od 3. Pri pH vrednostima rastvora koje se kreću od 5 do 12, odmah po rastvaranju flavilijum soli dobijaju se intenzivno obojeni rastvori. Za ovu intenzivnu početnu boju odgovorne su hinonoidalne strukture, A, A⁻, i možda A²⁻. U kiseloj sredini, dolazi do prelaza hinonoidalnih struktura, pH-zavisnom brzinom, u bezbojni neutralan hemiacetalni oblik. U baznoj sredini, dolazi do nestanka plave boje i pojave blede žute boje koja odgovara jonizovanoj halkonskoj formi. Jonizovani halkonski oblik je nestabilan, i zbog toga u zavisnosti od pH dolazi do bržeg ili sporijeg gubitka žute boje. Nakon ove poslednje faze, regeneracija flavilijum katjona jednostavnim zakišeljavanjem do pH 1 više nije moguća. U sveže pripremljenim alkalnim rastvorima malvin hlorida, nakon zakišeljavanja uočavaju se dve apsorpcione trake. Traka sa apsorpcionim maksimumom blizu 350 nm odgovara neutralnom halkonskom obliku dok traka sa apsorpcionim maksimumom blizu 520 nm odgovara flavilijum katjonu. Na sobnoj temperaturi, nakon nekoliko sati, traka na 350 nm potpuno nestaje, dok intenzitet vidljive trake raste (Brouillard, 1982).

Kada se bezbojan rastvor čija pH vrednost iznosi od 4 do 6 brzo zakiseli do pH vrednosti 1 do 2, odmah se pojavljuje boja katjonskog oblika. Strukturne modifikacije u kiselom rastvoru mogu se na zadovoljavajući način objasniti pomoću ravnotežnih konstanti i konstanti brzine reakcije koje su povezane sa šemom 2.1. Odnos ravnotežne koncentracije flavilijum katjona (AH⁺) prema ravnotežnim koncentracijama hinonoidalnih baza (A), hemiacetalnog oblika (B) i halkonskog oblika (C) date su jednačinama (2.31 do 2.33). Iako nema reakcije direktnog formiranja iz flavilijum katjona (AH⁺), uvek se može definisati ravnotežna konstanta K_c' za ukupnu reakciju $AH^+ \leftrightarrow C + H^+$ (Brouillard, 1982).

$$\frac{[\text{AH}^+]}{[\text{A}]} = \frac{a_{\text{H}^+}}{K_a'} \quad (2.31)$$

$$\frac{[\text{AH}^+]}{[\text{B}]} = \frac{a_{\text{H}^+}}{K_h'} \quad (2.32)$$

$$\frac{[\text{AH}^+]}{[\text{C}]} = \frac{a_{\text{H}^+}}{K_c'} \quad (2.33)$$

gde je:

$$K_c' = K_h' K_T'$$

K_c' ima iste dimenzije kao K_h' pošto se lako može pokazati da je identična proizvodu K_h' i bezdimenzione tautomerne prsten-lanac konstante K_T' .

Za neke sintetičke flavilijum soli koje ne spadaju u antocijanine, intermedijerna hemiacetalna forma se ne može detektovati zbog nepovoljnih kinetičkih i termodinamičkih uslova, pa izgleda kao da postoji jedna ravnoteža između flavilium jona i neutralnog halkonskog oblika.

Flavilijum katjon prevladuje svaki put kad je $a_{\text{H}^+} > K_a' + K_h' + K_c'$. Suprotno tome, neutralne forme A, B i C prevladavaju svaki put kada je $K_a' + K_h' + K_c' > a_{\text{H}^+}$, za a_{H^+} vrednosti veće od $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Odnos ravnotežnih koncentracija neutralnih vrsta hinonoidalne baze (A), hemiacetalnog oblika (B) i halkonskog oblika (C) dat je jednačinama (2.34 do 2.36). Kao što se i očekuje, za razblažene rastvore, ovaj odnos ne zavisi od pH (Brouillard, 1982).

$$\frac{[\text{A}]}{[\text{B}]} = \frac{K_a'}{K_h'} \quad (2.34)$$

$$\frac{[\text{A}]}{[\text{C}]} = \frac{K_a'}{K_c'} \quad (2.35)$$

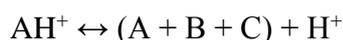
$$\frac{[\text{B}]}{[\text{C}]} = \frac{1}{K_T'} \quad (2.36)$$

Jednačina (2.37) prikazuje odnos zbira ravnotežnih koncentracija obojenih vrsta flavilijum katjona (AH^+) i hinonoidalne baze (A) prema zbiru ravnotežnih koncentracija bezbojnih vrsta hemiacetalnog oblika (B) i halkonskog oblika (C). Poznavanjem vrednosti K_a' , K_h' i K_T za dati antocijanin, može se naći zavisnost $(K_a' + a_{H^+})/(K_h' + K_c')$ u funkciji a_{H^+} i izmeriti frakcija pigmenta koja je prisutna u obojenom obliku za datu pH vrednost (Brouillard, 1982).

$$\frac{([AH^+] + [A])}{([B] + [C])} = \frac{(K_a' + a_{H^+})}{(K_h' + K_c')} \quad (3.37)$$

2.4.2. Strukturni efekti

Kod antocijanina se najčešće meri ukupan zbir tri ravnotežne konstante K_a' , K_h' i K_c' koji odgovara ukupnoj transformaciji:



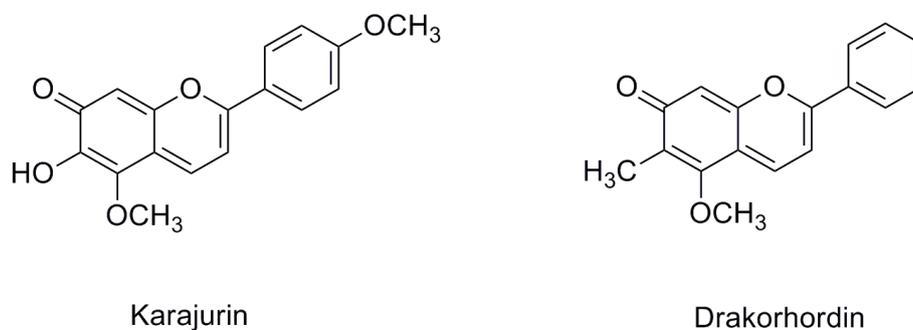
i koju karakteriše ravnotežna konstanta (jednačina 3.38):

$$K = K_a' + K_h' + K_c' \quad (3.38)$$

Pošto se ove tri konstante odnose na tri različita tipa reakcija, uticaj datog supstituenta razlikuje se od jedne do druge reakcije. Na primer, svaki supstituent na C-3 ili C-4 atomu, verovatno će snažno uticati na položaj ravnoteže hidratacije (K_h') i tautomerije (K_c'), ali će verovatno u znatno manjoj meri uticati na ravnotežu prenosa protona (K_a') (Brouillard, 1982).

U zavisnosti od relativnih vrednosti K_a' , K_h' i K_c' moguća su tri slučaja:

1. $K_h' \gg K_a', K_c'$. Nakon potpunog uravnoteženja, pigment se ponaša kao da je jedina ravnoteža bila $AH^+ \leftrightarrow B + H^+$. Ovo važi za obične antocijanine gde su jedine stabilne vrste u kiselom rastvoru flavilijum katjon (AH^+) i hemiacetalni oblik (B).
2. $K_c' \gg K_a', K_h'$. Kada se dostigne stanje ravnoteže, sistem je potpuno opisan reakcijom $AH^+ \leftrightarrow C + H^+$. Vrednosti K_T u ovom slučaju su mnogo veće od jedinice. Dobar primer je 4',7-dihidroksiflavilijum hlorid.
3. $K_a' \gg K_h', K_c'$. Ovo je najinteresantnija situacija, pošto podrazumeva da je hromofora hinonoidalne baze (A) stabilna do blizu neutralne sredine. Poznati su mnogi primeri sintetičkih flavilijum soli, acilovanih antocijanina i prirodnih hinonoidalnih baza. Jedine vrste koje se mogu uočiti su flavilijum jon (AH^+) i hinonoidalna baza (A), dok se hemiacetalni oblik (B) i halkonski oblik (C) veoma teško mogu detektovati. Jedina uočljiva reakcija je reakcija prenosa protona $AH^+ \leftrightarrow A + H^+$. Ukoliko su K_h' i K_c' niže od $\sim 1\%$ K_a' , onda se formiraju veoma niske količine hemiacetalnog oblika (B) i halkonskog oblika (C), tako da se ravnoteža ne može detektovati, a konstante K_h' i K_c' se ne mogu izmeriti. Glavni razlog za takvo ponašanje je taj, da su posle skoka pH vrednosti, hinonoidalne baze (A) istovremeno i kinetički i termodinamički proizvod. Ovaj slučaj se odnosi na *Zebrina* antocijanin, kao i neke druge strukturno povezane antocijanine. To se odnosi i na 4'-metoksi-4-metil-7-hidroksiflavilijum katjon. Takvi pigmenti pokazuju izuzetnu stabilnost boje u slabo kiselim ili neutralnim rastvorima. Pored toga, to daje mogućnost objašnjenja nekih prirodnih hinonoidalnih baza kao što su to karajurin i drakorhodin (slika 2.13). Neobične stabilnosti ove dve hinonoidalne baze posledica su niskih vrednosti K_h' i K_c' . U poređenju sa antocijaninima karajurin i drakorhodin karakteriše postojanje supstituenata na C-6 atomu, pirilijum prstena bez supstituenta u položaju C-3 i nedostatak hidroksilne grupe na C-4 atomu. Nakon zakišeljavanja, karajurin i drakorhodin hinonoidalne baze vraćaju se u oblik flavilijum katjona (Brouillard, 1982).



Slika 2.13: Struktura prirodnih hinonoidnih baza, karajurina i drakorhodina

Takođe, moguća je i situacija u kojoj je jedna od tri konstanti stabilnosti zanemarljiva u poređenju sa druge dve. Na primer, ako je $K_a' \approx K_c' \gg K_h'$, formiraju se samo male količine hemiacetalne forme (B), a ravnotežne koncentracije hinonoidnih baza (A) i halkonskog oblika (C) su približno ekvivalentne polovini analitičke koncentracije u slabo kiselom rastvoru, kao što je to slučaj kod 4',5,7-trihidroksiflavilijum (apigenidin) hlorida (Brouillard, 1982).

Hidroksilne grupe, metoksilne grupe, šećeri, i acilovani šećeri imaju značajan uticaj na stabilnost i intenzitet boje antocijanina. Kako se povećava broj hidroksilnih grupa na B-prstenu, tako se vidljivi apsorpcioni maksimum antocijanidina pomera prema većim talasnim dužinama, a boja se menja od narandžaste do plave. Na primer, položaji apsorpcionih maksimuma u 0,01% HCl-MeOH rastvorima za pelargonidin su na 520 nm (narandžast), cijanidin na 535 nm (narandžasto-crven), i delfinidin na 545 nm (plavkasto-crven). Kada metoksilne grupe zamenjuju hidroksilne grupe javlja se obrnuti trend. Hidroksilna grupa na C-3 atomu je posebno važna, jer utiče na promenu boje pigmenta od žuto-narandžaste u crvenu. Primer za ovo je razlika u boji između većine antocijanidina, koji su crveni i 3-dezokiantocijanidina, apigeninidina, luteolinidina i tricetinidina, koji su žuti. Ista hidroksilna grupa na C-3 atomu, međutim, destabilizuje molekul, što je ilustrovano činjenicom da su dezoksiantocijanidini mnogo stabilniji od ostalih antocijanidina (Mazza & Miniati, 1993).

Slično tome, i prisustvo hidroksilne grupe na C-5 atomu i supstitucija na C-4 atomu stabilizuju obojene oblike preko zaustavljanja reakcije hidratacije koja dovodi do formiranja bezbojnih vrsta. Na datoj pH vrednosti, antocijanidin 3-glikozidi su jače obojeni od 3,5- i 5-glikozida. Brojna istraživanja su pokazala da 3,5- i 5-glikozidi imaju samo 50% apsorpcije na 440 nm u poređenju sa onom koju imaju 3-glikozidi i slobodni antocijanidini. Slično tome, intenzitet kratkotalasnog maksimuma je niži u slučaju 3,5-diglukozida nego u slučaju 3-glukozida. Glikozilacija takođe utiče na stabilnost pigmenta. Na primer, poluživot (opadanje apsorpcije za 50% na talasnoj dužini apsorpcionog maksimuma) tipičnog antocijanina, cijanidin 3-rutinozida, je oko 65 dana na sobnoj temperaturi u 0,01 mol·dm⁻³ limunskoj kiselini, čija je pH vrednost 2,8. Odgovarajući slobodan antocijanidin, međutim, ima poluživot od samo 12 h. Slično tome, na pH 2,5 i 4,5, stabilnost peonidina i malvidina je znatno niža od stabilnosti njihovih 3-glukozida. Spora hidroliza 3-*O*-šećerne jedinice antocijanina u uslovima kisele sredine je po svoj prilici odgovorna za veću stabilnost ovih pigmenta. Pokušaji da se poboljša stabilnost metilacijom slobodnih fenolnih hidroksilnih grupa su umesto povećanja stabilnosti zapravo doveli do smanjenja stabilnosti. Prisustvo 4'-OH ili 7-OH grupa u molekul značajno stabilizuje pigment dok metilacija ovih hidroksilnih grupa smanjuje njegovu stabilnost (Mazza & Miniati, 1993).

Antocijanini koji sadrže dve ili više aromatičnih acil grupa (kao što su ternatin, platikonin, cinerarin, gentiodelfin i zebrinin) stabilni su u neutralnim ili slabo kiselim sredinama, što je verovatno posledica vodoničnog vezivanja između fenolnih hidroksilnih grupa u antocijanidinima i aromatičnih kiselina. Takođe je uočeno da su diacilovani antocijanini stabilizovani slaganjem "sendvič-tipa" koje se javlja zbog hidrofobnih interakcija između prstena antocijanidina i dve aromatične grupe (Mazza & Miniati, 1993).

Postavlja se pitanje koji strukturni elementi najviše utiču na položaj jedne ili više od tri ravnoteže koje su prikazane na šemi 2.1? Izmerene vrednosti konstante K_a' kreću se od $1,4 \cdot 10^{-5}$ do $31 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³ (tabela 2.2). Različiti supstituenti koji su vezani za flavilijum heterocikl imaju uticaj na prototropni tautomerizam. Taj uticaj, međutim, nije tako veliki i skoro sve izmerene pK_a' vrednosti nalaze se između 4,0 i 4,3. Delokalizacija pozitivnog naelektrisanja preko celog flavilijumskog sistema je verovatno glavni faktor koji određuje veličinu K_a' . Nasuprot tome, izgleda da položaj ravnoteže hidratacije jako zavisi od strukture. Za 3,5-dimonozide, K_h' vrednosti su blizu 10^{-2} mol·dm⁻³; za 3-monozide, one su blizu 10^{-3} mol·dm⁻³, i za jedinjenja bez supstituenta na C-3 atomu, one su znatno niže. Najniža poznata

K_h' vrednost izmerena je za 4'-metoksi-4-metil-7-hidroksiflavilijum hlorid i iznosi $8,9 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, što je za oko 15 000 puta niže od vrednosti koje se sreću kod 3,5-dimonozida. Veoma je bitno napomenuti, da šećerni ostatak na C-3 atomu snažno favorizuje reakciju hidratacije pirilijum jezgra. U isto vreme, on u velikoj meri smanjuje sadržaj halkona (K_T). Za flavilijum soli sa supstituentom na C-4 atomu, ravnoteža hidratacije je verovatno više pomeren prema flavilijum katjonu (AH^+) nego kod jedinjenja bez supstituenta na C-4 atomu. U ovom slučaju, ukoliko K_T nije preveliko, hromofora hinonoidalne baze (A) bi trebalo da bude stabilna (Brouillard, 1982).

Ukoliko uporedimo konstante brzine transformacije malvidin 3,5-diglukozid hlorida i malvidin 3-glukozid hlorida, koje su izmerene u mraku, može se uočiti da prisustvo glukozidnog ostatka na C-5 atomu umesto jedne grupe ima minimalan uticaj ne samo na položaj, već i na kinetiku brze ravnoteže prenosa protona $\text{AH}^+ \leftrightarrow \text{A} + \text{H}^+$. Nasuprot tome, prisustvo *O*-glukozil grupe na C-5 atomu značajno povećava konstantu brzine reakcije hidratacije k_h i značajno smanjuje konstantu brzine k_{-h} povratne reakcije. To dovodi do velikog pomeranja položaja ravnoteže hidratacije prema hemiacetalnom obliku (B). Ovo pomeranje ravnoteže odgovorno je za manju snagu bojenja 3,5-diglukozida u poređenju sa 3-monoglukozidima. Konstante brzine k_T i k_{-T} koje se odnose na hemiacetal-halkon prsten-lanac ravnotežu, pokazuju da je u kiselim rastvorima, za potpunu ravnotežu između ove dve strukture potrebno nekoliko sati. Otvaranje i zatvaranje prstena odvija se preko jonizovane hemiacetalne forme (B^-) i jonizovanog halkona (C^-). Čim ove dve jonizovane vrste postoje u priličnim količinama (alkalni uslovi), prsten-lanac tautomerna ravnoteža se uspostavlja veoma brzo (Brouillard, 1982).

Kinetička stabilnost hinonoidalne baze (A) može se izraziti jednačinom 2.39. τ je relaksaciono vreme vezano za transformaciju $\text{A} \leftrightarrow \text{B}$ pod uslovima gde flavilijum katjon (AH^+) više nije stabilan (blizu neutralne sredine). Relaksaciono vreme τ je mera vremena poluživota hinonoidalne baze (A). Ono raste kada kiselost opada. Ova pojava se uvek pripisivala većoj stabilnosti hinonoidalne baze (A) pri višim pH vrednostima. U stvari, radi se samo o kinetičkoj stabilnosti (Brouillard, 1982).

$$\tau = \frac{K_a}{k_h a_{\text{H}^+}} \quad (2.39)$$

2.4.3. Uticaj koncentracije

Količina antocijanina u biljnim tkivima može višestruko da varira. Utvrđeno je na primer, da se koncentracija cijanidin 3-galaktozida i 3-glukozida u većini sorti vrste *Amelanchier alnifolia* (Malaceae) povećava sa oko 60 mg/100 g u crvenim bobicama na preko 160 mg/100 g u tamno ljubičastim bobicama. Slično tome, u "Montmorency" višnjama, ukupan sadržaj antocijanina se kontinuirano povećava tokom sazrevanja od 2 do 43,6 mg/100 g sveže mase. Kod crvene ribizle ukupan sadržaj antocijanina se duplira tokom sazrevanja od pink faze do tamne, potpuno zrele faze. Kod ovih vrsta, povećanje koncentracije antocijanina praćeno je promenom glikozidacionog obrasca jedinog prisutnog aglikona, cijanidina. U "Meeker" malinama, ukupan sadržaj antocijanina četverostruko se povećava u zrelim plodovima. Relativni odnos četiri glavna pigmenta, koji se nalaze u nezrelim plodovima, ne menja se značajno tokom sazrevanja. Povećana koncentracija antocijanina u ovim i drugim biljnim tkivima pojačava njihovu boju i može povećati stabilnost boje kroz fenomen intermolekulske kopigmentacije ili auto-asocijacije (Mazza & Miniati, 1993).

2.4.4. Kopigmentacioni efekti

Između reakcija prenosa protona i nukleofilne adicije vode postoji kinetička i termodinamička konkurentnost. Faktori koji povećavaju K_a' i/ili smanjuju K_h' i K_T značajno povećavaju obojenost kiselih rastvora i obrnuto. Takvi rezultati dobijeni su za neke sintetičke flavilijum soli sa pogodnim supstinentima na pogodnim ugljenikovim atomima flavilijumskog sistema. Za prirodne antocijanine, međutim, broj supstituenata je ograničen na nekoliko grupa koje su uvek vezane za određene ugljenikove atome flavilijumskog sistema (Brouillard, 1982; Mazza & Miniati, 1993).

Za uobičajne neacilovane antocijanine, polazeći od flavilijumske strukture (AH⁺), formiranje bezbojne hemiacetalne strukture (B) je pod termodinamičkom kontrolom, dok je formiranje obojenih hinonoidalnih baza (A) pod kinetičkom kontrolom. Zbog toga uobičajni antocijanini nisu jako obojeni u slabo kiselim ili neutralnim rastvorima. Pošto se u prirodi termin antocijanin povezuje sa jako obojenim materijama, to znači da se ne nalaze u

bezbojnom hemiacetalnom obliku (B), i da su obojeni oblici jako stabilizovani nekim posebnim faktorima. Među tim faktorima, dva su dominantna. Prvi otkriveni faktor vezan je za prisustvo jedinjenja koja se uopšteno zovu kopigmenti. Drugi faktor vezan za postojanje antocijanina sa dve ili tri acil grupe vezane za šećerni ostatak (Brouillard, 1982; Mazza & Miniati, 1993).

2.4.4.1. Međumolekulska kopigmentacija

Međumolekulska kopigmentacija antocijanina sa drugim flavonoidima i srodnim jedinjenjima dovodi do povećanja intenziteta boje (hiperhromni efekat) i pomeranja položaja apsorpcionog maksima prema većim talasnim dužinama (batohromno pomeranje), dajući ljubičastu do plavu boju. U molekule koji deluju kao kopigmenti spada velik broj raznovrsnih jedinjenja, kao što su flavonoidi, polifenoli, alkaloidi, amino kiseline, organske kiseline, kao i sami antocijanini. Bezbojni flavonoidi i polifenoli često se mogu naći asociirani sa antocijaninima u vakuolama obojenih ćelija viših biljnih organa. Zbog toga je pojava kopigmentacije rasprostranjena u prirodi. Kopigmentacija se takođe javlja i u proizvodima od voća i povrća, kao što su sokovi i vina (Brouillard, 1982; Mazza & Miniati, 1993).

Utvrđeno je da se kopigmentacioni efekat sastoji u molekularnoj interakciji koja se javlja između obojenog oblika antocijanina i kopigmenta. Osnovna uloga kopigmenta jeste da kontroliše obim odigravanja reakcije hidratacije flavilijum katjona (AH⁺) koja dovodi do bezbojnog hemiacetalnog oblika (B) (Mazza & Miniati, 1993).

Šema 2.2 ilustruje najjednostavniji mehanizam koji opisuje efekat međumolekulske kopigmentacije. AHCP⁺ i ACP su flavilijum kopigment i hinonoidalna baza-kopigment kompleksi, respektivno.



Šema 2.2: Mehanizam međumolekulske (intermolekularne) kopigmentacije (Brouillard, 1982).

Pretpostavlja se, da se AHCP⁺ deprotonuje do ACP brzinom i u obimu koji je vrlo sličan deprotonaciji flavilijum katjona (AH⁺) do hinonoidalne baze (A). Sa druge strane, obe ravnoteže AH⁺ ↔ A + H⁺ i B ↔ C su izostavljeni sa šeme 2.2, jer su njihovi doprinosi zanemarljivi. Ravnotežna koncentracija kopigmentirane hinonoidalne baze ACP data je jednačinom (2.40):

$$[ACP] = \frac{K_{inter} K_a^i [CP]}{K_{inter} [CP] (K_a^i + a_{H^+}) + K_h^i + a_{H^+}} C_0 \quad (2.40)$$

gde je:

$$C_0 = [ACP] + [AHCP^+] + [AH^+] + [B]$$

$$K_a^i = \left(\frac{[ACP]}{[AHCP^+]} \right) a_{H^+}$$

$$K_{inter} = \frac{[AHCP^+]}{([AH^+][CP])}$$

$$K_h^i = \left(\frac{[B]}{[AH^+]} \right) a_{H^+}$$

Odnos [ACP]/[A] (kopigmentacioni efekat) zavisi od pH, konstante stabilnosti kopigmentiranog kompleksa K_{inter} , i koncentracije antocijanina i kopigmenta (Brouillard, 1982).

[A] je ravnotežna koncentracija hinonoidalne baze (A) u odsustvu kopigmenta (Brouillard, 1982).

Kao što se očekuje, kada su koncentracije antocijanidina i/ili kopigmenta previše niske, ne javlja se merljivi kopigmentacioni efekat. Sa povećanjem koncentracije kopigmenta ili antocijanidina povećava se odnos $[ACP]/[A]$. ACP kompleks apsorbuje u vidljivom spektru na nešto višim talasnim dužinama nego hinonoidalna baza (A). Ukoliko je K_a' vrednost za $AHCP^+$ veća nego za flavilijum katjon (AH^+), dolazi do povećanja stabilnosti hromofore. Oba ova efekta dovode do kompletnog zadržavanja boje vodenog rastvora kopigmentiranog antocijanina (Brouillard, 1982).

Dakle, intenzitet kopigmentacionog efekta zavisi od niza faktora, uključujući vrstu i koncentraciju antocijanina, pH i temperaturu sredine i rastvarač (Brouillard, 1982; Mazza & Miniati, 1993).

Najefikasniji kopigmenti su flavonoli, aureuzidin (auron), a pogotovu *C*-glikozil flavoni poput svertisina. Flavonolsulfonske kiseline su takođe dobri kopigmenti, verovatno zbog dodatnog privlačenja između negativnog naelektrisanja grupe sulfonske kiseline i flavilijum katjona (Brouillard, 1982; Mazza & Miniati, 1993).

Pod identičnim uslovima pH vrednosti, koncentracije pigmenta i kopigmenta, temperature, jonske jačine i rastvarača, kopigmentacioni efekat se povećava sa povećanjem stepena metoksilacije i glikozilacije antocijanina. Tako, na primer pri kopigment/pigment molarnom odnosu 40, povećanja apsorbance na talasnoj dužini apsorpcionog maksimuma bila su 4,2-puta za malvin, 2,6-puta za cijanin, 2,5-puta za malvidin 3-glukozid, i 1,7-puta za cijanidin 3-glukozid. Antocijanini koji sadrže aromatične acil grupe formiraju mnogo stabilnije pigment-kopigment komplekse sa *C*-glukozilflavonima nego neacilovani antocijanini. Intenziviranje boje kopigmentacijom raste sa povećanjem koncentracije antocijanina i povećanjem odnosa kopigmenta prema antocijaninu. Povećanje temperature znatno smanjuje efekat intenziviranja boje koji se javlja pri dodavanju kopigmenta u rastvor antocijanina (Mazza & Miniati, 1993).

Kopigmentacija se javlja u pH oblasti od blizu 1 do neutralne sredine. pH vrednost pri kojoj se javlja maksimalni kopigmentacioni efekat je oko 3,5, a može blago da varira u zavisnosti od pigment-kopigment sistema (Mazza & Miniati, 1993).

2.4.4.2. Unutarmolekulska kopigmentacija

Unutarmolekulska kopigmentacija odgovorna je za stabilnost boje antocijanina koji sadrže dve ili više aromatičnih acil grupa. Antocijanini koji poseduju dve acil grupe pokazuju izuzetnu stabilnost boje u celokupnom pH području. Njihovi flavilijum katjoni su stabilni u najkiselijoj sredini a njihovi prototropni tautomeri su stabilni u najmanje kiseljoj sredini. U slučaju kafeoilferuloilcijanidin 3,7,3'-triglukoziida, hemiacetalna i halkonska forma se ne mogu uočiti, što ukazuje na postojanje mehanizma koji u potpunosti štiti pirilijum prsten od napada vode. Za ove acilovane antocijanine, hidrofobne sile bi mogle da nastanu od interakcija između pirilijum prstena i acil grupa aromatičnog dela. Pošto je uočeno da su dve acil grupe neophodne za kompletno zadržavanje boje, Brouillard (1981) je zaključio da se jedna acil grupa nalazi iznad pirilijum prstena a druga ispod njega. Zbog toga se stabilnost ovih antocijanina u slabo kiselim ili neutralnim rastvorima pripisuje slaganju "sendvič-tipa" aromatičnog ostatka acil grupa sa pirilijum prstenom flavilijum katjona čime se smanjuje hidratacija u C-2 i C-4 položajima. Hidroliza acil grupa daje odgovarajuće deacilovane antocijanine koji se ponašaju normalno, tj. odmah nakon njihovog rastvaranja u blago kiseljoj ili neutralnoj sredini dolazi do gubitka boje. Pošto monoacilovani antocijanini ne pokazuju takvu stabilnost boje, prisustvo dve acil grupe je osnovni strukturni zahtev za dobro zadržavanje boje u vodi. Stabilizacija hromofore antocijanina je izgleda efikasnija za unutarmolekulsku nego za međumolekulsku kopigmentaciju (Brouillard, 1982; Mazza & Miniati, 1993).

U antocijanine koji ispoljavaju sposobnost unutarmolekulske kopigmentacije spadaju ternatini, platikonin, lobelinin, cinerarin, gentiofedin i zebrinin. Od navedenih jedinjenja najstabilniji u neutralnim vodenim rastvorima su ternatini A, B i D. Izgleda da se stabilnost boje povećava sa povećanjem sadržaja organskih kiselina (cimetna i malonska kiselina) i sa povećanjem supstitucije aglikona (derivati delfinidina su stabilniji od derivata cijanidina ili peonidina). Zbog toga je cinerarin, antocijanin baziran na delfinidinu, koji sadrži dva molekula kafene kiseline i jedan malonske kiseline, stabilniji od rubrocinerarina, antocijanina baziranog na cijanidinu, takođe sa dva molekula kafene kiseline i jednim molekulom malonske kiseline. Efekat dodatne organske kiseline je, međutim, značajniji od strukture aglikona. Tako je na primer, rubrocinerarin, koji poseduje jednu organsku kiselinu (malonsku kiselinu) više nego platikonin i gentiofedin (oba bazirana na delfinidinu sa dva molekula

kafene kiseline), stabilniji od druga dva pigmenta, bez obzira na to što je baziran na cijanidinu. Dakle, na unutarmolekulsku kopigmentaciju utiču: struktura aglikona, priroda, broj i položaj vezivanja acil grupe za šećer, struktura šećera i njegov položaj (Mazza & Miniati, 1993).

Krajnji rezultat kopigmentacije je veća količina pigmenta u obojenom flavilijum ili hinonoidalnom obliku (Brouillard, 1982).

Utvrđeno je da su pri biosintezi flavonoida, glikozilacija i acilacija usko povezani koraci i da oni prate formiranje flavonoidne jedinice. 3-Dezoksiantocijanidini su prekursori antocijanina, pošto su antocijanini nestabilni u vodi. Karakteristika 3-dezoksiantocijanidina je odsustvo supstituenata na C-3 i C-4 atomima i kao posledica toga, verovatno se javlja visok sadržaj halkona. Uvođenje šećera na C-3 atom favorizuje reakciju zatvaranja prstena, a zatim se 3-glikozilovani halkon kvantitativno konvertuje u 3-glikozilovani hemiacetalni oblik. Ova struktura se retko uočava u prirodi, ukazujući da je njegoa konverzija u hromofore završena. Flavilijum forma se javlja u manjoj meri u blago kiselim rastvorima (oko 1% malvidin 3-glukozida je u flavilijum formi na pH 5, na sobnoj temperaturi). Ova mala količina katjona dostupna na visokim pH vrednostima može biti uhvaćena brzom intra ili intermolekulskom kopigmentacijom, u zavisnosti od strukture pigmenta. Ovo brzo hvatanje sprečava bilo koju mogućnost povratka u bezbojni hemiacetalni oblik. Ovaj mehanizam na zadovoljavajući način objašnjava krajnju fazu biosinteze antocijanina (Brouillard, 1982).

2.4.5. Kompleksiranje metalima

Utvrđeno je da antocijanini formiraju stabilne antocijanin-metal komplekse sa kalajem, bakrom i aluminijumom. Nađeno je da su hinonoidalni oblici antocijanina, kao i flavilijum joni snažno stabilizovani i da ne formiraju bezbojne hemiacetalne oblike hidratacijom, kada se rastvore u koncentrovanim vodenim rastvorima neutralnih soli, kao što je na primer magnezijum-hlorid i natrijum-hlorid. Stabilizacija boje u rastvoru natrijum-hlorida može biti posledica podsticanja auto-asocijacije antocijanina dok stabilizacija magnezijum-hloridom može biti posledica smanjenja koncentracije slobodne vode zbog hidratacije magnezijum jona (Mazza & Miniati, 1993).

2.4.6. Ostali faktori

Pored pH vrednosti, strukture, koncentracije, kopigmentacije i kompleksiranja metalima, intenzitet i stabilnost boje antocijanina zavise i od nekoliko drugih faktora kao što su temperatura, svetlost, prisustvo kiseonika, acetaldehida, askorbinske kiseline, šećera i njihovih degradacionih proizvoda, sumpor dioksida, amino kiselina, katehina i drugih (Mazza & Miniati, 1993).

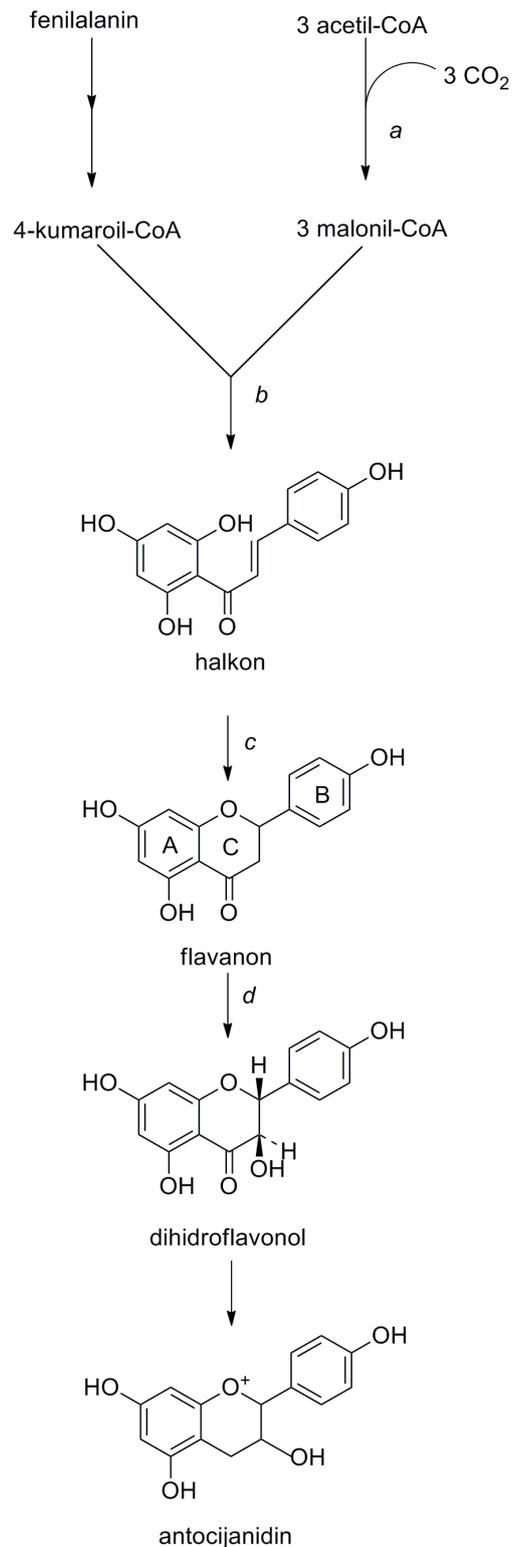
2.5. Biosinteza

Biosinteza antocijanina odvija se sledećim putem: halkon \rightarrow flavanon \rightarrow dihidroflavonol \rightarrow antocijanidin \rightarrow antocijanin (slika 2.14). Halkon se sintetise u biljci iz tri molekula malonil-CoA i odgovarajućeg hidroksicimetna kiselina-CoA estra, obično od 4-kumaroil-CoA, delovanjem enzima halkon sintetaze. C₁₅ halkon se zatim izomerizuje u flavanon pod dejstvom halkon izomeraze. Poznate su dve vrste halkon izomeraze, a razlika između njih je bazirana na njihovoj specifičnosti prema supstratu. U biljkama koje sadrže 5-dezoksi- i 5-hidroksiflavonoide, enzim je u stanju da izomerizuje i 2',4'-dihidroksi-(rezorcinol-tip) i 2',4',6'-trihidroksi-(floroglucinol-tip) halkona. U biljkama koje ne sadrže 5-dezoksiflavonoide, supstrati za enzim su samo halkoni floroglucinol-tipa (Mazza & Miniati, 1993).

Dihidroflavonol se formira od flavanona delovanjem flavanon 3-hidroksilaze. Dokazi da su dihidroflavonoli intermedijeri u biosintezi antocijanina dobiveni su eksperimentima sa inhibitorima fenilalanin amonijak-liaze i iz eksperimenata suplementacije sa genetski definisanim acijaničnim linijama *Matthiola incana*, *Petunia hybrida* i *Antirrhinum majus* i sa endosperma kukuruza (*Zea mays*). Enzimi za konverziju dihidroflavonola u antocijanidine još uvek su nepoznati. Leukoantocijanidini (monomerni flavan-3,4-dioli) mogu takođe biti intermedijeri u biosintezi antocijanina. Dokaz za to dobiveni su eksperimentima suplementacije na genetski definisanim linijama *Matthiola* sa belim cvetom (Mazza & Miniati, 1993).

Još uvek nije jasno utvrđeno da li su različite strukture antocijanidina determinisane u fazi cimetne kiseline ili u fazi C₁₅ intermedijera. Ukoliko je prva mogućnost ispravna, to znači da je 4-kumarat prekursor pelargonidina, kafeat prekursor cijanidina, ferulat prekursor peonidina, i tako dalje. Prema drugoj mogućnosti, 4-kumarat bi bio prekursor svih antocijanidina, i uvođenje dodatnih hidroksilnih grupa ili reakcije metilacije bi se odvijale u halkon/flavanon fazi ili u kasnijoj fazi sinteze. Većina prikupljenih dokaza favorizuje drugi put. Obe mogućnosti mogu objasniti uvođenje hidroksilnih grupa u slučaju cijanidina, ali je situacija manje jasna kod metilovanih antocijanidina kao što su peonidin i petunidin (Mazza & Miniati, 1993).

Biohemijska i genetska ispitivanja metilacije antocijanina, kao što su metilacije cijanidina do peonidina i delfinidina do petunidina i malvidina, otkrivaju najmanje četiri metiltransferaze, pri čemu je svaka kontrolisana posebnim genom. Glikozilacija je verovatno poslednji korak u biosintezi antocijanina. Enzimi uključeni u reakcije glikozilacije su glukoziltransferaze. Poznati enzimi koji su uključeni u reakcije acilovanja obuhvataju *O*-maloniltransferaze i aciltransferaze (Mazza & Miniati, 1993).



Slika 2.14: Biosintetički putevi antocijanina: (a) acetil-CoA karboksilaza; (b) halkon sintetaza; (c) halkon izomeraza; (d) flavanon 3-hidroksilaza (Mazza & Miniati, 1993).

2.6. Funkcije antocijanina

Najznačajnija funkcija antocijanina je njihova sposobnost da određuju boju celoj biljci ili pojedinim njenim delovima u kojima se javljaju. Boja je jedna od najvažnijih osobina hrane i pića. Ona je važna zbog estetske vrednosti i služi kao osnova za identifikaciju i procenu kvaliteta. Boja hrane i boja okoline u kojoj se hrana posmatra može značajno povećati ili smanjiti našu želju ili apetit za tom hranom (Mazza & Miniati, 1993).

Veruje se da prisustvo boje u cvetovima i plodovima obezbeđuje oplodjivanje i rasejavanje semena pomoću životinja. U listovima, pristni antocijanini deluju kao zaštita od štetnog UV zračenja i, zajedno sa površinskim strukturama epidermisa (kutikula i voštane materije), štite biljku od prekomernog zagrevanja i, samim tim, prekomernog isparavanja. Eksperimenti sa vrstom *Eucalyptus urnigera* pokazali su da je povećanje sadržaja antocijanina u mladim listovima u korelaciji sa povećanjem visine. Zbog toga je sugerisano da se više antocijanina proizvodi na većim nadmorskim visinama, gde je prirodno UV zračenje intenzivnije. Antocijanini su takođe povezani sa rezistencijom na patogene kod gajenih vrsta roda *Brassica*, suncokreta, graška i kukuruza (Mazza & Miniati, 1993).

Antocijanini takođe imaju pozitivna farmakološka svojstva i ljudi ih koriste u terapijske svrhe. Primenjeni oralno, intravenoznom ili intramuskularnom injekcijom, farmaceutski preparati antocijanina vrste *Vaccinium myrtillus* redukuju kapilarnu propustljivost. Takođe je objavljeno da antocijanini deluju protiv pojave čira i pružaju zaštitu od UV zračenja (Mazza & Miniati, 1993).

2.7. Antocijanini kao prehrambene boje

Boja je važna zbog svoje estetske uloge, ali služi i kao osnova za identifikaciju i procenu kvaliteta. Antocijanini daju neke od najspektakularnijih prirodnih boja. Termin antocijanin, izveden je od Grčkih reči za cvet i plavo, a prvi ga je upotrebio je Marquart 1835. godine da bi imenovao plavi pigment cveća. Kasnije je shvatio da se ne samo plava, već i purpurna, ljubičasta, i skoro sve nijanse crvene boje, koje se pojavljuju u cvetovima, plodovima, listovima, stablima i korenovima mogu pripisati pigmentima koji su hemijski

slični originalnom "flower blues" (Brouillard, 1982)

Antocijanini daju estetsku privlačnost i služe kao indikatori kvaliteta hrane; na primer crvene jabuke i crveno grožđe smatraju se zrelim kada se dovoljno antocijanina pojavi u epidermisu, a bobičasti plodovi su atraktivniji kada se boja antocijanina zadrži tokom prerade i skladištenja. Estetsko zadovoljstvo koje boja pruža čoveku dobro ilustruju određene Cruciferae kao što su crvena rotkva (*Raphanus sativus*) i crveni kupus (*Brassica oleracea*), koji se praktično gaje zbog njihove boje. Slično važi i za obojene mahune nekih predstavnika familije Leguminosae, a može se primeniti i na obojena semena određenih žitarica. Boja takođe daje ključni doprinos atraktivnom izgledu prerađene hrane i pića (Brouillard, 1982; Mazza & Miniati, 1993).

Najzastupljeniji i istorijski najstariji ekstrakt antocijanina koji se koristi kao prehrambena boja dobijen je iz kljuka grožđa. Drugi, komercijalno dostupni i intenzivno proučavani ekstrakti u cilju industrijske primene ili lokalno korišćeni kao prirodni ekstrakti za bojenje namirnica, obuhvataju pigmente borovnice, crne ribizle, brusnice, zove, crvenog kupusa, ljubičastog kukuruza, slatkog krompira, sporedne proizvode prilikom prerade crne masline, crne višnje, crne aronije i brusnice (Mazza & Miniati, 1993).

Prvobitni ljudi, čija je ishrana u velikoj meri bila zasnovana na šumskim plodovima, bez sumnje su bili privučeni njihovim živim i briljantnim bojama, i pri tome su verovatno konzumirali velike količine antocijanina, veće od njihovog unosa danas. Čovek je, dakle, dobro prilagođen konzumiranju antocijanina. Veća upotreba prirodnih ekstrakata u bojenju namirnica može se razmatrati u kontekstu održavanja nivoa ako ne i pomeranja ravnoteže, što može biti poželjno sa tačke gledišta njihovih korisnih efekata (Brouillard, 1982; Mazza & Miniati, 1993).

Dostupni dokazi sugerišu da su antocijani ne samo netoksični i nemutageni već imaju i korisne terapeutske osobine, posebno u oftalmologiji, kao i za lečenje različitih poremećaja cirkulacije. Fiziološki efekti antocijanina su u vezi sa prevencijom kapilarne fragilnosti u lečenju oboljenja koja uključuju zapaljenja tkiva, u stvari oni možda mogu dobro zameniti rutin i njegove derivate. Većina radova u ovoj oblasti je urađena sa farmaceutskim preparatima koji sadrže ekstrakt borovnice (*Vaccinium myrtillus*). Ovaj ekstrakt sadrži kompleksnu mešavinu jednostavnih glikozida svih uobičajenih antocijanidina osim pelargonidina, pa bi se mogao smatrati predstavnikom antocijanina u celini. Utvrđeno je da

takvi ekstrakti inhibiraju agregaciju trombocita u krvi i da su od interesa u različitim aspektima dijabetične mikroangiopatije, i da deluju preventivno u pojavi čira. Mnogi farmaceutski proizvodi koji su u upotrebi sadrže antocijanine (Mazza & Miniati, 1993).

Imajući u vidu da ljudi i životinje konzumiraju ove pigmente od samog početka, bez bilo kakvih vidljivih štetnih efekata, oni su veoma poželjna zamena za sintetičke prehrambene boje, koje ne mogu biti podvrgnute tako obimnom testiranju (Brouillard, 1982).

Zbog svih navedenih razloga, danas postoji veliki interes prehrambene industrije za antocijanine sa aspekta njihove primene kao prirodnih boja koje bi zamenile sintetičke prehrambene (Brouillard, 1982; Heredia, Francia-Aricha, Rivas-Gonzalo, Vicario, & Santos-Buelga, 1998; Mazza & Brouillard, 1987; Mazza & Miniati, 1993). Razlog za to je pokušaj da se razviju bezbedne, ekonomične i efikasne prehrambene boje koje bi zamenile zabranjene boje katranskog (ili azo) tipa (Brouillard, 1982; Del Carpio Jiménez et al., 2011; Mazza & Brouillard, 1987). Antocijanini su uzeti u razmatranje kao zamena za sintetičke prehrambene boje. Njihove prednosti su sledeće: oni su bezbedni, jarko su obojeni, pogotovu u crvenom regionu i relativno su rastvorljivi u vodi, što pojednostavljuje njihovu inkorporaciju u vodene sisteme hrane (Brouillard, 1982; Mazza & Brouillard, 1987).

Međutim, postoje određena ograničenja u upotrebi antocijana kao prehrambenih boja. Nedostaci antocijanina odnose se na njihovu hemijsku nestabilnost, njihovu potrebu za prečišćavanjem, i njihovu moć bojenja, koja je skoro 100 puta niža nego kod boja katranskog tipa. U prehrambenim proizvodima mogu se odigravati brojne reakcije, pH vrednost može uticati na njihovu boju, mada je glavni problem vezan za upotrebu antocijana kao prehrambenih boja njihova temperaturna, svetlosna i enzimaska nestabilnost i nestabilnost u prisustvu kiseonika. (Bordignon-Luiz, Gauche, Gris, & Falcão, 2007; Brouillard, 1982; Downham & Collins, 2000; Laleh, Frydoonfar, Heidary, Jameei, & Zare, 2006; Mazza & Brouillard, 1987; Mazza & Miniati, 1993; Torskangerpoll & Andersen, 2005)

Antocijanini se intenzivno proučavaju sa hemijske, biohemijske, botaničke i prehrambeno-tehnološke tačke gledišta. Poznavanje izvora i karakteristika identifikovanih antocijana neophodno je za osnovna istraživanja i industrijsku primenu. Prehrambena industrija zahteva dodatne informacije kako bi maksimalno povećala vizuelnu privlačnost ovih pigmenta, kako u proizvodima u kojima su prirodno prisutni tako i u proizvodima u koje se mogu dodati kao boje (Brouillard, 1982; Mazza & Miniati, 1993).

2.8. Antocijanini u biljnim organima

Antocijanini su posebno karakteristični za skrivenosemenice, a karakteristični su za porodice Vitaceae (vinova loza) i Rosaceae (porodica ruže) sa svojim širokim generičkim spektrom pigmentisanih plodova, kao što su plodovi jabuke (*Malus*), kruške (*Pyrus*), kajsije, višnje, šljive, breskve i trnjine (*Prunus*), kupine i maline (*Rubus*), jagode (*Fragaria*) i dunje (*Cydonia*). U druge porodice koje imaju pigmentisane plodove spadaju Ericaceae (borovnica, brusnica), Saxifragaceae (crne i crvene ribizle), Caprifoliceae (zova) i Solanaceae. Prirodna funkcija pigmentacije korena određenih biljnih vrsta, naročito kada je obojeni deo sakriven pod zemljom, nije dovoljno jasna. Pigmentacija plodova je adaptacija na rasejavanje pomoću životinja (Mazza & Miniati, 1993).

Svi plodovi okarakterisani su svojim antocijanidin glikozidima. U plodovima je pronađeno oko 70 različitih antocijana, dok je u različitim delovima biljaka otkriveno preko 200 jedinjenja. Najbrojniji glikozidi su glikozidi cijanidina i delfinidina, a zatim, u opadajućem redosledu slede, glikozidi malvidina, petunidina, peonidina i pelargonidina. Kada se uporede svi delovi biljke, može se uočiti bitna razlika. Plodove karakteriše znatno veći broj glikozida delfinidina i mali broj derivata pelargonidina (Macheix et al., 1990).

Plodovi se takođe izdvajaju od ostalih biljnih organa po tome što sadrže relativno veliku količinu monoglikozida u poređenju sa diglikozidima. Takođe treba napomenuti značaj acilovanih antocijanina (Macheix et al., 1990).

Šest antocijanina, koji se najčešće nalaze u plodovima, cijanidin 3-glukozid, cijanidin 3-rutinozid, delfinidin 3-glukozid, cijanidin 3-galaktozid, cijanidin 3-arabinozid i peonidin 3-glukozid, se sastoji od pet 3-monoglikozida i jednog diglikozida cijanidin 3-rutinozida. Među njima je najčešći cijanidin 3-glukozid, a isto važi i za biljne organe u celini, u kojima je ovaj pigment najčešći antocijanin (Macheix et al., 1990).

Broj antocijanina koji su prisutni u plodovima takođe je kriterijum na osnovu kojeg je moguće napraviti razliku između plodova. Prilično retko se nalazi samo jedan glikozid. To je npr. slučaj sa mangom, koji sadrži peonidin 3-glukozid i određenim sortama breskve sa crveno obojenom korom koje sadrže cijanidin 3-glukozid (Macheix et al., 1990).

Većina ispitivanih plodova sadrži dva do šest antocijanina, pri čemu se najčešće sreću četiri pigmenta. U tom slučaju, to mogu biti četiri glikozida cijanidina (na primer, plodovi crne maline i zove) ili dva aglikona, svaki u obliku dva glikozida (na primer, plodovi ribizle) (Macheix et al., 1990).

U većini plodova koji imaju komercijalni značaj, postoje brojne sorte u kojima sadržaj antocijanina može znatno da varira. Pored toga, varijabilnost u sadržaju antocijanina između pojedinih plodova veća je od varijacija između sorti (Macheix et al., 1990).

Antocijanini plodova mogu da se podele u dve grupe prema njihovoj kvantitativnoj zastupljenosti. To su glavni antocijanini koji formiraju preko 90% ukupnih pigmenata, i minorni antocijanini od kojih je svaki prisutan samo u tragovima ili na nivou od samo nekoliko procenata. U principu, jedan ili dva antocijanina se izdvajaju među glavnim antocijaninima. Na primer, u plodovima 11 sorti jabuka, cijanidin 3-galaktozid je glavni pigment, formirajući 83 do 94% ukupnih antocijanina. Cijanidin 3-glukozid je glavni pigment u plodovima kupine, breskve, zove i duda. U druge preovlađujuće antocijanine spadaju pelargonidin 3-glukozid u plodovima jagode, cijanidin 3-rutinozid u plodovima smokve i trešnje. U plodovima ribizle i brusnice nema dominantnih antocijanina i njih karakteriše relativna proporcija četiri pigmenta (Macheix et al., 1990).

2.9. Boja i njene dimenzije

2.9.1. Definicija boje

Boja nije osobina tela, već je prema jednostavnoj definiciji, subjektivni čulni doživljaj. Po DIN normama 5033, boja je određena sledećom definicijom:

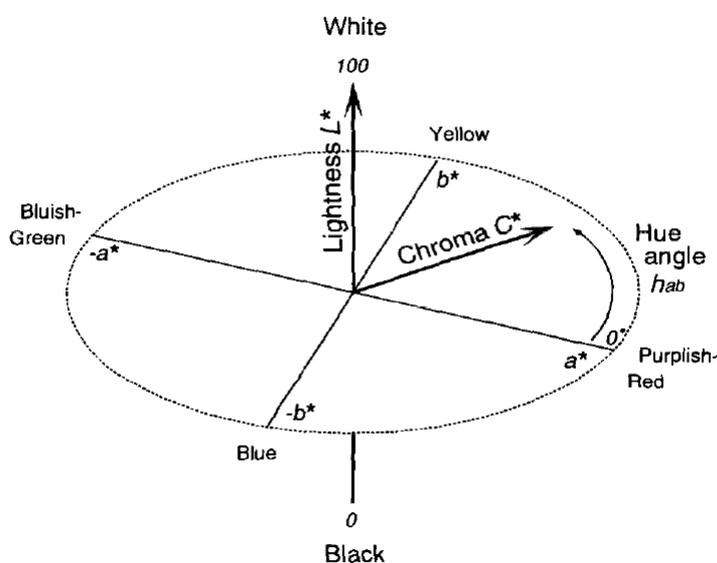
"Boja je ono vidljivo zapažanje određenog dela vidljivog polja, kojeg sa jednim nepokretnim okom razlikujemo od istovremeno posmatranog graničnog (susednog) područja, jednake površinske strukture" (Miljković, Milena N., 1994).

2.9.2. Dimenzije boje

Boja je određena sa tri dimenzije:

1. Tonom boje, uglom tona boje, nijansom, h_{ab} , (hue angle);
2. Svetlina boje, L^* (lightness);
3. Zasićenošću boje, hromom, C^* (chroma)

Ove dimenzije omogućavaju njenu interpretaciju u bojenom prostoru (slika 2.15).



Slika 2.15: CIELAB bojeni prostor (Gonnet, 1998).

Ton boje, ugao tona boje, nijansa, (h_{ab}), je bitna komponenta kvaliteta boje. Po tonu boje razlikujemo "šarene" (žuto, crveno, zeleno i plavo) i "ne šarene" (neutralne boje). Šarene boje su raspoređene u zatvorenom krugu boja (odnosno elipsi) (Miljković, Milena N., 1994).

Svetlina boje, (L^*), je druga dimenzija boje. Pod pojmom svetline boje podrazumevamo koliko je boja svetla ili tamna. Izražava se svetlosnim stepenima od bele do crne. Helmholtz je crno belu skalu (koja postoji vertikalno na ravni u kojoj se nalazi dijagram boja) poistovetio sa stepenima jačine. Pojmovi svetlo, tamno, zasenčeno, označavaju stepen svetline. Ako se nekoj boji pridoda belo ili crno, menja se njena svetlina ($L^* = 0\%$ za crno i $L^* = 100\%$ za belo) (Miljković, Milena N., 1994).

Prema Helmholtz-u, Hering-u i Kaltz-u, zasićenost boje, hroma, (C^*), je bitna dimenzija boje. Zasićenost boje predstavlja udaljenost od belo-crne ose, a opisuje intenzitet boje i to pojmovima kao što su: jako, brilijantno, mutno, mat itd. Da bi se promenila zasićenost, boji se pridodaje sivi ton iste svetline (Miljković, Milena N., 1994).

Sasvim zasićene boje su smeštene na bojenom krugu u najvećoj udaljenosti jedna od druge, ahromatska boja je na sredini između dve komplementarne boje. Nezasićene boje nalaze se na dijametrima bliže jednoj ili drugoj od komplementarnih boja, mogu se dakle smatrati smesom zasićene spektarske boje i ahromatske boje iste svetline. Ahromatske boje nemaju bojenog tona, a zasićenost im je jednaka nuli, one su dakle potpuno određene svojom svetlinom. U sredini dijagrama boja nalazi se neobojena tačka, poznata kao bela tačka, srednje siva tačka ili ahromatska tačka (Miljković, Milena N., 1994).

Svaka od tri dimenzije boje razumljiva je samo uz istovremeno posmatranje ostale dve. Veza između istih je uzana i nužna i samo tako omogućava pravilno vrednovanje kvaliteta svake boje (Miljković, Milena N., 1994).

2.9.3. Numeričko vrednovanje boje

Zbrajanjem vrednosti nađenih u celom vidljivom području spektra za različite talasne dužine, mogu se izračunati tri merna broja boje, koji u oku odgovaraju bojenom nadražaju sa tri vrste čepića. Ova tri primarna merna broja boje nazivaju se normalne vrednosti boje X, Y, Z i obračunavaju se prema jednačinama 2.41 do 2.43. Jedinice se normiraju tako, da za idealnu površinu (teoretsko telo, koje reflektuje svu upalu svetlost do 100%), a kod osvetljavanja energetski jednakim spektrom (teorijski izvor svetlosti, koji u celom vidljivom

delu spektra daje jednaku količinu svetlosti) normalne vrednosti boje iznose X=100, Y=100, Z=100. Za sve ostale izvore svetlosti važi Y=100, za idealnu površinu.

Primeri:

	X	Y	Z
Dnevna svetlost	94,81	100,00	107,33
Svetlost sijalice	111,15	100,00	35,20
Svetlost fluo-cevi	99,68	100,00	66,96

$$X = \sum_{400}^{700} S(\lambda) \cdot R(\lambda) \cdot \bar{x}(\lambda) \quad (2.41)$$

$$Y = \sum_{400}^{700} S(\lambda) \cdot R(\lambda) \cdot \bar{y}(\lambda) \quad (2.42)$$

$$Z = \sum_{400}^{700} S(\lambda) \cdot R(\lambda) \cdot \bar{z}(\lambda) \quad (2.43)$$

$S(\lambda)$ refleksija svetlosti sa neobojenog materijala (zavisi od izvora svetlosti i prirode supstrata koji će se bojiti);

$R(\lambda)$ izmerena refleksija za određenu talasnu dužinu obojenog uzorka;

$\bar{x}(\lambda), \bar{y}(\lambda), \bar{z}(\lambda)$ faktori koji se odnose na osvetljenost oka tzv. "crveni, zeleni i plavi nadražaj oka", za određenu talasnu dužinu.

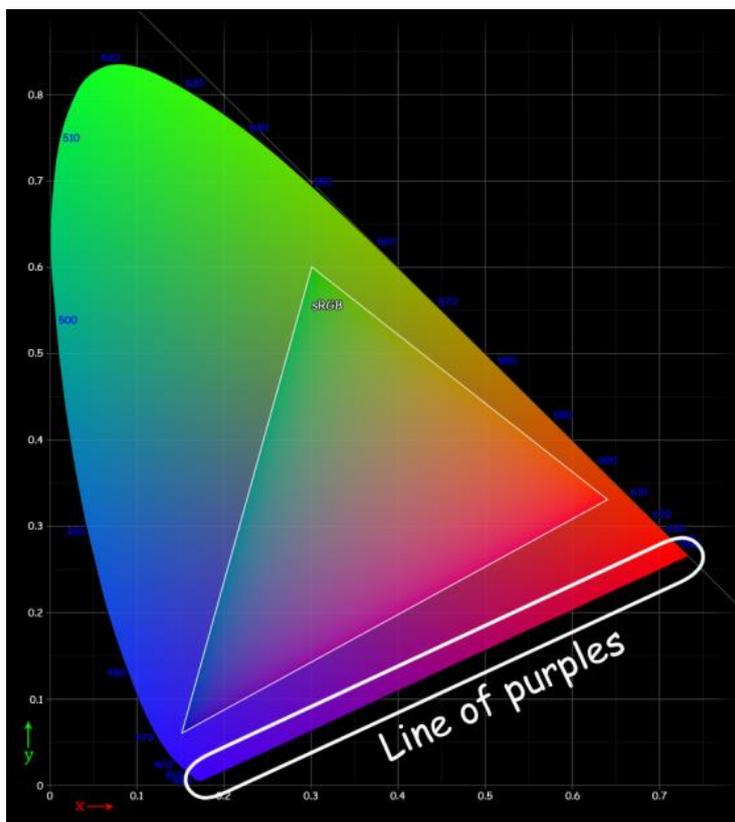
Boja je dakle računskim putem razložena na tri komponente: crvenu X, zelenu Y i plavu Z. Međutim, za praktičnu primenu nije dovoljno jednu boju predstaviti jednoznačno, već je bitno odrediti njen odnos sa drugim bojama, tj. boju treba prikazati u koordinatnom sistemu u kojem su prikazane sve boje i u tom sistemu odrediti njen položaj. Takav sistem je dvodimenzionalni *xy* dijagram boje, uveden 1931. godine i naziva se CIE dijagram hromatičnosti ili dijagram boja (slika 2.16).

gde je:

$$x = \frac{X}{X + Y + Z} \quad (\text{žuto/plava koordinata}) \quad (2.44)$$

$$y = \frac{Y}{X + Y + Z} \quad (\text{crveno/zelena koordinata}) \quad (2.45)$$

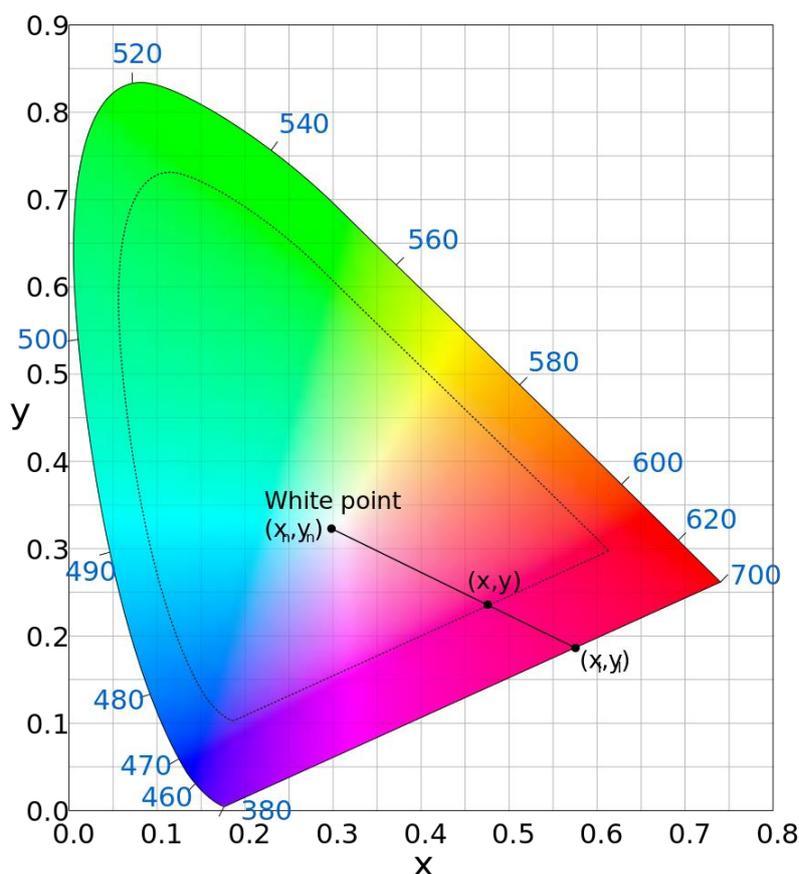
Sve spektralne boje se nalaze na paraboli koja spaja tačku ljubičaste boje i tačku crvene boje. Sve stvarne boje nalaze se unutar površine opisane ovom parabolom. Linija ljubičasta-crvena se naziva purpurna linija ("line of purples") (slika 2.16). Boje koje se nalaze na ovoj liniji, nalaze se u spektru boja, ali nisu definisane svojim talasnim dužinama, već talasnim dužinama njihovih komplementarnih boja (slika 2.16) (Miljković, Milena N., 1994).



Slika 2.16: CIE dijagram boja, purpurna linija

(Photo: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/90/Line_of_purples.png)

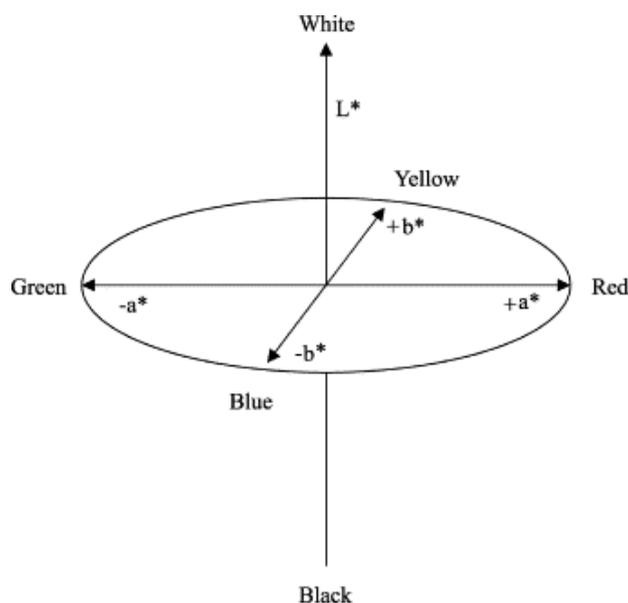
U sredini dijagrama boja, nalazi se nebojena tačka, poznata kao ahromatska tačka "white point" (slika 2.17). Dominantna talasna dužina neke boje čija je tačka hromatičnosti negde na dijagramu boja, dobija se povlačenjem prave između ahromatske tačke i tačke hromatičnosti i njenim produženjem do preseka sa parabolom. Duž ove linije nalaze se boje istog tona, ali različitog zasićenja (Miljković, Milena N., 1994).



Slika 2.17: CIE dijagram boja, ahromatska tačka "white point"

(Photo: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/96/Excitation_Purity.svg/903px-Excitation_Purity.svg.png)

Godine 1976. u okviru CIE napravljen je sistem čije su koordinate obeležene sa L , a , b i zato se koristi skraćenica CIELAB, CIELAB 76 ili CIE $L^*a^*b^*$ za ovaj sistem. Sistem omogućava prostorni prikaz boja (slika 2.18.).



Slika 2.18: CIELAB bojeni prostor (Joiner, 2004).

gde je:

- L^* vertikalna koordinata trodimenzionalnog sistema, poseduje vrednosti od 0 (crno) do 100 (belo)
- a vodoravna koordinata, čije se vrednosti u zavisnosti od osvetljenja kreću od oko -80 (zeleno) do oko +80 (crveno)
- b vodoravna koordinata, čije se vrednosti u zavisnosti od osvetljenja kreću od -80 (plavo) do +80 (žuto)
- ugao h_{ab} , (hue angle) nijansa, ton boje, izražava se u stepenima ($h_{ab} = 0^\circ$ odgovara crvenoj boji, $h_{ab} = 90^\circ$ žutoj, $h_{ab} = 180^\circ$ zelenoj, $h_{ab} = 270^\circ$ plavoj boji)
- C^* (chroma) zasićenost boje, predstavlja udaljenost posmatrane boje od nešarene tačke ($a = b = 0$) to je ujedno i mera za jasnoću boje

Jedna boja može biti definisana sa koordinatama L^* , a , b , ili koordinatama L^* , C^* , h_{ab} .

Tabela 2.3: Formule za izračunavanje CIELAB koordinata.

Veličina	Matematička formula	Značenje
L^*	$L^* = 116(Y/Y_n)^{1/3} - 16$	svetlina boje
a	$a = 500[(X - X_n)^{1/3} - (Y - Y_n)^{1/3}]$	zeleno-crvena koordinata
b	$b = 500[(X - X_n)^{1/3} - (Y - Y_n)^{1/3}]$	plavo-žuta koordinata
C^*	$C^* = (a + b)^{1/2}$	hroma ili zasićenost boje
h_{ab}	$h_{ab} = \arctg(b / a)$	ugao nijanse boje
E^*	$E^* = (L^2 + C^2)^{1/2}$	prostorni vektor boje (ukupna razlika od idealno crne boje)

Veličine koje su u formulama označene sa X_n , Y_n i Z_n zavise od vrste osvetljenja i mogu se naći u tabelama standarda (Miljković, Milena N., 1994).

2.9.4. Opšti obračun razlike boja

Pomoću koordinata boja može se izračunati ukupna razlika boja. Najčešće primenjivan sistem za određivanje razlike u boji je CIELAB sistem. S obzirom na to da su koordinate boja definisane (CIELAB koordinate), svaka boja ima svoj položaj u prostoru boje, tako da se može odrediti prostorno rastojanje između dve tačke boja. Ovo rastojanje se označava kao ukupna razlika u boji (Miljković, Milena N., 1994).

Ukupna razlika u boji izračunava se prema jednačinama 2.46 i 2.47.

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta a)^2 + (\Delta b)^2 + (\Delta L^*)^2} \quad (2.46)$$

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta C^*)^2 + (\Delta h_{ab})^2} \quad (2.47)$$

Ukupna razlika u boji može se dalje deliti na:

- razlika u svetlini boje ΔL^*
- razlika u hromi (zasićenosti) boje ΔC^*
- razlika u nijansi boje Δh_{ab}

Veličine koje se javljaju u jednačinama 2.46 i 2.47 imaju sledeće značenje:

Δa - razlika na crveno-zelenoj koordinati ($\Delta a = a_{probe} - a_{standarda}$)

- + Δa - znači crvenije odnosno manje zeleno
- Δa - znači zelenije odnosno manje crveno

Δb - razlika na plavo-žutoj koordinati ($\Delta b = b_{probe} - b_{standarda}$)

- + Δb - znači više žuto odnosno manje plavo
- Δb - znači više plavo odnosno manje žuto

ΔL^* - razlika u svetlini ($\Delta L^* = L^*_{probe} - L^*_{standarda}$)

- + ΔL^* - znači svetlije
- ΔL^* - znači tamnije

ΔC^* - razlika u hromi ($\Delta C^* = C^*_{probe} - C^*_{standarda}$)

- + ΔC^* - znači jasniji (brilijantniji) ton
- ΔC^* - znači mutniji ton

Δh_{ab} - razlika u nijansi boje, izraunava se prema jednačini 2.48:

$$\Delta h_{ab} = \sqrt{(\Delta E^*_{ab})^2 - (\Delta L^*)^2 - (\Delta C^*)^2} \quad (2.48)$$

Razlike u nijansi zavise od tona boje, tj. za različite tonove boje, predznak ima različito značenje:

- za crveni ton:

+ Δh_{ab} znači više žuto

- Δh_{ab} znači više plavo

- za žuti ton:

+ Δh_{ab} znači više zeleno

- Δh_{ab} znači više crveno

- za zeleni ton:

+ Δh_{ab} znači više plavo

- Δh_{ab} znači više žuto

- za plavi ton:

+ Δh_{ab} znači više crveno

- Δh_{ab} znači više zeleno

Dijagrami razlike boja konstruisani kod Sandoza-a omogućavaju verbalno označavanje izračunatih razlika u svetlini, hromi i nijansi boje, što u CIE propisu nije zabranjeno. Kod ΔC^* i ΔL^* označavanje se može izvršiti na osnovu predznaka izračunate razlike. Kod Δh_{ab} predznak sam nije dovoljan, pa se dodatno još mora znati o kom tonu boje se radi. Ova informacija se nalazi u uglu tona boje h_{ab}° (Miljković, Milena N., 1994).

2.10. Plazma membrana - opšti koncept

Osnovni princip organizacije membrana izgleda vrlo jednostavno, formirana je od lipidnog dvosloja gde su polarne glave orjentisane prema vodenoj sredini, dok su ugljovodončni repovi orjentisani prema unutrašnjosti dvosloja, međutim, detalji su iznenađujuće složeni. Plazma membrane su složeni dinamični entiteti koji odvajaju ćeliju od njenog okruženja. One predstavljaju tačke razmene sa susednim ćelijama, i između ćelije i spoljašnje sredine. (Deleu, Crowet, Nasir, & Lins, 2014).

Ćelijska membrana je pažljivo izbalansirano okruženje i bilo koja promena u njenoj strukturi izazvana bioaktivnim molekulima mora se razmatrati zajedno sa ukupnim efektom koji oni mogu da imaju na funkciju i integritet membrane. Zbog toga je od suštinskog značaja, razumevanje, na molekulskom nivou, mehanizama kojim biološki aktivni molekuli interaguju sa ćelijskim membranama (Deleu et al., 2014).

2.10.1. Sastav plazma membrana

Plazma membrane se sastoje od tri glavne grupe lipida: glicerolipida (uglavnom fosfolipida), sfingolipida i sterola. Međutim, sastav lipida plazma membrane između različitih vrsta ćelija ili različitih tipova ćelija unutar vrste, može da bude veoma različit (Deleu et al., 2014).

U eukariotskim ćelijama, glavni strukturni lipidi su glicerofosfolipidi, kao što su fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin i fosfatidna kiselina. Njihovi hidrofobni repovi, čija dužina lanca uglavnom varira od 14 do 22 ugljenikova atoma su ili zasićeni ili *cis*-nezasićeni. Fosfatidilholin je najzastupljeniji, čineći više od 50% fosfolipida. Kičma sfingolipida je izgrađena od ceramida sa zasićenim ili *trans*-nezasićenim hidrofobnim lancima. U ćelijama sisara najzastupljeniji su, sfingomijelin i glikosfingolipidi. Što se tiče sterola, kod sisara preovladava holesterol. Važno je napomenuti da varijacija polarnih glava i alifatičnih lanaca omogućava postojanje više od hiljadu različitih lipida (Deleu et al., 2014).

U poređenju sa membranama sisara, plazma membrane biljka su uvek veoma bogate sterolima (uglavnom sitosterolom i stigmaterolom) i sfingolipidima koji se pakuju gušće od glicerolipida i otporni su na mehanički stres (Deleu et al., 2014).

Za razliku od eukariotskih membrana, u bakterijskim membranama, prisutna je znatno veća količina negativno naelektrisanih lipida (fosfatidilglicerol i kardiolipin) dok su odsutni steroli (Deleu et al., 2014).

Paralelno sa ogromnom raznolikošću u njihovom sastavu membranski lipidi se takođe javljaju u različitim lipidnim fazama u zavisnosti od njihove strukture i okoline (Deleu et al., 2014).

Globalno, za lamelarne faze, mogu se uočiti tri različita ponašanja:

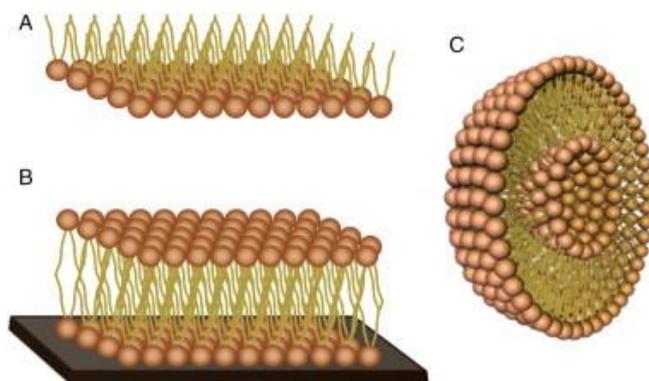
1. tečno-kristalna (liquid-crystalline) ili tečna-neuređena faza (liquid disordered phase), koju pre svega formiraju glicerofosfolipidi sa nezasićenim acil lancima
2. faza čvrstog gela (solid gel phase) kod lipidnih smeša bogatih sfingomijelinom;
3. tečno-uređena (liquid-ordered) faza, nastaje udruživanjem sterola i lipida koji formiraju dvostruke slojeve.

2.10.2. Modeli membrana

Postojanje lipidnih domena, lipidne asimetrije, koegzistencije faza i raznovrsnosti u sastavu lipida, razlozi su zbog kojih su membrane veoma složene strukture. Složenost ovog sistema je dodatno povećana njihovom asocijacijom sa proteinima i ugljenim hidratima. Zbog ove složenosti, istraživanje biofizičke interakcije membrana sa bioaktivnim molekulima u "stvarnom" stanju je veoma teško. Zbog toga su razvijeni, pojednostavljeni, veštački membranski sistemi, koji oponašaju prirodne dvoslojne lipidne membrane (Deleu et al., 2014).

Modeli membrana su sistemi u kojima organizacija najbolje oponaša uređenje lipida nađeno u prirodnim plazma membranama. Najčešće se koriste tri sistema: lipidni

monoslojevi, podupreti dvostruki slojevi i lipozomi (slika 2.19). Iako svaki od ovih sistema pokazuje određene prednosti i mane, svi u određenoj meri oponašaju uređenje lipida prirodnih ćelijskih membrana (Deleu et al., 2014).



Slika 2.19: Šematski prikaz modela membrana: (A) lipidnog monosloja, (B) poduprtog lipidnog dvosloja, (C) lipozoma (Deleu et al., 2014).

Lipidni monoslojevi obezbeđuju jednostavan model koji se može razmatrati kao polovina dvosloja bioloških membrana. Oni se mogu koristiti za proučavanje sposobnosti jedinjenja da prodru u spoljašnji sloj membrane i za karakterizaciju interakcije molekula sa lipidima (Deleu et al., 2014).

Poduprti lipidni dvostruki slojevi su modeli membrana koji koji oponašaju prirodne membrane. Oni se sastoje od ravnog lipidnog dvosloja koji je poduprt čvrstom površinom kao što površina liskuna, stakla ili silicijum oksida. Ovi sistemi obično omogućavaju ispitivanje interakcija sa "glavama" lipida, ali takođe omogućavaju i predviđanje faznog ponašanja i molekularne lateralne (bočne) organizacije bioloških membrana. Oni takođe mogu biti pogodni za istraživanje interakcija membrana-integralni protein. Modeli poduprtih lipidnih dvostrukih slojeva mogu biti pripremljeni prilično lako i mnogo su stabilniji od lipidnih vezikula. Pored toga, pošto se ovi membranski modeli nalaze na površini čvrste podloge, oni se mogu okarakterisati mnogo lakše nego slobodno plutajuće vezikule uz upotrebu širokog izbora površinski osetljivih tehnika (Deleu et al., 2014).

Lipidne vezikule ili lipozomi su raznovrsni modeli membrana, koji se obično koriste za proučavanje faznog ponašanja membrana i membranskih procesa, kao što su membranska fuzija, molekulsko prepoznavanje, ćelijska adhezija i formiranje pora. Ovi lipidni modeli ograđuju mali vodeni prostor i dobijaju se iz vodene disperzije membranskih lipida (čistih ili u smeši) (Deleu et al., 2014).

Dok se lipidni monoslojevi sastoje samo od jednog sloja lipida i zbog toga ne odražavaju složenost bioloških membranskih struktura, lipidne vezikule se sastoje od dva sloja lipida, koji su uređeni na način koji je sličan onom u biološkim membranama (Deleu et al., 2014).

Međutim, lipozomi su metastabilne strukture, koje imaju lošu dugoročnu stabilnost. U zavisnosti od načina pripreme, lipozomi mogu biti multilamelarni (MLV), (više dvostrukih slojeva) ili unilamelarni (ULV), (jedan dvostruki sloj). Prema veličini, unilamelarni lipozomi se mogu podeliti na male unilamelarne vezikule (small unilamellar vesicles, SUV), velike unilamelarne vezikule (large unilamellar vesicles, LUV) ili džinovske unilamelarne vezikule (giant unilamellar vesicles, GUV) (Deleu et al., 2014).

2.10.3. Izbor lipida za modele membrana

Pošto modeli membrana treba da budu predstavnici prirodnih membrana, njihova rekonstrukcija mora najbolje da odražava taj "pravi" sastav, uzimajući u obzir i praktične eksperimentalne detalje. Zbog toga je važno dobro razmotriti izbor lipida i modela (monosloj ili dvosloj, tip lipozom ili poduprti lipidni dvostruki sloj, ...) i složenost lipidne smeše (Deleu et al., 2014).

- Izbor lipida: Ovaj izbor vrši se u skladu sa različitim kriterijumima. Prvi kriterijum se sastoji u izboru odgovarajućeg lipida za organizam koji se razmatra. Na primer, u vezi modela od sterola, treba izabrati holesterol za istraživanja sa crvenim krvnim zrnima, sitosterol prilikom rada sa biljkama, ili ergosterol u slučaju gljiva. Drugi kriterijum je dostupnost lipida. Neki od lipida su komercijalno dostupni ili se mogu

Iako ekstrahovati i prečistiti upotrebom dobro poznatih protokola, dok drugi ne mogu. Na primer primer, biljni sfingolipidi nisu komercijalno dostupni i vrlo se teško prečišćavaju iz biljnih ekstrakata ćelija. Slično tome, dominantan ceramid u kvascu 4-hidroksisfinganin, nije komercijalno dostupan. Da bi se prevazišli ovi problemi, koriste se raspoloživi modeli, koji, što je moguće bliže odražavaju lipid koji treba razmotriti u pogledu strukture, naelektrisanja, dužine lanca i (ne)zasićenja (Deleu et al., 2014).

- Izbor modela membrane: Svaki sistem ima svoje prednosti i nedostatke i biće izabran u skladu sa potrebnim informacijama, uzimajući u obzir izvodljivost eksperimenta. Da bi se analizirali prvi koraci interakcije bioaktivnih molekula sa membranom, najpogodniji će biti model monoslojeva. Analogno tome, za analizu umetanja membranski-aktivnih molekula unutar membrana, prednost će imati lipozomi ili poduprti dvostruki slojevi. Pri tome se moraju uzeti u obzir ograničenja svakog od modela. (Deleu et al., 2014).
- Izbor lipidne smeše: sastav lipida model membrane je jedna od najvažnijih tačaka. Kao što se očekuje, ukoliko je sastav model membrane bliži stvarnom sastavu membrane, utoliko će rezultati eksperimenta biti biološki relevantniji. Međutim, povećanje složenosti modela membrana dovodi do toga da se biofizička zapažanja teško mogu protumačiti. Zbog toga je važno pažljivo dizajnirati eksperimente, uzimajući u obzir ovaj balans između složenosti i izvodljivosti. Većina studija koje koriste modele membrana generalno prihvataju pristup korak-po-korak, modifikujući postepeno sastav lipida, na primer polazeći od fosfatidilholinskih membrana prema fosfatidilholin/sterolnim ili fosfatidilholin/sfingolipid/sterolnim sistemima. U literaturi, najsloženiji sistemi sadrže uglavnom tri vrste lipida (fosfatidilholin, sfingolipid, sterol) (Deleu et al., 2014).

2.10.4. Biofizičke metode (izbor biofizičkih metoda)

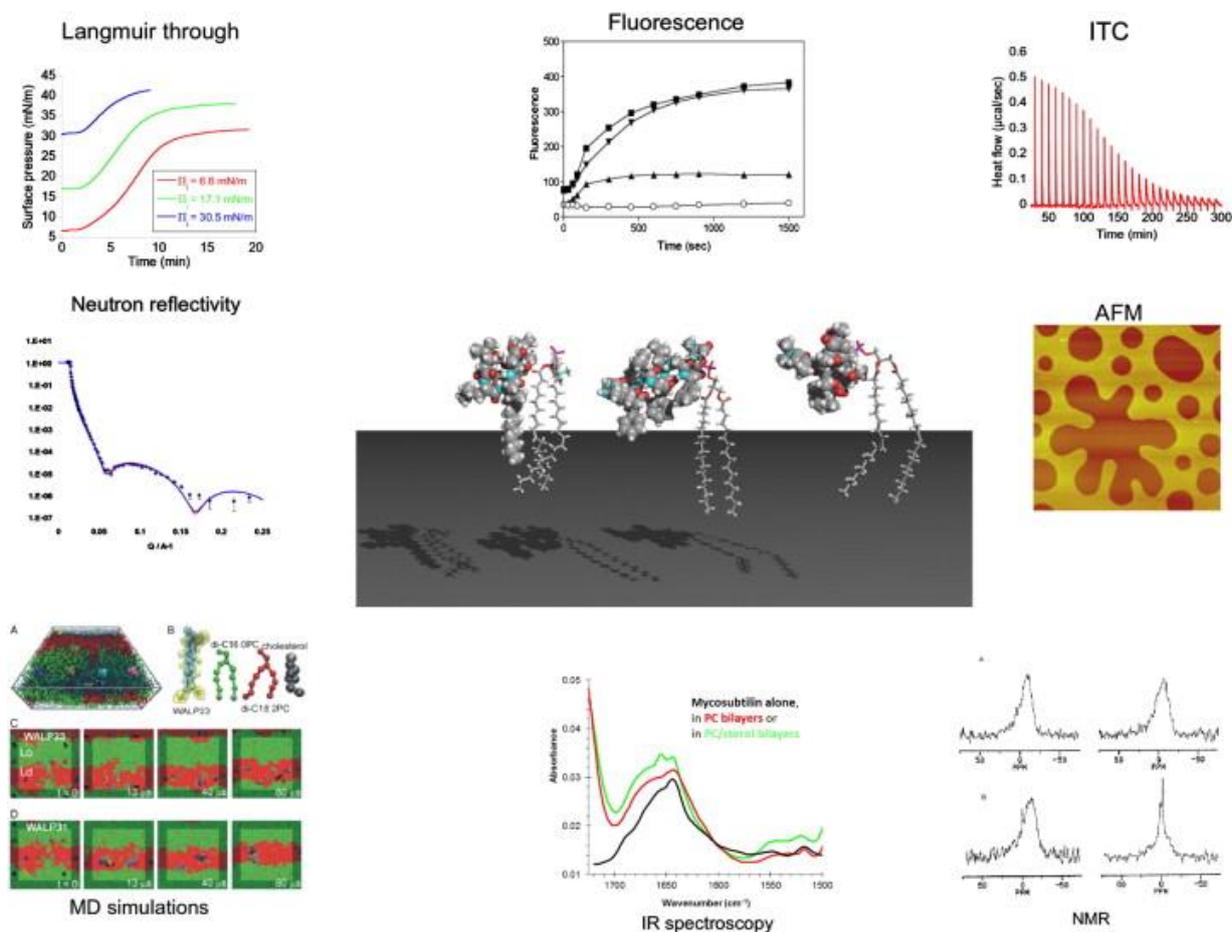
Prema Deleu et al. (Deleu et al., 2014) biofizičke metode se mogu podeliti u dve grupe, u zavisnosti od vrste informacija koje daju:

1. "Globalne molekulske" metode daju informacije o globalnim efektima ispitivanih molekula na lipide. U ove metode (pored ostalih) spadaju: Langmuir-ova tehnika monosloja (Langmuir monolayer technique), izotermalna titraciona kalorimetrija (isothermal titration calorimetry, ITC), fluorescentna spektroskopija i fluorescentno snimanje (fluorescence spectroscopy and imaging), atomic force mikroskopija (AFM), neutronska reflektivnost (neutron reflectivity, NP), površinska plazmonska rezonanca (surface plasmon resonance, SPR) ili elektronska paramagnetna spektroskopija (electron paramagnetic spectroscopy, EPR).
2. U drugu grupu spadaju tehnike koje pružaju informacije na molekulskom/atomskom nivou, i koje se zovu "molekularno-specifične" tehnike. U ovu grupu spadaju infracrvene spektroskopije (infrared spectroscopy, FTIR i PM-IRRAS), nuklearna magnetna rezonanca (nuclear magnetic resonance, NMR) na lipidu (^{31}P , ^2H , ^{13}C NMR), sekundarna maseno jonska spektrometrija (secondary ion mass spectrometry, SIMS).

Biofizičke metode obe grupe prikazane su na slici 2.20.

Tačan način na koji bioaktivni molekuli interaguju sa plazma membranom i molekulski detalji ovog mehanizma su oblast aktivnog istraživanja. Upotreba modela membrana sa specifičnim sastavom lipida je način da se zaobiđe visoka kompleksnost prirodnog lipidnog dvosloja i da se fokusira na specifičnosti lipida (Deleu et al., 2014).

Biofizički alati su glavni način da se razumeju ovi procesi i mogu pomoći u rešavanju problema koji imaju biološki značaj. Važno je naglasiti komplementarnost između svih ovih pristupa, koji daju detaljnu sliku o tome šta se dešava na molekulskom nivou (Deleu et al., 2014).



Slika 2.20: Šematski prikaz različitih biofizičkih metoda koje se koriste za proučavanje specifične interakcije između lipida i bioaktivnih molekula. Tri glavne klase molekula koje se razmatraju, prikazane na sredini slike: 1. ciklični lipopeptidi ostavljeni sa surfaktinom u interakciji sa 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholinom, 2. peptidi slični Simian Immunodeficiency Virus peptidu u interakciji sa 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolaminom, 3. farmakološki lekovi, kao što su azitromicin (desno) povezan sa 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholinom. Biofizičke tehnike su ovde, razvrstane u dve grupe: jedna grupa opisuje globalne efekte bioaktivnih molekula na membrane (Langmuir-ova tehnika, fluorescencija, ITC, NR, AFM), druga grupa pruža informacije na molekularnom (atomskom) nivou (NMR, IR spektroskopije, molekularno modeliranje) (Deleu et al., 2014).

Konstantan razvoj biofizičkih tehnika, obezbeđuje bolju korelaciju između *in vitro* i *in vivo* studija. Tehnike koje omogućavaju praćenje živih ćelijskih membrana na molekularnoj (čak atomskoj) rezoluciji se stalno poboljšavaju i treba da doprinesu boljem razumevanju kompleksnih lipidnih struktura i procesa koji se dešavaju na njihovoj međupovršini (Deleu et al., 2014).

Bolje razumevanje interakcije između biomolekula i plazma membrane na molekulskom nivou, i još preciznije sa jednim konkretnim lipidom, je važno ne samo za objašnjavanje različitih bioloških procesa, već takođe može poslužiti za projektovanje molekula prilagođene funkcionalnosti za razvoj lekova, kao što su npr. antibiotici. Membrana ćelija se često ne uzima u razmatranje u ovoj oblasti, jer nije meta farmakoloških molekula kao takva. Međutim, interakcija većine ovih egzogenih amfifilnih jedinjenja sa plazma membranom može da utiče na njenu strukturu i samim tim njenu normalanu funkciju (Deleu et al., 2014).

3.EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Hemikalije i reagensi

Cijanidin, (2-(3,4-dihidroksifenil)hromenilijum-3,5,7-triol hlorid, CAS Number: 528-58-5, $C_{15}H_{11}O_6Cl$, molarna masa 322,7 g/mol) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid, ((2S,3R,4S,5S,6R)-2-[2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksihromenilijum-3-il]oxi-6-(hidroksimetil)oksan-3,4,5-triol hlorid, CAS Number: 7084-24-4, $C_{21}H_{21}O_{11}Cl$, molarna masa 484,8 g/mol) kao hloridne soli kupljeni su od Polyphenols Laboratories AS (Sandnes, Norway).

Korišćeni fosfolipidi 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (DPPC) i 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-*rac*-glicerol) (natrijumova so) (DPPG) kupljeni su od Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Fluorofore 1,6-difenil-1,3,5-heksatrien (DPH) i N,N,N-trimetil-4-(6-fenil-1,3,5-heksatrien-1-il)fenilamonijum p-toluensulfonat (TMA-DPH) kupljeni su od Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, USA). 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (HEPES) je kupljen od Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Acetonitril (99,9%, HPLC grade) i amonijum-formijat nabavljeni su od Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). Sirćetna kiselina, amonijum-acetat, monohidrat limunske kiseline, mravlja kiselina, natrijum-citrat i metanol nabavljeni su od Merck (Darmstadt, Germany). Sve ostale upotrebljavane hemikalije bile su analitičke čistoće i nabavljene od Merck (Darmstadt, Germany). Vodeni rastvori su pripremani od Milli-Q vode (otpor > 18 M Ω ·cm) (Millipore, Bedford, MA, USA).

3.2. pH-titracija cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida praćena UV-Vis spektrometrijom

Hloridne soli cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida rastvorene su u Milli-Q vodi, tako da daju $2 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³ rastvora. Rastvori su ostavljeni da se uravnoteže u mraku na 25,0°C, u skladu sa procedurom Brouillard et al. (Brouillard et al., 1982; Brouillard et al., 1978). Sukcesivni pH skokovi od oko 0,2 pH jedinice (u području pH vrednosti od pH 0,4 do pH 13,5) postignuti su po modifikovanoj proceduri Brouillard et al. i Heredia et al.

(Brouillard et al., 1982; Brouillard et al., 1978; Heredia et al., 1998). Posle dodavanja svakog alikvota (nekoliko μ l) hlorovodonične kiseline ili natrijum hidroksida, rastvor je ostavljen da se uravnoteži tokom 5 minuta na magnetnoj mešalici. pH vrednost rastvora je merena pomoću Mettler Toledo Seven Easy pH metra (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) koji je bio opremljen sa Mettler Toledo InLab mikro elektrodom (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland). Apsorpcioni spektri (190-900 nm) rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na svakoj pH vrednosti snimani su pomoću Cary 100 Bio UV Visible spektrofotometra (Varian, Mulgrave, Victoria, Australia) u termostatiranim 10 mm kvarcnim kivetama sa Milli Q kao referencom. Tokom celokupnog eksperimenta temperatura u kivetama je merena digitalnim termoparom i održavana na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ u skladu sa procedurama Mazza & Brouillard (1987) i Dangles, Saito, & Brouillard (1993). Svaki spektar korigovan je za slepu probu i pomnožen je faktorom razblaženja.

3.3 Merenje boje rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida

Ispitivani su Commission Internationale de l'Eclairage Lab (CIELAB) parametri: L^* , svetlina; a^* , zeleno-crvena koordinata (redness); b^* plavo-žuta koordinata (yellowness); C^* hroma (hromatičnost, zasićenost boje, chroma); i h_{ab} ugao nijanse (hue angle). Ovi parametri određeni su za $2 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³ rastvore cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, na različitim pH vrednostima. Sukcesivni pH skokovi od oko 0,5 pH jedinica (od pH 0,5 do 13,1) postignuti su po modifikovanim procedurama Heredia et al. i Hurtado et al. dodavanjem malih alikvota (nekoliko μ L) hlorovodonične kiseline ili natrijum hidroksida (Heredia et al., 1998; Hurtado, Morales, González-Miret, Escudero-Gilete, & Heredia, 2009). pH vrednost je merena pomoću Mettler Toledo Seven Easy pH metra (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) koji je bio opremljen Mettler Toledo InLab mikro elektrodom (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland). Apsorpcioni spektri (190-900 nm) rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na svakoj pH vrednosti snimani su pomoću Cary 100 Bio UV Visible spektrofotometra (Varian, Mulgrave, Victoria, Australia) u termostatiranim 10 mm kvarcnim kivetama sa Milli Q kao referencom. Svaki spektar korigovan je za slepu probu i pomnožen je faktorom razblaženja. CIELAB parametri: L^* , a^* , b^* , C^* i h_{ab} rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida određeni su na svakoj pH vrednosti pomoću Konica Minolta CR-400 Chroma Meter-a (Sensing, Inc., Osaka, Japan).

Nakon svakog dodavanja reagensa, rastvori su ostavljeni 5 minuta na magnetnoj mešalici, da se uravnoteže, a zatim je vršeno merenje pH vrednosti, snimanje apsorpcionih spektara i određivanje CIELAB koordinata.

Ukupna razlika u boji ΔE^*_{ab} između početne pH vrednosti i posle svakog povećanja pH vrednosti, i "step by step" razlika u boji između dve susedne pH vrednosti izračunate su uzimajući u obzir Euclidean-ovu distancu između dve bojene tačke (jednačina 3.1) (Hurtado et al., 2009; J. Sun, Bai, Zhang, Liao, & Hu, 2011):

$$\Delta E^*_{ab} = ((\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2)^{1/2} \quad (3.1)$$

sva merenja su izvedena u triplikatu.

3.4. HPLC-DAD-ESI/MS analiza cijanidina i cijanidin 3-*O*-β-glukopiranozida

Da bi se odredila kinetička stabilnost cijanidina i cijanidin 3-*O*-β glukopiranozida na različitim pH vrednostima izvedena je analiza rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*-β glukopiranozida visoko efikasnom tečnom hromatografijom sa diode array deteckcijom sa elektronsprej jonizacionom/masenom spektrometrijom (HPLC-DAD-ESI/MS). Rastvori koncentracije $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ inkubirani su u puferima sa različitim pH vrednostima u periodu od 1090 min, a merenja su vršena u vremenskim intervalima od 218 min. Upotrebljavani su sledeći puferi: amonijum-formijat/mravljja kiselina (pH 2,0), natrijum-acetat/sirćetna kiselina (pH 4,0), natrijum-citrat/limunska kiselina (pH 7,0) i amonijum-acetat/amonijum hidroksid (pH 9,0). HPLC-DAD-ESI/MS sistem se sastojao od Agilent 1100 model G1312A binarne pumpe, autosemplera model G1330B i DAD detektora model G1315B (Agilent Technologies, Inc., Wilmington, DE). HPLC odvajanje izvedeno je uz upotrebu Gemini C18 kolone (150 × 2,00 mm I.D., veličina čestica 3 μm), zaštićene Gemini C18 Security Guard kertridžom (4,0 × 2,0 mm I.D.) (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Micromass Quattro Micro maseni spektrometar opremljen elektrosprej jonizacionim izvorom

radio je u pozitivnom jonskom modu (ESI⁺, Waters, Milford, MA, USA). Mobilna faza sastojala se od 1% vodenog rastvora mravlje kiseline (rastvarač A) i acetonitrila (rastvarač B). Korišćen je sledeći gradijent mobilne faze: 0-2 min, 10% B; 2-18 min, 10%-60% B; 18-18,2 min, 60%-80% B; 18,2-20 min, 80% B, 20-20,2 min 80%-10% B and 20,2-26 min 10% B. Kolona je držana na 25°C. Injekciona zapremina bila je 20 μ L, a protok mobilne faze bio je 0,2 mL/min. UV-Vis absorpcioni spektri snimani su on-line tokom svake HPLC analize. Maseni spektrometar je radio u pozitivnom jonskom modu (ESI⁺) sa sledećim parametrima rada: kapilarna voltaža, 3kV; konusna voltaža, 20V; ekstraktor, 5V. Temperatura izvora bila je 100°C i temperatura desolvatacije bila je 350°C. Protok konusnog gasa bio je postavljen na 40 L/h, a protok desolvacionog gasa bio je postavljen na 400 L/h sa kolizionom energijom na 30V. Relativne koncentracije različitih formi cijanidina i cijanidin 3-*O*- β glukopiranozida koje su detektovane izračunate su iz površina pikova. Integrali apsorbance, odvojenih formi cijanidina i cijanidin 3-*O*- β glukopiranozida analizirani su pomoću TableCurve 2D version 5.01 softvera (Systat Software Inc.). Različite forme cijanidina i cijanidin 3-*O*- β glukopiranozida identifikovane su pomoću MassLynx version 4.0 softvera (Micromass), na osnovu UV-Vis spektara i MS podataka. Ponovljivost analize bila je $\pm 2\%$.

3.5. Proučavanje fluorescentnih osobina cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na pH 5,5

3.5.1. Fluorescentni emisioni spektri cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na pH 5,5

Hloridne soli cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida rastvorene su u Milli-Q vodi, tako da daju $2 \cdot 10^{-5}$ mol \cdot dm⁻³ rastvora. Fluorescentni emisioni spektri cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida mereni su u vodenom rastvoru na pH 5,5. Ova pH vrednost je izabrana u skladu sa procedurom Drabent et al. (2007). Potrebne pH vrednosti postignute su dodavanjem hlorovodonične kiseline ili natrijum hidroksida i merene su Seven Easy pH metrom (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) koji je bio opremljen InLab mikro elektrodom (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland). Ovi rastvori uravnoteženi su u mraku na 25°C, u skladu sa procedurom Brouillard et al. (Brouillard et al., 1982; Brouillard et al., 1978). Fluorescentni emisioni spektri cijanidina i cijanidin 3-*O*- β glukopiranozida

snimani su na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, pomoću Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer-a (Varian, Mulgrave, Victoria, Australia) u termostatiranim 10 mm kivetama za fluorimetar, uz upotrebu Varian Auto Polarizers sa širinom proreza za normalni prolaz trake od 5 nm za ekscitaciju i emisiju. Za ekscitaciju molekula cijanidina i cijanidin 3-*O*- β glukopiranozida korišćene su talasne dužine iz UV oblasti spektra (210 - 350 nm, na svakih 10 nm).

3.5.2. Apsorpcioni spektari cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na pH 5,5

Za snimanje apsorpcionih spektara pripremljeni su $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rastvori cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida. UV-Vis spektri cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida mereni su na pH vrednostima 0,4 i 5,5, u skladu sa procedurom Drabent et al. i Figueiredo et al. (Drabent et al., 2007; Figueiredo, Pina, Vilas-Boas, & Macanita, 1990). Na $\text{pH} < 2$, antocijanini se javljaju u obliku flavilijum katjona, koji pokazuje apsorpciju u vidljivom delu spektra (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982; da Silva, Lima, Quina, & Maçanita, 2004; Drabent et al., 2007; Figueiredo et al., 1994; Figueiredo, Elhabiri, Saito, & Brouillard, 1996; George, Figueiredo, & Brouillard, 1999; Mazza & Brouillard, 1987), dok se na pH 5,5 antocijanini javljaju u obliku bezbojne hemiacetalne forme (Brouillard et al., 1982; Brouillard, Mazza, Saad, Albrecht-Gary, & Cheminat, 1989; Brouillard, 1982, 1988; Drabent et al., 2007; Mazza & Brouillard, 1987; Torskangerpoll & Andersen, 2005). Potrebne pH vrednosti postignute su dodavanjem hlorovodonične kiseline ili natrijum hidroksida i izmerene su Seven Easy pH metrom (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) koji je bio opremljen InLab mikro elektrodom (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland). Ovi rastvori uravnoteženi su u mraku na $25,0^\circ\text{C}$, u skladu sa procedurom Brouillard et al. (Brouillard et al., 1982; Brouillard et al., 1978). Apsorpcioni spektri (190-900 nm) rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida snimani su na navedenim pH vrednostima na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, pomoću Cary 100 Bio UV-visible spektrofotometra (Varian, Mulgrave, Victoria, Australia) u termostatiranim 10 mm kvarcnim kivetama, sa Milli-Q vodom kao referencom. Svaki spektar korigovan je za slepu probu i pomnožen faktorom razblaženja.

3.6. Stabilnost cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na 25,0°C, na različitim pH vrednostima

Da bi se odredila boja i stabilnost cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na sobnoj temperaturi izvršena je spektrofotometrijska analiza njihovih rastvora na različitim pH vrednostima (2,0; 4,0; 7,0 i 9,0) tokom inkubacije na $25 \pm 0,1$ °C, u periodu od 8 sati.

Za rastvaranje cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida pripremljeni su puferski rastvori sa koncentracijom $2,5 \cdot 10^{-2}$ mol·dm⁻³ i četiri različite pH vrednosti. Korišćeni su sledeći puferi amonijum-formijat/mravljja kiselina (pH 2,0), natrijum-acetat/sirćetna kiselina (pH 4,0), natrijum-citrat/limunska kiselina (pH 7,0) i amonijum-acetat/amonijum hidroksid (pH 9,0). pH vrednost svakog rastvora pufera merena je pomoću Mettler Toledo S20 Seven Easy pH metra (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) koji je bio opremljen Mettler Toledo InLab elektrodom (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland). pH vrednost uzoraka nije se menjala tokom stajanja.

Boja i stabilnost cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida određivani su na $25,0 \pm 0,1$ °C. Hloridne soli cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida rastvorene su u svakom od pufera do konačne koncentracije od $5 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³. Vidljivi apsorpcioni spektri (380-800 nm) rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida snimani su na definisanim pH vrednostima na $25,0 \pm 0,1$ °C, pomoću Cary 100 Bio UV-visible spektrofotometra (Varian, Mulgrave, Victoria, Australia) u termostatiranim 10 mm kvarcnim kivetama. Čisti puferi korišćeni su kao slepe probe. Spektrofotometrijska merenja vršena su neposredno nakon rastvaranja, a zatim u definisanim vremenskim intervalima u periodu od 8 sati. Svaki spektar korigovan je za slepu probu. Vrednosti apsorbance u vidljivoj oblasti, kretale su se u području od 0,01 do 0,96 jedinica apsorbance i nijedan uzorak nije razbležen pre merenja. Spektralne osobine antocijanina zavise od rastvarača (Cabrita, Fossen, & Andersen, 2000), a supstance prisutne u rastvoru mogu uticati na boju i stabilnost. Uticaj atmosferskog kiseonika i drugih faktora, kao što su sastav puferskog rastvora nisu obrađivani u ovoj studiji.

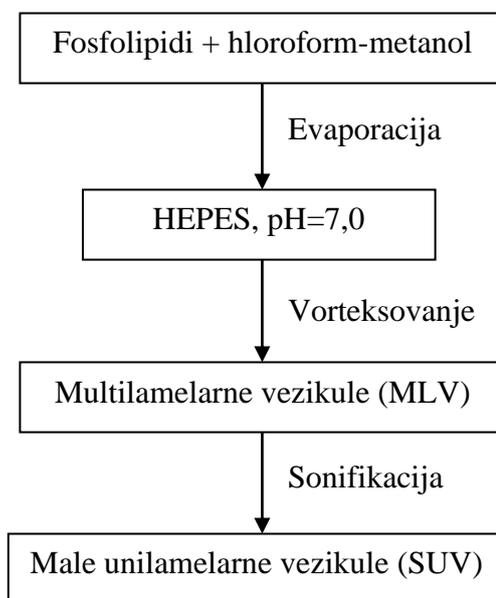
3.7. Kinetička stabilnost cijanidina i cijanidin 3-*O*- β glukopiranozida na 55,0°C i na pH 7,0

Kinetička stabilnost cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida određivana je u $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ u HEPES puferu, pH 7,0, na $55,0^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$. Hloridne soli cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida rastvorene su u $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, HEPES puferu do konačne koncentracije od $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Apsorpcioni spektri (190-900 nm) rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ snimani su pomoću Cary 100 Bio UV Visible Spectrophotometer (Varian, Mulgrave, Victoria, Australia) u termostatiranim 10 mm kvarcnim kivetama koje su bile opremljene digitalnim termoparom koji omogućava direktno merenje temperature uzorka i sa $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HEPES puferom, pH 7,0 kao referencom. Spektri su snimani u određenim vremenskim intervalima. Svaki spektar korigovan je za slepu probu. Opadanje apsorbance, u procentima, u odnosu na početnu apsorbancu u nultom vremenu (t_0), prikazano je kao funkcija vremena. Za cijanidin, promene u apsorbanci merene su na 568 nm i 418 nm, dok su za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid promene u apsorbanci merene na 559 nm i 437 nm. Braon indeks (BI) je izražen kao odnos absorbance na 430 nm prema onoj na 520 nm.

3.8. Priprema lipozoma

Multilamelarne vezikule (MLV) pripremljene su od 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoholine (DPPC) i 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-*rac*-glicerol) (natrijumova so) (DPPG) po metodi tankoslojnog-filma (Lasic, 1993). Ukratko, lipidi su rastvoreni u rastvoru methanol:chloroform (3:7, v/v) za pripremu DPPC lipozoma, i rastvoru methanol:chloroform (1:9, v/v) za pripremu DPPG lipozoma i prebačeni u okrugli balon, gde je rastvarač kompletno uparen pod sniženim pritiskom (10 mbar) i na kraju osušen u vakuumu na rotacionom vakuum uparivaču (BÜCHI, Labortechnik AG, Switzerland). Kada je formiran tanak film, dodat je HEPES pufer $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH=7,0, zagrejan na 50°C , (iznad temperature faznog prelaza lipida [T_m], za DPPC i DPPG) i smeša je energično vorteksovana

da bi se dobile multilamelarne vezikule (MLV-i). Finalna koncentracija lipidne smeše u lipozomima bila je 2,0 mg/mL. Za diferencijalna skenirajuća kalorimetrijska (DSC) merenja, MLV-i su pripremani u $2 \cdot 10^{-2}$ mol \cdot dm $^{-3}$ HEPES puferu, pH 7,0, sa finalnom koncentracijom DPPC-a i DPPG-a od 0,5 mg/mL. Za merenja fluorescence, male unilamelarne vezikule (SUV) pripremane su od MLV-a, 30 minutnom pulsnom sonifikacijom pomoću Vibracell ultrasonic dezintegratora (Sonics and Materials, Newtown, USA), uz upotrebu izlazne skale 4 i 50% radnog ciklusa (sobna temperatura), prema proceduri Sepčić et al. (Sepcic et al., 2003). Male unilamelarne vezikule (SUV) za merenja fluorescence pripremljene su u $2 \cdot 10^{-2}$ mol \cdot dm $^{-3}$ HEPES puferu, pH 7,0, sa finalnom koncentracijom DPPC-a i DPPG-a od 0,1 mg/mL. Postupak pripreme MLV-a i SUV-a prikazana je na slici 3.1.



Slika 3.1: Postupak pripreme multilamelarnih vezikula (MLV) i malih unilamelarnih vezikula (SUV)

3.9. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrijska (DSC) merenja

Da bi se pratili efekti cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na fazni prelaz MLV-a sastavljenih od DPPC-a ili DPPG-a (sa koncentracijom lipida od 0,5 mg/mL) korišćen je kalorimetar NANO DSC series III system (Calorimetry Science, Provo, UT, USA). Fazni prelaz MLV-a praćen je pri molarnom odnosu cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid prema DPPC-u 2:1 i prema DPPG-u 1:1. Uzorci su degasirani pod vakuumom i preneti u kalorimetrijsku ćeliju, u kojoj su zagrevani/hlađeni u više navrata u temperaturnom području od 10°C do 70°C, sa brzinom zagrevanja/hlađenja od 1°C/min. Prvi DSC skenovi su upotrebljavani su za određivanje temperature pre-tranzicije (T_{pre}), temperature glavnog faznog prelaza lipida (T_m), i model-nezavisne kalorimetrijske entalpije (ΔH_{cal}). Naredni skenovi su upotrebljavani su za određivanje reverzibilnosti faznog prelaza lipida. Za procenu entalpija i temperatura prelaza iz DSC termograma korišten je OriginPro 8.1 softver (OriginLab Corporation, USA).

3.10. Merenja fluorescentne emisije polarizacije

Merenja fluorescentne polarizacije fluorofora 1,6-difenil-1,3,5-heksatrien (DPH) i N,N,N-trimetil-4-(6-fenil-1,3,5-heksatrien-1-il)fenilamonijum p-toluensulfonat (TMA-DPH) izvedena u 10 mm fluorimetarskim kivetama uz upotrebu Cary Eclipse Fluorescence spektrofotometra (Varian, Mulgrave, Victoria, Australia) opremljenog magnetnom mešalicom i termostatski kontrolisanim držačem kiveta i digitalnim termoparom koji omogućava direktno merenje temperature uzorka. Za DPPC SUV-e upotrebljavane su temperature od $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ i $45,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, dok su za DPPG SUV-e upotrebljavane temperature od $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ i $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (temperature ispod i iznad DPPC/DPPG glavnog prelaza). Korišćeni su Varian auto-polarizeri sa širinom proreza za normalni prolaz trake od 5 nm za ekscitaciju i emisiju. DPH i TMA-DPH su dodati u 0,1 mg/mL rastvore SUV-a čistog DPPC-a ili DPPG-a u $2 \cdot 10^{-2}$ mol·dm⁻³ HEPES puferu, čiji je pH iznosio 7,0. Finalne koncentracije DPH i TMA-DPH fluorofora bile su $5 \cdot 10^{-7}$ i $5 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³ respektivno.

Rastvori DPPC ili DPPG SUV-a sa DPH ili TMA-DPH su titrovani dodavanjem alikvota rastvora cijanidina ili cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u metanolu koncentracije $2 \cdot 10^{-3}$ mol·dm⁻³, da bi se dobio cijanidin/cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid:DPPC/DPPG molarni odnos od 1:1 do 3:1. Nakon svakog dodavanja cijanidina ili cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, uzorak je ostavljan 10 min da bi se uravnotežio. DPH i TMA-DPH fluorescentna emisijska polarizacija je merena u prisustvu DPPC ili DPPG SUV-a kao funkcija koncentracije cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida. Upotrebljavana je ekscitaciona talasna dužina od 358 nm, sa ekscitacionim polarizatorom orjentisanim u vertikalnom položaju, dok su vertikalna i horizontalna komponenta polarizovane emitovane svetlosti registrovane kroz monohromator na 410 nm, za obe probe. Vrednosti G-faktora (odnosa osetljivosti detekcionog sistema za vertikalno i horizontalno polarizovano svetlo) određivane su posebno za svaki uzorak. DPH i TMA-DPH polarizacija (*P*) izračunavana je pomoću softvera koji je ugrađen u instrument, prema jednačini 3.2.

$$P = \frac{I_{\parallel} - GI_{\perp}}{I_{\parallel} + GI_{\perp}} \quad (3.2)$$

gde su I_{\parallel} i I_{\perp} fluorescentni intenziteti vertikalno i horizontalno polarizovane emisije kada se uzorak ekscituje vertikalno polarizovanim svetlom (Lakowicz, 2006).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. pH-titracija cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida praćena UV-Vis spektrometrijom

Uticaj pH vrednosti na spektralne osobine cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida ispitivan je u celokupnom pH području od 0,5 do 13,5. Rezultati su izraženi kao UV-Vis spektri pri različitim pH vrednostima, zatim kao talasne dužine apsorpcionih maksimuma ($\lambda_{\text{max-vis}}$), i kao molarne absorbtivnosti na 520 nm (ϵ), u funkciji pH vrednosti. To omogućava ispitivanje uticaja 3-glukozidne supstitucije aglikona na spektralne osobine i strukturnu ravnotežu između različitih strukturnih oblika koji su prisutni pri različitim pH vrednostima.

UV-Vis spektri cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida prikazani su na slikama 4.1 do 4.3 i 4.6 do 4.8, respektivno. U cilju bolje prezentacije, prikazane su i promene u poziciji apsorpcionog maksimuma u vidljivom delu spektra ($\lambda_{\text{max-vis}}$), (od 500 do 620 nm) cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida i promene u molarnoj absorbtivnosti (ϵ) na 520 nm kao funkcije pH.

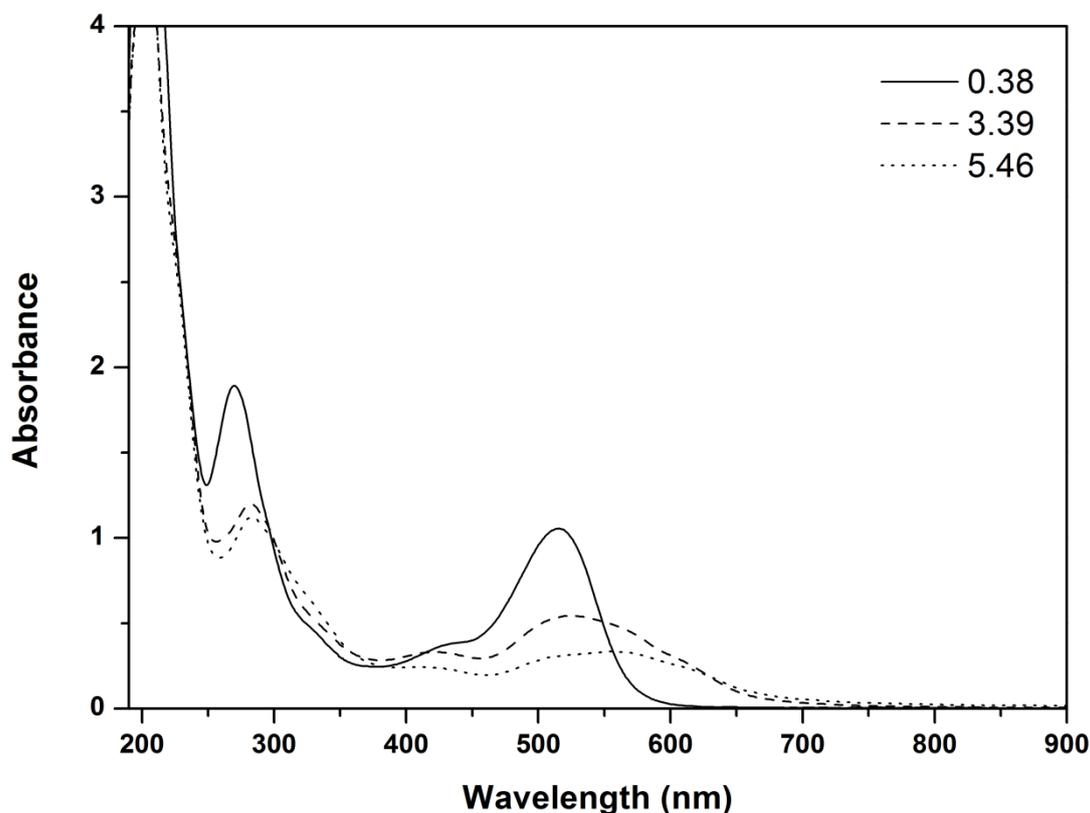
4.1.1. UV-Vis spektralne osobine cijanidina na različitim pH vrednostima

Na najnižoj merenoj pH vrednosti 0,38, apsorpciona traka u vidljivom delu spektra cijanidina je uska sa apsorpcionim maksimumom u vidljivom delu spektra, $\lambda_{\text{max-vis}}$, blizu 520 nm (slika 4.1), i odgovara flavilijum katjonu, (Brouillard, 1982; Figueiredo et al., 1990). U području pH vrednosti sve do pH 3,5, intenzitet apsorpcione trake flavilijum katjona značajno opada, ukazujući na prelazak obojenog flavilijum katjona u bezbojni hemiacetal oblik (slika 2.6, B) i obojene hinonoidalne baze (slika 2.6, A).

U području pH vrednosti koje su više od 3,5 može se uočiti batohromni pomak, $\lambda_{\text{max-vis}}$, od 524 nm do 560 nm (slika 4.4). U literaturi je ovaj pomak pripisan prelazu flavilijum katjona u hinonoidalne baze, (Brouillard, 1982). To ukazuje da se na pH 4,4 ($\pm 0,2$), dešava prvi pomak u ravnoteži protonacija/depotonacija, što je u skladu sa rezultatima Brouillard et al. (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982), prema kojima se gubitak prvog protona sa kiselih fenolnih grupa flavilijum katjona obično dešava na pH vrednostima između 4 i 5. Široka apsorpciona traka (slika 4.1) ukazuje da je u ovom pH području cijanidin verovatno prisutan u obliku nekoliko sličnih ravnotežnih struktura.

U brzom proton-transfer difuziono kontrolisanoj reakciji protoni se prenose sa kiseonikovog atoma hidroksilne grupe koja je vezana za C-3, C-5, C-7, C-3' i C-4' atom flavilijum katjona na molekul vode. Deprotonacija se, u određenoj meri, dešava na svakoj hidroksilnoj grupi (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982), što rezultira mogućnošću formiranja pet prototropnih tautomera, (uopšteno označenih sa A): A₃, A₅, A₇, A_{3'} i A_{4'} (slika 2.6). Vidljivu svetlost jako apsorbuju i flavilijum katjon i hinonoidalne baze (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982). Traka sa $\lambda_{\text{max-vis}}$ blizu 520 nm koja odgovara flavilijum katjonu isčezava u ovoj pH oblasti, međutim apsorpciona traka sa $\lambda_{\text{max-uv}}$ na oko 280 nm (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982; Figueiredo et al., 1990), prethodno pripisana hemiacetalnoj formi ne prati takvo ponašanje, ukazujući na očekivano formiranje bezbojnog hemiacetalnog oblika i obojenih hinonoidalnih baza na račun flavilijum katjona.

Bezbojni hemiacetal oblik nastaje kao rezultat nukleofilne adicije vode na pozitivno naelektrisani pirilijum prsten u položaju C-2 (slika 2.6). Ravnoteža ove reakcije uspostavlja se mnogo sporije od proton transfer reakcije, i zahteva par minuta na sobnoj temperaturi (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982).

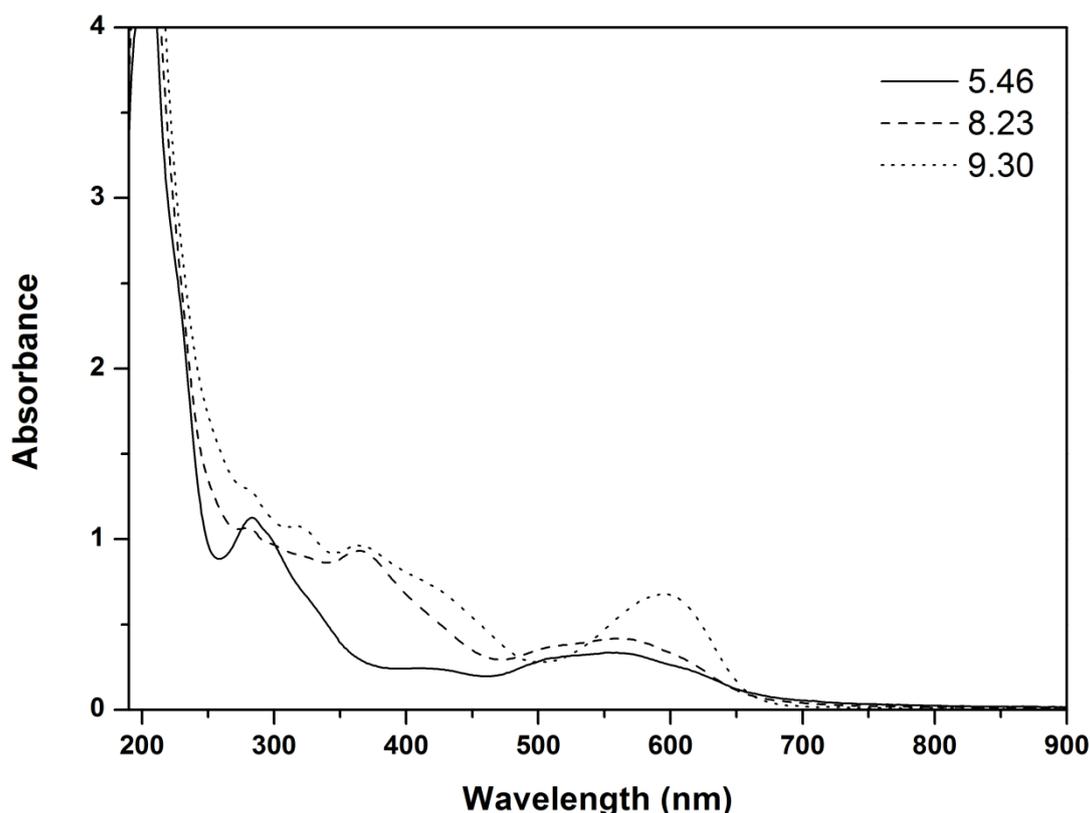


Slika 4.1: UV-Vis spektri $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rastvora cijanidina u području pH vrednosti od 0,38 do 5,46

U pH području od 5,5 do 8,2 (slika 4.2) apsorpciona traka u vidljivom području se proširuje, što upućuje na koegzistenciju više stuktura (u ovom slučaju hinonoidalnih baza). Traka sa $\lambda_{\text{max-uv}}$ blizu 360 nm koja se javlja u ovom pH području odgovara neutralnom halkonu (slika 2.6, C) (Brouillard, 1982; Figueiredo et al., 1990).

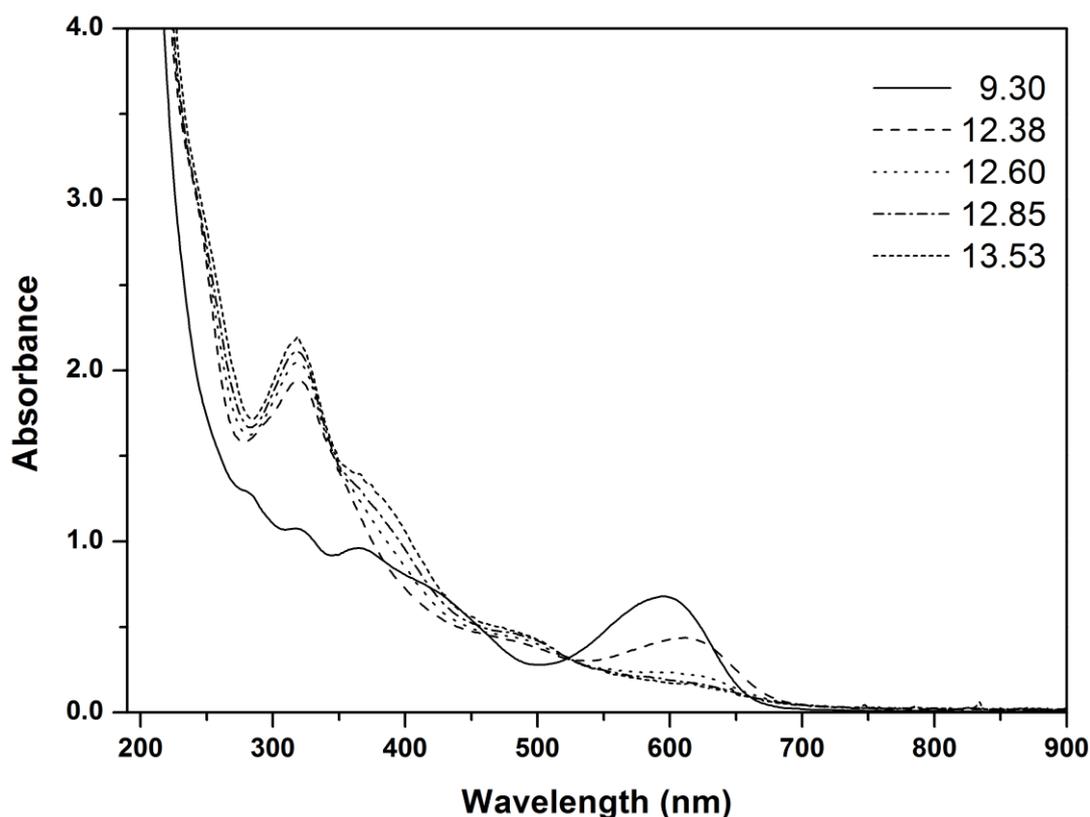
Sa porastom pH vrednosti, apsorpciona traka na 280 nm, pripisana hemiacetalnom obliku opada, ukazujući na njegovu transformaciju u halkonski oblik u bazno katalizovanoj prsten-lanac tautomernoj reakciji (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982). Halkonski oblik sa otvorenim prstenom ne apsorbuje svetlost u vidljivom području spektra (Brouillard, 1982).

U odsustvu 3-glukozidnog supstituenta, kao u slučaju cijanidina, ravnoteža između hemiacetalnog i halkonskog oblika je skoro u potpunosti pomerena prema otvorenom halkonskom obliku (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982), što je u skladu sa nestajanjem hemiacetalne apsorpcione trake i relativno visokim apsorbanicama dobijenim na 360 nm (od oko 1 jedinice absorbance) (slika 4.2).



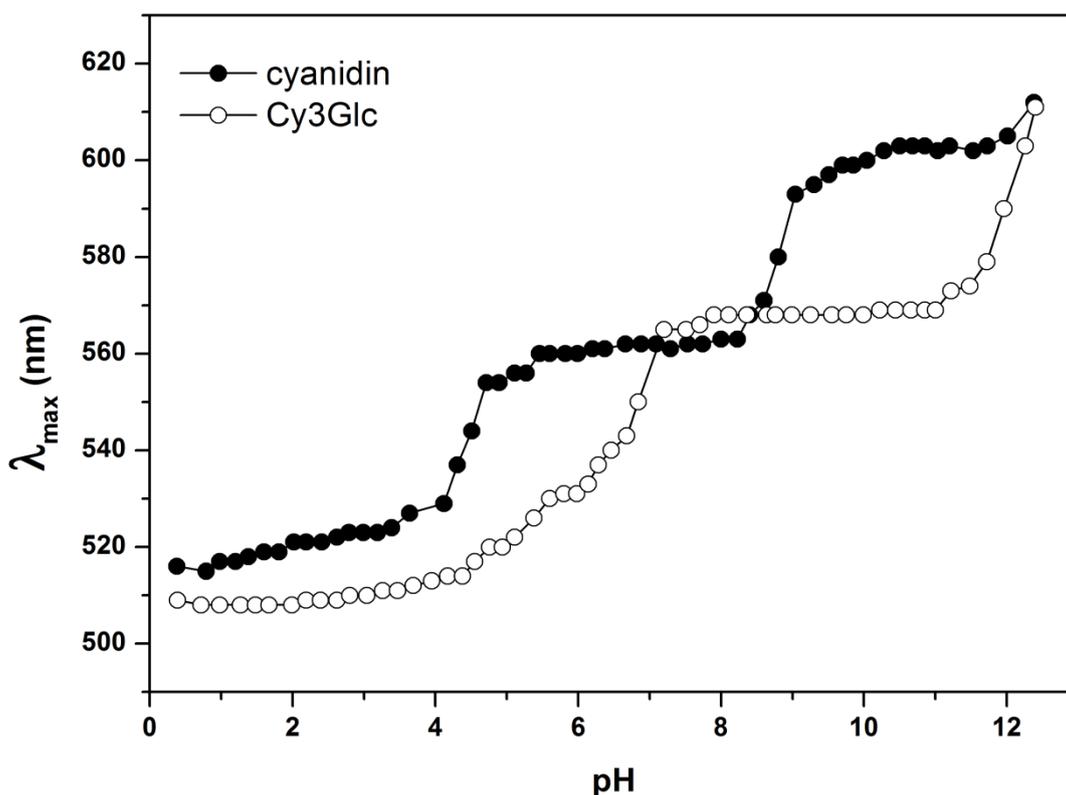
Slika 4.2: UV-Vis spektri $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rastvora cijanidina u području pH vrednosti od 5,46 do 9,30

U baznijem području, u oblasti pH vrednosti od 8,2 do 9,3 uočava se drugo batohromno pomeranje sa promenom položaja apsorpcionog maksimuma u vidljivoj oblasti, $\lambda_{\text{max-vis}}$, od 563 do 595 nm (slike 4.2 i 4.4). To ukazuje da na pri pH 8,8 ($\pm 0,2$) javlja drugi pomak u ravnoteži deprotonacija/protonacija, koji dovodi do formiranja negativno naelektrisanih prototropnih tautomera hinonoidalnih baza (A^-). U ovoj pH oblasti i neutralni tautomeri (A) i negativno naelektrisani prototropni tautomeri (A^-) doprinose boji. Obe vrste (A i A^-) su visokokonjugovani sistemi koji snažno apsorbuju vidljivu svetlost i snažno boje sredinu u kojoj se nalaze. Ovi rezultati su u saglasnosti sa ranije objavljenim podacima (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982), prema kojima je postojanje neutralnih i negativno naelektrisanih tautomera praćeno velikim batohromnim pomeranjem u vidljivom delu spektra. U ovom regionu prisutna je traka na 360 nm, što ukazuje na prisustvo halkonske forme, ali bez promena u absorbanci (slika 4.2.).



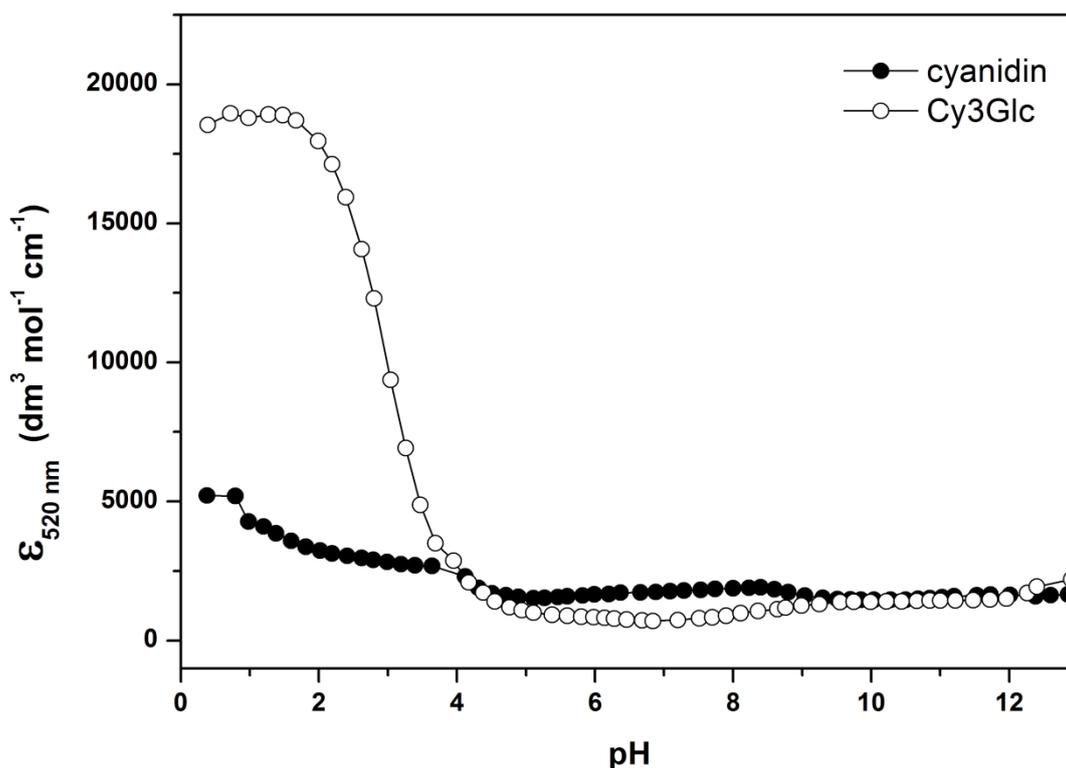
Slika 4.3: UV-Vis spektri $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rastvora cijanidina u području pH vrednosti od pH 9,30 do pH 13,53

U pH području od 9,3 do 12,3 uočen je treći batohromni pomak. Ovde se $\lambda_{\max\text{-vis}}$ pomera od 595nm do 612 nm (slika 4.4). Verujemo da se u ovom pH području možda javlja treća ravnoteža deprotonacije/protonacije, pri čemu se, zbog visoke baznosti rastvora, mogu formirati negativno naelektrisani dianjoni (A^{2-}) gubitkom trećeg protona (Brouillard, 1982). Apsorpciona traka u vidljivom području je uska (slika 4.3). Pored toga, u pH području od pH 11,5 do 12,5 uočeno je opadanje molarne apsorbtivnosti (slika 4.5), udruženo sa nestajanjem trake karakteristične za halkonsku formu, što ukazuje da pri $\text{pH} > 12$ dolazi do degradacije cijanidina. Prema tome, maksimum koji se javlja na 320 nm u UV-Vis spektrima cijanidina može se pripisati proizvodu degradacije cijanidina.



Slika 4.4: Položaji apsorpcionih maksimuma (λ_{\max} , nm) $2 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³ rastvora cijanidina (●) i cijanidin 3-O- β -glukopiranozida (○) u funkciji pH.

Promene pH vrednosti utiču na vrednosti molarne apsorptivnosti cijanidina (slika 4.5.). Vrednost molarne apsorptivnosti na pH 0,38 iznosila je $5\,216,00\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Povećanje pH vrednosti rezultiralo je postepenim opadanjem molarne apsorptivnosti sve do pH 5,11, na kojoj se dostiže minimum (od $1\,529,45\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Daljim povećanjem pH vrednosti dovodi do izuzetno blagog povećanja molarnih apsorptivnosti sve do pH vrednosti pH 8,40 ($1\,914,75\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), a zatim do neznatnog pada do pH 9,51 ($1\,489,90\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). U alkalnoj oblasti, pri pH vrednostima od 9,51 do 12,38 vrednosti molarnih apsorptivnosti su skoro konstantne ($1\,500$ do $1\,600\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Maksimalne vrednosti molarnih apsorptivnosti nađene su, očekivano, u najkiselijoj sredini u pH oblasti od 0,38 do 0,79 ($5\,216,00$ i $5\,200,10\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) u kojoj se pigment javlja u obliku flavilijum katjona (Brouillard, 1982; Figueiredo et al., 1990). Međutim, sam aglikon ima veoma niske vrednosti molarne apsorptivnosti.



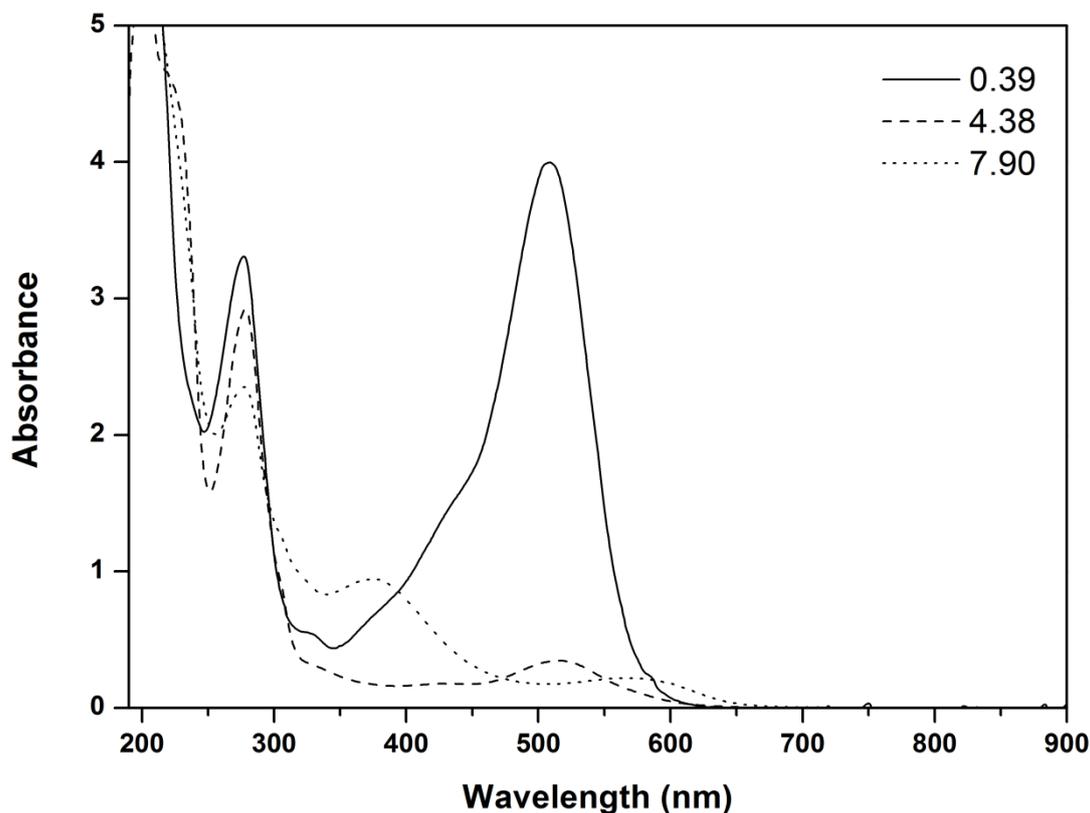
Slika 4.5: Molarne apsorptivnosti na 520 nm (ϵ , $\text{dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) $2\cdot 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ rastvora cijanidina (●) i cijanidin 3-O- β -glukopiranozida (○) kao funkcije pH vrednosti.

4.1.2. UV-Vis spektralne osobine cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na različitim pH vrednostima

Slično cijanidinu, na najnižim merenim pH vrednostima apsorpciona traka u vidljivom delu spektra za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid bila je uska i odgovarala je flavilijum katjonu (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982; Heredia et al., 1998) (slika 4.6, pH 0,39). Prethodno je utvrđeno da cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid u vodenom rastvoru u pH području od 0,8 do 3,7 pokazuje apsorpcioni maksimumi na 511 (\pm 1) nm (Fossen et al., 1998; Heredia et al., 1998; G. Mazza & Brouillard, 1990; Torskangerpoll & Andersen, 2005), što je u dobroj saglasnosti sa našim rezultatima. Poređenje molarnih apsorptivnosti za cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid na najnižim merenim pH vrednostima ukazuje na veoma visoki uticaj 3-glukozidne supstitucije na apsorptivnost aglikonskog dela (slika 4.5).

Na pH vrednostima većim od 2,5, dolazi do velikog pada molarne apsorptivnosti cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (slika 4.5). To odražava konverziju obojenog flavilijum katjona u bezbojni hemiacetalni i kasnije halkonski oblik (Mazza & Brouillard, 1987). Glavni proces u ovom pH području je nukleofilna adicija vode na obojeni flavilium katjon.

Poređenje spektra na pH 4,38 sa apsorpcionim spektrom flavilijum katjona (slika 4.6., pH 0,39) ukazuje da u vodenom rastvoru na pH vrednostima većim od 4,38 cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid uglavnom postoji u bezbojnom obliku. Vrlo je verovatno da 3-glukozidna supstitucija snažno favorizuje reakciju adicije vode na pirilijum jezgro, što rezultira formiranjem visokih koncentracija bezbojnog hemiacetalnog oblika i kasnije formiranjem halkona, što je potvrđeno pojavljivanjem trake na 370 nm koja je karakteristična za halkonski oblik (Brouillard, 1982; Figueiredo et al., 1990). Prisustvo 3-glukozidnog ostatka smanjuje stabilnost boje cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida snažno utičući na poboljšanje efikasnosti procesa hidratacije.



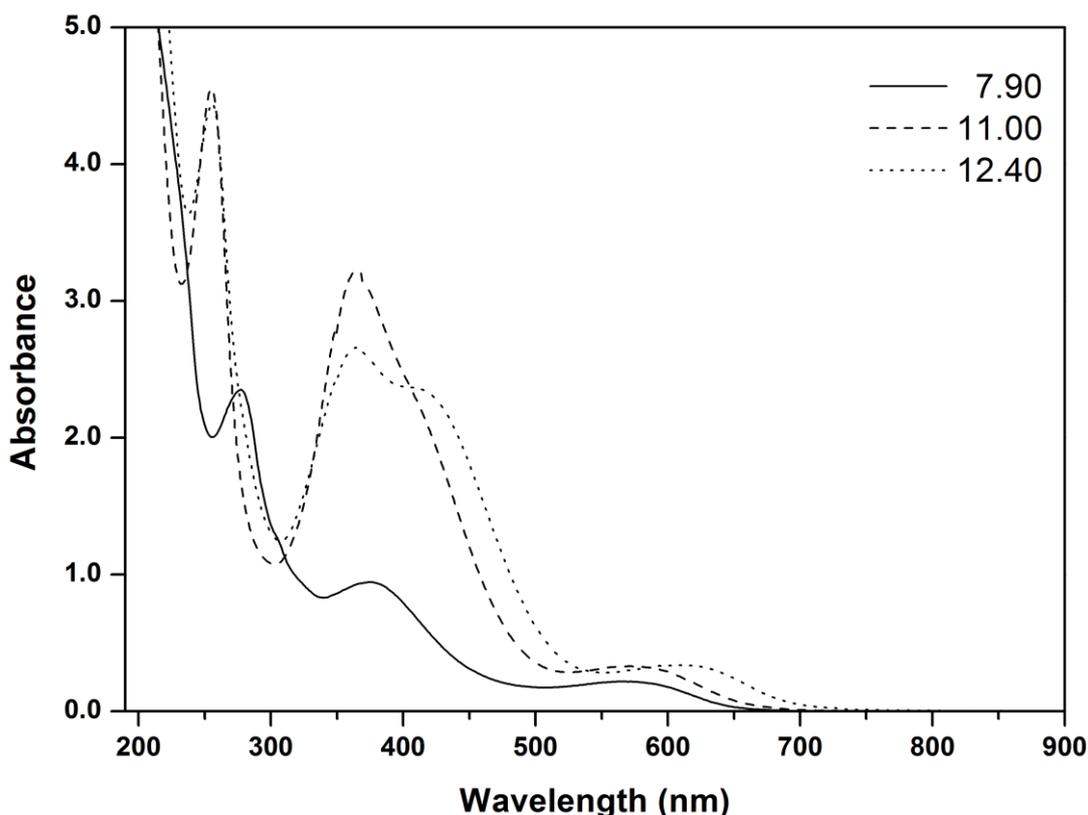
Slika 4.6: UV-Vis spektri $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u području pH vrednosti od 0,39 do 7,90.

U pH području od 4,5 do 8,0 uočen je veliki batohromni pomak u UV-Vis spektru (slika 4.4) sa promenom položaja apsorpcionog maksimuma od 514 nm do 568 nm. To ukazuje da se u pH području od 4,0 do 7,0 uspostavlja ravnoteža deprotonacija/protonacija koja odgovara deprotonaciji preostale male količine flavilijum katjona do hinonoidalnih baza. Pošto cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid ima četiri hidroksilne grupe na C-5, C-7, C-3' i C-4' atomima, iz istih razloga kao u slučaju cijanidina, gubitak prvog protona može se desiti na bilo kojoj od ovih hidroksilnih grupa, što rezultira formiranjem četiri prototropna tautomera (uopšteno označenih sa A): A₅, A₇, A_{3'} i A_{4'}. U poređenju sa cijanidinom, broj mogućih hinonoidalnih baza je redukovana za jednu, zbog 3-glukozidne supstitucije jedne od hidroksilnih grupa.

Vrednosti vidljivih apsorbanca i njihove promene u ovom pH području su male (0,35 na pH 4,38 i 0,22 na pH 7,90), što ukazuje na veoma nisku koncentraciju formiranih hinonoidalnih baza koje apsorbuju vidljivu svetlost (slika 4.6). Traka karakteristična za flavilijum katjon nestaje na pH vrednostima većim od 4,4. Sa povećanjem pH vrednosti, apsorpciona traka na oko 275 nm karakteristična za hemiacetalni oblik (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982; Figueiredo et al., 1990), opada. Poređenje ovih spektara sa

apsorpcionim spektrom flavilijum katjona na pH 0,39 (slika 4.6.) ukazuje da u pH području od 4,4 do 7,9, cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid uglavnom postoji u bezbojnom hemiacetalnom i halkonskom obliku. Na pH 7,5 javlja se traka sa maksimumom na oko 370 nm, karakteristična za halkonski oblik (Brouillard, 1982; Figueiredo et al., 1990), koji nastaje kao rezultat prsten-lanac prototropnog tautomerizma između cikličnog hemiacetal oblika koji se formira na nižim pH vrednostima i halkonskog oblika sa otvorenim prstenom (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982).

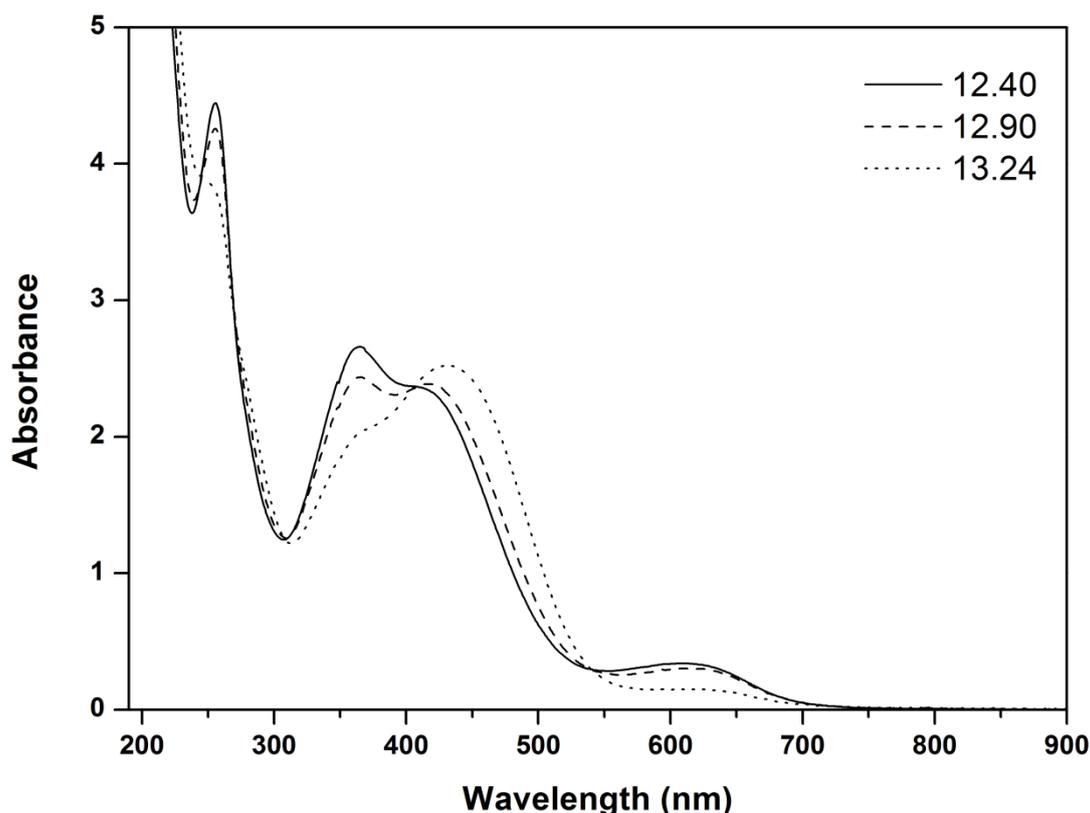
U pH području od 7,9 do 11,0 (slika 4.7) nisu primećene značajne promene u poziciji vidljivog apsorpcionog maksimuma niti promene molarnih apsorptivnosti cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (slika 4.4 i 4.5), za šta verujemo da je posledica male i konstantne koncentracije hinonoidalnih baza koje jedine apsorbuju vidljivu svetlost. Na pH 11,0 uočeno je značajno povećanje apsorbanca na 370 nm (od 0,95 na pH 7,90 do 3,21 na pH 11,0). To je posledica prelaska bezbojnog hemiacetalnog oblika, koji se formira pri nižim pH vrednostima u halkonski oblik u ovom području.



Slika 4.7: UV-Vis spektri $2 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot dm $^{-3}$ rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u području pH vrednosti od 7,90 do 12,40.

U pH području od 11,0 do 12,4 (slika 4.8) može se uočiti drugi batohromni pomak u vidljivom delu spektra od 569 do 611 nm (slika 4.4). To ukazuje na pojavu druge ravnoteže deprotonacija/protonacija na pH 11,7 ($\pm 0,2$) (koja nije završena) i formiranje negativno naelektrisanih prototropnih tautomera (A^-). Ipak, molarna apsorptivnost u vidljivom spektralnom području je veoma niska (slika 4.5), što potvrđuje vrlo nisku koncentraciju vrsta koje apsorbuju vidljivu svetlost (hinonoidalnih baza A i hinonoidalnih anjona A^-). Na pH vrednostima većim od 12,4 nestaje vidljivi apsorpcioni maksimum (slika 4.8). Pik u UV-Vis spektru na oko 370 nm menja svoj oblik, što ukazuje na transformaciju halkonaskog oblika u neki degradacioni proizvod.

Na pH 13,24 je dobijen potpuno drugačiji spektar (slika 4.8). U njemu nema apsorpcionih traka na talasnim dužinama karakterističnim za hinonoidalne baze, a javlja se apsorpciona traka sa maksimumom na 430 nm i malim ramenom na talasnoj dužini karakterističnoj za halkonski oblik. Vrlo je verovatno da se ovde javljaju degradacioni proizvodi cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida.



Slika 4.8. UV-Vis spektri $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u području pH vrednosti od 12,40 do 13,24.

Promene pH vrednosti jako utiču na vrednost molarne apsorptivnosti cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (slika 4.5). Povećanje pH vrednosti od 0,4 do 4,4 rezultira ekstremnim padom molarnih apsorptivnosti cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (od 18 544,65 dm³·mol⁻¹·cm⁻¹ na pH 0,39 do 1 721,05 dm³·mol⁻¹·cm⁻¹ na pH 4,38), a zatim dolazi do znatno postepenijeg opadanja, sve do minimuma koji se dostiže na pH 6,84 (707,1 dm³·mol⁻¹·cm⁻¹). Heredia et al. (1998) su prethodno objavili da cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid na pH 1,5 ima molarnu apsorptivnost od 18 800 dm³·mol⁻¹·cm⁻¹. Mi smo dobili istu vrednost (18 891,25 dm³·mol⁻¹·cm⁻¹ na pH 1,48). Rezultati koje smo dobili su takođe u dobroj saglasnosti sa radovima Fossen et al. (1998) i Torskangerpoll & Andersen (2005). Dalje povećavanje pH vrednosti dovodi do veoma blagog povećanja molarne apsorptivnosti sve do pH 11,96 (1 510,45 dm³·mol⁻¹·cm⁻¹). Maksimalne vrednosti molarne apsorptivnosti za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid nađene su, kao što je i očekivano u najkiselijem pH području, na pH vrednostima od 0,4 do 2,0, na kojima se pigment javlja u obliku flavilijum katjona u skladu sa rezultatima Fossen et al. (1998).

Vrednosti molarnih apsorptivnosti rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na pH 0,8 iznosile su 5 200,10 i 18 955,1 dm³·mol⁻¹·cm⁻¹ respektivno (10 mm kvarcne kivete), što jasno ukazuje na velike razlike u molarnim apsorpcionim koeficijentima flavilijum katjona aglikona (cijanidina) i 3-glukozidno supstituisanog aglikona (cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida), koji je dominantna strukturna forma na pH 0,8.

Na pH 0,8, takođe se mogu uočiti razlike između spektara cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida. Apsorpcioni maksimum u vidljivoj oblasti je blago pomeren prema kraćim talasnim dužinama u slučaju 3-monoglukozidne supstitucije (cijanidin ima za oko 7 nm više $\lambda_{\text{max-vis}}$ vrednosti u poređenju sa cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozidom) i taj trend se održava sve do pH vrednosti oko 7 (slika 4.4). 3-glukozidna supstitucija snažno utiče na povećanje molarne apsorptivnosti flavilijum katjona. Npr. na pH 1,6, molarne apsorptivnosti rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida ($2 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³ rastvori), na 520 nm iznose 3 587,15 i 18 699,95 dm³·mol⁻¹·cm⁻¹, respektivno (slika 4.5). U isto vreme cijanidin je imao za 10 nm više $\lambda_{\text{max-vis}}$ vrednosti u odnosu na cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid (slika 4.4).

Ove razlike jasno pokazuju ekstremno visok uticaj 3-glukozidne supstitucije aglikona na povećanje molarne apsorptivnosti flavilijum katjona. Dobijene vrednosti molarnih apsorptivnosti dobro se slažu sa prethodno objavljenim rezultatima (Fossen et al., 1998; Heredia et al., 1998; Torskangerpoll & Andersen, 2005).

Značajan hiperhromni efekat 3-glukozidne supstitucije uočljiv je u svim spektrima na pH vrednostima nižim od 4. Poređenjem molarnih apsorptivnosti cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, može se videti da u pH području od 0,4 do 4 cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid ima ekstremno više molarne apsorptivnosti, što je povezano sa prisustvom 3-glikozidne supstitucije. U ostatku pH regiona cijanidin ima neznatno više molarne apsorptivnosti u poređenju sa cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozidom.

Neočekivano, u alkalnom području, u pH oblasti od 9,50 do 11,20 cijanidin ima drugi maksimum vrednosti molarnih apsorptivnosti, i ove vrednosti su više u poređenju sa odgovarajućim vrednostima cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida. Ipak molarne apsorptivnosti na pH vrednostima višim od 4 su veoma niske za oba jedinjenja. Na pH vrednostima oko 4 oba jedinjenja imaju praktično iste vrednosti molarnih apsorptivnosti ($2\ 305,95\ \text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ cijanidin i $2\ 093,2\ \text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid) (slika 4.5).

Značajan hipohromni efekat, pogotovu u slučaju cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, može se uočiti na pH vrednostima višim od 4. Uvođenje glukozil grupe u C-3 položaj aglikona snažno favorizuje reakciju hidratacije, kao što se to može videti poređenjem spektara cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u pH području od 0,3 do 4,5. Evidentno je da pri ovim pH vrednostima prisustvu 3-glukozil grupe jako favorizuje reakciju hidratacije (u kojoj nastaju bezbojne strukture) u odnosu na proton transfer reakcije. U prisustvu 3-glukozidne supstitucije aglikona može se očekivati formiranje nižih procenata obojenih hinonoidalnih baza, što vodi formiranju višeg procenta bezbojnog hemiacetalnog i halkonskog oblika.

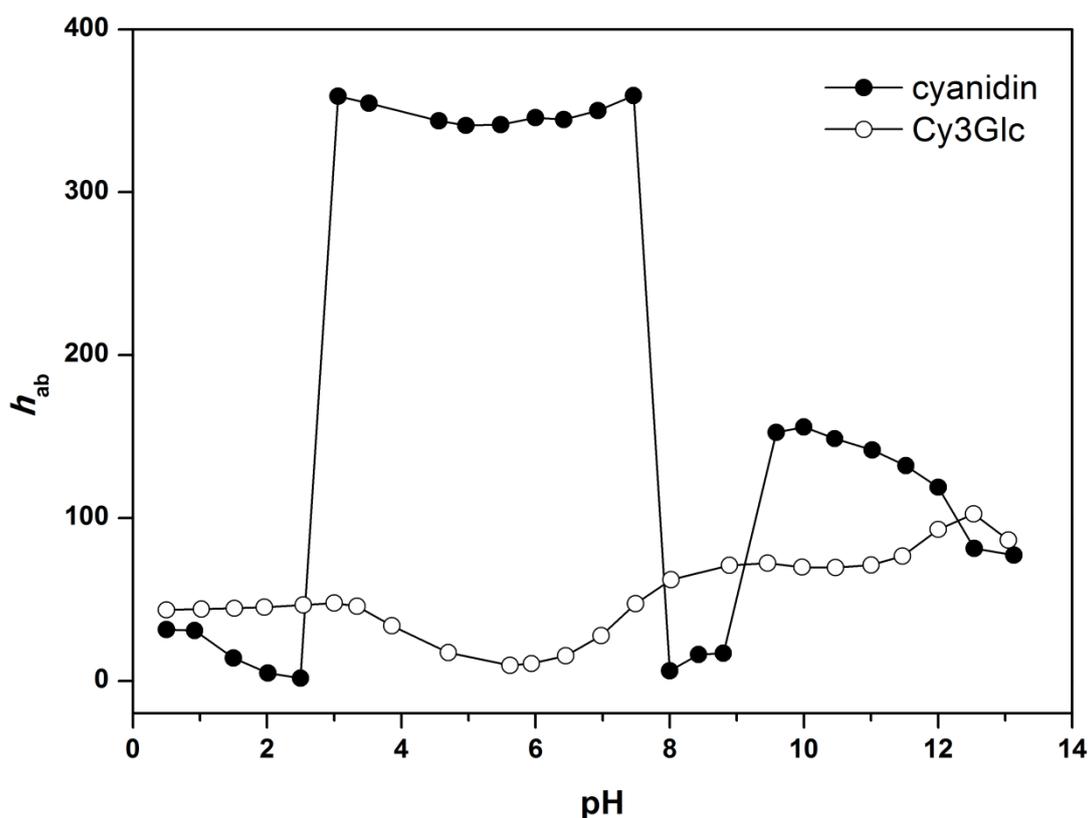
4.2. Merenje boje rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida

Za kolorimetrijsku analizu uzet je u obzir CIELAB uniformni prostor boja. Varijacija boje vodenog rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida ($2 \cdot 10^{-4}\ \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) je proučavana u celokupnom pH području (od 0,5 do 13). Merenje CIELAB parametara L^* , C^* , h_{ab} i ΔE^*_{ab} pokazalo je da su njihove vrednosti jako zavisile od pH vrednosti i prisustva glukozidnog supstituenta u C-3 položaju aglikona.

4.2.1. Uticaj pH vrednosti na ugao tona boje (h_{ab}) cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida

Ugao tona boje (h_{ab}), je kvalitativna karakteristika boje (Hurtado et al., 2009; Miljković, Milena N., 1994). Uglovi tona boje su se menjali na različite načine sa promenom pH vrednosti za cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid (slika 4.9). Glukozidna supstitucija u cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozidu u položaju 3 aglikonskog dela dovela je do relativno velikog pada h_{ab} vrednosti, u celokupnom pH području. Kao što je očekivano, i cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid, su u najkiselijim uslovima (0,50) u kojima je flavilijum katjon dominantna strukturna forma (Brouillard, 1982; Figueiredo et al., 1990), bili najjače obojeni.

Rastvori cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida su imali različite nijanse u celokupnom pH području (slika 4.9).



Slika 4.9. Promena ugla tona boje (h_{ab} , $^{\circ}$) u funkciji pH vrednosti za $2 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot dm $^{-3}$ vodene rastvore cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc, ○).

Na najnižoj pH vrednosti (0,50) rastvor cijanidina pokazivao je crvenkastu nijansu ($31,41^\circ$), dok je cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid imao narandžastu nijansu ($43,50^\circ$) (tabela 4.1), kao što su to prethodno objavili Heredia et al. i Torskangerpoll et al. za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid (Heredia et al., 1998; Torskangerpoll & Andersen, 2005). Pri postepenom povećavanju pH vrednosti do pH 7,46, boja rastvora cijanidina se postepeno menjala prema lila (purpurnim) tonovima (do $h_{ab} = 359,34^\circ$), a zatim sa daljim povećavanjem pH vrednosti do 8,80 boja rastvora cijanidina menja prema crvenkastim nijansama (do $h_{ab} = 16,92^\circ$). Na pH 9,59 rastvor cijanidina pokazuje zelenkaste tonove ($h_{ab} = 152,55^\circ$), koji se sa daljim povećavanjem pH vrednosti postepeno menjaju ka žutim nijansama ($81,36^\circ$ na pH 12,54).

Za razliku od cijanidina u slučaju cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida početna osnovna narandžasta nijansa ($43,50^\circ$ na pH 0,50) ostaje u oblasti narandžastih tonova sa povećanjem pH sve do pH 3,34 (do $h_{ab} = 45,83^\circ$), a zatim se sa daljim povećanjem pH vrednosti boja cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida postepeno menja prema crvenkastim nijansama ($15,38^\circ$ na pH 6,45) (tabela 4.1). Na pH 6,98 ($h_{ab} = 27,86^\circ$), ugao nijanse cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida počinje da raste i kao posledica toga boja rastvora se menja od narandžaste ($47,39^\circ$ na pH 7,49) prema žutoj na pH 9,46 ($h_{ab} = 72,30^\circ$). Dobijeni obrazac promene ugla nijanse je u dobroj saglasnosti sa onim koji su prethodno utvrdili Heredia et al. za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid (Heredia et al., 1998). U pH oblasti od 9,97 do 10,47 cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je imao žutu boju ($69,58^\circ$ na pH 10,47). Pri višim pH vrednostima, ugao nijanse opet raste i boja se postepeno menja prema žućkasto zelenim tonovima ($102,56^\circ$ pri pH 12,53).

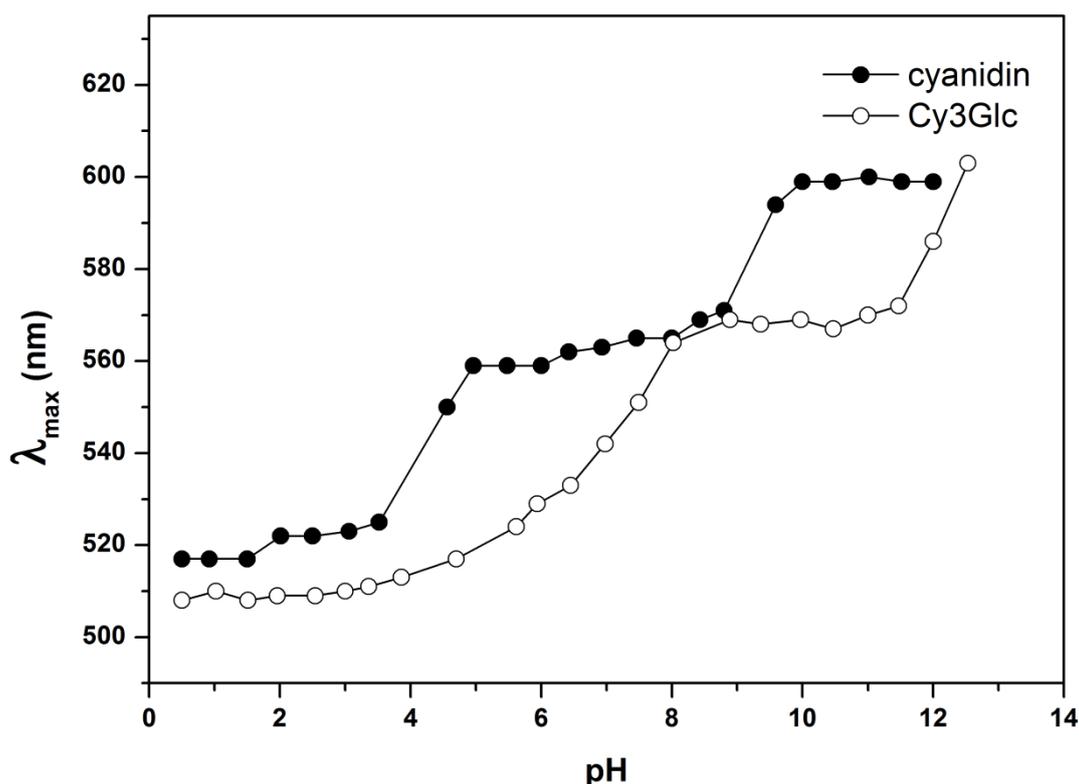
Kao što pokazuju uglovi tona boje (tabela 4.1), glukozidna supstitucija aglikona u položaju 3 dovodi do relativno velikog pada h_{ab} vrednosti u oblasti pH od 3 do 8 i u baznim rastvorima na pH vrednostima višim od 9 i jasno utiče na karakteristike boje aglikona.

Praćenjem promena položaja vidljivog apsorpcionog maksimuma $\lambda_{\max\text{-vis}}$ za rastvore cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida sa promenom pH vrednosti (slika 4.10), kao mere promene boje, uočena je sledeća tendencija: za oba pigmenta, polazeći od najkiselijih rastvora, povećanje pH vrednosti izazivlo je batohromni pomak: $\lambda_{\max\text{-vis}}$ rastvora cijanidina pomakao se od 517 nm (pH 0,50) na 599 nm (pH 12,00), u isto vreme $\lambda_{\max\text{-vis}}$ rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida pomakao se od 508 nm (pH 0,50) na 603 nm (pH 12,53).

Ovaj batohromni pomak za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid bio je praćen dramatičnim hipohromnim efektom: apsorbanca na pH 5,62 bila je samo oko 5,1% apsorbanca izmerene na pH 0,50.

Tabela 4.1. Uticaj različitih pH vrednosti na položaj apsorpcionog maksimuma u vidljivoj oblasti ($\lambda_{\max\text{-vis}}$, nm) i vrednosti ugla tona boje (h_{ab} , °) za $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodene rastvore cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc).

pH	$\lambda_{\max\text{-vis}}$ (nm)	h_{ab} (°)	pH	$\lambda_{\max\text{-vis}}$ (nm)	h_{ab} (°)
cijanidin			Cy3Glc		
0,50	517	31,41	0,50	508	43,50
0,92	517	30,92	1,02	510	44,04
1,50	517	14,05	1,51	508	44,51
2,01	522	4,76	1,96	509	45,15
2,50	522	1,65	2,54	509	46,47
3,06	523	358,99	3,00	510	47,71
3,52	525	354,62	3,36	511	45,83
4,56	550	343,89	3,86	513	33,78
4,96	559	341,01	4,70	517	17,37
5,48	559	341,51	5,62	524	9,50
6,00	559	345,89	5,94	529	10,57
6,42	562	344,59	6,45	533	15,38
6,93	563	350,05	6,98	542	27,86
7,46	565	359,34	7,49	551	47,39
8,00	565	6,20	8,02	564	62,10
8,43	569	16,22	8,89	569	70,88
8,80	571	16,92	9,36	568	72,30
9,59	594	152,55	9,97	569	69,82
10,00	599	155,88	10,47	567	69,58
10,46	599	148,73	11,00	570	71,11
11,02	600	141,73	11,47	572	76,65
11,52	599	132,08	12,00	586	93,02
12,00	599	118,89	12,53	603	102,56
12,54		81,36	13,05		86,48
13,13		77,19			



Slika 4.10: Položaj apsorpcionih maksimuma (λ_{\max} , nm) $2 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³ rastvora cijanidina (●) i cijanidin 3-O-β-glukopiranozida (○) kao funkcija pH vrednosti.

U slučaju cijanidina, došlo je do izuzetno velikog bathohromnog pomeranja u pH oblasti od 3,5 do 4,5 (od 525 na 550 nm) (slika 4.10). Dalje povećanje pH vrednosti, rezultiralo je veoma postepenim povećanjem $\lambda_{\max\text{-vis}}$, sve do pH oblasti od 8,8 do 9,6, gde je uočen sledeći izuzetno veliki bathohromni pomak (od 571 na 594 nm), što je u skladu sa našim prethodnim spektroskopskim ispitivanjem.

U slučaju cijanidin 3-O-β-glukopiranozida, porast pH vrednosti, takođe je rezultirao bathohromnim pomeranjem. U pH oblasti od 5 do 8 cijanidin 3-O-β-glukopiranozid je pokazao veliko bathohromno pomeranje (od 517 na 564 nm), ali sa mnogo postepenijim porastom u poređenju sa cijanidinom, što je u skladu sa našim prethodnim spektroskopskim istraživanjima.

Kada je reč o tonu boje, ranije se smatralo da je jedina referenca za rastvore antocijanina na različitim pH vrednostima, položaj njihovog apsorpcionog maksimuma u

vidljivoj oblasti spektra $\lambda_{\text{max-vis}}$. Bilo je postulirano da dokle god se ne menja položaj apsorpcionog maksimuma u vidljivoj oblasti, ne menja se ni ton boje (Gonnet, 1998, 1999, 2001). Naša kolorimetrijska analiza tona boje rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (slika 4.9) u poređenju spektrofotometrijskim praćenjem promene pložaja apsorpcionog maksimuma u vidljivoj oblasti spektra (slike 4.10), doveli su do drugačijeg zaključka: rastvori cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida pokazali su velike varijacije hromatskih tonova, iako njihov spektralni $\lambda_{\text{max-vis}}$ bio stabilan. Rastvori cijanidina u pH oblasti od 0,50 do 1,50 imali su isti položaj apsorpcionog maksimuma ($\lambda_{\text{max-vis}} = 517 \text{ nm}$), dok su u isto vreme pokrivali širi obim nijansi: od narandžasto-crvene nijanse ($h_{\text{ab}} = 31,41^\circ$) do osnovne crvene nijanse ($h_{\text{ab}} = 14,05^\circ$) (tabela 4.1). U pH području od 2,01 do 3,06 rastvori cijanidina imali su isti vidljivi $\lambda_{\text{max-vis}}$ (522 - 523 nm) dok su se njihove nijanse menjale od crvene ($h_{\text{ab}} = 4,76^\circ$) do magenta nijanse ($h_{\text{ab}} = 358,99^\circ$). Daljim porastom pH vrednosti u oblasti od 7,46 do 8,00 rastvori su ponovo imali istu $\lambda_{\text{max-vis}}$, (565 nm) dok su se u isto vreme njihove nijanse kretale od magenta ($h_{\text{ab}} = 359,34^\circ$) do crvene ($h_{\text{ab}} = 6,20^\circ$). U pH oblasti od 10,00 do 12,00 rastvori cijanidina imali su istu vidljivu $\lambda_{\text{max-vis}}$, (599 nm) a njihove nijanse varirale su od zelene ($h_{\text{ab}} = 155,88^\circ$) do žuto-zelene nijanse ($h_{\text{ab}} = 118,89^\circ$).

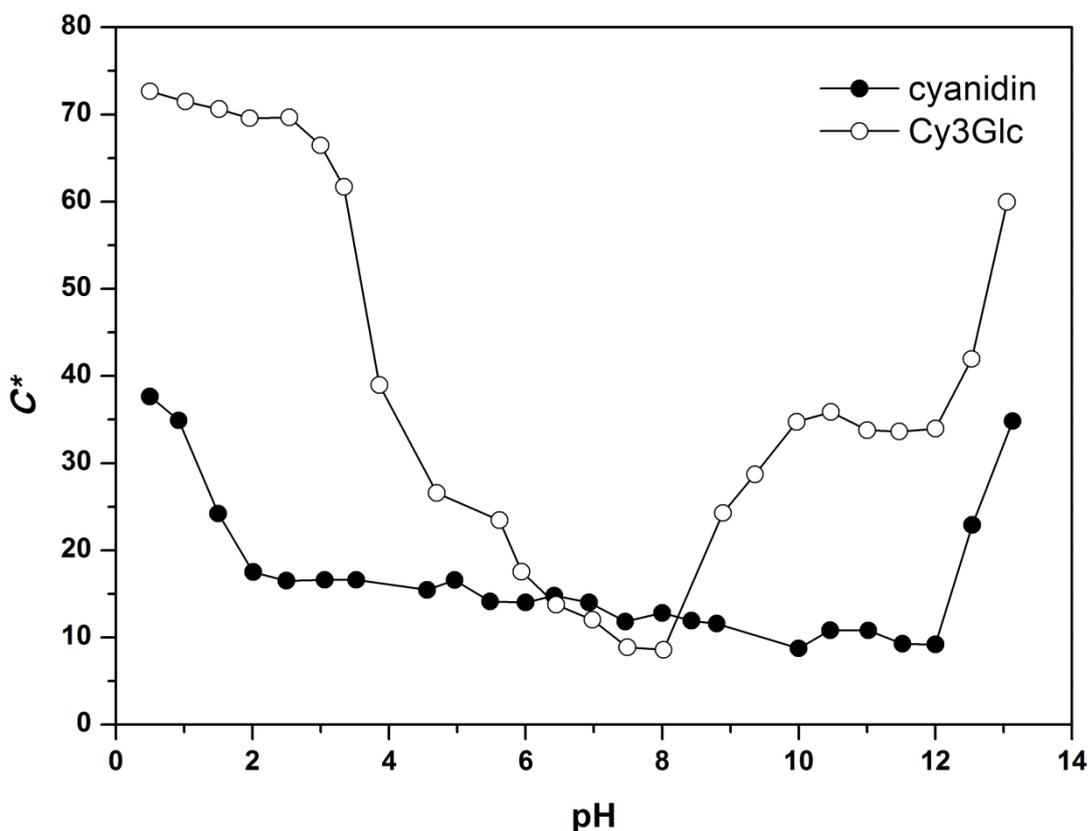
Uporedivi efekti, ali sa znatno ograničenijom amplitudom nijansi, bili su uočeni i u rastvorima cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na pH vrednostima od 3,36 do 3,86 (imali su istu $\lambda_{\text{max-vis}}$, 511-513 nm): od osnovne narandžaste nijanse ($h_{\text{ab}} = 45,83^\circ$) do crveno-narandžaste ($h_{\text{ab}} = 33,78^\circ$).

Nasuprot tome, rastvori cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, koji su imali različite (pomerene) spektre imali su isti osnovni tonalit. Rastvori cijanidina na pH vrednostima 3,06 i 7,46 imali su $\lambda_{\text{max-vis}}$ na 523 i 565 nm, respektivno i isti osnovni magenta tonalit ($h_{\text{ab}} = 358,99 - 359,34^\circ$) (tabela 4.1). U slučaju rastvori cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na pH 3,00 i 7,49 imali su $\lambda_{\text{max-vis}}$ na 510 i 551 nm i istu h_{ab} vrednost od oko 47° .

Prema tome, možemo zaključiti da su $\lambda_{\text{max-vis}}$ vrednosti rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na različitim pH vrednostima u lošoj korelaciji sa odgovarajućim h_{ab} vrednostima, kao što je i ranije objavljeno (Gonnet, 1998, 1999, 2001; Miljkovic, Purenovic, Djordjevic, & Petrovic, 2011; Torskangerpoll & Andersen, 2005). Takođe, ovo pokazuje da treba biti oprezan kada se koriste $\lambda_{\text{vis-max}}$ vrednosti za interpretaciju boje.

4.2.2. Uticaj pH vrednosti na hromu (C^*) cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida

Vrednosti hrome, (zasićenosti boje) C^* , pokazuju udaljenost od sivog tona tj. stepen zasićenosti boje, na skali od 0 do 100 (Miljković, Milena N., 1994). Varijacije hrome kao funkcije pH vrednosti za rastvore cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida prikazane su na slici 4.11. Kao što su ranije objavili Torskangerpoll i Andersen (2005) za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid, najviša vrednost hrome nađena je na najnižim pH vrednostima. Početna vrednost hrome za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid (72,66) na najnižim pH vrednostima bila je mnogo viša nego za cijanidin (37,63). Vrednosti hrome dobijene za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid na najnižim pH vrednostima se dobro slažu sa rezultatima do kojih su došli Herdiaet al. (Heredia et al., 1998).



Slika 4.11: Promene vrednosti hrome (C^*) u funkciji pH vrednosti za $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodene rastvore cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc, ○).

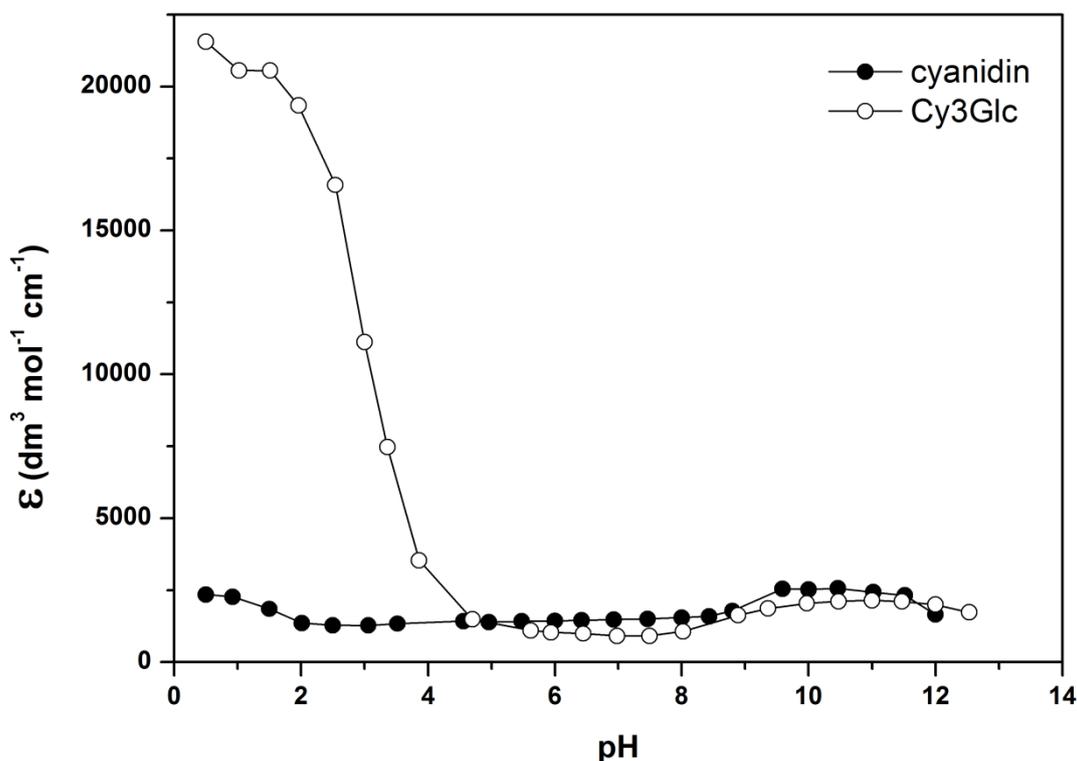
U slučaju cijanidina vrednosti hrome bile su niske i skoro konstantne u praktično čitavoj pH oblasti, osim najkiselijeg i najalkalnijeg područja. U najkiselijem području povećanje pH vrednosti od 0,50 do 2,01 dovelo je do smanjenja hrome za više od 20

jedinica hrome. Nasuprot tome u najalkalnijoj oblasti promena pH od 12,00 do 13,13 dovodilo je do povećanja hrome za više od 25 jedinica.

U slučaju rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, povećanje pH vrednosti prouzrokovalo je gubitak hrome, što se uočavalo kao gubitak boje, sve do pH vrednosti 7,5 i 8,0 gde je dostignut minimum, a zatim je sa daljim povećanjem pH vrednosti došlo do ponovnog porasta vrednosti hrome. Smanjenje vrednosti hrome bilo je posebno izraženo u pH području od 3,3 do 4,7 gde je došlo do gubitka više od 35 jedinica hrome. Suprotan efekat je uočen u pH oblasti od 8,02 do 8,89 u kojoj je došlo do porasta hroma za više od 15 jedinica.

Cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je imao značajno veće vrednosti hrome nego cijanidin u skoro celokupnoj pH oblasti, izuzev pH područja 6,5 do 8,9. Ovo ukazuje na uticaj 3-glukozilacije u cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozidu na zasićenje boje (C^*): prisustvo 3-glukozidne supstitucije snažno utiče na povećanje hrome.

Molarne absorptivnosti (ϵ) rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida pratile su sličan obrazac promene (slika 4.12) boje kao i vrednosti C^* (slika 4.11).



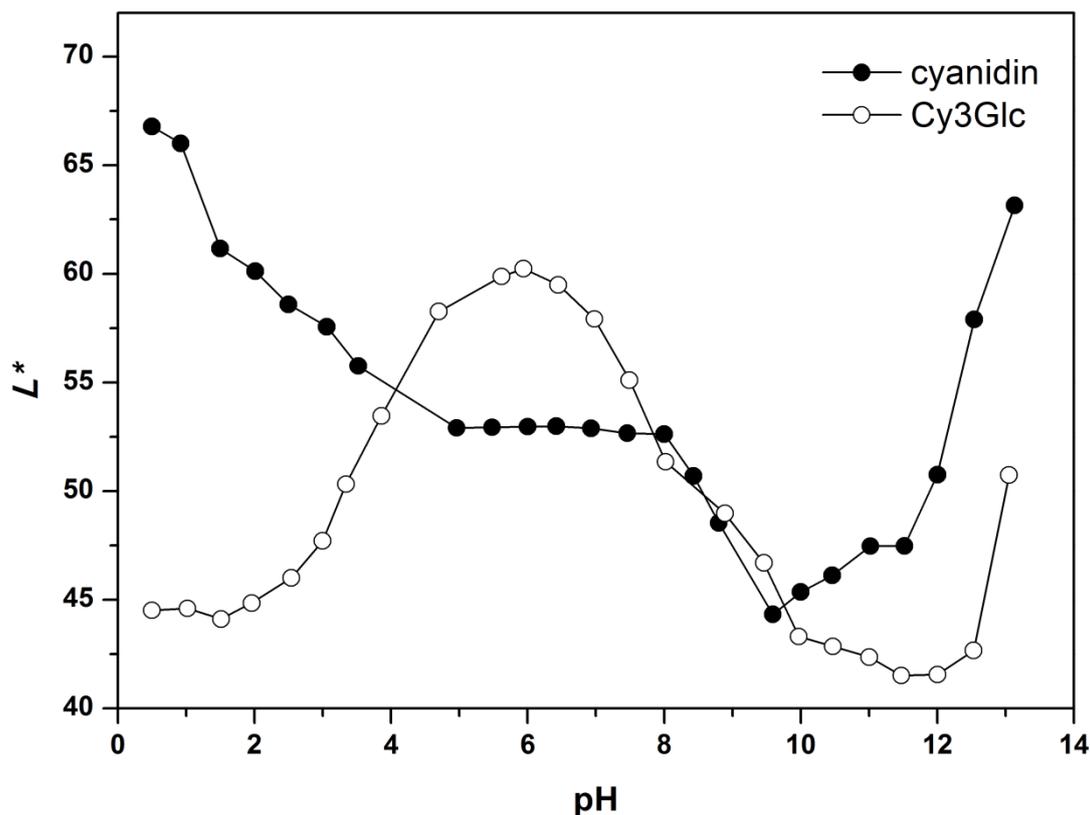
Slika 4.12: Molarne absorptivnosti (ϵ , $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rastvora cijanidina (\bullet) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc, \circ) u funkciji pH vrednosti.

4.2.3. Uticaj pH vrednosti na svetlinu boje (L^*) cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida

Svetlina boje L^* označava raspon od svetline (100) do tamnoće (0), (u rasponu od 0 za crnu do 100 za belu) (Hurtado et al., 2009; Miljković, Milena N., 1994). Promene u svetlini, L^* , u funkciji pH vrednosti za cijanidin su bile veoma složene (slika 4.13). Početna vrednost svetline (L^*) za rastvor cijanidina na najnižoj pH vrednosti (0,50) bila je 66,78 jedinica. Sa povećanjem pH vrednosti svetlina je opadala (boja je bivala sve tamnija) sve do pH 5,0 (52,92 jedinica), kada je svetlina postala konstantna i održavala je taj trend sve do pH 8,0 (od 52,92 do 52,63 jedinica). Na pH 8,0 započelo je dramatično smanjenje L^* (boja je postajala sve tamnija), sve do pH 9,6 (44,33 jedinica) gde je svetlina boje dostigla minimum t.j., pri ovoj pH vrednosti rastvor cijanidina je bio najtamniji. Dalje povećanje pH rezultiralo je porastom vrednosti L^* , i u skladu sa tim rastvor je postajao sve svetliji, naročito u najalkalnijem području, pri pH vrednostima većim od 12 (50,76 jedinica).

Početna svetlina boje (L^*) na najnižoj pH vrednosti (0,50) rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (44,52) bila je mnogo niža nego za rastvor cijanidina (slika 4.13), što praktično znači da je rastvor cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bio mnogo tamniji. Kao što su prethodno objavili Heredia et al. (1998) sa povećanjem pH vrednosti, svetlina boje L^* rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida je progresivno rasla, dostižući maksimum pri pH vrednostima između 4 i 5, usled formiranja bezbojnih formi (hemiacetalne i halkonske forme). Dalje povećanje pH vrednosti rezultiralo je padom L^* vrednosti rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida sve do 12,0 (41,57 jedinica). U najalkalnijoj sredini vrednosti L^* su ponovo počele da rastu.

U slučaju rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida dobijen je simetričan obrazac promene svetline boje u zavisnosti od pH vrednosti (slika 4.13), sa maksimumom oko sredine ispitivane pH oblasti (pH 6). Ono što je posebno interesantno, vrednost L^* rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u najkiselijim i najbaznijim uslovima imala je slične i niske vrednosti (oko 40 jedinica), t.j. rastvori cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bili su najtamniji u ovim ekstremnim regionima.



Slika 4.13: Promene vrednosti svetline boje (L^*) u funkciji pH vrednosti za $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodene rastvore cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc, ○).

Za rastvore cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida uočen je potpuno različit obrazac u promeni L^* sa pH vrednosti. U ovom slučaju nismo našli jasan obrazac o uticaju 3-glukozidne supstitucije na svetlinu boje.

4.2.4. Uticaj pH vrednosti na ukupnu razliku boja (ΔE^*_{ab}) cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida

Ukupna razlika boja ΔE^*_{ab} obračunata u odnosu na početnu najnižu pH vrednost i "step by step" razlika boja ΔE^*_{ab} između dve uzastopne pH vrednosti, sumirane su u tabeli 4.2.

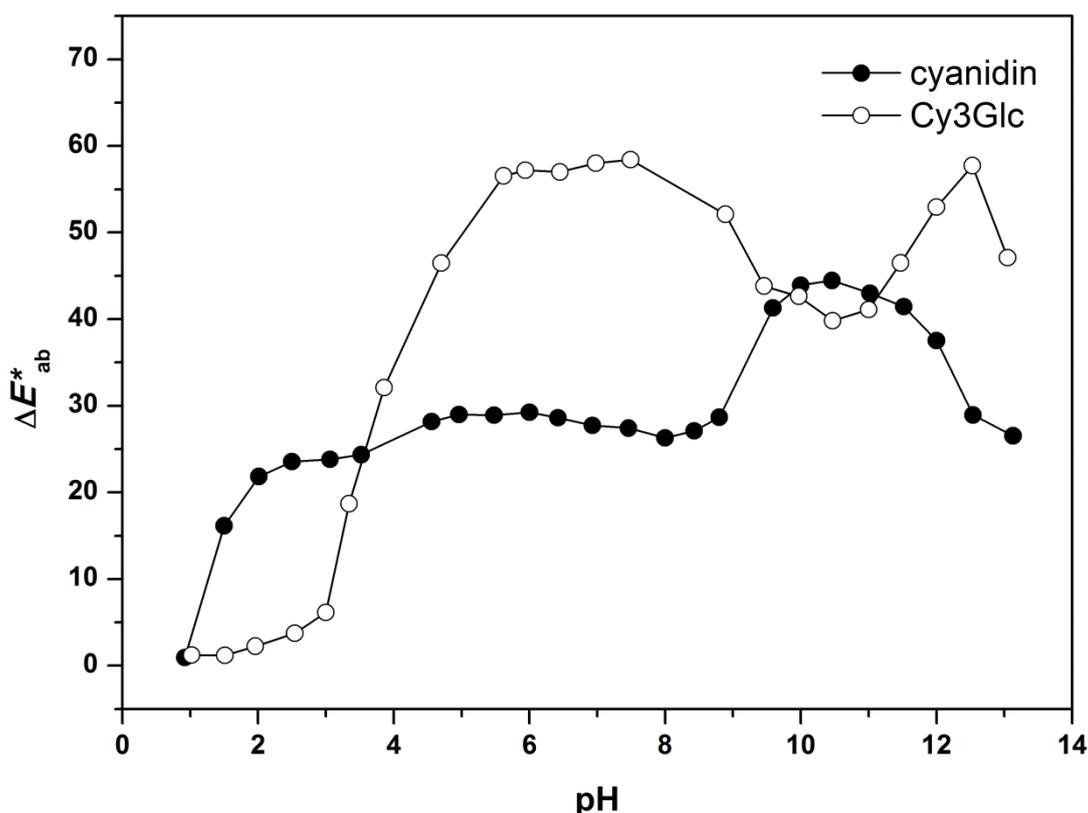
Ukupne kolorimetrijske razlike između boje koje pokazuje rastvor flavilijum jona (na najnižoj pH vrednosti) i boje koju pokazuju rastvori cijanidina na različitim pH vrednostima dostizale su ogromne vrednosti. Maksimalna vrednost ukupne razlike boja ΔE^*_{ab} , između rastvora na najnižoj merenoj pH vrednosti i rastvora na odgovarajućoj pH vrednosti, za rastvor cijanidina nađena je na pH 10,50 i iznosila je 44,46, dok je odgovarajuća vrednost za rastvor cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila na pH 7,49 i iznosila je 58,42.

Što se tiče sukcesivne, "step by step" razlike boja $\Delta E^*_{ab'}$ između dve uzastopne pH vrednosti, u slučaju rastvora cijanidina, pH koraci od kojih su poticale najveće kolorimetrijske razlike, na niskim pH vrednostima, bili su pH korak od 0,9 do 1,5 ($\Delta E^*_{ab'}$ od 0,91 do 12,16), dok je na višim pH vrednostima to bio pH korak od 8,8 do 9,6 ($\Delta E^*_{ab'}$ od 2,33 do 14,20). U rastvoru cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida pH koraci koji su izazvali najveće sukcesivne kolorimetrijske razlike boja, $\Delta E^*_{ab'}$, bili su u oblasti od pH 3,0 do 3,3 ($\Delta E^*_{ab'}$ od 2,52 do 15,54), i na višim pH vrednostima u oblasti 7,5 do 8,9 ($\Delta E^*_{ab'}$ od 3,68 do 11,37) (tabela 4.2). Ovi pH koraci opažali su se vizuelno, preko značajnih promena boja rastvora.

U poređenju sa cijanidinom, ukupna razlika boja, ΔE^*_{ab} , bila je viša za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid skoro u celokupnoj pH oblasti (osim najkiselije oblasti, pri pH < 3) (slika 4.14), što je dokaz niže stabilnosti boje (veće osetljivosti na promene pH vrednosti) cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Hurtado et al., 2009). U pH oblasti od 3 do 6 cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je bio najnestabilniji (pokazivao je najviše ΔE^*_{ab} vrednosti). Cijanidin je pokazivao manje razlike u boji (ΔE^*_{ab}) u najvećem delu pH oblasti, sa izuzetkom veoma baznog područja (pH > 9). U jako kiseloj oblasti, na pH < 3, cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je pokazivao veću otpornost na promenu boje (niže ΔE^*_{ab} vrednosti).

Tabela 4.2: Razlike boja obračunate u odnosu na početnu najnižu pH vrednost (ΔE^*_{ab}) i sukcesivne, "step by step" razlike boja između dve uzastopne pH vrednosti ($\Delta E^*_{ab'}$) u funkciji pH vrednosti za $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodene rastvore cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc).

pH	$\Delta E^*_{ab'}$	ΔE^*_{ab}	pH	$\Delta E^*_{ab'}$	ΔE^*_{ab}
cijanidin			Cy3Glc		
0,50			0,50		
0,92	0,91	0,91	1,02	1,22	1,22
1,50	12,16	16,15	1,51	1,04	1,19
2,01	9,94	21,84	1,96	1,23	2,23
2,50	2,13	23,55	2,54	2,58	3,76
3,06	0,96	23,80	3,00	2,52	6,14
3,52	2,05	24,35	3,34	15,54	18,69
4,56	5,75	28,17	3,86	14,11	32,10
4,96	2,76	28,98	4,70	14,59	46,48
5,48	0,91	28,91	5,62	11,98	56,54
6,00	1,92	29,24	5,94	1,99	57,19
6,42	1,87	28,62	6,45	1,88	57,01
6,93	1,23	27,74	6,98	3,81	58,02
7,46	1,83	27,42	7,49	3,68	58,42
8,00	2,54	26,30	8,89	11,37	52,12
8,43	2,69	27,10	9,46	10,73	43,83
8,80	2,33	28,68	9,97	2,95	42,65
9,59	14,20	41,31	10,47	3,46	39,81
10,00	4,50	43,91	11,00	1,59	41,11
10,46	2,69	44,46	11,47	5,39	46,49
11,02	1,76	42,99	12,00	7,91	52,92
11,52	1,83	41,44	12,53	6,30	57,73
12,00	4,19	37,53	13,05	20,43	47,10
12,54	14,47	28,94			
13,13	14,94	26,52			



Slika 4.14: Promene ukupne razlike boja (ΔE^*_{ab}) u funkciji pH vrednosti za $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodene rastvore cijanidina (●) i cijanidin 3-O-β-glukopiranozida (Cy3Glc, ○).

Prema Gonnet-u, promena "intenziteta" boje odgovara istovremenoj i intenzivnoj promeni svetline i hrome boje (Gonnet, 1998, 1999, 2001). Za rastvor cijanidina molarna apsorptivnost i promene u molarnoj apsorptivnosti sa povećanjem pH vrednosti bile su male u poređenju sa odgovarajućim vrednostima za rastvor cijanidin 3-O-β-glukopiranozida i bile su praćene smanjenjem svetline boje, (tj. njihova boja postajala je tamnija, sve do pH 9,6) dok je promena hrome pratila skoro isti obrazac kao i promena molarne apsorptivnosti.

Rastvor cijanidin 3-O-β-glukopiranozida pokazivao je kompleksnu vezu između opadanja molarne apsorptivnosti i varijacije hrome i svetline boje. Povećanje pH vrednosti izazivalo je dramatično opadanje molarne apsorptivnosti sve do pH oko 5. U isto vreme hroma je opadala sve do pH oko 8, gde je dostigla minimum i zatim počela da raste, dok svetlina rasla sve do pH oko 6, gde je dostigla maksimum, a zatim je počela da opada sa daljim povećanjem pH vrednosti.

Merenja boje rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida pokazala su da neke merljive spektralne promene ne odgovaraju promenama boje koje može da registruje ljudski vizuelni sistem. U skladu sa tim, izveštaji o efektima pH na boju antocijanina, pogotovu sa tačke gledišta upotrebe ovih molekula kao pogodnih prehrambenih aditiva za dobijanje atraktivnije boje na bazi prirodnih pigmenata, zahteva da svi parametri boje budu uzeti u obzir. Mora se obratiti pažnja na varijacije na koje utiču svi delovi spektralnih krivih, snimljenih u celokupnom području osetljivosti ljudskog vizuelnog sistema.

Tabela 4.3: Uticaj različitih pH vrednosti na promena ugla tona boje (h_{ab}), vrednosti hrome (C^*), svetlinu boje (L^*) i ukupne razlike boja (ΔE^*_{ab}), za $2 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³ vodene rastvore cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc).

pH	h_{ab}	C^*	L^*	ΔE^*_{ab}	pH	h_{ab}	C^*	L^*	ΔE^*_{ab}
cijanidin					Cy3Glc				
0,50	31,41	37,63	66,78		0,50	43,50	72,66	44,52	
0,92	30,92	34,91	66,01	0,91	1,02	44,04	71,49	44,61	1,22
1,50	14,05	24,22	61,17	16,15	1,51	44,51	70,61	44,12	1,19
2,01	4,76	17,50	60,12	21,84	1,96	45,15	69,57	44,85	2,23
2,50	1,65	16,52	58,59	23,55	2,54	46,47	69,67	46,01	3,76
3,06	358,99	16,61	57,57	23,80	3,00	47,71	66,45	47,71	6,14
3,52	354,62	16,62	55,76	24,35	3,34	45,83	61,68	50,33	18,69
4,56	343,89	15,46	52,92	28,17	3,86	33,78	38,95	53,46	32,10
4,96	341,01	16,60	52,94	28,98	4,70	17,37	26,58	58,27	46,48
5,48	341,51	14,13	52,97	28,91	5,62	9,50	23,46	59,88	56,54
6,00	345,89	14,02	52,99	29,24	5,94	10,57	17,55	60,24	57,19
6,42	344,59	14,80	52,89	28,62	6,45	15,38	13,77	59,49	57,01
6,93	350,05	14,03	52,67	27,74	6,98	27,86	12,04	57,93	58,02
7,46	359,34	11,83	52,63	27,42	7,49	47,39	8,86	55,11	58,42
8,00	6,20	12,80	50,70	26,30	8,02	62,10	8,58	51,36	56,43
8,43	16,22	11,91	48,55	27,10	8,89	70,88	24,27	48,98	52,12
8,80	16,92	11,58	44,33	28,68	9,46	72,30	28,72	46,70	43,83
10,00	155,88	8,76	45,36	43,91	9,97	69,82	34,73	43,31	42,65
10,46	148,73	10,83	46,12	44,46	10,47	69,58	35,88	42,86	39,81
11,02	141,73	10,80	47,48	42,99	11,00	71,11	33,80	42,37	41,11
11,52	132,08	9,29	47,49	41,44	11,47	76,65	33,62	41,52	46,49
12,00	118,89	9,21	50,76	37,53	12,00	93,02	33,95	41,57	52,92
12,54	81,36	22,91	57,91	28,94	12,53	102,56	41,96	42,67	57,73
13,13	77,19	34,83	63,15	26,52	13,05	86,48	59,96	50,74	47,10

4.3. HPLC-DAD-ESI/MS analiza cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida

Pojavljivanje različitih formi cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na različitim pH vrednostima i pri različitim vremenima ispitivano je pomoću visoko efikasne tečne hromatografije sa diode array deteckcijom sa elektronsprej jonizacionom/masenom spektrometrijom (HPLC-DAD-ESI/MS). pH vrednost rastvora u kome je vršeno rastvaranje imala je veliki uticaj na različite forme cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, dobijene posle rastvaranja u izabranim puferima pre analize. U masenoj spektrometriji, različiti oblici cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida okarakterisani su prema njihovoj m/z vrednosti i identifikovani na 320 nm.

4.3.1. Uticaj pH vrednosti na vremensku stabilnost različitih oblika cijanidina

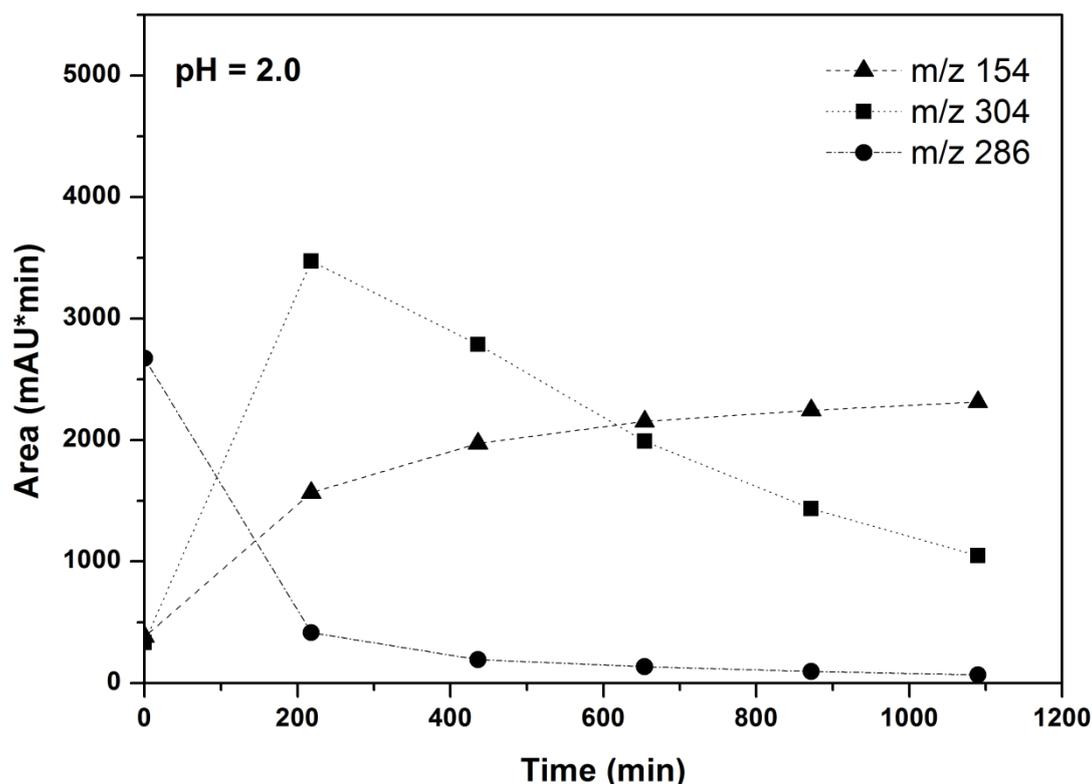
Tokom 1090 minutne HPLC-DAD-ESI/MS analize cijanidin je pokazao maksimalan broj fragmenata na pH 4,0, sa m/z 154, 196, 286, 302 i 304, dok su samo neki od njih nađeni na pH 2,0; 7,0 i 9,0 (tabela 4.4).

Tabela 4.4: m/z podatci za rastvore cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc) ($2 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3}) dobiveni HPLC-DAD-ESI/MS analizom

pH		m/z				pH		m/z	
		cijanidin						Cy3Glc	
2,0	154		286		304	2,0	432	448	466
4,0	154	196	286	302	304	4,0		448	466
7,0	154		286			7,0	432	448	466
9,0			286		334	9,0		448	461

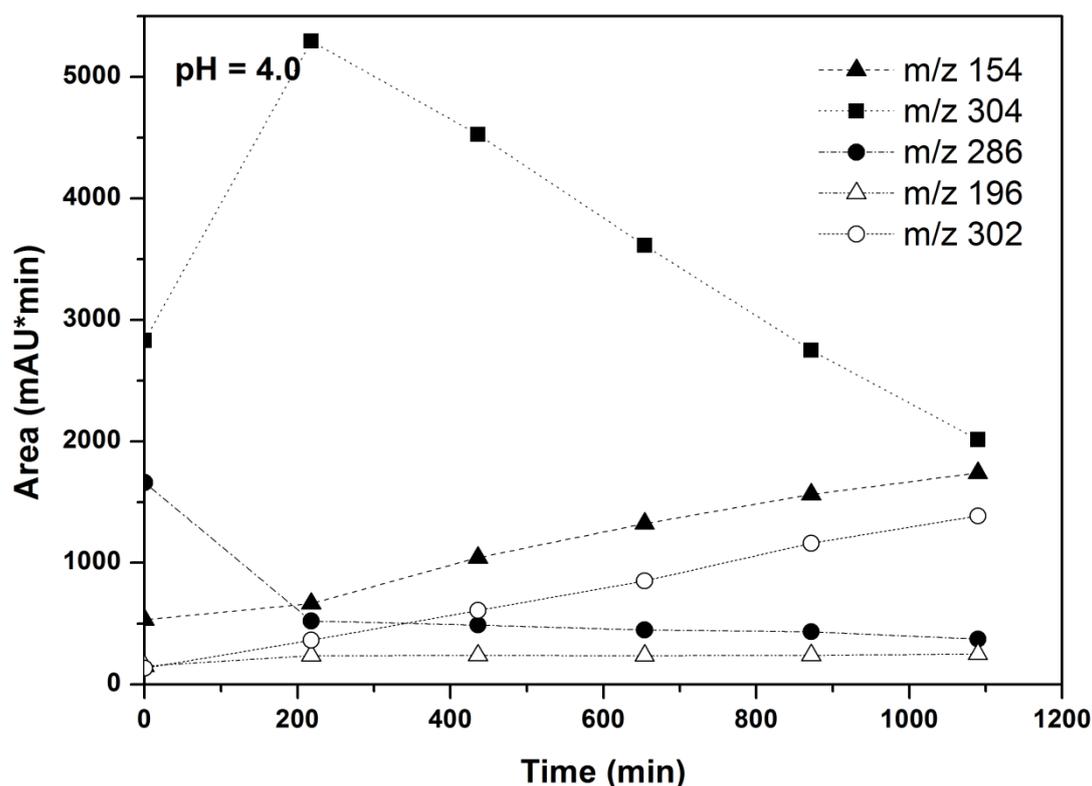
Pik karakterističan za aglikonski deo, cijanidin javljao se na pH 2,0; 4,0 i 7,0, sa retencionim vremenom 8,52 min i m/z 286 (slike 4.15 do 4.17). Tokom 1090 minuta, ovaj aglikonski pik (m/z 286), karakterističan za cijanidin na pH 2,0; 4,0 i 7,0 opao je za 97,0%, 77,5% i 47,8%, respektivno (slika 4.19). Pik sa m/z 286, uočen je na pH 9,0, odmah nakon rastvaranja cijanidina i nakon 218 minuta je potpuno nestao. Pik sa retencionim vremenom 7,27 min i m/z 154 takođe je detektovan neposredno nakon rastvaranja cijanidina na pH 2,0; 4,0 i 7,0, ali ne i na pH 9,0 (slike 4.15 do 4.17).

pH vrednost 2,0 promoviše eluiranje cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u njihovoj flavilijum katjonskoj formi (Gómez-Alonso, García-Romero, & Hermosín-Gutiérrez, 2007). Odnos između pikova sa m/z 154 i m/z 286 (m/z 154:286), nakon rastvaranja na pH 2,0 bio je 1:7, i posle 218 min ovaj m/z 154:286 odnos preokrenut je u korist m/z 154, u 3,8:1. Nakon 1090 min, ovaj m/z 154:286 odnos na pH 2,0 bio je 34:1 (slika 4.15).



Slika 4.15: Kinetika transformacije proizvoda generisanih od cijanidina, nakon rastvaranja na pH 2,0. Promene u relativnoj koncentraciji proizvoda određene su iz integrala pikova (mAU * min) dobijenih spektrofotometrijskom detekcijom na 320 nm (\blacktriangle – m/z 154; \blacksquare – m/z 304; \bullet – m/z 286).

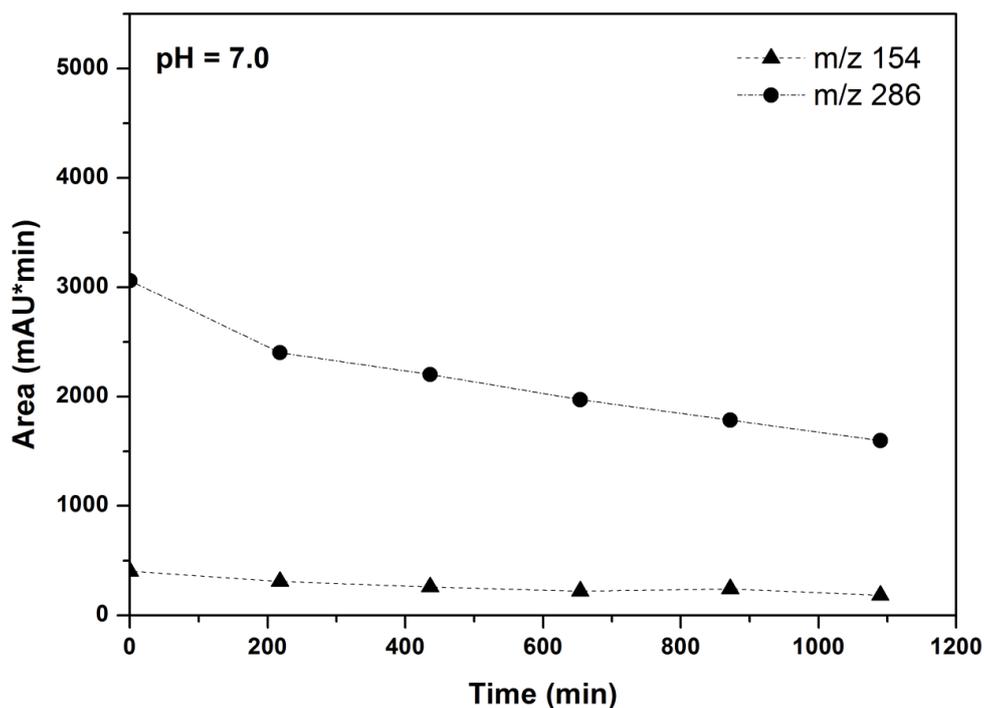
Na pH 4,0, m/z 154:286 odnos, nakon rastvaranja bio je 1:3, posle 218 min ovaj m/z 154:286 odnos je promenjen u 1,2:1. Nakon 1090 min, ovaj m/z 154:286 odnos na pH 4,0 bio je 4,7:1 (slika 4.16).



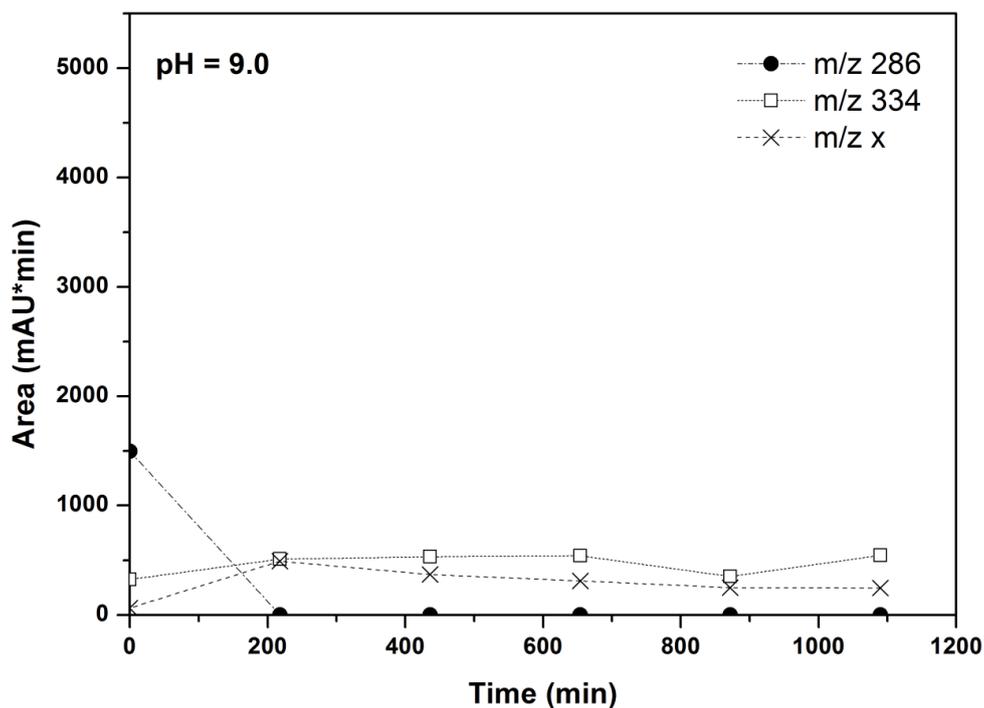
Slika 4.16: Kinetika transformacije proizvoda generisanih od cijanidina, nakon rastvaranja na pH 4,0. Promene u relativnoj koncentraciji proizvoda određene su iz integrala pikova (mAU * min) dobijenih spektrofotometrijskom detekcijom na 320 nm (\blacktriangle – m/z 154; \blacksquare – m/z 304; \bullet – m/z 286; \triangle – m/z 196; \circ – m/z 302;).

Na pH 7,0 ovaj m/z 154:286 odnos nije se promenio u korist m/z 154 pika (slika 4.17).

Na pH 9,0, pik sa m/z 154 nije detektovan ni u jednom trenutku tokom HPLC-DAD-ESI/MS analize (slika 4.18).



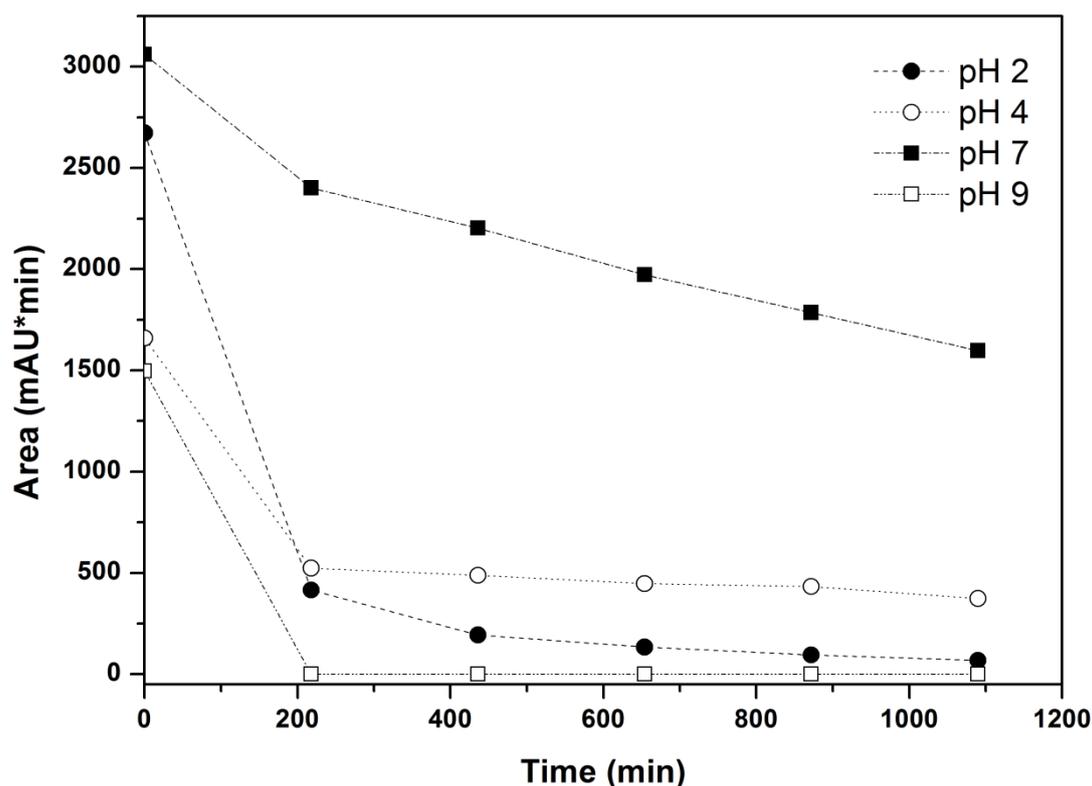
Slika 4.17: Kinetika transformacije proizvoda generisanih od cijanidina, nakon rastvaranja na pH 7,0. Promene u relativnoj koncentraciji proizvoda određene su iz integrala pikova (mAU * min) dobijenih spektrofotometrijskom detekcijom na 320 nm (\blacktriangle – m/z 154; \bullet – m/z 286).



Slika 4.18: Kinetika transformacije proizvoda generisanih od cijanidina, nakon rastvaranja na pH 9,0. Promene u relativnoj koncentraciji proizvoda određene su iz integrala pikova (mAU * min) dobijenih spektrofotometrijskom detekcijom na 320 nm (\bullet – m/z 286; \square – m/z 334; \times – m/z x).

Pik sa m/z 154 mogao bi predstavljati protokatehničku kiselinu ili floroglucin aldehyd, koji su poznati kao degradacioni proizvodi antocijanina (Sadilova, Carle, & Stintzing, 2007). Pik sa m/z 304 detektovan je tokom HPLC-DAD-ESI/MS analize na pH 2,0 i 4,0, ali ne i na pH 7,0 i 9,0. Pik sa m/z 304 mogao bi da predstavlja adukt cijanidina sa vodom ($286 + 18$). Pikovi sa m/z 196 i 334 koji su detektovani na pH 4,0 i pH 9,0, respektivno, ostali su neidentifikovani.

Kähkönen et al. (Kähkönen & Johanna; Ollilainen, Velimatti; Heinonen, 2003) su prijavili pik sa m/z 287,18 kao fragmentarni jon pri HPLC ESI-MS/MS analizi cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, dok su Dugo et al. (Dugo et al., 2001) dobili fragment cijanidina sa m/z 287 iz cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, gubitkom šećera na visokoj voltaži (60 V).

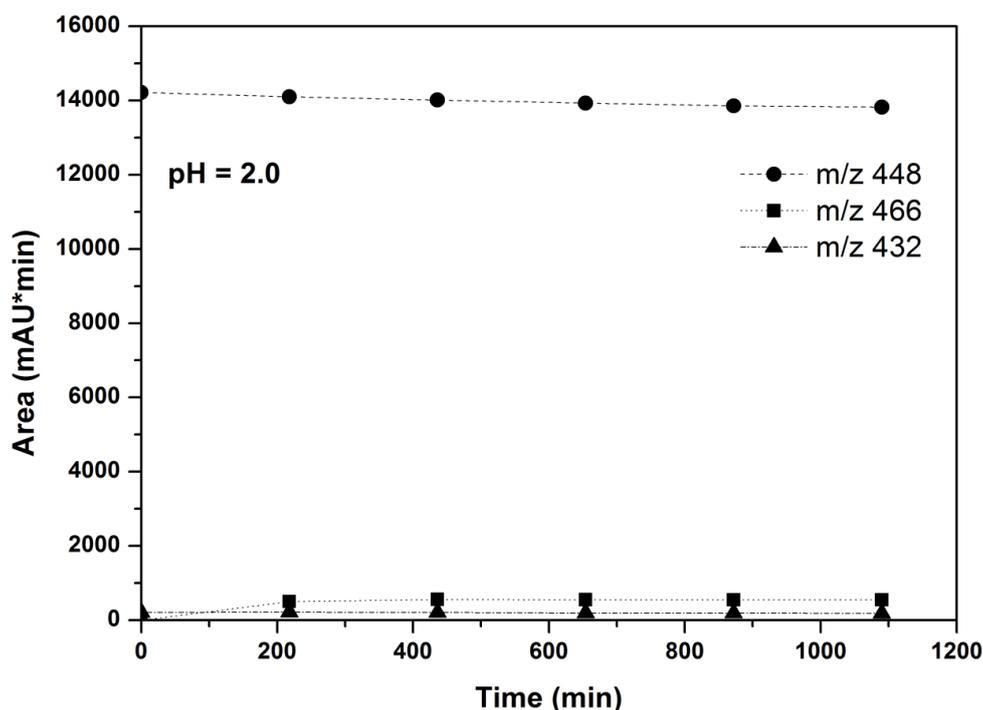


Slika 4.19: Kinetička stabilnost cijanidina tokom 1090 minuta na pH 2,0 (●); pH 4,0 (○); pH 7,0 (■) and pH 9,0 (□). Promene u relativnoj koncentraciji proizvoda određene su iz integrala pikova (mAU * min) dobijenih spektrofotometrijskom detekcijom na 320 nm.

4.3.2. Uticaj pH vrednosti na vremensku stabilnost različitih oblika cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida

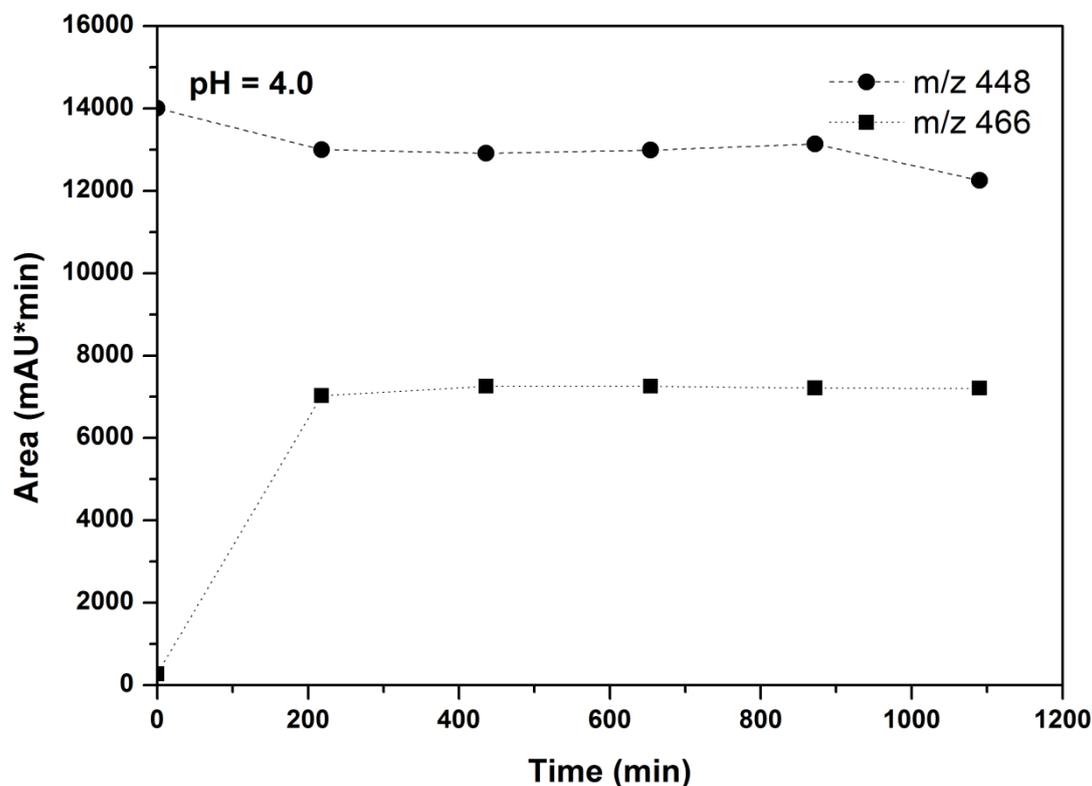
HPLC-DAD-ESI/MS analiza cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na različitim pH vrednostima, takođe je bila izvedena u vremenskim intervalima od po 218 min u periodu od 1090 min. Detektovani su pikovi sa *m/z* 432, 448, 461 i 466 (tabela 4.4), na 320 nm. Pik sa *m/z* 448, pripisan je antocijaninu cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozidu, u skladu sa literaturnim podacima (Cuevas-Rodríguez et al., 2010; Dugo et al., 2001; Jordheim, Enerstvedt, & Andersen, 2011; Kähkönen & Johanna; Ollilainen, Velimatti; Heinonen, 2003; Kammerer, Gajdos Kljusuric, Carle, & Schieber, 2005; Mertz, Cheynier, Günata, & Brat, 2007). Analiza je pokazala da je tokom 1090 min, cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid degradirao 2,8% na pH 2,0, 12,5% na pH 4,0, 35,5% na pH 7,0 i 85,5% at pH 9,0 (slika 4.24).

Na pH 2,0 cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid se eluira u obliku flavilijum katjona (Gómez-Alonso et al., 2007). Kao što je očekivano cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je bio veoma stabilan na pH 2,0 u skladu sa svojom flavilijum formom (slika 4.20).



Slika 4.20: Kinetika transformacije proizvoda generisanih od cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, nakon rastvaranja na pH 2,0. Promene u relativnoj koncentraciji proizvoda određene su iz integrala pikova (mAU * min) dobijenih spektrofotometrijskom detekcijom na 320 nm (● – *m/z* 448; ■ – *m/z* 466; ▲ – *m/z* 432).

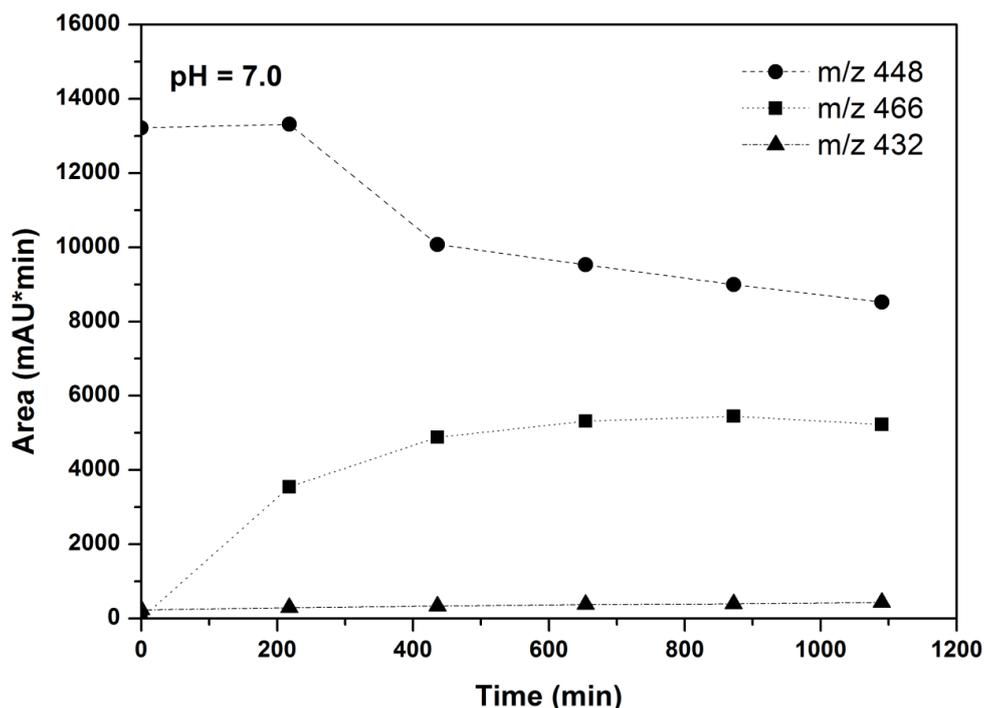
Degradacija cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na pH 4,0 detektovana je posle prvog 218 min vremenskog intervala (slika 4.21).



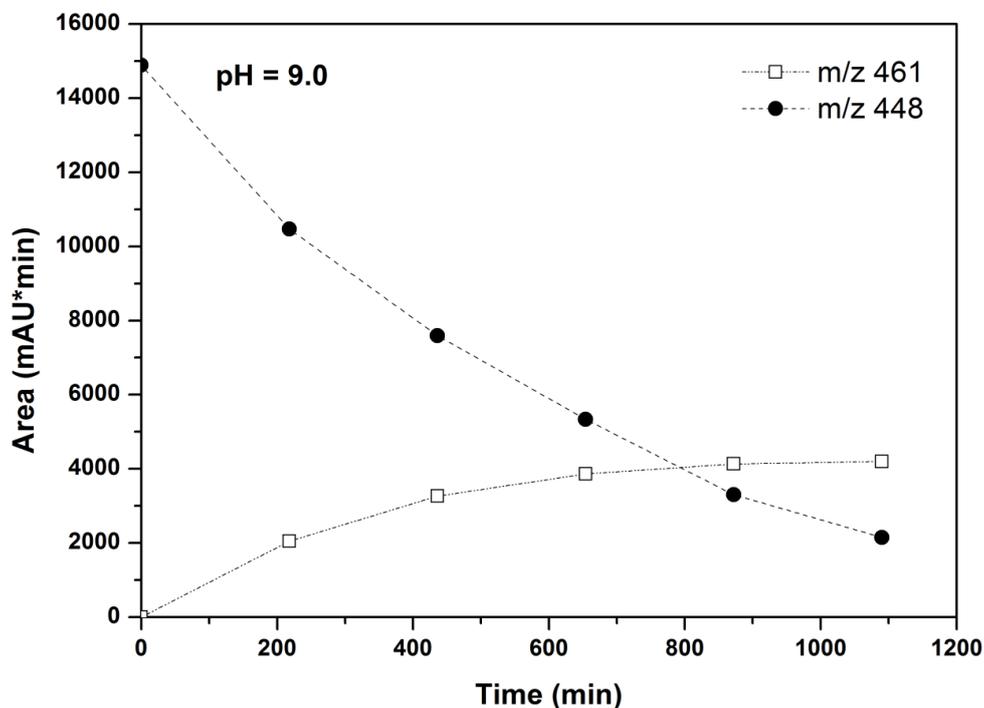
Slika 4.21: Kinetika transformacije proizvoda generisanih od cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, nakon rastvaranja na pH 4,0. Promene u relativnoj koncentraciji proizvoda određene su iz integrala pikova (mAU * min) dobijenih spektrofotometrijskom detekcijom na 320 nm (● – *m/z* 448; ■ – *m/z* 466).

Na pH 7,0 nije detektovana degradacija cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida tokom prvog 218 min vremenskog intervala (slika 4.22).

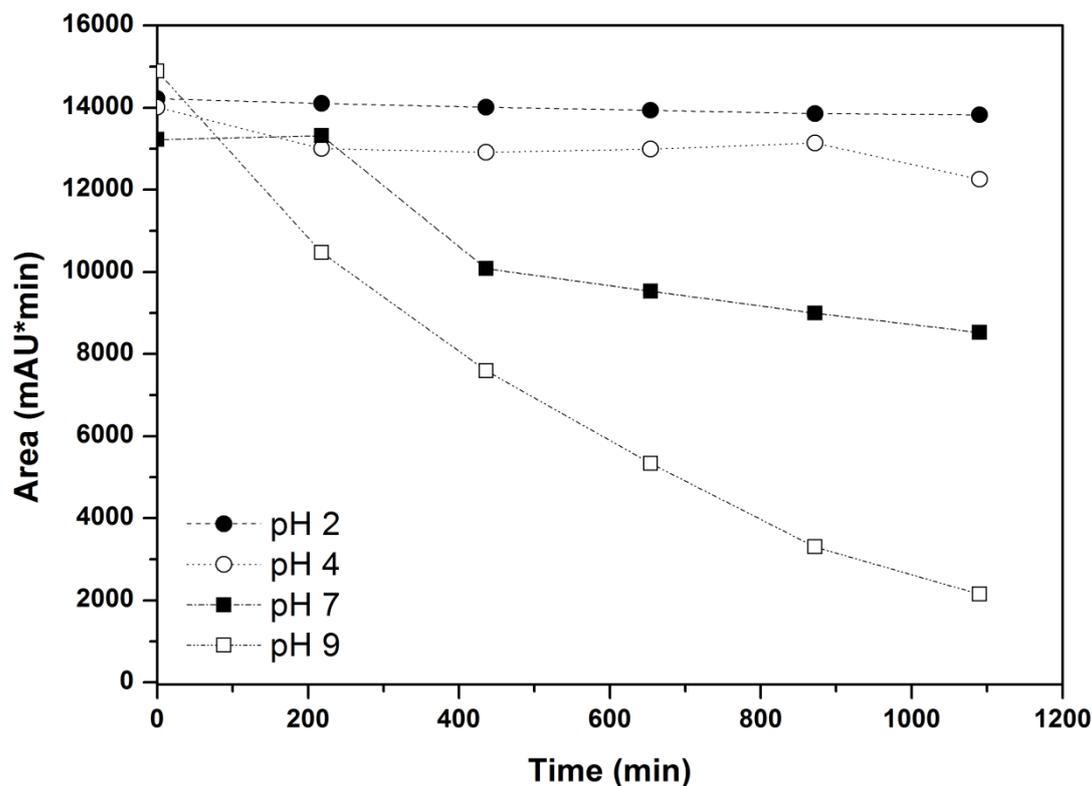
Degradacija cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na pH 9,0 uočena je u toku prvog 218 min vremenskog intervala (slika 4.23).



Slika 4.22: Kinetika transformacije proizvoda generisanih od cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, nakon rastvaranja na pH 7,0. Promene u relativnoj koncentraciji proizvoda određene su iz integrala pikova (mAU * min) dobijenih spektrofotometrijskom detekcijom na 320 nm (● – *m/z* 448; ■ – *m/z* 466; ▲ – *m/z* 432).



Slika 4.23. Kinetika transformacije proizvoda generisanih od cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, nakon rastvaranja na pH 9,0. Promene u relativnoj koncentraciji proizvoda određene su iz integrala pikova (mAU * min) dobijenih spektrofotometrijskom detekcijom na 320 nm (□ – *m/z* 461; ● – *m/z* 448;).



Slika 4.24: Kinetička stabilnost cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida tokom 1090 minuta na pH 2,0 (●); pH 4,0 (○); pH 7,0 (■) i pH 9,0 (□). Promene u relativnoj koncentraciji proizvoda određene su iz integrala pikova (mAU * min) dobijenih spektrofotometrijskom detekcijom na 320 nm.

Pik sa m/z 286 nije detektovan ni u jednom trenutku ni u jednom od ovih rastvora. Ovi rezultati odgovaraju barem rastvoru cijanidina na pH 9,0, gde je pik sa m/z 286 prisutan na početku, ali u potpunosti nestaje u toku prvih 218 min. Pikovi sa m/z 432 i 466 nisu identifikovani za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid. Pik sa m/z 466 mogao bi biti adukt cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida sa vodom (446 + 18). Fragment sa m/z 461 identifikovan je samo na pH 9,0, i verovatno se javlja zbog regulacije pH puferom amonijum-acetat/amonijum hidroksid. Razlika od m/z 162 između pikova sa m/z 448 i 286, odgovara glukozi, što je u skladu sa rezultatima Kähkönen et al. (2003).

Prethodno je pokazano da degradacija cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida rezultira formiranjem galne kiseline, protokatehnične kiseline i 2,4,6-trihidroksibenzaldehida (Kadivec et al., 2013; Sadilova et al., 2007).

Poređenjem slika 4.19 i 4.24, može se uočiti da 3-glukozidna supstitucija jako utiče na povećanje stabilnosti aglikonskog dela na pH 2,0, gde je flavilijum katjon dominantna struktura za oba. Na pH 2,0 cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je bio stabilan, dok je cijanidin degradirao 97,0% tokom 1090 min. Analogni rezultati dobiveni su na pH 4,0. Na pH 7,0 i 9,0 3-glukozidna supstitucija aglikonskog dela nije uticala na stabilnost i cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida i oba su bili nestabilni.

Stabilnost aglikonskog dela, cijanidina povećavala se povećanjem pH vrednosti sve do pH 9,0, dok 3-glukozidna supstitucija aglikona rezultira suprotnim efektom, stabilnost cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida opadala je sa povećanjem pH vrednosti.

4.4. Proučavanje fluorescentnih osobina cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na pH 5,5

Apsorpcioni i fluorescentni emisijski spektri cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida ispitivani su u vodenim rastvorima, na pH 5,5. Ispitan je uticaj 3-glukozidne supstitucije aglikona (cijanidina) na fluorescentne emisije osobine. To omogućava da se istraži uticaj 3-glukozidne supstitucije aglikonskog dela na spektralne osobine.

Autoasocijacija cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida javlja se pri visokim koncentracijama ($>10^{-3}$ mol dm⁻³) (Cherepy et al., 1997). U našim istraživanjima cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid bili su rastvoreni do finalnih koncentracija od $2 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³ za merenje fluorescence i $2 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³ za merenje apsorbance. Pri ovim niskim koncentracijama, cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid su u ispitivanim rastvorima prisutni u monomernom obliku (Drabent et al., 2007).

4.4.1. Apsorpcione i fluorescentne emisije osobine cijanidina

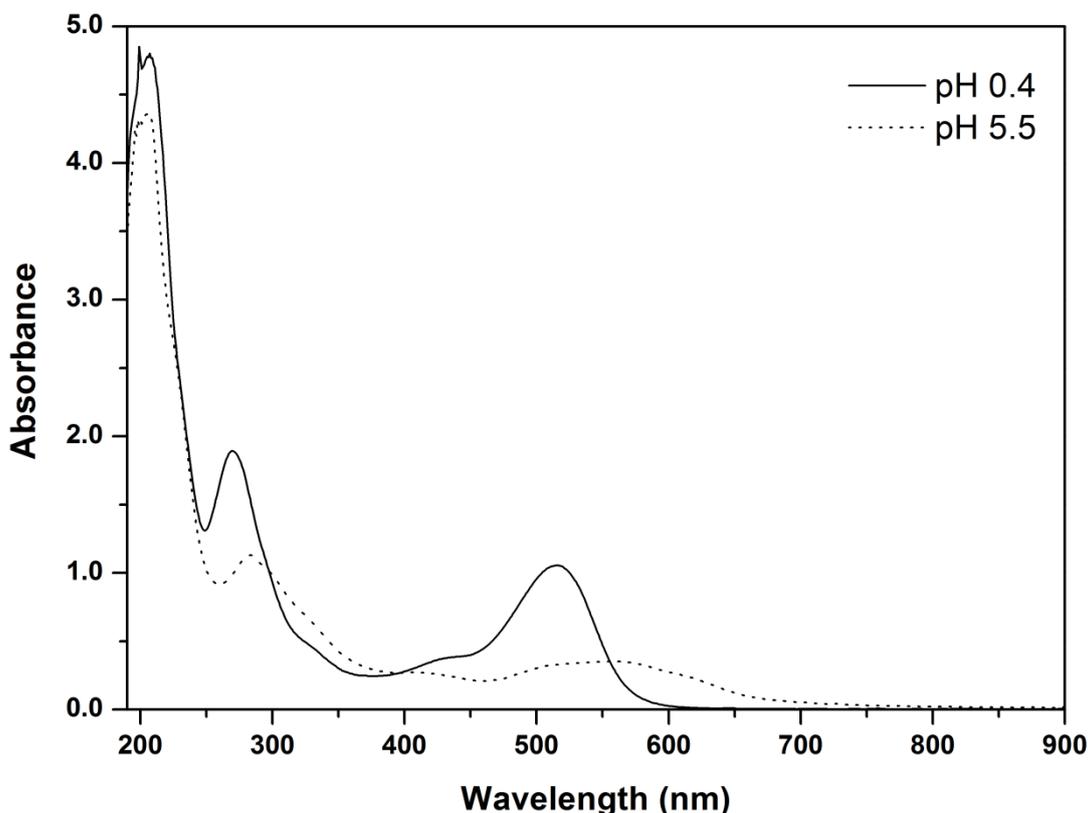
UV-Vis apsorpcioni spektri cijanidina u vodenom rastvoru na pH vrednostima 0,4 i 5,5 prikazani su na slici 4.25. Fluorescentni emisijski spektri cijanidina u vodenom rastvoru na pH 5,5, pri različitim eksitacionim talasnim dužinama prikazani su na slikama 4.26 i 4.27.

Na pH 0,4 apsorpciona traka u vidljivom delu spektra za cijanidin je uska, sa vidljivim apsorpcionim maksimumom ($\lambda_{\text{max-vis}}$) na 516 nm (slika 4.25), što odgovara flavilijum katjonu (slika 2.6, AH⁺) (Brouillard, 1982; Mazza & Brouillard, 1987). Na ovoj pH vrednosti flavilijum katjon je u suštini jedina prisutna vrsta u rastvoru (Brouillard, 1982).

Traka koja odgovara flavilijum katjonu nestaje na pH 5,5, pri čemu dolazi do potpunog prelaza flavilijum katjona u bezbojni hemiacetalni oblik i obojene hinonoidalne baze. Široka apsorpciona traka, koja se javlja na pH 5,5, ukazuje da je na ovoj pH vrednosti cijanidin verovatno prisutan u nekoliko sličnih ravnotežnih struktura. Ovde dolazi do batohromnog pomaka od 516 nm (na pH 0,4) do 560 nm (na pH 5,5). U literaturi je ovaj pomak pripisan prelazu flavilijum katjona u hinonoidalne baze (Brouillard, 1982). U brzom proton-transfer difuziono kontrolisanoj reakciji proton se prenosi sa kiseonikovog atoma hidroksilne grupe koja je vezana za C-3, C-5, C-7, C-3' i C-4' atom flavilijum katjona na molekul vode. Deprotonacija se dešava u određenoj meri na svim hidroksilnim grupama katjona (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982) (slika 2.6, A). Vidljivu svetlost jako apsorbuju i flavilijum katjon i hinonoidalne baze (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982).

Bezbojni hemiacetal oblik nastaje kao rezultat nukleofilne adicije vode na pozitivno naelektrisani pirilijum prsten u položaju C-2 (slika 2.6, B). Ravnoteža ove reakcije uspostavlja se mnogo sporije od proton transfer reakcije, i zahteva par minuta na sobnoj temperaturi (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982).

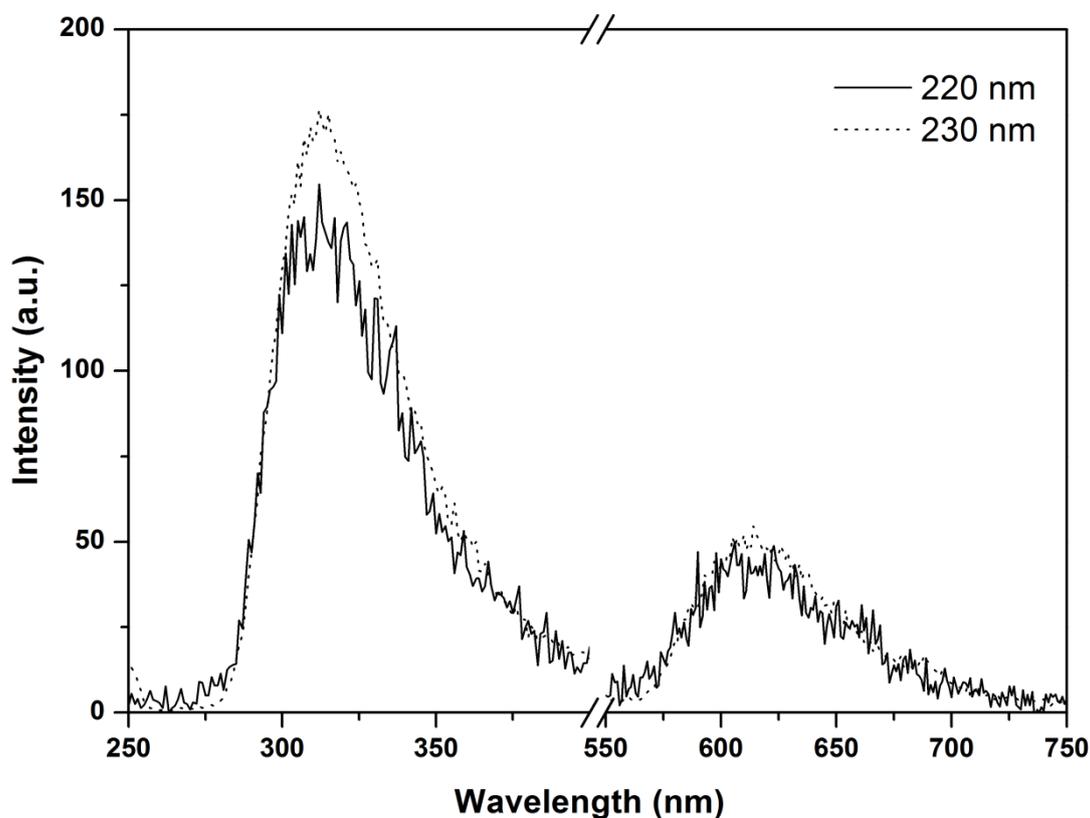
Poređenje apsorpcionog spektra cijanidina na pH 5,5 sa apsorpcionim spektrom flavilijum katjona (pH 0,4) pokazuje da u vodenom rastvoru, na pH 5,5, uglavnom postoji bezbojni oblik cijanidina (slika 4.25). Njegov apsorpcioni spektar u UV oblasti razlikuje se od onog za flavilijum katjon, posebno u oblasti 270 - 280 nm (oblast korišćena za ekscitaciju molekula). Na pH 0,4 cijanidin ima apsorpcionu traku u UV oblasti sa $\lambda_{\text{max-uv}}$ na 270 nm, dok je na pH 5,5 $\lambda_{\text{max-uv}}$ na 284 nm. Ova apsorpciona traka ranije je pripisana hemiacetalnoj formi, ukazujući na očekivano formiranje hemiacetalnog oblika na račun flavilijum katjona (Brouillard, 1982; Figueiredo et al., 1990). U UV oblasti se javlja još jedna apsorpciona traka veoma velikog intenziteta i kratke talasne dužine. Položaj ove apsorpcione trake se ne menja sa promenom pH vrednosti i javlja se na oko 210 nm i karakteristična je za polifenolna jedinjenja (Friedman & Jürgens, 2000). Ova talasna dužina kasnije je upotrebljavana za ekscitaciju molekula. Prezentovani rezultati u skladu su sa prethodno objavljenim podacima za antocijanine (Brouillard, 1982; Figueiredo et al., 1996, 1990).



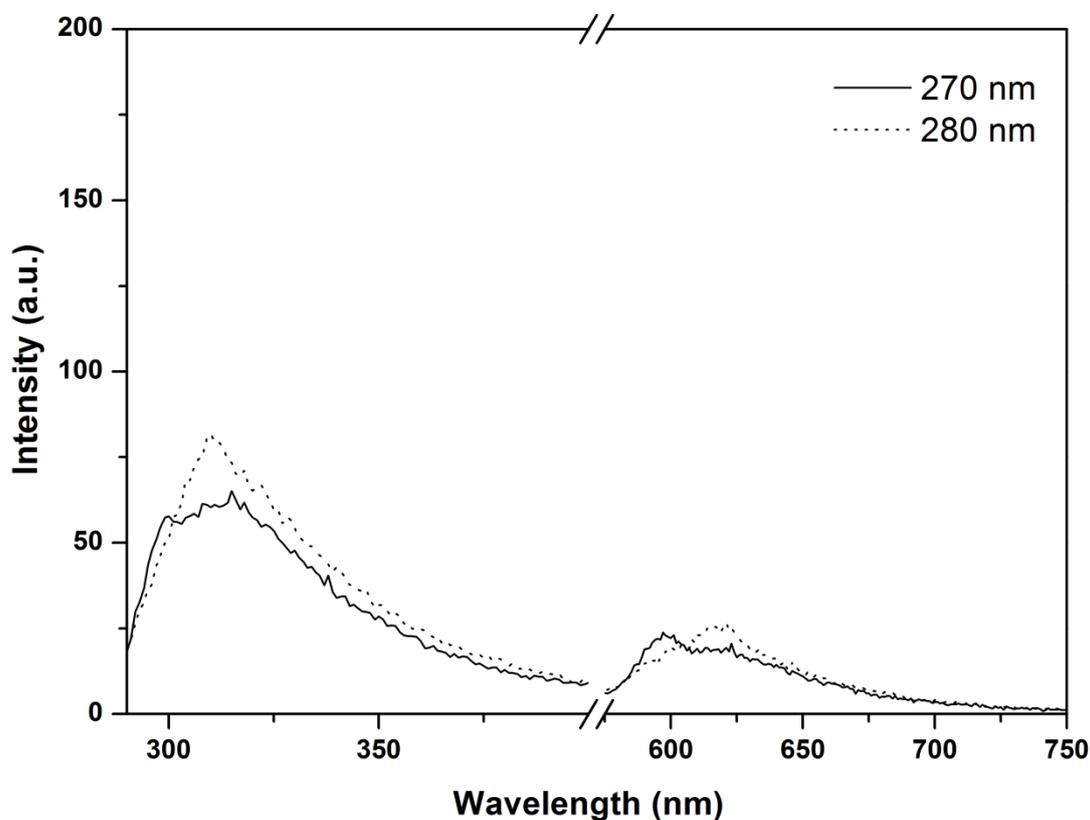
Slika 4.25: UV-Vis apsorpcioni spektri cijanidina u vodenom rastvoru na pH 0,4 (—) i 5,5 (·····). Koncentracija rastvora cijanidina iznosila je $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, a temperatura $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Fluorescentni emisioni spektri cijanidina u vodenom rastvoru na pH 5,5 snimani su uz ekscitaciju molekula talasnim dužinama iz UV oblasti spektra (210 - 350 nm, na svakih 10 nm). U skladu sa UV-Vis apsorpcionim spektrima (slika 4.25), najefikasnija ekscitacija molekula cijanidina izmerena je na prvom UV apsorpcionom maksimumu na 220 i 230 nm (slika 4.26). Na ovim talasnim dužinama molarna apsorptivnost jedinjenja je visoka ($\epsilon = 14\,731,35$ i $11\,581,60 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, respektivno). Drugi, UV apsorpcioni maksimum cijanidina, manjeg intenziteta, javljao se na oko 280 nm i u skladu sa tim druga efikasna ekscitacija molekula cijanidina bila je na 270 i 280 nm (slika 4.27). Ova apsorpciona traka karakteristična je za flavonoide kod kojih ne dolazi do kuplovanja između dva prstenasta sistema (tj. hemiacetalni oblik) (Figueiredo et al., 1990; Santos et al., 1993). Ovi rezultati u skladu su sa dobivenim spektroskopskim podacima ($\epsilon = 4\,886,70 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, na 270 nm

i $5\,565,1\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, na 280 nm). Utvrđeno je da cijanidin ima fluorescentni emisijski spektar u oblasti talasnih dužina od 280 do 700 nm, sa dve trake, prvu u UV oblasti sa maksimumom na $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}\sim 310\text{ nm}$ i drugu u vidljivoj oblasti sa maksimumom na $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}\sim 615\text{ nm}$ (slike 4.26 i 4.27). Traka u vidljivom delu fluorescentnog emisijskog spektra cijanidina je pripisana hinonoidnim bazama (Figueiredo et al., 1990).



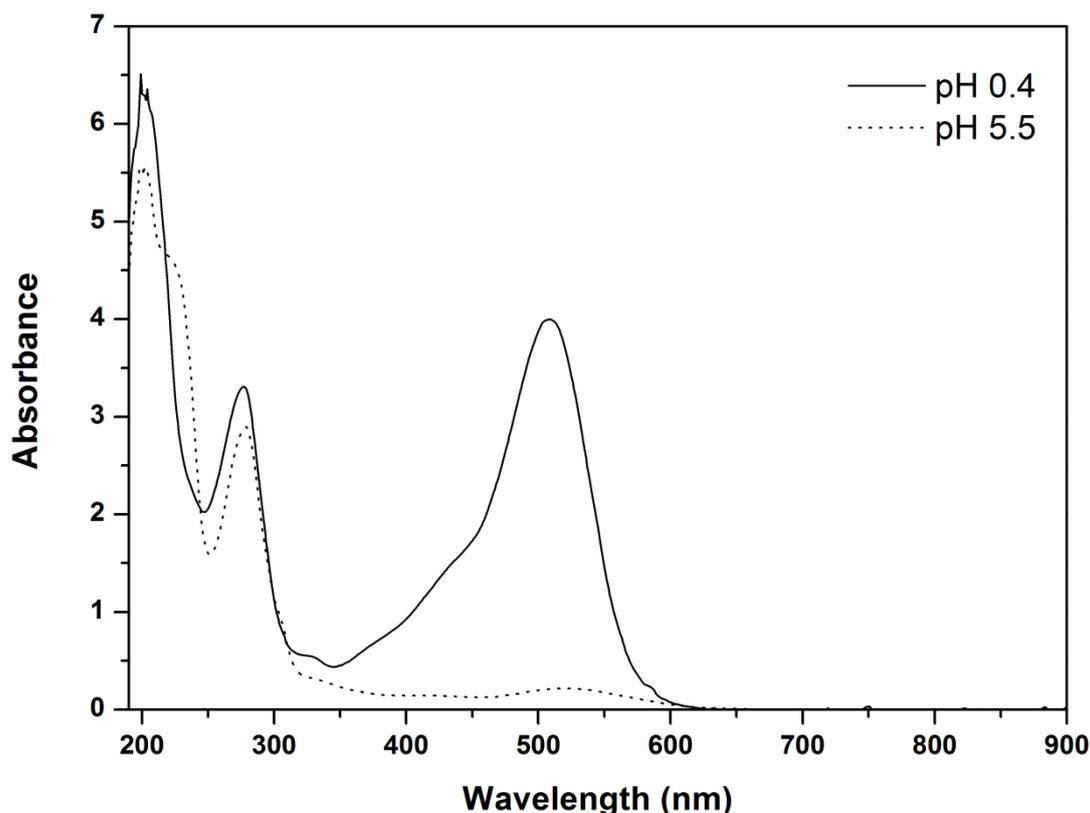
Slika 4.26: Fluorescentni emisijski spektar cijanidina u vodenom rastvoru na pH 5,5. Ekscitacione talasne dužine bile su $\lambda_{\text{exc}} = 220\text{ nm}$ (—) i $\lambda_{\text{exc}} = 230\text{ nm}$ (·····). Koncentracija rastvora cijanidina bila je $2\cdot 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, a temperatura $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.



Slika 4.27: Fluorescentni emisijski spektar cijanidina u vodenom rastvoru na pH 5,5. Ekscitacione talasne dužine bile su $\lambda_{exc} = 270$ nm (—) i $\lambda_{exc} = 280$ nm (·····). Koncentracija rastvora cijanidina bila je $2 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³, a temperatura $25,0 \pm 0,1$ °C.

4.4.2. Apsorpcione i fluorescentne emisije osobine cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida

UV-Vis apsorpcioni spektri cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u vodenom rastvoru na pH vrednostima 0,4 i 5,5 prikazani su na slici 4.28. Fluorescentni emisijski spektri cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u vodenom rastvoru na pH 5,5, pri različitim ekscitacionim talasnim dužinama prikazani su na slikama 4.29 i 4.30.



Slika 4.28. UV-Vis apsorpcioni spektri cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u vodenom rastvoru na pH 0,4 (—) i 5,5 (·····). Koncentracija rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, a temperatura $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Slično cijanidinu, na najnižoj merenoj pH vrednosti apsorpciona traka za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid u vidljivom spektru bila je uska i odgovarala je flavilijum katjonu (slika 2.6, AH^+) (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982; Heredia et al., 1998). Prethodno je utvrđeno da cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid u vodenom rastvoru u pH području od 0,8 do 3,7 pokazuje apsorpcioni maksimum na $511 (\pm 1) \text{ nm}$ (Fossen et al., 1998; Heredia et al., 1998; Mazza & Brouillard, 1990; Torskangerpoll & Andersen, 2005), što je u dobroj saglasnosti sa našim rezultatima.

Na pH 5,5 javlja se ekstremno veliki pad apsorbcije cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u vidljivoj oblasti u poređenju sa apsorbancom na pH 0,4 (slika 4.28). Traka karakteristična za flavilijum katjon nestaje na pH 5,5. To odražava konverziju obojenog flavilijum katjona u bezbojni hemiacetal oblik (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982; Mazza & Brouillard, 1987). Glavni proces u ovom pH području je nukleofilna adicija vode na obojeni flavilijum katjon.

Poređenje spektra na pH 5,5 sa apsorpcionim spektrom flavilijum katjona na pH 0,4 (slika 4.28) ukazuje da cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid uglavnom postoji u obliku bezbojnog hemiacetalnog i halkonskog oblika, koji se formiraju na ovoj pH vrednosti, što je u dobroj saglasnosti sa rezultatima do kojih su došli Drabent et al. (2007).

Vrednosti molarne apsorptivnosti u vidljivom području, na 520 nm za cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid na pH 0,4 ($\epsilon = 5\,216,00$ i $18\,544,65\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, respektivno) ukazuju na veliki uticaj 3-glukozidne supstitucije na apsorptivnost aglikonskog dela. U pH području od 0,4 do 5,5, uočava se batohromni pomak u UV-Vis spektru cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, pri čemu se položaj vidljivog apsorpcionog maksimuma pomera sa 509 nm na 530 nm. To ukazuje da se u ovom pH području uspostavlja ravnoteža deprotonacija/protonacija koja odgovara deprotonaciji preostale male količine flavilijum katjona do hinonoidalnih baza.

Pored vidljivog apsorpcionog maksimuma, cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid ima dve trake u UV oblasti sa skoro konstantnim položajima apsorpcionog maksimuma, bez obzira na pH vrednost. Prva traka, nižeg intenziteta ima apsorpcioni maksimum na 277 nm na pH 0,4 i 278 nm na pH 5,5. Položaj apsorpcionog maksimuma druge apsorpcione trake, koja ima veoma veliki intenzitet i javlja se pri kratkim talasnim dužinama se ne menja sa pH i javlja se na 204 nm. Ova traka karakteristična je za polifenolna jedinjenja (Friedman & Jürgens, 2000). Talasna dužina ove trake, upotrebljavana je kasnije za ekscitaciju molekula cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida. Dobijeni rezultati su u dobroj saglasnosti sa prethodno objavljenim podacima (Brouillard, 1982; Figueiredo et al., 1996, 1990).

Fluorescentni emisioni spektri cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u vodenom rastvoru na pH 5,5 snimani su uz ekscitaciju molekula talasnim dužinama iz UV oblasti spektra (210 - 350 nm, na svakih 10 nm). U skladu sa UV-Vis apsorpcionim spektrima (slika 4.29), najefikasnija ekscitacija molekula cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida izmerena je na 220 i 230 nm (slika 4.29). Na ovim talasnim dužinama je molarna apsorptivnost jedinjenja visoka ($\epsilon = 23\,333,00$ i $21\,718,45\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, respektivno). Drugi, UV apsorpcioni maksimum cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, manjeg intenziteta, javljao se na oko 280 nm i u skladu sa tim druga efikasna ekscitacija molekula cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je na 300 i 310 nm (slika 4.30). Ovi rezultati su u dobroj saglasnosti sa dobivenim spektroskopskim

podacima ($\varepsilon = 5\,791,20\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ na 300 nm i $3\,404,50\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ na 310 nm). Utvrđeno je da cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid ima fluorescentni emisijski spektar u oblasti talasnih dužina od 320 do 550 nm. Dobijeni fluorescentni emisijski spektri su u skladu sa rezultatima koje su prethodno objavili Drabent et al. (2007). Utvrđeno je da cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid ima fluorescentni emisijski spektar sa maksimumom na $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}} \sim 380\text{ nm}$ (slike 4.29 i 4.30). Odsustvo fluorescentne emisije trake u vidljivoj oblasti može biti posledica veoma niske koncentracije hinonoidnih baza, kao što se to može videti iz apsorpcionog spektra.

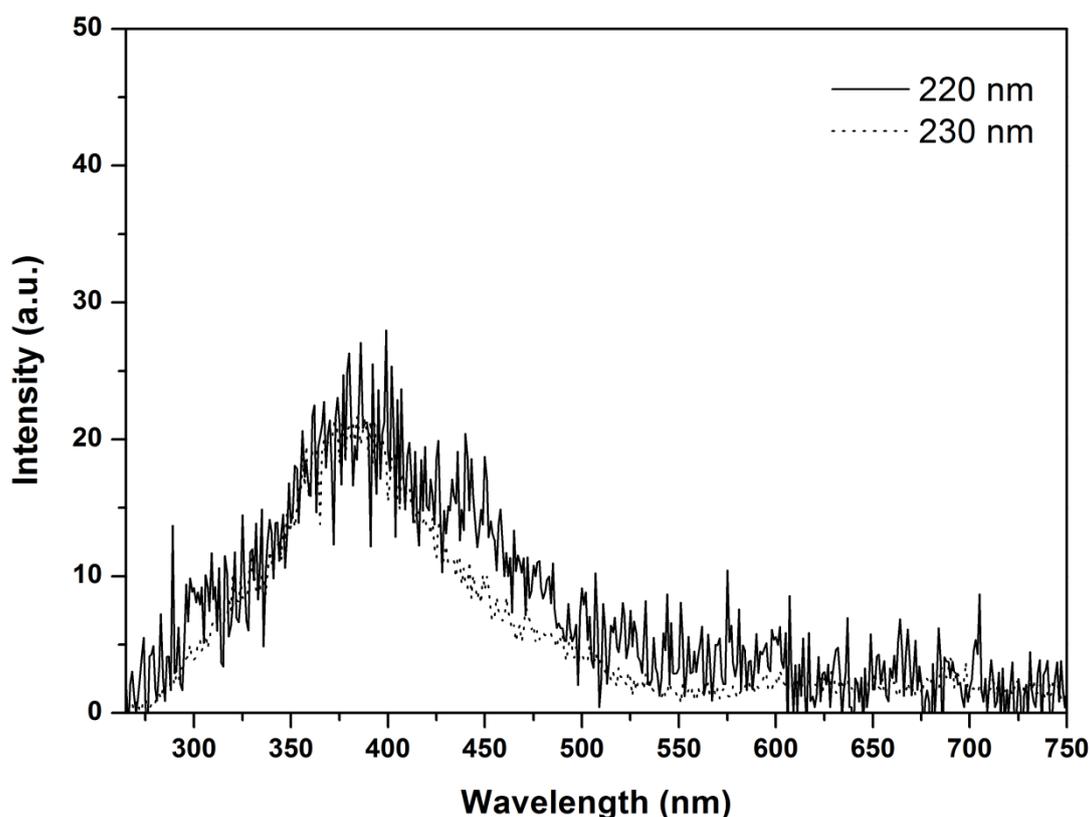


Figure 4.29: Fluorescentni emisijski spektar cijanidina 3-*O*- β -glukopiranozida u vodenom rastvoru na pH 5,5. Ekscitacione talasne dužine $\lambda_{\text{exc}} = 220\text{ nm}$ (—) i $\lambda_{\text{exc}} = 230\text{ nm}$ (·····). Koncentracija rastvora cijanidina 3-*O*- β -glukopiranozida bila je $2 \cdot 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, a temperatura $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

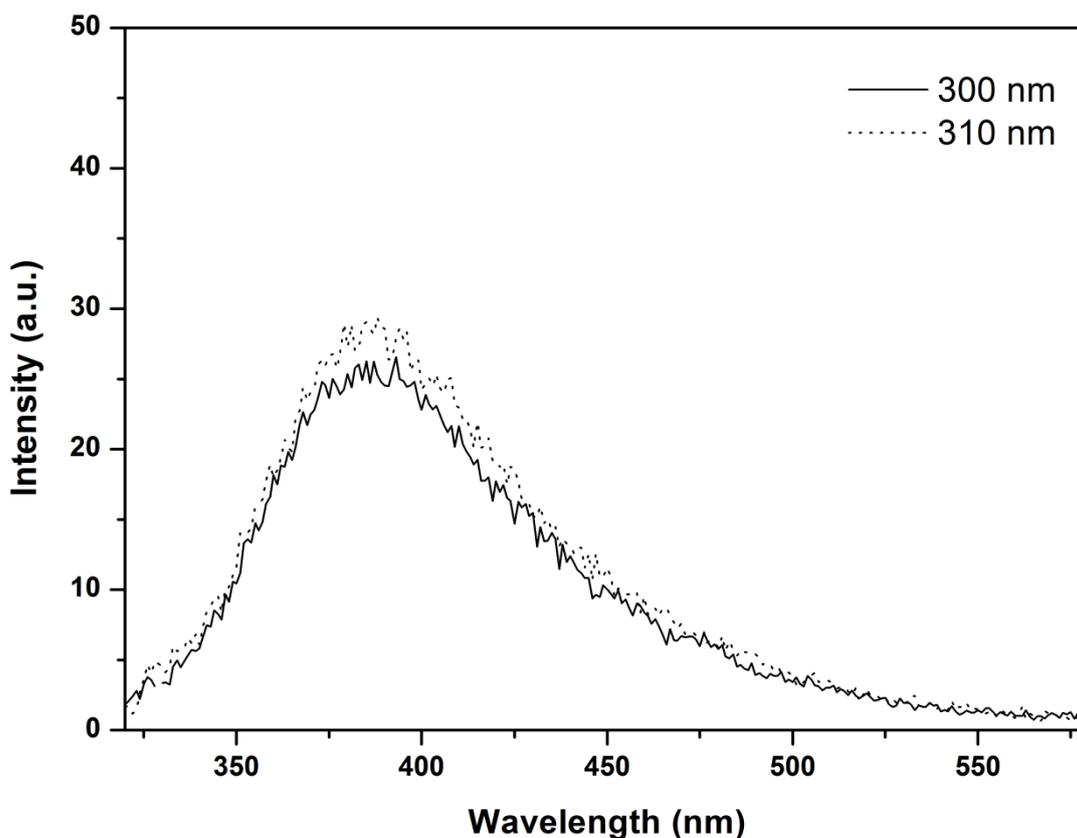


Figure 4.30: Fluorescentni emisijski spektar cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u vodenom rastvoru na pH 5,5. Ekscitacione talasne dužine $\lambda_{\text{exc}} = 300$ nm (—) i $\lambda_{\text{exc}} = 310$ nm (·····). Koncentracija rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je $2 \cdot 10^{-5}$ mol \cdot dm $^{-3}$, a temperatura $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Ako se uporede fluorescentni emisijski spektri cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (λ_{exc} bila je 230 nm) može se videti da je intenzitet fluorescentne emisije cijanidina bio značajno veći od intenziteta fluorescentne emisije cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (oko 170 a.u. za cijanidin i 20 a.u. za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid) (slike 4.26 i 4.27 i slike 4.29 i 4.30). Slični rezultati dobijeni su primenom $\lambda_{\text{exc}} = 270$ nm. Dobijeni intenzitet fluorescentne emisije cijanidina bio je značajno veći od intenziteta fluorescentne emisije cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (oko 70 a.u. za cijanidin i oko 20 a.u. za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid).

Ovi rezultati ukazuju na uticaj 3-glikozidne supstitucije na C-3 atomu aglikona (do oblika cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida) na značajno smanjenje intenziteta fluorescentne emisije i gašenje fluorescencije u oblasti talasnih dužina vidljivog dela spektra. Smatra se da cijanidin glukozidi ne fluoresciraju ili da pokazuju veoma slabu fluorescenciju, barem u neutralnim ili blago kiselim vodenim rastvorima (Brouillard, 1982; Cherepy et al., 1997; Figueiredo et al., 1996; Figueiredo et al., 1994; George et al., 1999; Santos et al., 1993). Mi smo utvrdili da oba ispitivana jedinjenja imaju fluorescentne emisije spektre. Prema našim saznanjima, u prezentovanom radu je prvi put izvršena karakterizacija fluorescencije cijanidina.

4.6. Stabilnost cijanidina i cijanidin 3-*O*- β glukopiranozida na 25,0°C, na različitim pH vrednostima

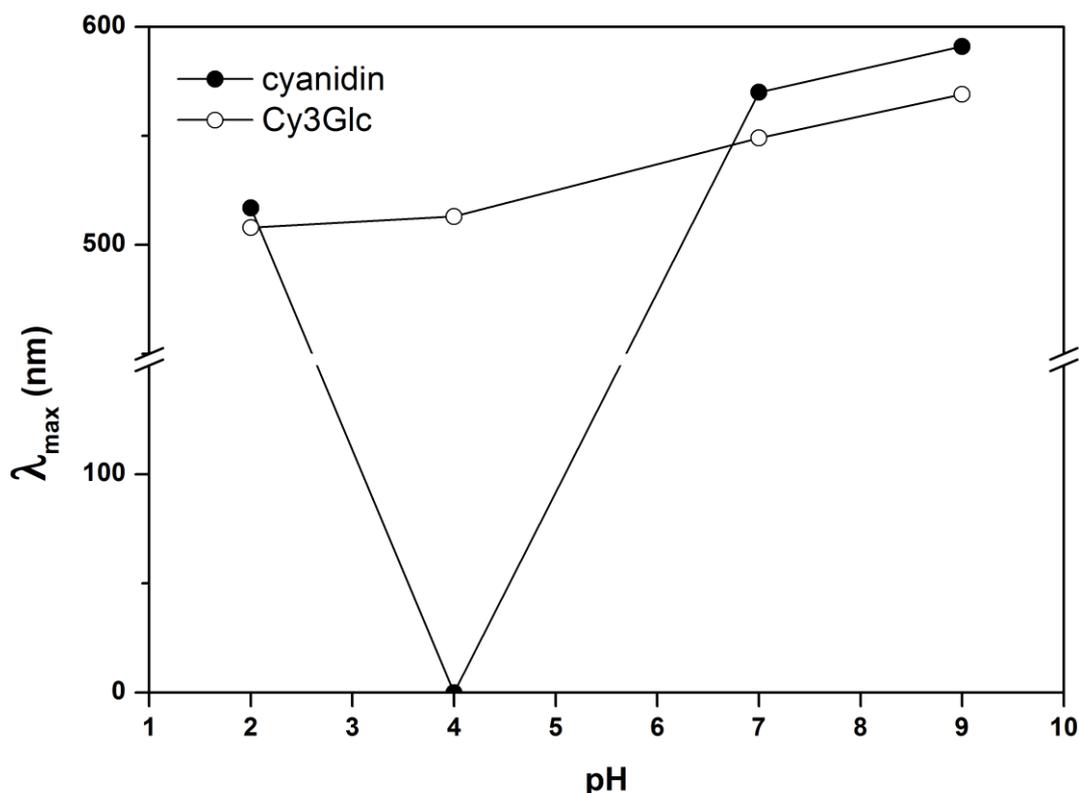
Prema Cabrita et al. i Fossen et al. (Cabrita et al., 2000; Fossen et al., 1998), varijacija boje cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida izražena je kao promena u položaju apsorpcionog maksimuma u vidljivoj oblasti ($\lambda_{\max\text{-vis}}$), intenzitet boje meren je kao vrednost apsorbanca na apsorpcionom maksimumu u vidljivoj oblasti neposredno nakon rastvaranja (t_0) i nakon određenih vremenskih intervala i izražen je kao molarna apsorptivnost (ϵ , u $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), dok je stabilnost izražena kao procenat apsorbanca preostale nakon određenih vremenskih intervala, mereno na $\lambda_{\max\text{-vis}}$. Braun indeks (BI) je, u skladu sa Malien-Aubert et al. (Malien-Aubert, Dangles, & Amiot, 2001; Malien-Aubert, Dangles, & Amiot, 2002), izražen kao odnos apsorbanca na 430 nm prema onoj na 520 nm. pH vrednost pri kojoj je vršeno rastvaranje imala je veliki uticaj na dobijeni spektroskopski profil cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida. Autoasocijacija cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida javlja se pri visokim koncentracijama ($>10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) (Cherepy et al., 1997). U našem istraživanju cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid bili su rastvoreni do finalne koncentracije od $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pri ovim niskim koncentracijama cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid postoje kao monomeri u ispitivanim rastvorima (Drabent et al., 2007).

4.7.1. Varijacija boje cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na 25,0°C, na različitim pH vrednostima

Najčešći način za predstavljanje boje antocijanina zasniva se na prezentaciji njihovih vidljivih $\lambda_{\text{max-vis}}$ vrednosti iz vidljivih apsorpcionih spektara. Ako grafički predstavimo $\lambda_{\text{max-vis}}$ vrednosti dobijene neposredno nakon rastvaranja cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u puferima sa različitim pH vrednostima (tabela 4.5), može se uočiti sličan obrazac (slika 4.31). Kod cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida uočena je sledeća tendencija: počevši od najkiselijeg rastvora, porast pH vrednosti izaziva batohromno pomeranje apsorpcionih maksimuma u vidljivoj oblasti spektra (slika 4.31). Ovaj obrazac je u dobroj korelaciji sa ranijim izveštajima za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid (Cabrita et al., 2000; Fossen et al., 1998; Torskangerpoll & Andersen, 2005). Na pH 4,0 cijanidin nema apsorpcionih traka u vidljivom delu spektra, dok na ostalim pH vrednostima vidljivi apsorpcioni maksimumi cijanidina pokazuju batohromno pomeranje sa povećanjem pH vrednosti (slika 4.31). Vidljivi apsorpcioni maksimumi cijanidina, bili su u svim slučajevim (osim na pH 4,0) viši od odgovarajućih $\lambda_{\text{max-vis}}$ vrednosti za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid (tabela 4.5). Ovo ukazuje na uticaj 3-glukozilacije u cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozidu na položaj vidljivog apsorpcionog maksimuma: prisustvo 3-glukozidne supstitucije dovodi do hipsohromnog pomeranja.

Tabela 4.5: Položaji vidljivih apsorpcionih maksimuma ($\lambda_{\text{max-vis}}$, nm) i molarne apsorptivnosti spektralnih traka u vidljivoj oblasti spektra (ϵ , $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) za cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid (Cy3Glc) ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) neposredno nakon rastvaranja u puferovanim vodenim rastvorima na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

pH	cijanidin		Cy3Glc			
	$\lambda_{\text{max-vis}}$ (nm)	ϵ ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{max-vis}}$ (nm)		ϵ ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	
2,0	517	5034,42	508		19297,16	
4,0	0	0	513		2429,10	
7,0	570	1467,17	549	441	7732,31	7904,24
9,0	591	1503,02	569		12349,24	



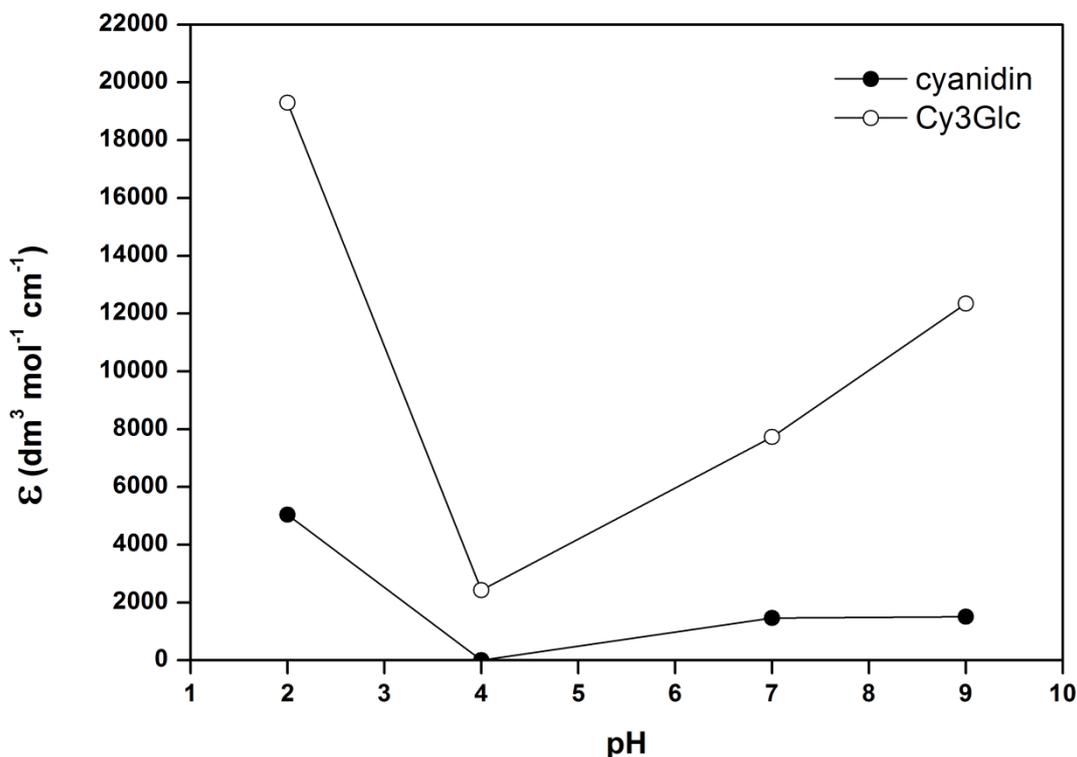
Slika 4.31: Položaji apsorpcionih maksimuma (λ_{\max} , nm) na različitim pH vrednostima rastvora cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc, ○) ($5 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³) neposredno nakon rastvaranja u puferovanim vodenim rastvorima na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

4.7.2. Intenzitet boje cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na $25,0^\circ\text{C}$, na različitim pH vrednostima

Varijacija pH vrednosti utiče na intenzitet boje cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (tabela 4.5). Poređenjem molarnih apsorptivnosti spektralnih traka u vidljivoj oblasti spektra za cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid (slika 4.32) može se videti da 3-glukozidna supstitucija jako povećava apsorptivnost aglikonskog dela. Molarne apsorptivnosti bile su najviše na pH 2,0 za oba pigmenta, a zatim su jako opadale prema pH 4,0, gde je dostignut lokalni minimum za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid, dok cijanidin nije imao spektralnih traka u vidljivoj oblasti spektra. Prema ranije objavljenim podacima, jednostavni antocijanini, kao što je cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid, su nestabilni i brzo se obezbojavaju hidratacijom skeleta antocijanidina u položaju-2 u pH području od 5 do 7 (Brouillard, 1988; Fossen et al., 1998), što je u dobroj saglasnosti sa ovde prikazanim rezultatima. Dalje povećanje pH vrednosti izaziva povećanje molarnih apsorptivnosti za oba

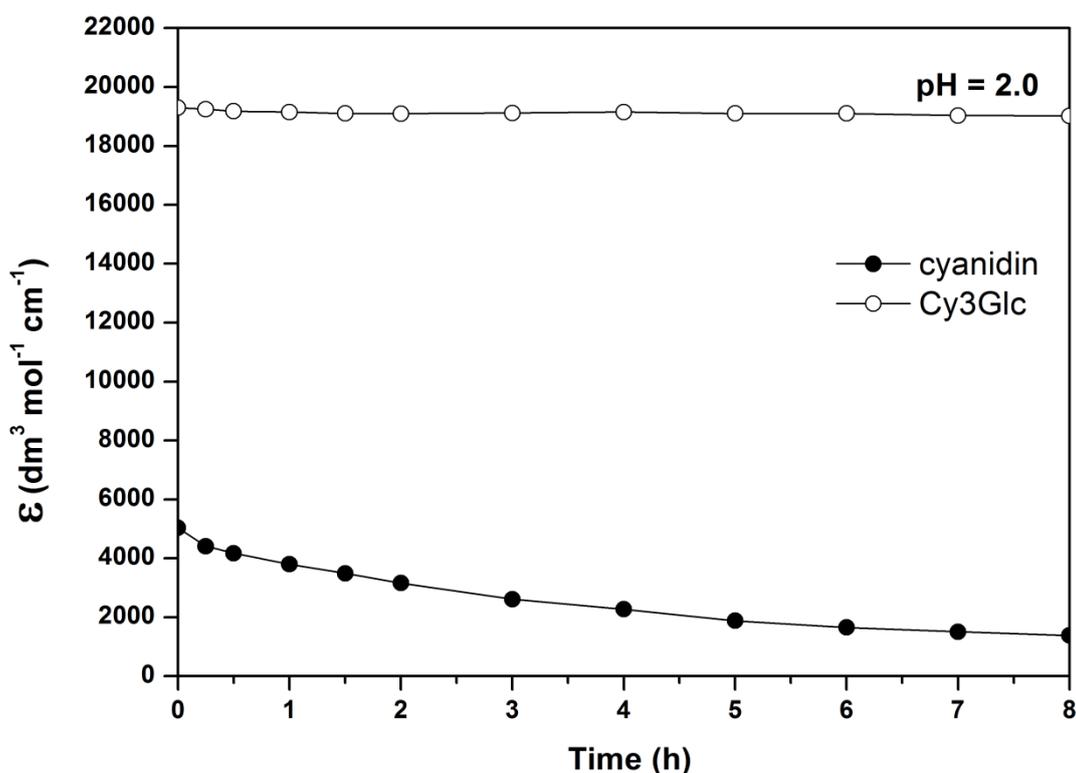
pigmenta. Sličnost između krivih ukazuje da oba pigmenta imaju isti tip i distribuciju ravnotežnih oblika: jako obojeni flavilijum oblik dominira na pH 2,0, a pojavljivanje bezbojnog hemiacetalnog oblika povećava se prema pH 4,0 (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982, 1988; Cabrita et al., 2000; Drabent et al., 2007; Fossen et al., 1998). Na pH vrednostima većim od 7,0, cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid pokazuju hiperhromni efekat sve do pH 9,0, gde se očekuje da se antocijanini javljaju uglavnom u svom hinonoidalnom obliku i u obliku hinonoidalnih anjona (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982, 1988; Cabrita et al., 2000; Drabent et al., 2007).

Uočeno je da cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid pokazuje relativno visoke vrednosti molarne apsorptivnosti u alkalnim rastvorima. Odnos između vrednosti apsorbanse na lokalnom maksimumu u alkalnom regionu na pH 9,0 i na pH 2,0 za cijanidin je bio 0,30, dok je taj odnos za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid bio 0,64 ukazujući da 3-glukozidna supstitucija utiče na povećanje intenziteta boje u alkalnom regionu. Dobijeni rezultati za molarnu apsorptivnost cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (tabela 4.5) su u dobroj saglasnosti sa ranije objavljenim podacima (Cabrita et al., 2000; Fossen et al., 1998).



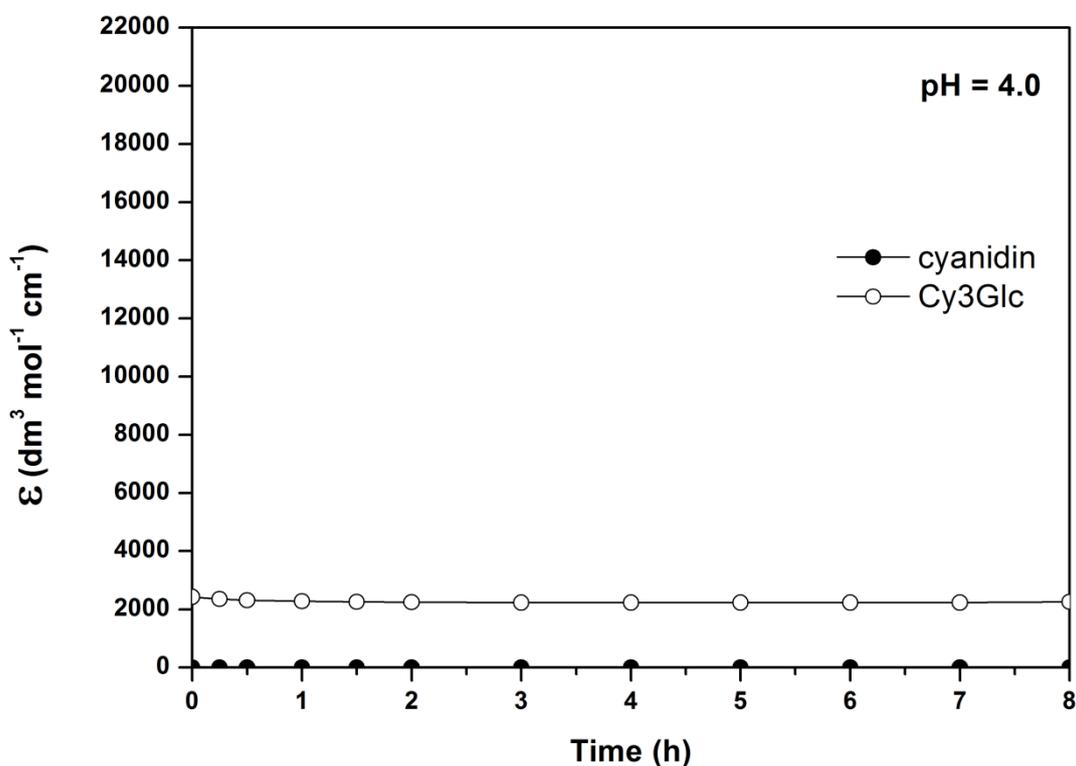
Slika 4.32: Molarne apsorptivnosti (ϵ , $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) spektralnih traka u vidljivoj oblasti spektra za cijanidin (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid (Cy3Glc, ○) ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rastvori) neposredno nakon rastvaranja u puferovanim vodenim rastvorima na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Molarne apsorptivnosti rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida tokom inkubacije na pH 2,0 i $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ bile su visoke i konstantne, u skladu sa strukturom flavilijum katjona (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982, 1988; Drabent et al., 2007) (slika 4.33). Neočekivano, tokom inkubacije rastvora cijanidina na pH 2,0 i $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ došlo je do opadanja molarnih apsorptivnosti, iako se on nalazio u obliku flavilijum katjona (Brouillard, 1982, 1988) (slika 4.39). Ovo ukazuje na prelazak obojenog flavilijum katjona u druge strukture.



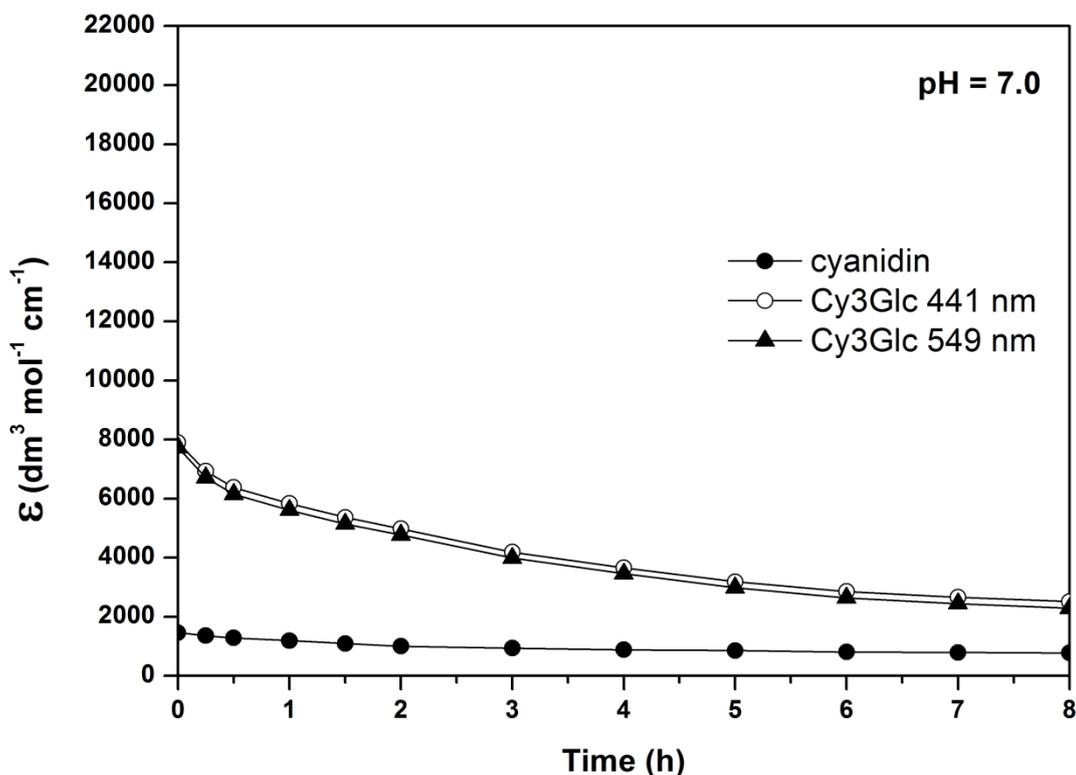
Slika 4.33: Molarne apsorptivnosti (ϵ , $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) spektralnih traka u vidljivoj oblasti spektra (mereno na početnoj $\lambda_{\text{max-vis}}$) za rastvor cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc, ○) ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rastvori) nakon različitog vremena inkubacije na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ u puferovanim vodenim rastvorima na pH 2,0.

Molane apsorptivnosti rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na pH 4,0 i $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ bile su značajno niže u poređenju sa onim na pH 2,0, ali su ostale konstantne tokom inkubacije (slika 4.34). Na pH 4,0 cijanidin nije imao spektralnih traka u vidljivoj oblasti spektra (slika 4.34).



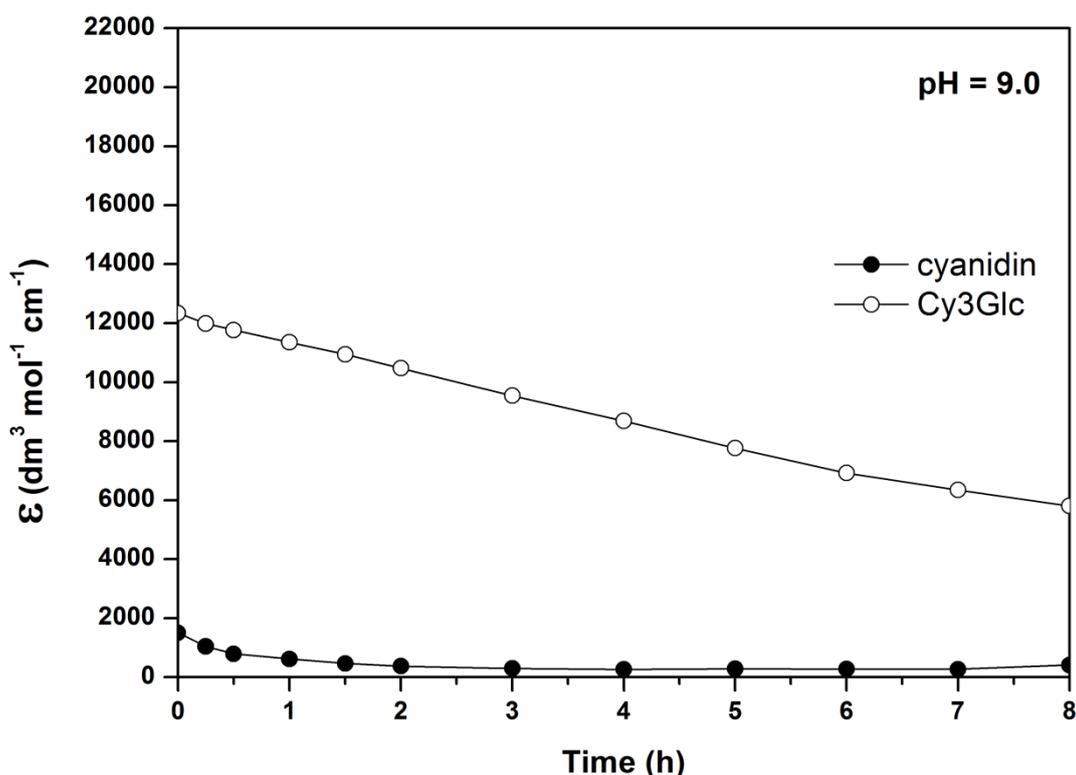
Slika 4.34: Molarne apsorptivnosti (ϵ , $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) spektralnih traka u vidljivoj oblasti spektra (mereno na početnoj $\lambda_{\text{max-vis}}$) za rastvor cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc, ○) ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rastvori) nakon različitog vremena inkubacije na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ u puferovanim vodenim rastvorima na pH 4,0.

Na pH 7,0 cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je imao dve apsorpcione trake u vidljivoj oblasti spektra sa apsorpcionim maksimumima na 441 i 549 nm (slika 4.35). Cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je pokazao veliki pad molarnih apsorptivnosti sa vremenom na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Pod istim uslovima cijanidin je pokazivao niske i skoro konstantne vrednosti molarnih apsorptivnosti (slika 4.35).



Slika 4.35: Molarne apsorptivnosti (ϵ , $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) spektralnih traka u vidljivoj oblasti spektra (mereno na početnoj $\lambda_{\text{max-vis}}$) za rastvor cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc, ○, ▲) ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rastvori) nakon različitog vremena inkubacije na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ u puferovanim vodenim rastvorima na pH 7,0.

Na pH 9,0 početna, relativno visoka vrednost molarne apsorptivnosti cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, pokazala je pad tokom inkubacije na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (slika 4.36). Molarne apsorptivnosti cijanidina na pH 9,0 bile su niske i blago su opadale tokom stajanja.



Slika 4.36: Molarne apsorptivnosti (ϵ , $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) spektralnih traka u vidljivoj oblasti spektra (mereno na početnoj $\lambda_{\text{max-vis}}$) za rastvor cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc, ○) ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rastvori) nakon različitog vremena inkubacije na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ u puferovanim vodenim rastvorima na pH 9,0.

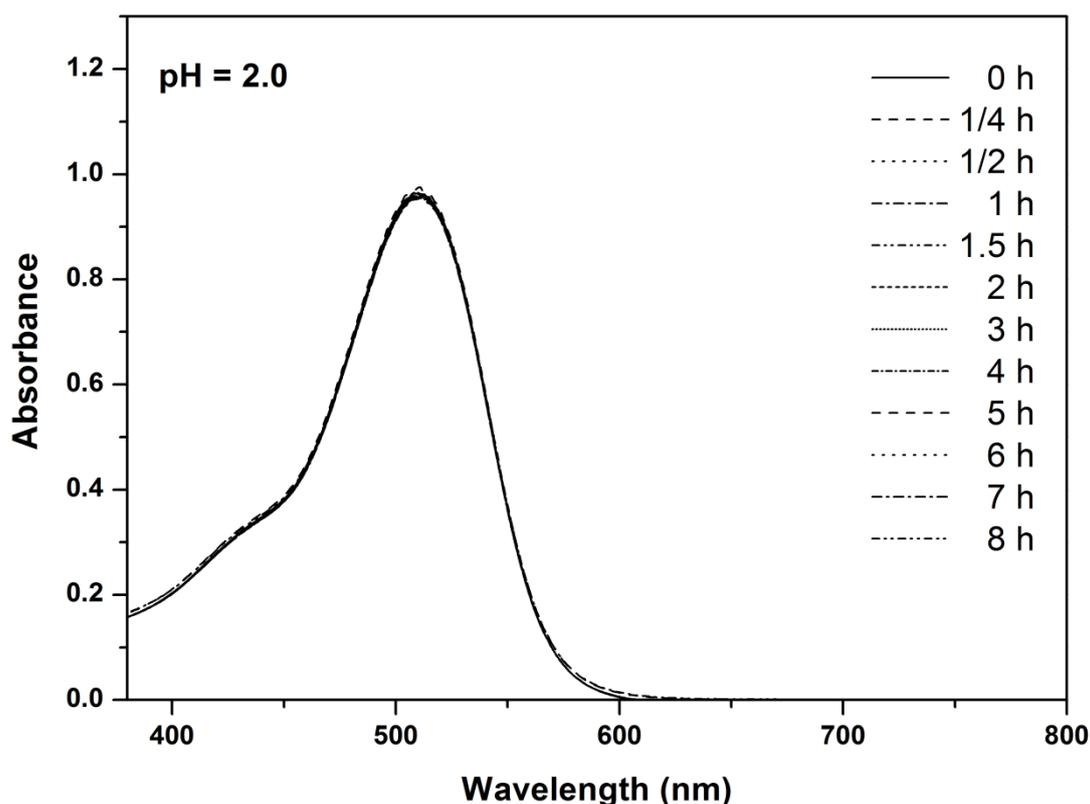
Ovo ukazuje na uticaj 3-glukozilacije u cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozidu na molarnu apsorptivnost: prisustvo 3-glukozydne supstitucije jako povećava molarnu apsorptivnost na svim ispitivanim pH vrednostima i popravlja stabilnost na pH 2,0 i 4,0.

4.7.3. Stabilnost boje cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na $25,0^\circ\text{C}$, na različitim pH vrednostima

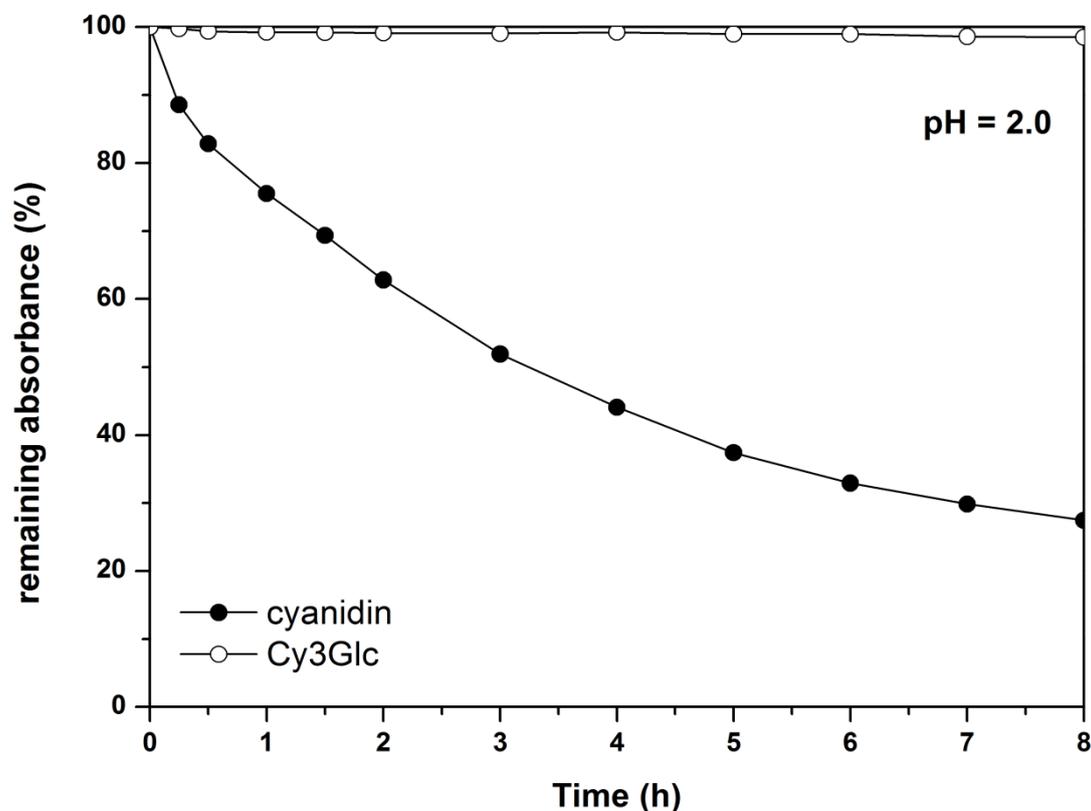
Stabilnosti cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida jako zavise od pH vrednosti i strukture. Cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid su inkubirani tokom 8 sati u puferovanim rastvorima na 4 različite pH vrednosti i na temperaturi od $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ i njihovi vidljivi apsorpcioni spektri su snimani u određenim vremenskim intervalima. Prema Cabrita

et al. (Cabrita et al., 2000) stabilnost je opisana na osnovu promene vrednosti apsorbance merene na početnoj $\lambda_{\text{max-vis}}$ cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida za svaku pH vrednost.

Tokom inkubacije na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ i pH 2,0, (tabela 4.6) cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je pokazao značajno veće vrednosti vidljive apsorbance u poređenju sa cijanidinom. Prema Brouillard-u (Brouillard, 1982), u vodenim rastvorima, za uobičajene antocijanine, jedina stabilna obojena vrsta je flavilijum katjon, koji se obično javlja na pH vrednostima nižim od 3. U skladu sa tim, cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je pokazao stabilnost iznad 98%, nakon 8 sati na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ i pH 2,0 (slika 4.37 i 4.38).

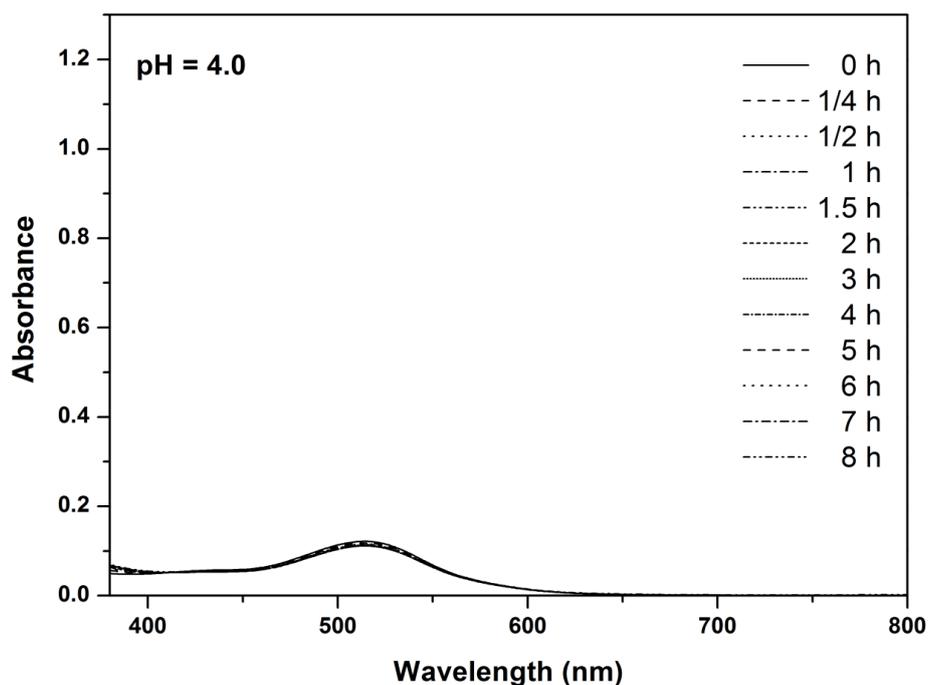


Slika 4.37: UV-Vis apsorpcioni spektri rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida tokom 8 sati inkubacije na pH 2,0. Koncentracija rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, a temperatura $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

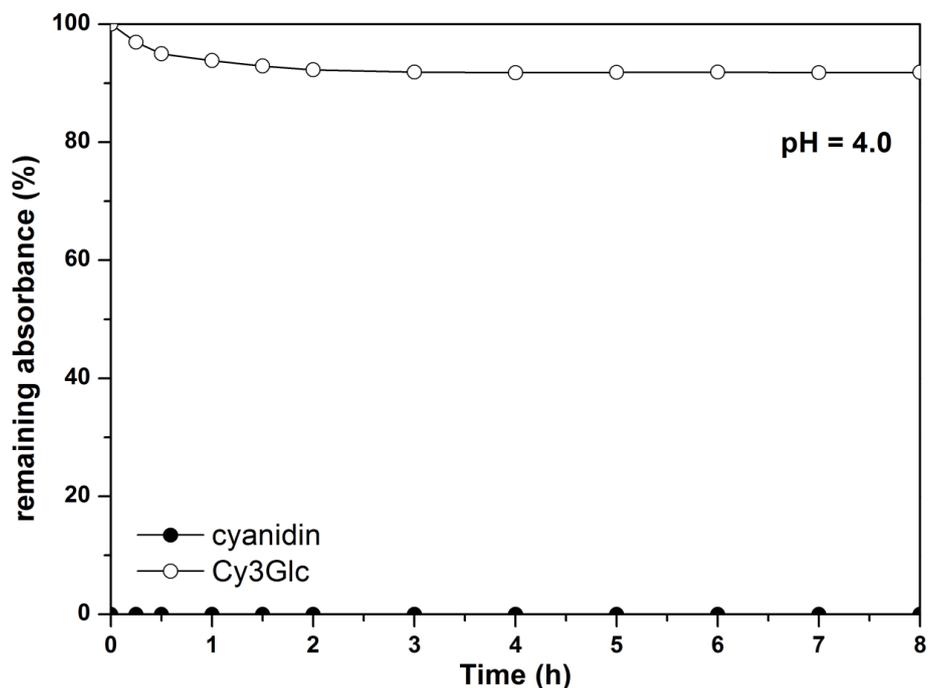


Slika 4.38: Procenti preostale apsorbance (mereno na početnoj $\lambda_{\text{max-vis}}$) nakon različitih vremena inkubacije cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc, ○) na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ u puferovanom vodenom rastvoru na pH 2,0. Koncentracija rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Na pH 4,0 nakon 8 sati cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je pokazao stabilnost iznad 90%, iako je odgovarajući intenzitet boje bio nizak (tabela 4.6, slike 4.39 i 4.40).

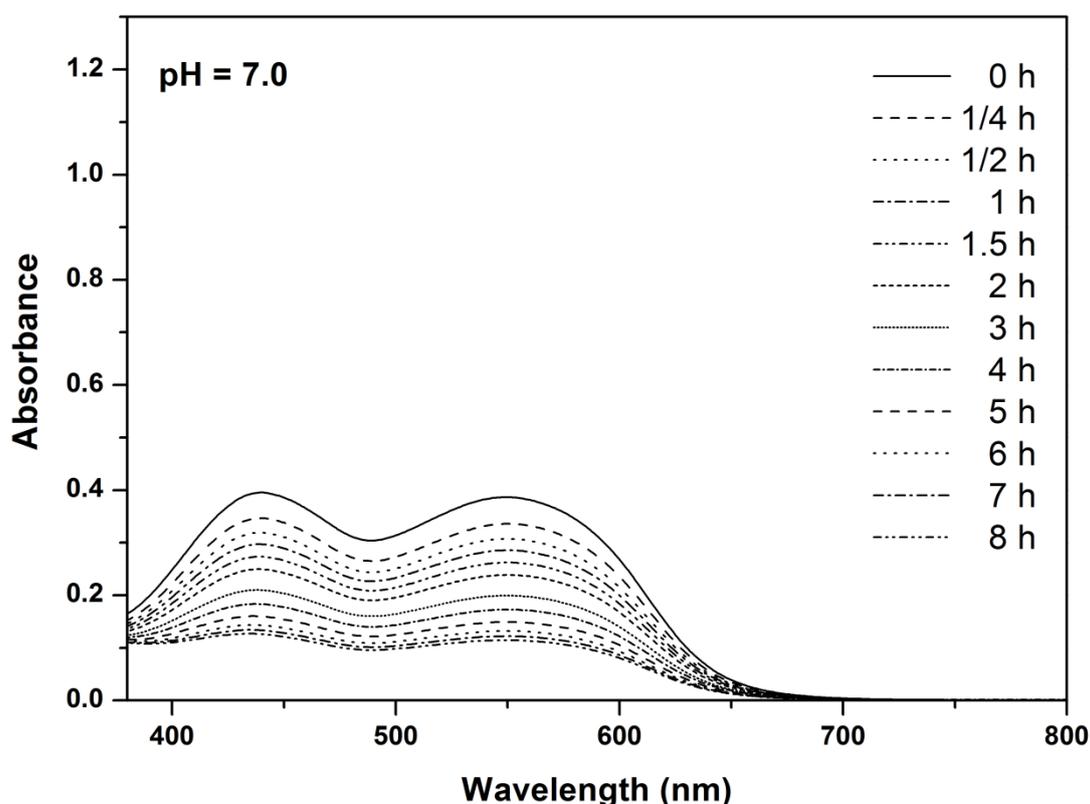


Slika 4.39: UV-Vis apsorpcioni spektri rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida tokom 8 sati inkubacije na pH 4,0. Koncentracija rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, a temperatura $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

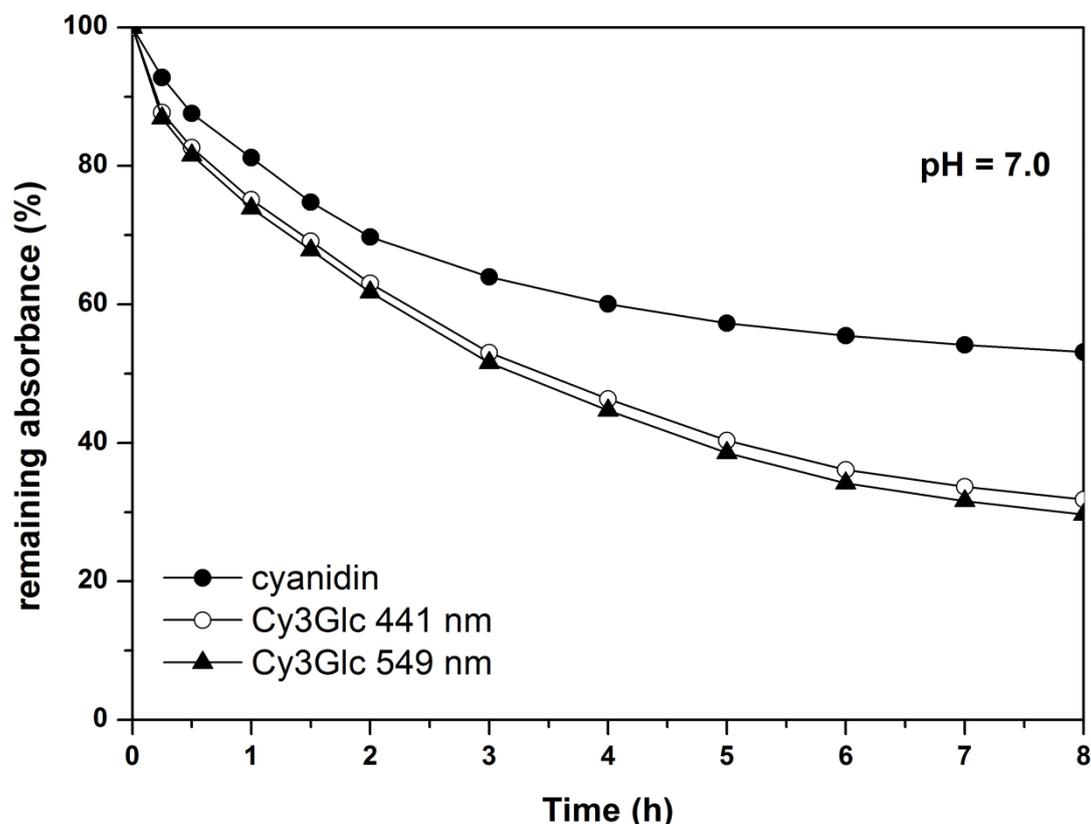


Slika 4.40: Procenti preostale apsorbance (mereno na početnoj $\lambda_{\text{max-vis}}$) nakon različitih vremena inkubacije cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc, ○) na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ u puferovanom vodenom rastvoru na pH 4,0. Koncentracija rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Tokom inkubacije cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na pH 7,0 i $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ došlo je do velikog opadanja vidljive apsorbance (slika 4.41 i 4.42). Utvrđeno je da stabilnost brzo opada, kako se pH povećava prema 7,0. Nakon 8 sati inkubacije cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je pokazivao vrednosti stabilnosti od oko 30% (slika 4.42).

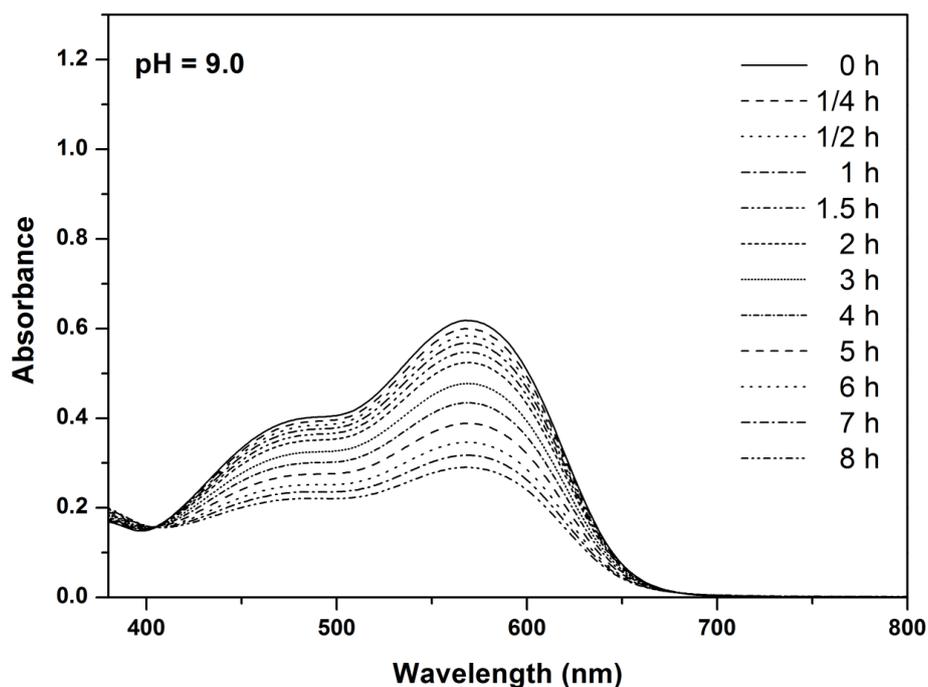


Slika 4.41: UV-Vis apsorpcioni spektri rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida tokom 8 sati inkubacije na pH 7,0. Koncentracija rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, a temperatura $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

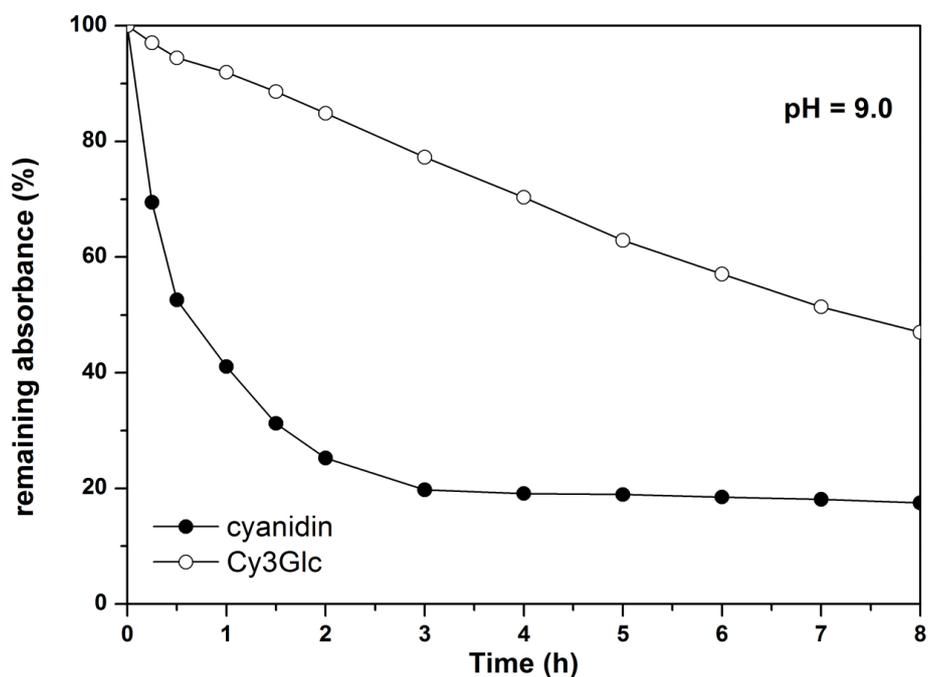


Slika 4.42: Procenti preostale apsorbance (mereno na početnoj $\lambda_{\text{max-vis}}$) nakon različitih vremena inkubacije cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc, ○,▲) na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ u puferovanom vodenom rastvoru na pH 7,0. Koncentracija rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Stabilnost cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida blago se povećavala, kako se pH vrednost pomerala prema alkalnoj sredini. Na pH 9,0 cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid pokazivao je oko 50% stabilnosti nakon 8 sati inkubacije na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (slike 4.43 i 4.44).

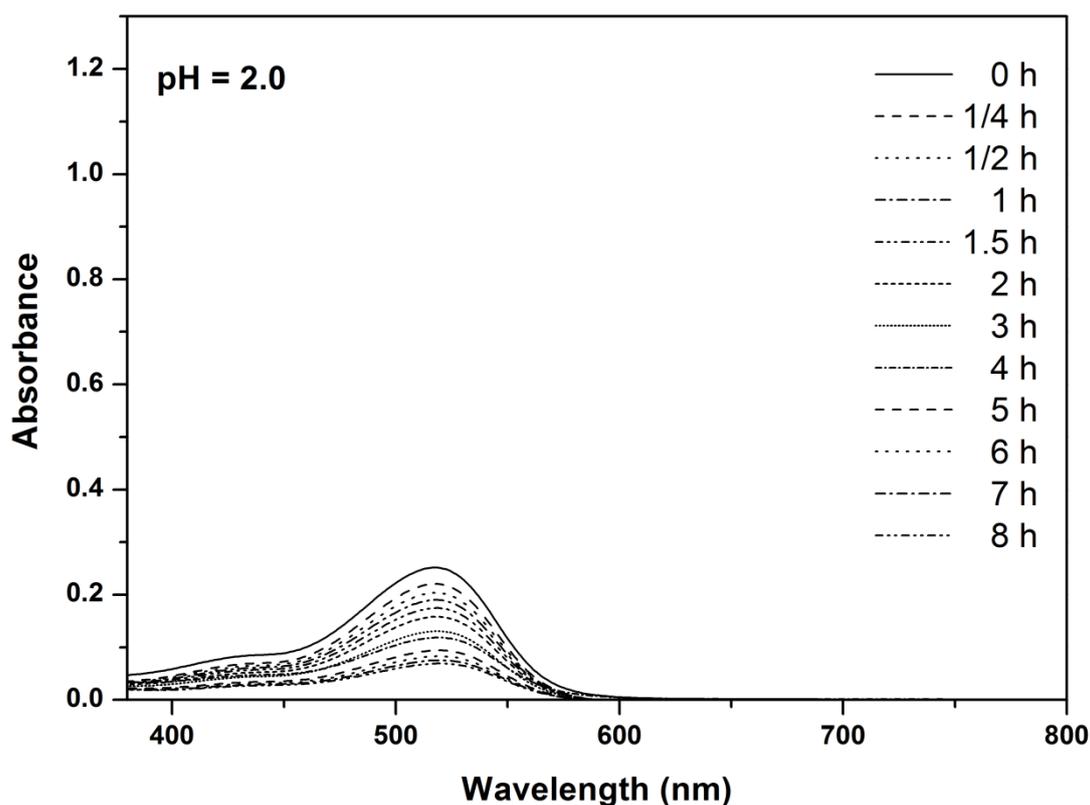


Slika 4.43: UV-Vis apsorpcioni spektri rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida tokom 8 sati inkubacije na pH 9,0. Koncentracija rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, a temperatura $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.



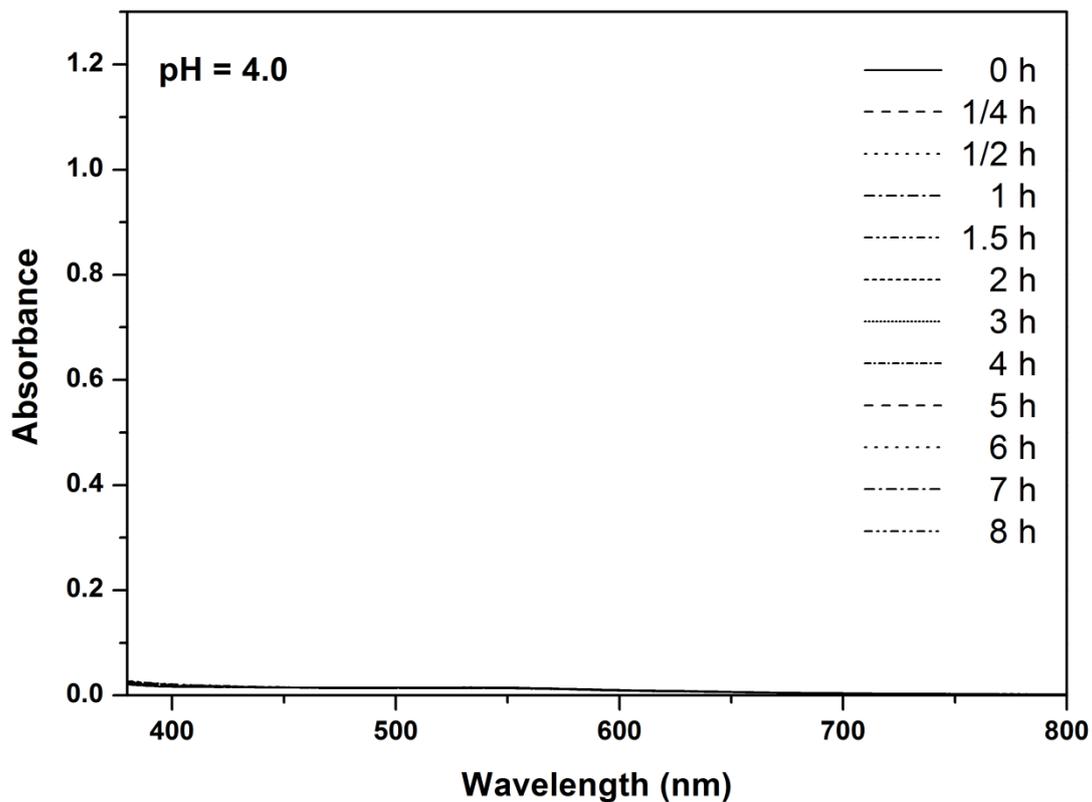
Slika 4.44: Procenti preostale apsorbance (mereno na početnoj $\lambda_{\text{max-vis}}$) nakon različitih vremena inkubacije cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc, ○) na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ u puferovanom vodenom rastvoru na pH 9,0. Koncentracija rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Spektrfotometrijska analiza rastvora cijanidina na pH 2,0 tokom 8 sati inkubacije na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, pokazala je veliko opadanje apsorpcione trake u vidljivoj oblasti. Na ovoj pH vrednosti cijanidin je pokazivao nisku stabilnost, iako se nalazio u obliku flavilijum katjona (Brouillard, 1982, 1988). Cijanidin je zadržao samo 27% svoje početne apsorbance nakon 8 sati stajanja na 25°C (slike 4.38 i 4.45). Slika 4.38 i tabela 4.6 jasno pokazuju da je cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid mnogo stabilniji od svog aglikona. Prema Brouillard-u (Brouillard, 1982), pošto je utvrđeno da su antocijanidini nestabilni u vodi i da su monogo manje rastvorljivi od antocijanina, pretpostavlja se da glukozilacija povećava rastvorljivost i stabilnost pigmenta.



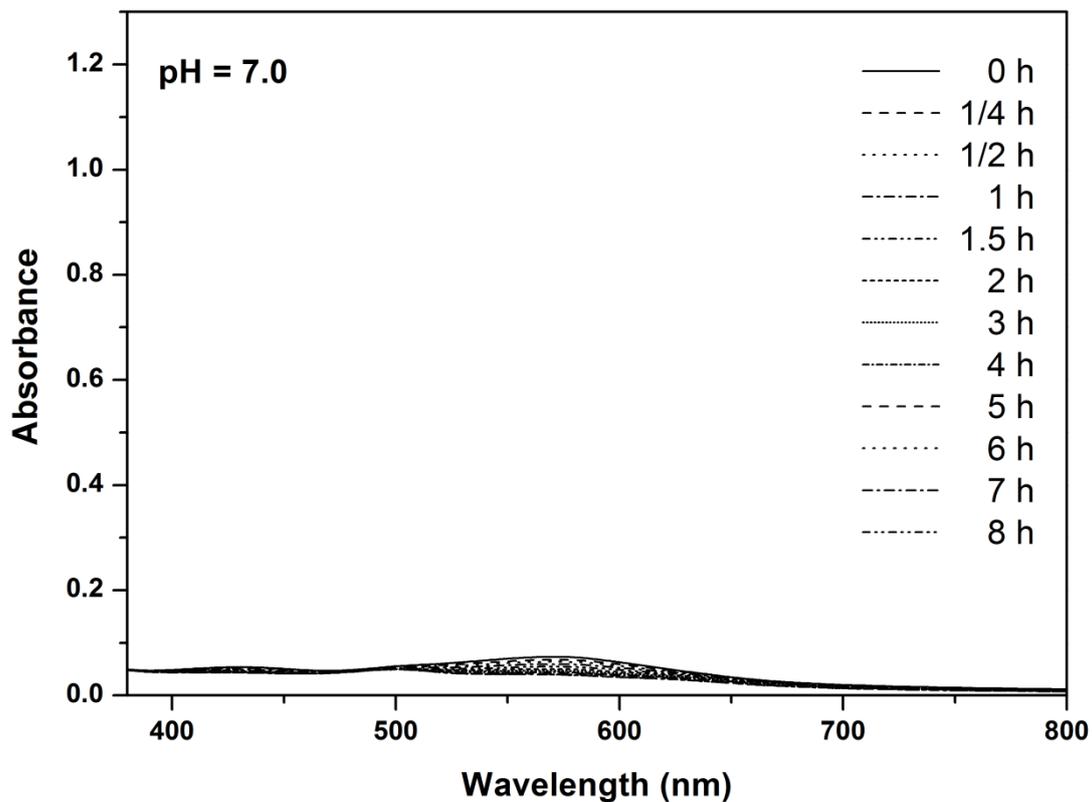
Slika 4.45: UV-Vis apsorpcioni spektri rastvora cijanidina tokom 8 sati inkubacije na pH 2,0. Koncentracija rastvora cijanidina bila je $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, a temperatura $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Na pH 4,0 cijanidin nema apsorpcionih traka u vidljivoj oblasti (slike 4.40 i 4.46).



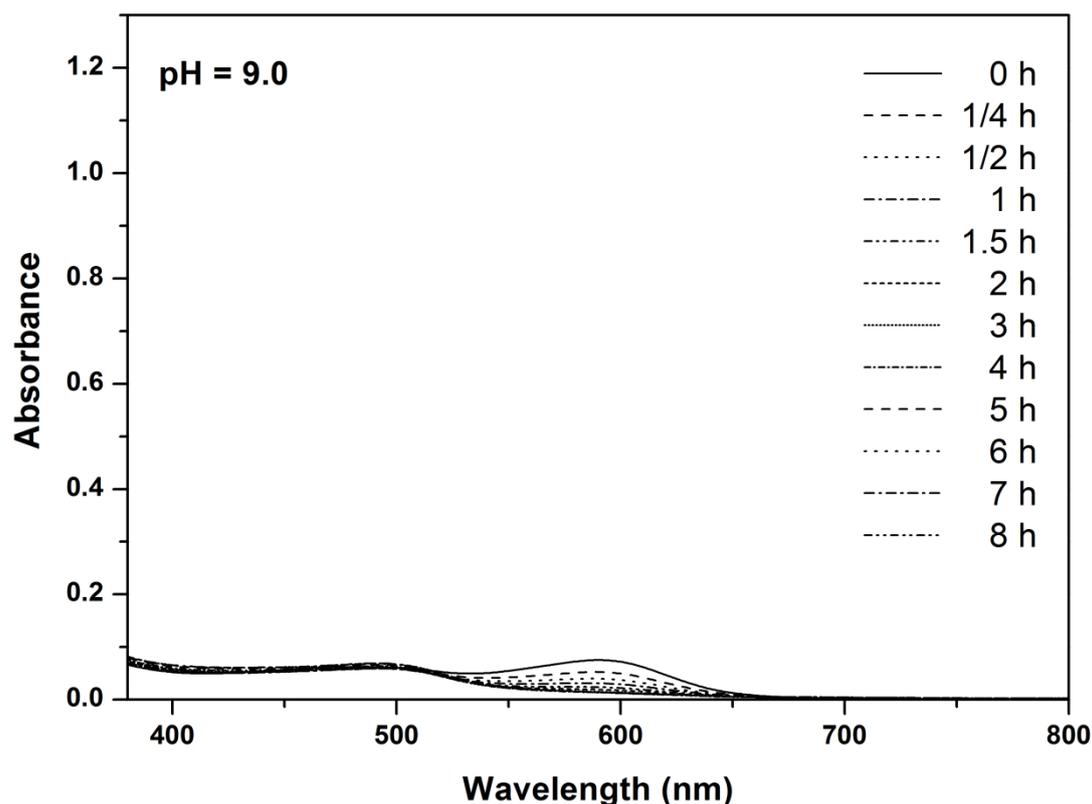
Slika 4.46: UV-Vis apsorpcioni spektri rastvora cijanidina tokom 8 sati inkubacije na pH 4,0. Koncentracija rastvora cijanidina bila je $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, a temperatura $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Međutim, stabilnost cijanidina se poboljšala sa povećanjem pH vrednosti prema 7,0 (slike 4.42 i 4.47). U stvari, cijanidin pokazuje određeni stepen stabilnosti samo na ovoj pH vrednosti, mada je odgovarajući intenzitet boje bio nizak. Cijanidin je pokazivao oko 50% stabilnosti nakon 8 sati inkubacije na ovoj pH vrednosti (slika 4.42 i tabela 4.6).



Slika 4.47: UV-Vis apsorpcioni spektri rastvora cijanidina tokom 8 sati inkubacije na pH 7,0. Koncentracija rastvora cijanidina bila je $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, a temperatura $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Sa druge strane, cijanidin je bio veoma nestabilan u alkalnoj sredini, na pH 9,0 (slike 4.44 i 4.48), i zadržao je samo oko 18% svoje početne apsorbanse nakon 8 sati inkubacije (tabela 4.6).



Slika 4.48: UV-Vis apsorpcioni spektri rastvora cijanidina tokom 8 sati inkubacije na pH 9,0. Koncentracija rastvora cijanidina bila je $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, a temperatura $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Tabela 4.6: Vrednosti apsorbanci rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) merene na počenim $\lambda_{\text{max-vis}}$, na vrednostima od pH 2,0 do 9,0 tokom 8 sati inkubacije na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ u mraku na vazdušnoj atmosferi.

pH	Vreme ^a											
	0 h	1/4 h	1/2 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
2,00	0,25	0,22	0,20	0,19	0,17	0,16	0,13	0,12	0,09	0,08	0,08	0,07
	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,95	0,96	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95
4,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,12	0,12	0,12	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
7,00	0,07	0,07	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
	^b 0,40	0,35	0,32	0,30	0,27	0,25	0,21	0,18	0,16	0,14	0,13	0,13
9,00	^c 0,39	0,34	0,31	0,29	0,26	0,24	0,20	0,17	0,15	0,13	0,12	0,11
	0,08	0,05	0,04	0,03	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	0,62	0,60	0,58	0,57	0,55	0,52	0,48	0,43	0,39	0,35	0,32	0,29

^a Gonja i donja vrednost u svakom intervalu odgovaraju cijanidinu i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozidu, respektivno

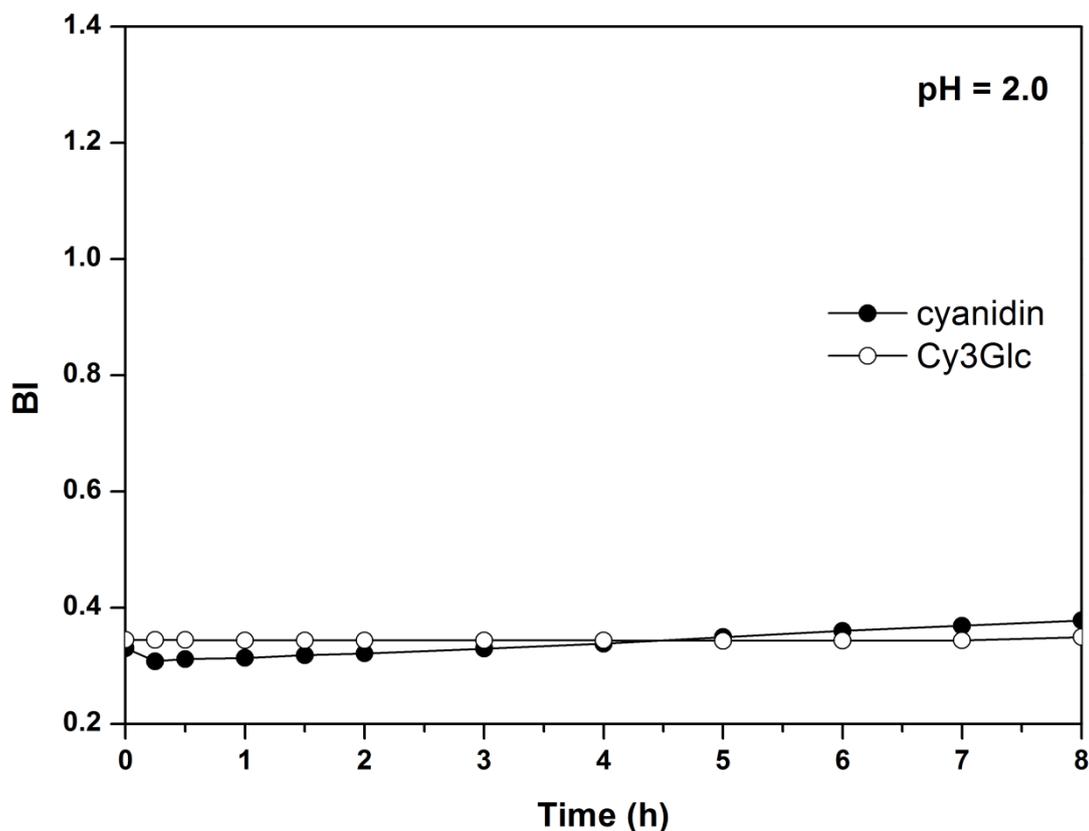
^b 441 nm

^c 549 nm.

Stabilnost cijanidina bila je viša od stabilnosti cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida samo na pH 7,0, dok je na svim ostalim pH vrednostima cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid pokazivao veću stabilnost. Sa strukturne tačke gledišta, izgleda da prisustvo 3-glukozidne supstitucije jako povećava stabilnost aglikonskog dela, možda štiteći flavilijum jezgro od nukleofilnog napada vode na C-2 atom, koji dovodi do formiranja bezbojnog hemiacetalnog i halkonskog oblika (tabela 4.6, slike 4.37 do 4.48).

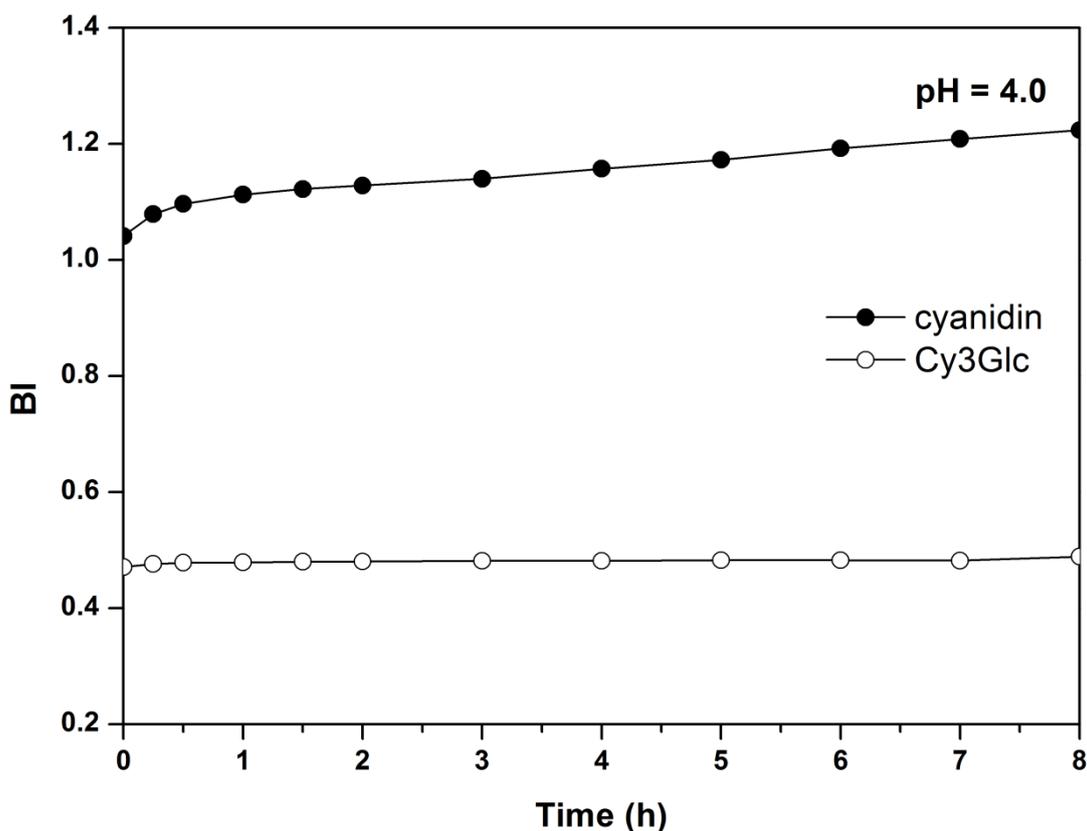
4.6.4. Braon indeks cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na 25,0, na različitim pH vrednostima

Početni braon indeks (BI odnos apsorbance na 430 nm prema onoj na 520 nm) za cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid na najnižoj merenoj pH vrednosti bio je sličan i iznosio je oko 0,3. (slika 4.49). Na pH 2,0 cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid pretežno postoje u obliku crveno-narandžastih flavilijum katojna ($\lambda_{\max\text{-vis}}$ za cijanidin je bila 517 nm i $\lambda_{\max\text{-vis}}$ za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je bila 508 nm, tabela 4.5) (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982; Drabent et al., 2007). Cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid su pokazivali veoma niske BI vrednosti na pH 2,0 tokom 8 sati inkubacije na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid pokazivao je konstantne BI vrednosti tokom eksperimenta (slika 4.49). Cijanidin je pokazao veoma postepeni porast BI vrednosti, praćen padom apsorbanci na $\lambda_{\max\text{-vis}}$ (slike 4.45 i 4.49).



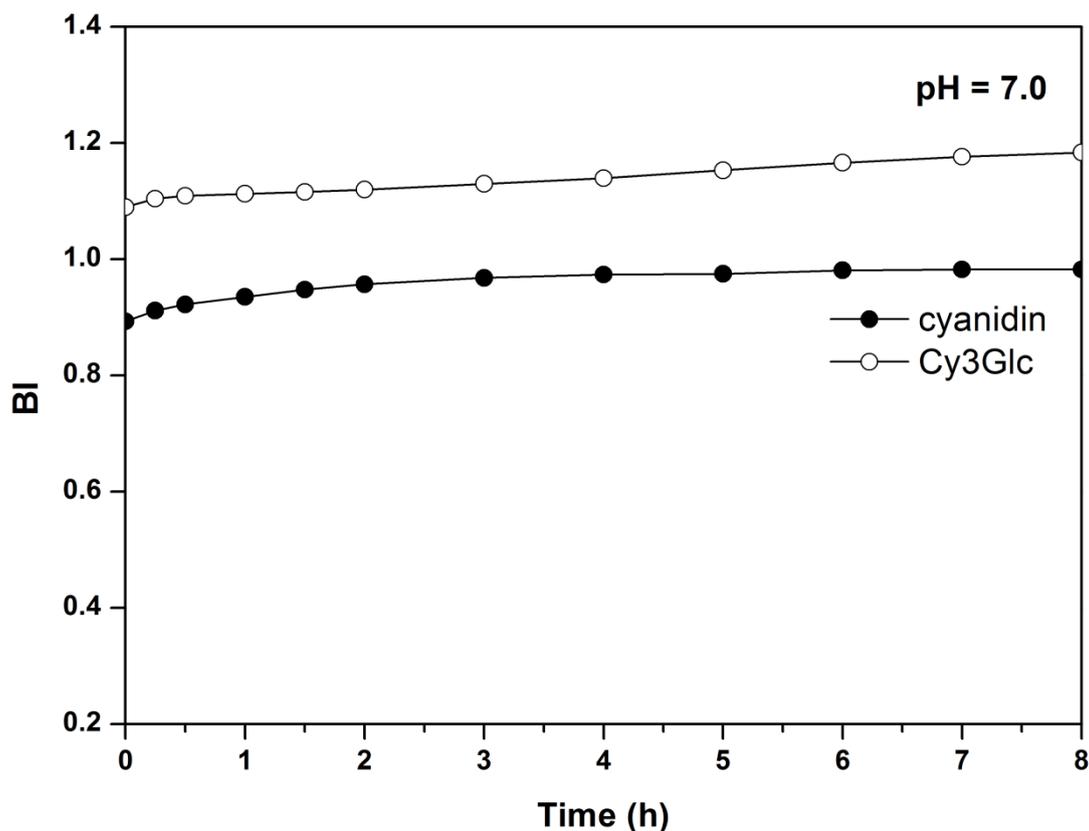
Slika 4.49: Braon indeks (BI) neposredno nakon rastvaranja i nakon različitog vremena inkubacije na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, u puferovanom vodenom rastvoru na pH 2,0, za rastvore cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc, ○). Koncentracija rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Na pH 4,0 cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid bio je stabilan (slika 4.40) sa početnom BI vrednošću nižom od 0,48 (slika 4.50). Na ovoj pH vrednosti BI vrednost za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid ostala je skoro konstantana tokom 8 sati inkubacije na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Na pH 4,0 cijanidin nije imao apsorpcione trake u vidljivom delu spektra (slika 4.46) i pokazivao je BI vrednosti >1 (slika 4.50). Zbog toga je rastvor cijanidina bio bezbojan sa žućkastom nijansom.



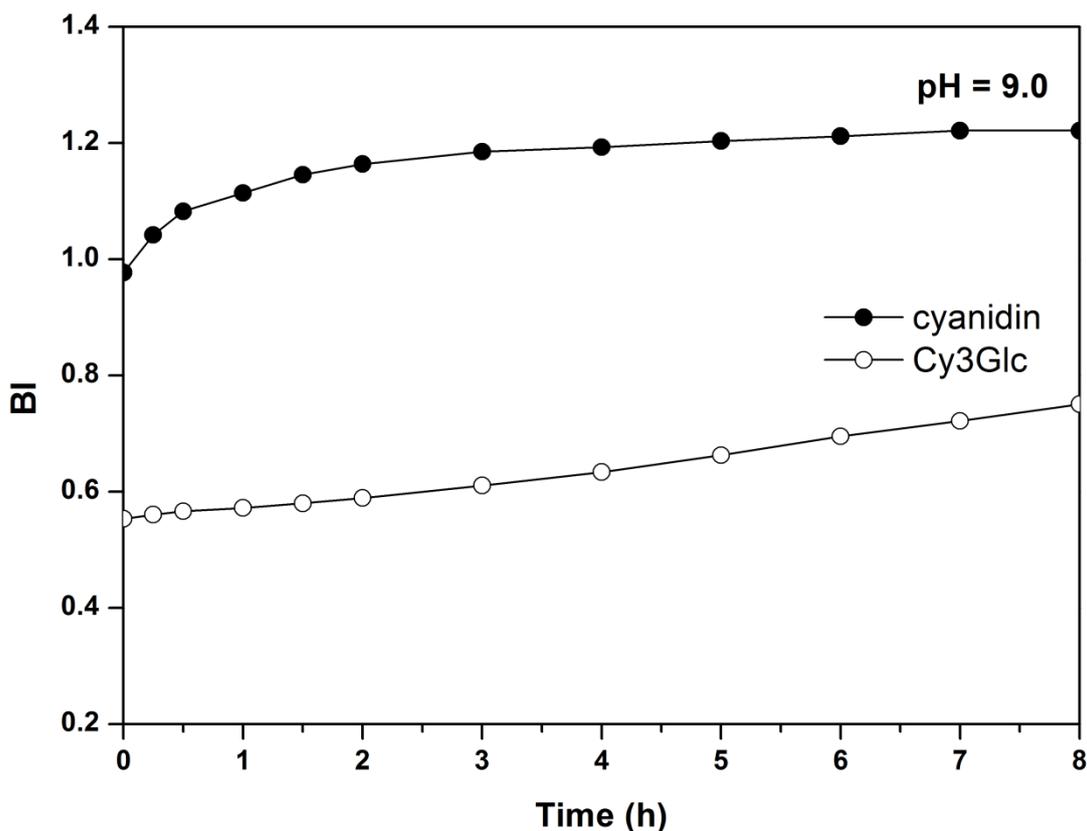
Slika 4.50: Braon indeks (BI) neposredno nakon rastvaranja i nakon različitog vremena inkubacije na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, u puferovanom vodenom rastvoru na pH 4,0, za rastvore cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc, ○). Koncentracija rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Na pH 7,0 cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je pokazivao dve apsorpcione trake u vidljivoj oblasti, sa vidljivim apsorpcionim maksimumima na 441 i 549 nm (slika 4.41). U skladu sa visokim vrednostima apsorbanace na 441 nm, BI (odnos apsorbanace na 430 nm prema onoj na 520 nm) bio je 1,09, dajući rastvoru žućkastu nijansu (Malien-Aubert et al., 2001). Postepeno povećanje BI vrednosti sa vremenom (slika 4.51), bilo je praćeno opadanjem vidljive apsorbanace na ova dva apsorpciona maksimuma i promenom odnosa apsorbanaci na ove dve talasne dužine (slika 4.41). Početna BI vrednost za cijanidin je bila 0,89 i postepeno je rasla sa vremenom (slika 4.51), što je bilo praćeno veoma postepenim gubitkom boje u vidljivoj oblasti (opadanje apsorbanace, slika 4.47). Međutim, cijanidin je pokazivao BI vrednosti < 1 , tokom celog eksperimenta.



Slika 4.51: Braon indeks (BI) neposredno nakon rastvaranja i nakon različitog vremena inkubacije na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, u puferovanom vodenom rastvoru na pH 7,0, za rastvore cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc, ○). Koncentracija rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Početna BI vrednost za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid na pH 9,0 bila je 0,55 i postepeno je rasla tokom 8 sati (slika 4.52) udruženo sa smanjenja vidljive apsorbance (slika 4.43). Ipak, BI vrednosti bile su niske i ostale su < 1 tokom eksperimenta. Na pH 9,0 cijanidin je pokazivao veoma niske vrednosti apsorbance (slika 4.48) i početnu BI vrednost 0,98. BI vrednosti nakon 15 min postale su > 1 , i ostale su > 1 tokom ostatka eksperimenta. Postepeni porast BI vrednosti sa vremenom (slika 4.52) bio je praćen postepenim opadanjem vidljive apsorpcione trake i promenom njenog položaja (slika 4.48).



Slika 4.52: Braon indeks (BI) neposredno nakon rastvaranja i nakon različitog vremena inkubacije na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, u puferovanom vodenom rastvoru na pH 9,0, za rastvore cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Cy3Glc, ○). Koncentracija rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Na osnovu dobijenih rezultata smatramo da je BI osetljivi pokazatelj stabilnosti cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na različitim pH vrednostima. Na pH 2,0 i 4,0 cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je bio stabilan i imao je veoma niske i konstantne BI vrednosti. Na pH 7,0 i 9,0 cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je bio nestabilan, dok su BI vrednosti postepeno rasle tokom eksperimenta. Cijanidin je bio nestabilan na svim ispitivanim pH vrednostima, što je bilo praćeno postepenim porastom BI vrednosti tokom stajanja. Tokom eksperimenta, cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je dobio žućkastu nijansu na pH 7,0, dok je cijanidin dobio žućkastu nijansu na pH vrednostima 4,0 i 9,0.

4.5. Stabilnost cijanidina i cijanidin 3-*O*- β glukopiranozida na 55,0°C, na pH 7,0

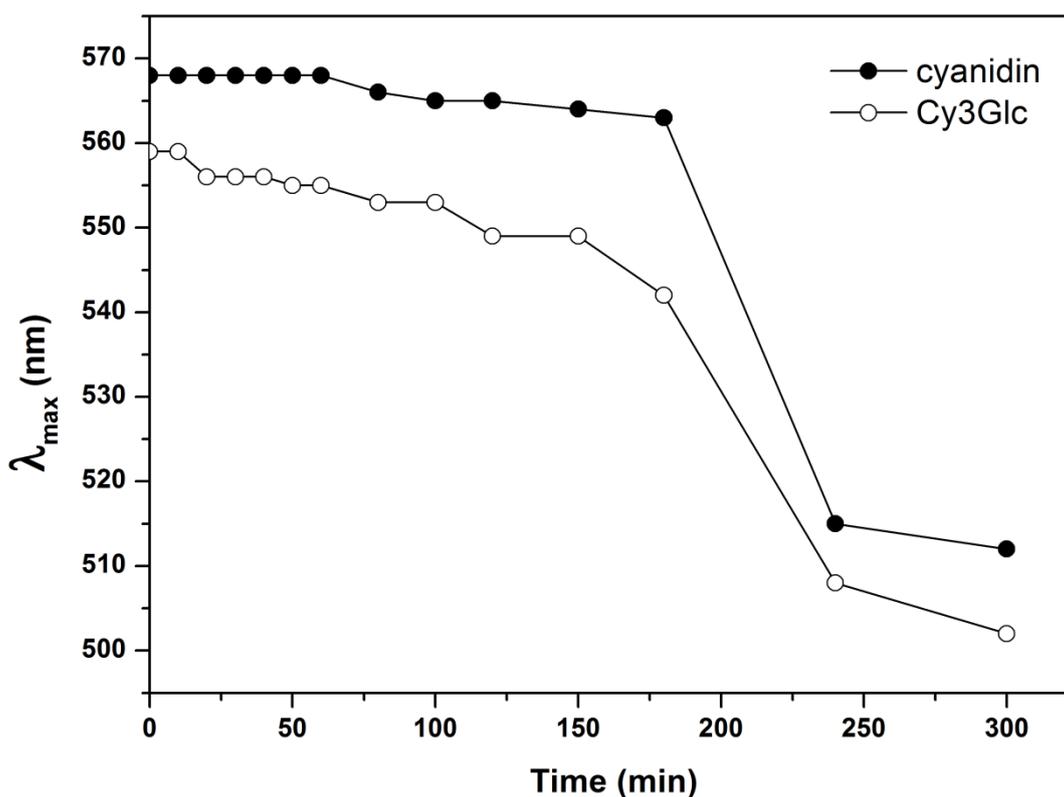
U skladu sa radovima Cabrita et al. and Fossen et al. (Cabrita et al., 2000; Fossen et al., 1998), varijacija boje cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida izražena je kao promena u poziciji apsorpcionog maksimuma u vidljivoj oblasti spektra ($\lambda_{\max\text{-vis}}$), intenzitet boje je meren kao vrednost apsorbanca na apsorpcionom maksimumu u vidljivoj oblasti $\lambda_{\max\text{-vis}}$ u nultom vremenu (t_0) (neposredno nakon rastvaranja) i posle određenih vremenskih intervala i izražen je kao vrednost molarne apsorptivnosti (ϵ , $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), stabilnost boje izražena je kao procenat apsorbanca preostale nakon određenih vremenskih intervala, mereno na početnoj $\lambda_{\max\text{-vis}}$. Braun indeks (BI) izražen je kao odnos apsorbanca na 430 nm prema onoj na 520 nm.

Da bi se eliminisao uticaj termalne nestabilnosti cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na rezultate merenja fluorescentne polarizacije fluorofora DPH i TMA-DPH, proučavana je kinetička stabilnost cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida pri $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Vremenska stabilnost cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, proučavana je pomoću UV-Vis spektrofotometrije u $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HEPES-u, pH 7,0, koji je korišten za pripremu lipozoma. Opadanje apsorbanca, na konstantnoj talasnoj dužini, u funkciji vremena izraženo je kao preostala apsorbanca u odnosu na početnu apsorbanca u nultom vremenu (na početku merenja) (u procentima). Ovi podaci dobijeni za cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ prikazani su na slikama 4.57 do 4.60.

4.5.1. Varijacija boje cijanidina i cijanidin 3-*O*- β glukopiranozida na 55,0°C, na pH 7,0

Ako grafički predstavimo položaje apsorpcionih maksimuma u vidljivoj oblasti, $\lambda_{\max\text{-vis}}$ dobijene za rastvore cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na početku merenja (t_0) i posle određenih vremenskih intervala, u vodenom rastvoru na pH 7,0 i $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, dobijaju se krive koje se menjaju na sličan način (slika 4.53). Rastvori cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida najpre pokazuju postepeno hipsokromno pomeranje sve do 180-tog minuta, a zatim dramatičano hipsokromno pomeranje do 300-tog minuta.

Početni položaj apsorpcionog maksimuma u vidljivoj oblasti, $\lambda_{\max\text{-vis}}$ u vremenu t_0 za cijanidin bio je za 9 nm viši nego za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid (slika 4.53). Kriva koja pokazuje promenu položaja apsorpcionih maksimuma, za cijanidin je bila skoro paralelna osi koja prikazuje vreme, tokom prvih 180 min, dok je kriva za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid pokazivala postepeni pad u ovom vremenskom intervalu. Nakon 300 min može se videti hipsokromno pomeranje vidljive apsorpcione trake (slika 4.53) od oko 60 nm, za oba jedinjenja. Ovo ukazuje na uticaj 3-glukozilacije u cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozidu na položaj vidljivog apsorpcionog maksimuma: prisustvo 3-glukozidne supstitucije utiče na pomeranje vidljivog apsorpcionog maksimuma prema kraćim talasnim dužinama (hipsokromno pomeranje) na pH 7,0 i $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.



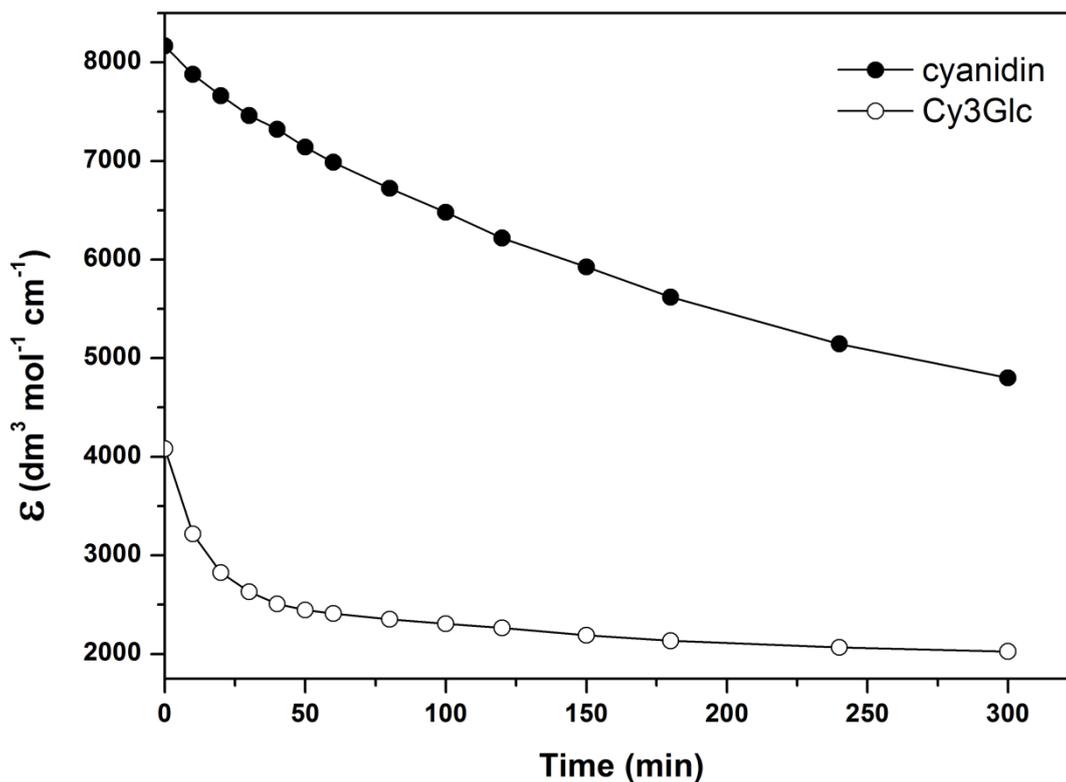
Slika 4.53: Promene položaja vidljivih apsorpcionih maksimuma ($\lambda_{\max\text{-vis}}$) $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rastvora cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (○) u funkciji vremena, u $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HEPES-u, na pH 7,0, i $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

4.5.2. Intenzitet boje cijanidina i cijanidin 3-*O*- β glukopiranozida na 55,0°C, na pH 7,0

Inkubiranje rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ i na pH 7,0 utiče na intenzitet njihove boje. Molarne apsorptivnosti cijanidina bile su znatno više nego molarne apsorptivnosti cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida sve vreme (slika 4.54).

Krive koje pokazuju promenu molarne apsorptivnosti sa vremenom, za oba jedinjenja pokazuju hipohromni efekat. Opadanje molarnih apsorptivnosti cijanidina bilo je postepeno sve vreme, dok cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid pokazuje značajan pad molarnih apsorptivnosti tokom prvih 20 min, a zatim niske i skoro konstantne vrednosti molarnih apsorptivnosti (slika 4.54). Molarna apsorptivnost cijanidina, neposredno nakon rastvaranja (0 min) bila je $8\,166,88\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, a nakon 300 min $4\,801,92\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, što je više od vrednosti molarne apsorptivnosti cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida neposredno nakon rastvaranja (0 min) koja je iznosila $4\,083,32\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Ovi podaci jasno ukazuju na veću moć bojenja cijanidina u odnosu na cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid na pH 7,0. Ova činjenica važna je sa tačke gledišta upotrebe ovih jedinjenja kao prehrambenih boja. Prisustvo 3-glukozidnog ostatka značajno smanjuje intenzitet boje cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na 7,0, i temperaturi od $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.



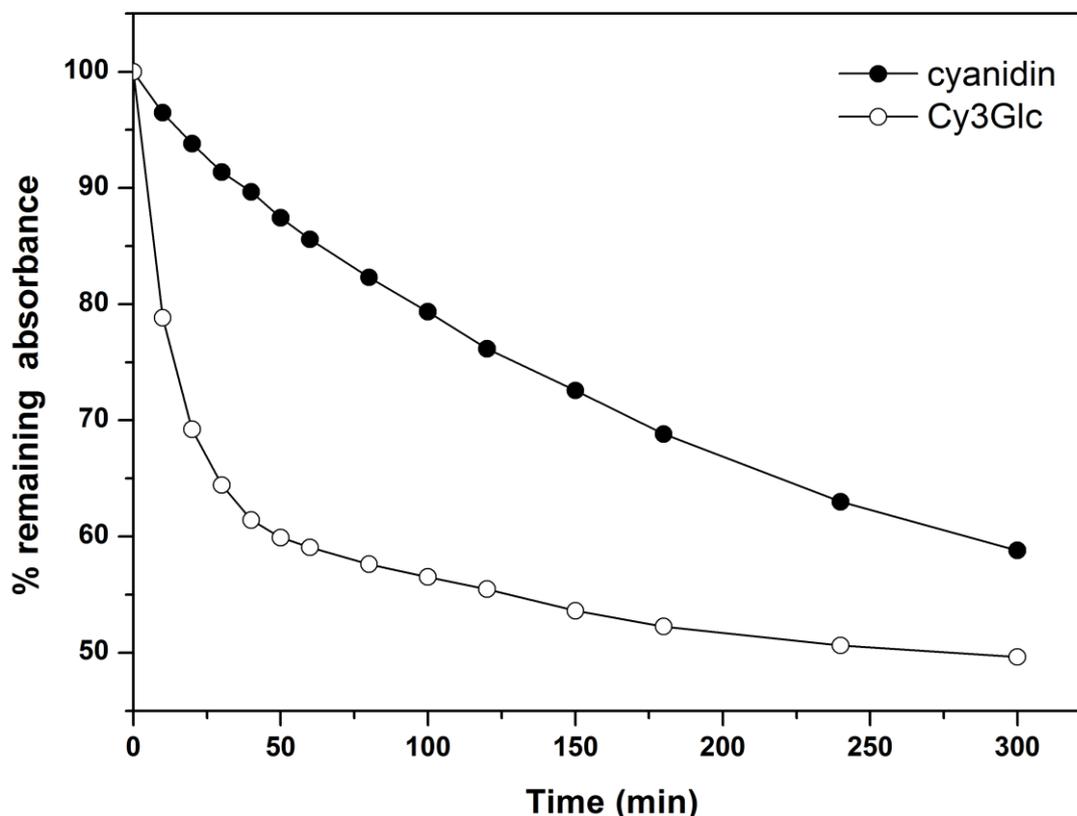
Slika 4.54: Molarne apsorptivnosti $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rastvora cijanidina (●) i cijanidin 3-O-β-glukopiranozida (○) kao funkcije vremena u $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HEPES-u, na pH 7,0, i $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

4.5.3. Stabilnost boje cijanidina i cijanidin 3-O-β glukopiranozida na $55,0^\circ\text{C}$, na pH 7,0

Oba ispitivana jedinjenja pokazuju stabilnost iznad 50% nakon 300 min na pH 7,0 i $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Cijanidin 3-O-β-glukopiranozid pokazuje niže vrednosti temperaturne stabilnosti od cijanidina. Utvrđeno je da stabilnost cijanidin 3-O-β-glukopiranozida brzo opada u prvim minutima nakon rastvaranja. Slika 4.55 jasno pokazuje višu termalnu stabilnost cijanidina u odnosu na cijanidin 3-O-β-glukopiranozid na pH 7,0.

Sa strukturne tačke gledišta, izgleda da prisustvo 3-glukozidne supstitucije smanjuje stabilnost cijanidin 3-O-β-glukopiranozida u uslovima povišene temperature u neutralnim vodenim rastvorima. Prisustvu 3-glukozidne polovine snažno favorizuje reakciju adicije vode na pirilijum jezgro što rezultira formiranjem bezbojnog hemiacetalnog oblika i kasnije

halkona. Dobijeni rezultati su u dobroj saglasnosti sa prethodno opisanom niskom stabilnošću 3-*O*- β -glukopiranozida na pH 7,0 (Fossen et al., 1998).



Slika 4.55. Procenti preostale apsorbance (mereno na početnoj $\lambda_{\text{max-vis}}$) $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rastvora cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (○) u funkciji vremena u $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HEPES-u, na pH 7,0 i $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

4.5.4. Braon indeks cijanidina i cijanidin 3-*O*- β glukopiranozida na $55,0^\circ\text{C}$, na pH 7,0

Početni BI za cijanidin bio je 0,63 i ostao je < 1 , sve vreme (slika 4.56). Početni BI za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid bio je 1,09 i ostao je > 1 , dajući rastvoru žućkastu nijansu. Postepeni gubitak boje (opadanje molarnih apsorptivnosti, slika 4.54), udružen je sa povećanjem BI. U uslovima povišenih temperatura, koje simuliraju ubrzano starenje hrane, porast BI praćen je hipsohromnim pomeranjem vidljive apsorpcione trake (slika 4.53) od blizu 60 nm.

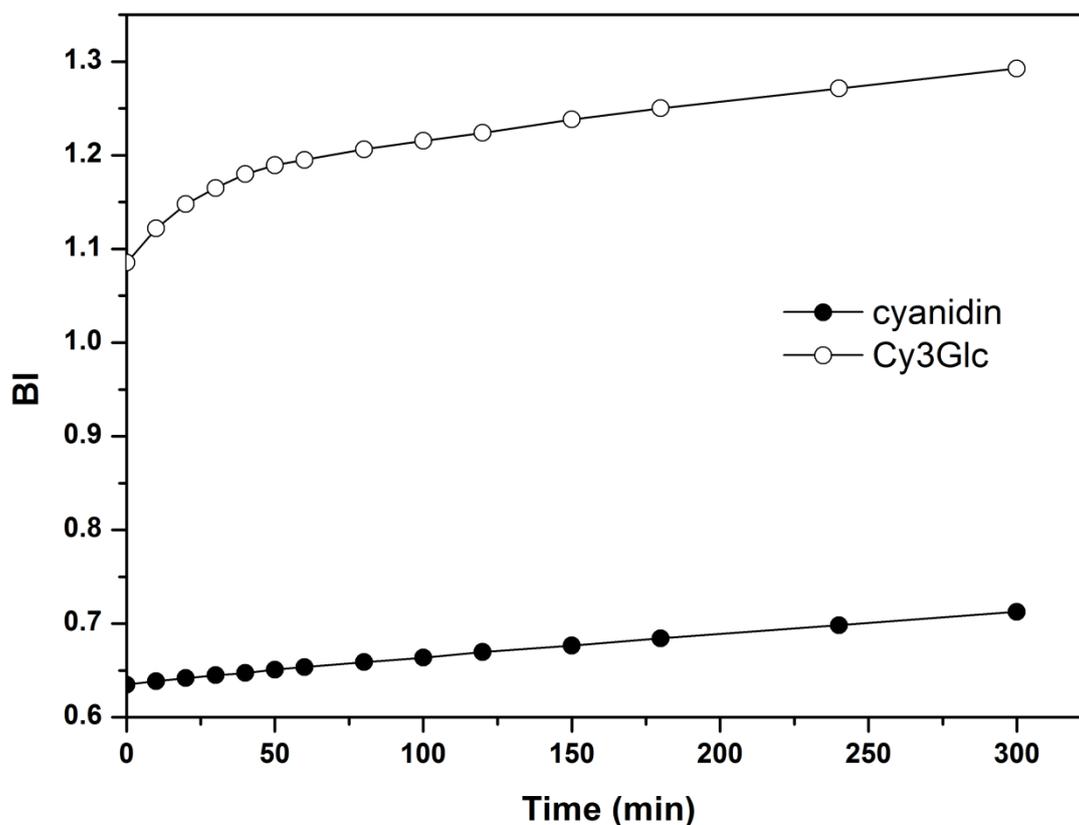


Figure 4.56: Braon indeks $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rastvora cijanidina (●) i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (○) u funkciji vremena, u $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HEPES-u, na pH 7,0, i $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

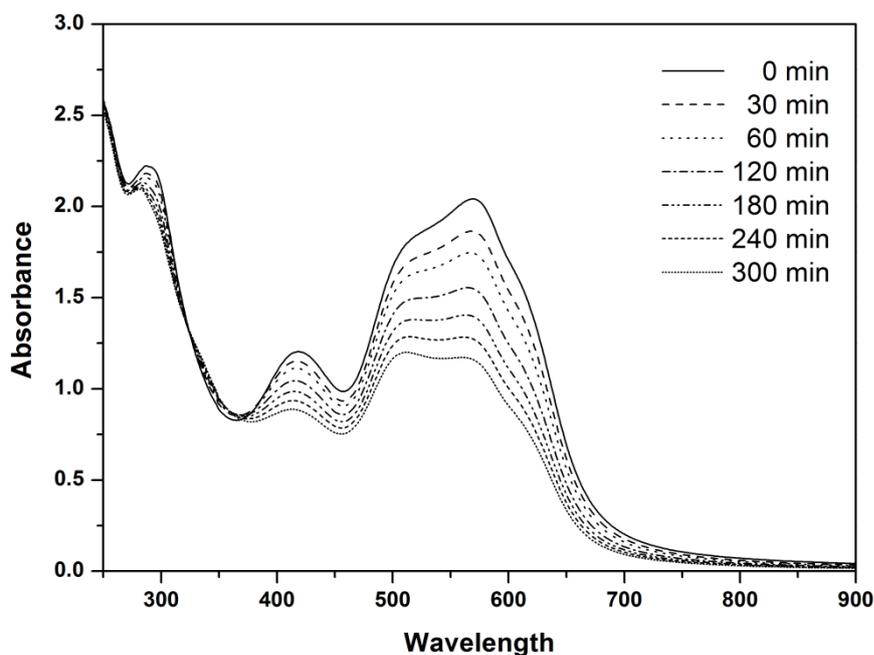
Tabela 4.7: Promena talasnih dužina apsorpcionih maksimuma, BI i apsorbanci cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na 520 nm na pH 7,0.

vreme (min)	cijanidin			Cy3Glc		
	λ_{max} (nm)	BI	% $A_{520\text{nm}}$	λ_{max} (nm)	BI	% $A_{520\text{nm}}$
0	568	0,63	100,00	559	1,09	100,00
300	512	0,71	64,76	502	1,29	53,41

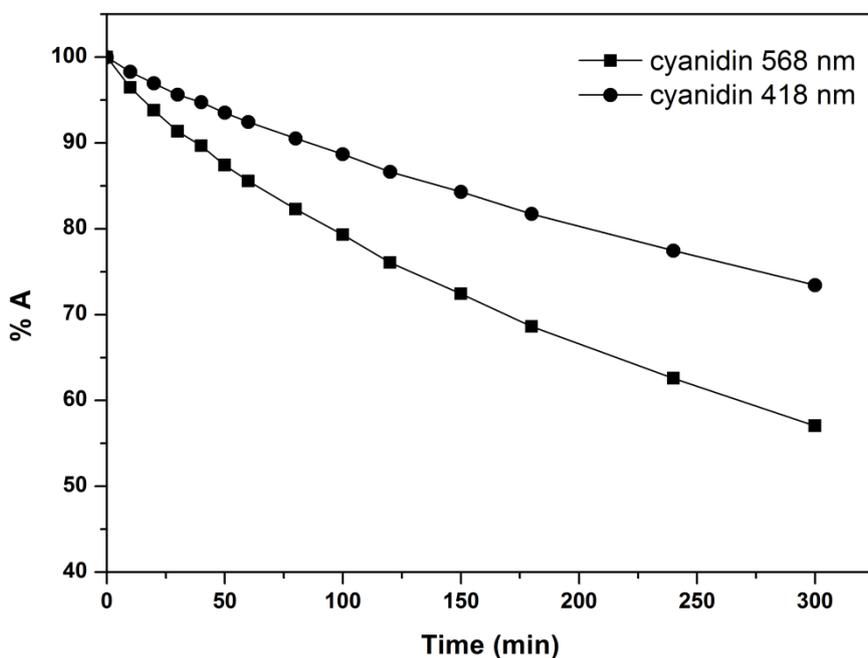
4.5.5. Kinetička stabilnost cijanidina i cijanidin 3-*O*- β glukopiranozida na 55,0°C, na pH 7,0

Da bi se eliminisao bilo kakav uticaj termičke nestabilnosti cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na podatke merenja fluorescentne polarizacije, ispitivana je kinetička stabilnost cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Vremenska stabilnost cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ ispitivana je pomoću UV-Vis spektrometrije, u $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HEPES puferu, pH 7,0, koji je korišćen za pripremu lipozoma. Opadanje apsorbance pri konstantnoj talasnoj dužini u funkciji vremena izraženo je kao procenat preostale apsorbance u odnosu na početnu apsorbancu (na početku merenja), (t_0). Podaci dobijeni za cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid na prikazani su na slikama 4.57 i 4.59.

Za date uslove, promene u vrednostima apsorbanci sa vremenom za cijanidin, razlikovale su se od onih za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid. Na početku merenja (t_0), cijanidin pokazuje dve glavne trake u vidljivom delu spektra, jednu široku traku sa apsorpcionim maksimumom na 568 nm i malim ramenom na oko 515 nm i užu traku sa apsorpcionim maksimumom na 418 nm. Pored toga, cijanidin pokazuje jednu traku u UV oblasti, sa apsorpcionim maksimumom na oko 285 nm (slika 4.57). Obe treke iz vidljive oblasti pokazuju opadanje apsorbance sa vremenom, pri čemu široka traka (568 nm) pokazuje veće opadanje apsorbance u poređenju sa užom trakom (418 nm) (slike 4.57 i 4.58).



Slika 4.57: Promene u UV-Vis spektru $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rastvora cijanidina tokom inkubiranja (do 300 min) u $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HEPES-u, na pH 7,0, i na $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

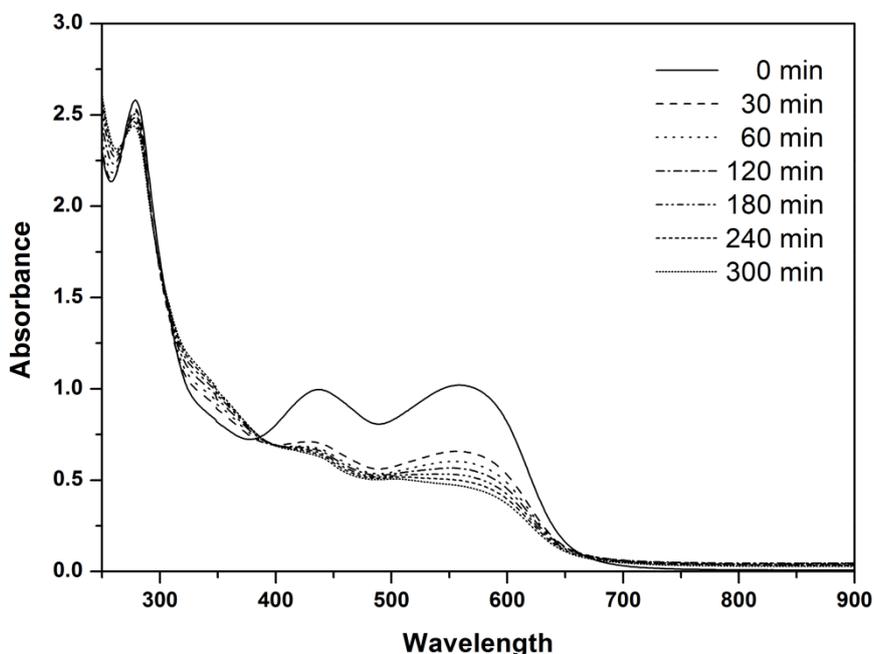


Slika 4.58: Vremenska stabilnost rastvora cijanidina ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) na 568 nm (■) i 418 nm (●) tokom inkubiranja (do 300 min) u $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HEPES-u, na pH 7,0, i na $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

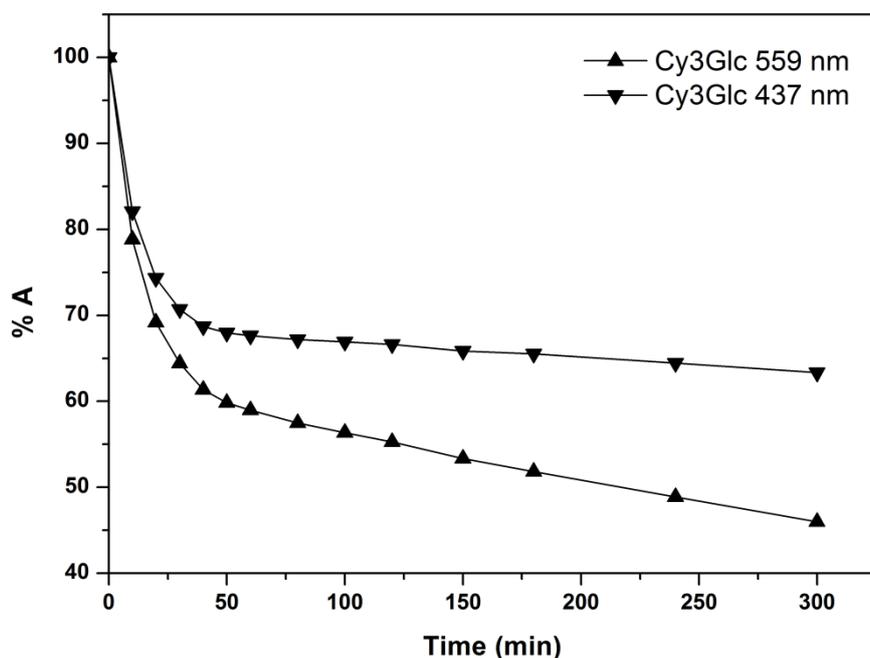
Na početku merenja (t_0), cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid takođe pokazuje dve glavne trake u vidljivoj oblasti spektra, sa apsorpcionim maksimumima na 559 nm i 437 nm i jednu traku u UV oblasti, sa apsorpcionim maksimumom na 280 nm (slika 4.59). Paralelno sa cijanidinom, traka cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na 559 nm pokazuje veće opadanje apsorbanse u poređenju sa trakom na 437 nm (slike 4.59 i 4.60).

Cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid pokazuje veće opadanje apsorbanse sa vremenom na $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ od cijanidina: posle 10 min, 78,8% cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida i 96,5% cijanidina bilo je intaktno dok je posle 30 min 64,4% of cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida i 91,4% cijanidina bilo intaktno.

Prethodno je pokazano da degradacija cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida rezultira formiranjem galne kiseline, protokatehuične kiseline i 2,4,6-trihidroksibenzaldehida (Kadivec et al., 2013). Pošto su svi ovi proizvodi degradacije negativno naelektrisani, malo je verovatno da će oni interagovati sa negativno naelektrisanim lipidima.



Slika 4.59: Promene u UV-Vis spektru $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida tokom inkubiranja (do 300 min) u $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HEPES-u, na pH 7,0, i na $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.



Slika 4.60: Vremenska stabilnost rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) na 559 nm (\blacktriangle) i 437 nm (\blacktriangledown) tokom inkubiranja (do 300 min) u $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HEPES-u, na pH 7,0, i na $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

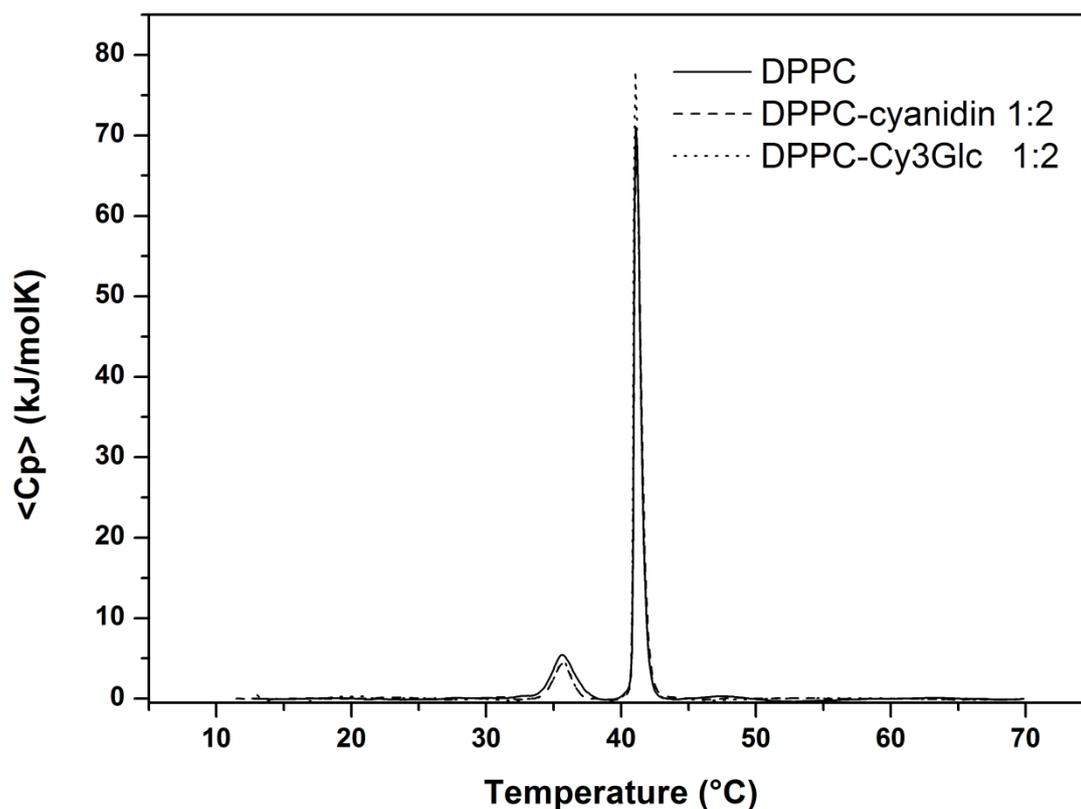
4.6. Energetski uticaj cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na fazni prelaz DPPC-a i DPPG-a

Fazni prelaz lipida je povezan sa pikovima u profilu toplotnog kapaciteta, i zbog toga se može pratiti diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC), koja omogućava merenje toplotnog kapaciteta pri konstantnom pritisku u funkciji temperature (Riske et al., 2009). Glavni fazni prelaz "gel - tečno" na temperaturi prelaza, T_m , generalno daje veoma intenzivne i oštre pikove u toplotnom kapacitetu. Sa druge strane, temperatura pre-tranzicije (T_{pre}) se obično detektuje kao pik mnogo manjeg intenziteta i veće širine, pri nižim temperaturama (Riske et al., 2009). Za proučavanje cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid - lipid interakcije, izabrani su DPPC i DPPG MLV lipozomi kao modeli membrana. Fosfoholin i fosfoglicerol lipidi sa istim acil lancima pokazuju slično toplotno ponašanje (Watts, Harlos, Maschke, & Marsh, 1978).

Slike 4.61 i 4.62 prikazuju termotropno fazno ponašanje lipidnih DPPC i DPPG MLV-a bez dodatka i sa dodatkom cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida. Temperature glavnog faznog prelaza, T_m , DPPC-a i DPPG-a u odsustvu cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bile su $41,2 (\pm 0,2)^\circ\text{C}$ i $40,4 (\pm 0,2)^\circ\text{C}$, respektivno (tabela 4.8). Ovi podaci su u dobroj saglasnosti sa literaturnim podacima (Riske et al., 2009; Wesolowska, Gąsiorowska, Petrus, Czarnik-Matusiewicz, & Michalak, 2014). Glavni prelaz je pripisan preorijentaciji acil lanaca iz uređene strukture u nagnutu konfiguraciju, poznatu kao L_α - L_β fazni prelaz. Ovo termotropno ponašanje se može proučavati pomoću DSC-a, i na njega mogu uticati mali molekuli rastvoreni u uređenoj dvoslojnoj lipidnoj strukturi (Cater, Chapman, Hawes, & Saville, 1974; Papahadjopoulos, Jacobson, Poste, & Shepherd, 1975; Saija et al., 1995).

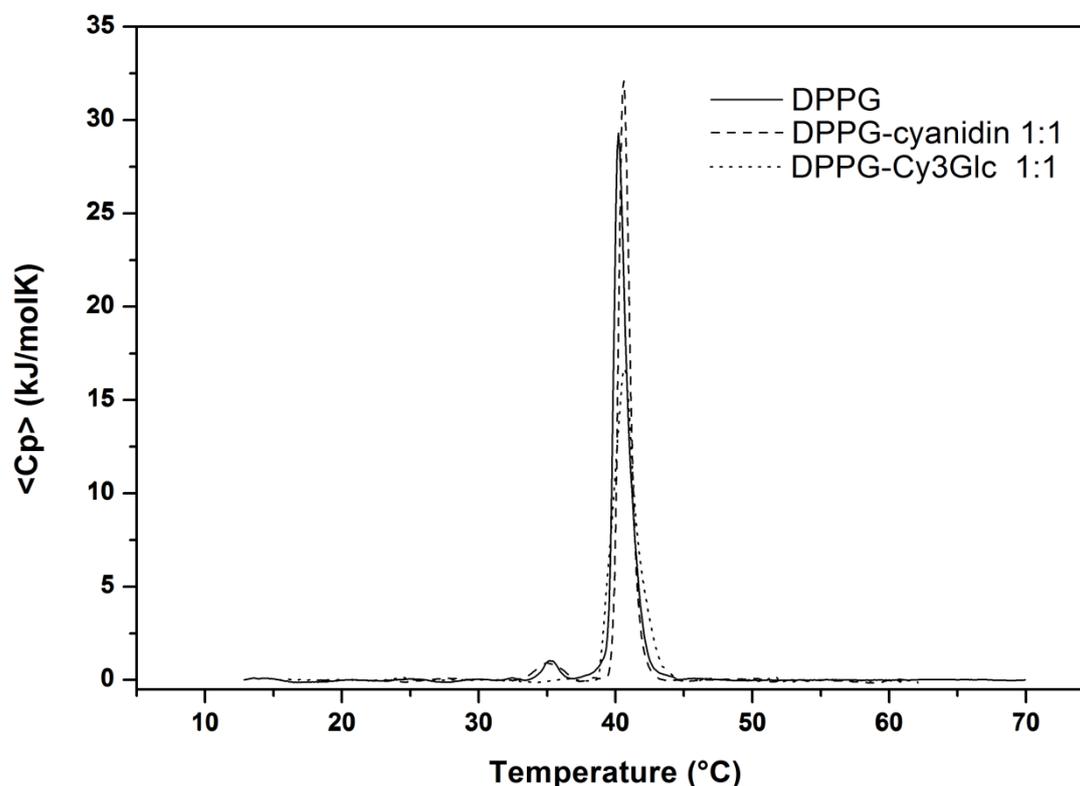
Na slici 4.61 se može videti efekat dodavanja cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na termotropno fazno ponašanje DPPC MLV-a pri molarnom odnosu 2:1 cijanidina ili cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida prema DPPC-u. Pri molarnom odnosu 1:1 nije uočen uticaj cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na fazni prelaz DPPC MLV-a. Čak ni pri molarnom odnosu 2:1 nije uočen efekat cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na fazni prelaz DPPC-a u temperaturnoj oblasti od 10°C do 70°C .

Integral povećanja toplotnog kapaciteta daje promenu entalpije ΔH_{cal} , koja je povezana sa faznim prelazom "gel - tečno". Termodinamički parametri ovog prelaza dati su u tabeli 4.8. Detaljan pregled tabele 4.8 pokazuje da cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida nemaju značajan efekat na termičku i entalpijsku stabilizaciju DPPC MLV-a pri 2:1 odnosu cijanidin/cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid prema DPPC-u, pošto se temperatura i entalpija "gel - tečno" prelaza ne menjaju značajno (tabela 4.8). Na osnovu DSC profila, vrlo je verovatno da ovde nema značajne interakcije između neutralnih cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida sa ovim cviterjonskim DPPC MLV-a.



Slika 4.61: Diferencijalni skenirajući kalorimetrijski profili u odsustvu i prisustvu cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida za DPPC MLV-e pri 2:1 molarnom odnosu. DPPC (—); cijanidin+DPPC (-----); cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid+DPPC (.....).

Na slici 4.62 prikazan je efekat cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na termotropno fazno ponašanje DPPG MLV-a, pri molarnom odnosu 1:1 cijanidin/cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid prema DPPG-u.



Slika 4.62: Diferencijalni skenirajući kalorimetrijski profili u odsustvu i prisustvu cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida za DPPG MLV-e pri 1:1 molarnom odnosu. DPPG (—); cijanidin+DPPG (-----); cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid+DPPG (.....).

Interakcije cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida sa negativno naelektrisanim DPPG MLV-ima neznatno su menjale T_m (slika 4.62, tabela 4.8). Temperatura pretranzicije, T_{pre} , u prisustvu cijanidina se nije menjala, dok je u prisustvu cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida nestao pretranzicioni pik. Glavni tranzicioni pik u termogramu postaje manji i širi, mada se entalpija nije menjala (slika 4.62, tabela 4.8). Cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid nisu imali uticaj na entalpijsku stabilizaciju/destabilizaciju glavne tranzicije ovih DPPG MLV-a pri molarnom odnosu 1:1 (tabela 4.8).

Table 4.8: Termodinamički profili DPPC i DPPG MLV-a (pH 7,0) u odsustvu i prisustvu cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, pri različitim molarnim odnosima (R).

MLV uslovi	R	T_m (°C)	ΔH_{cal} (kJ/mol)
DPPC	-	41.2 \pm 0.2	44.0 \pm 2.0
Cyanidin + DPPC	2:1	41.2 \pm 0.2	44.8 \pm 2.0
Cy3Glc + DPPC	2:1	41.2 \pm 0.2	46.3 \pm 2.0
DPPG	-	40.4 \pm 0.2	36.0 \pm 2.0
Cyanidin + DPPG	1:1	40.6 \pm 0.2	35.3 \pm 2.0
Cy3Glc + DPPG	1:1	40.6 \pm 0.2	35.6 \pm 2.0

MLVs pri 0,5 mg/mL DPPC/DPPG

Podci predstavljaju aritmetičku srednju vrednost \pm SD (n = 3)

Dakle, na osnovu DSC podataka, cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid, termalno i entalpijski ne stabilizuju negativno naelektrisane DPPG MLV-e (slika 4.62, tabela 4.8). Polarne glave DPPG-a su negativno naelektrisane, pored toga on ima dve -OH grupe na glicerol ostatku. Na pH vrenosti 7,0 cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid se nalaze u obliku neutralnog hemiacetalnog oblika i neutralnih hinonoidalnih baza (Brouillard et al., 1982; Brouillard, 1982, 1988), koji ne mogu da interaguju elektrostatički, kao što se može očekivati. Neznatne promene u entalpiji glavne tranzicije, ΔH_{cal} , koje su u principu uočene za cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid mogu biti posledica površne interakcije cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid i lipida na nivou polarnih glava DPPC-a i DPPG-a, kao što je to ranije uočeno za neke lipide (Saija et al., 1995).

4.7. Efekti cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na DPH i TMA-DPH polarizaciju u modelima DPPC i DPPG lipidnih membrana

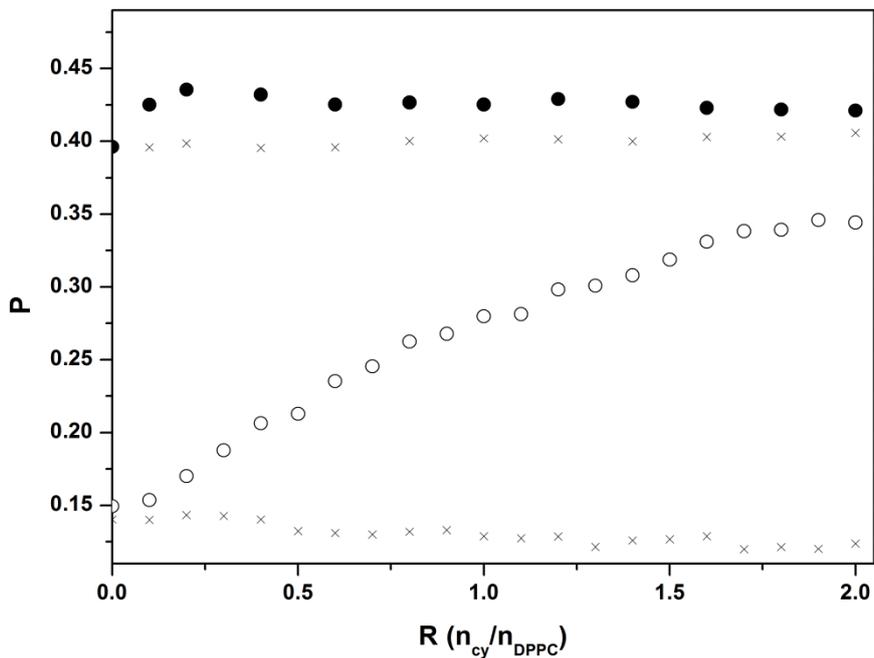
Merenja polarizacije stacionarnog stanja izvršena su za DPPC i DPPG SUV-e na različitim temperaturama (prema tome i pri različitim faznim stanjima lipida) i u prisustvu cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, u različitim molarnim odnosima. Fluorescentna polarizacija merena je uz upotrebu dve fluorescentne probe: DPH i TMA-DPH. Ove dve fluorescentne probe izabrane su zbog toga što se svaka od njih ugrađuje u različit region lipidnog dvostrukog sloja. DPH proba se pozicionira u hidrofobni region dvostrukog sloja, dok je TMA-DPH proba pozicionirana na četvrtom ugljenikovom atomu u prelaznom regionu između hidrofobnog i hidrofilnog dela dvostrukog sloja. Ovakva diferencijalna inkorporacija ovih proba obezbeđuje uvid u strukturne promene izazvane inkorporacijom cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (Arora et al., 2000; Bonarska-Kujawa, Pruchnik, Oszmiański, Sarapuk, & Kleszczyńska, 2011).

Stepen DPH i TMA-DPH fluorescentne polarizacije reflektuje stepen do kojeg se molekuli ovih fluorescentnih proba preorjentišu tokom ekscitovanog stanja. To se vidi kao opadanje u stepenu preorjentacije (i u skladu sa tim povećanje polarizacije) u okruženju u kome je kretanje ograničeno, tj. u blisko (tesno) pakovanom, uređenom (manje fluidnom) lipidnom okruženju. Vrednost polarizacije je najveća (tj. fluidnost najniža) u gel stanju lipida, najniža u tečnom-neuređenom stanju i srednja u tečnom-uređenom stanju (Xu & London, 2000).

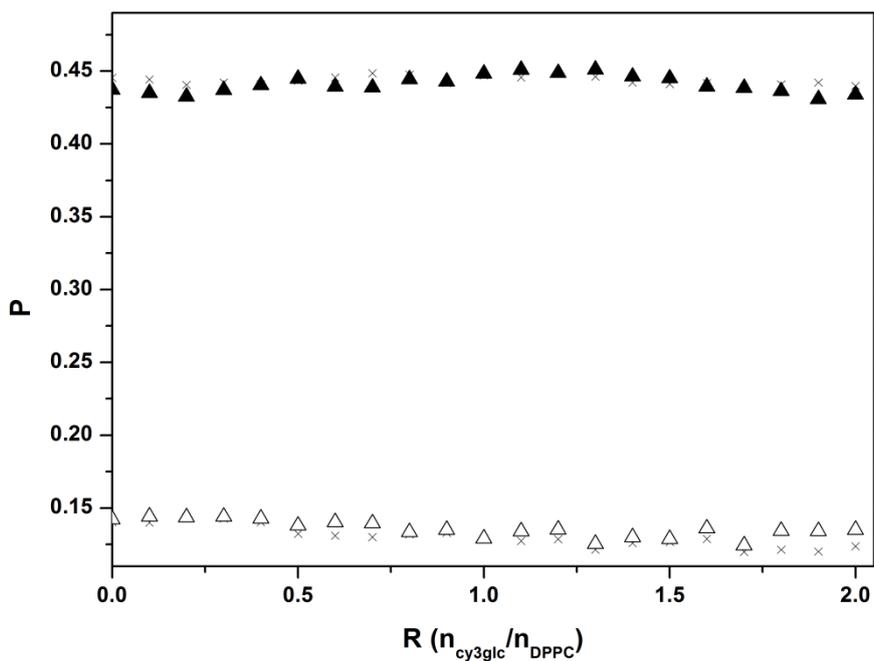
Podaci merenja polarizacije ravnotežnog stanja DPH i TMA-DPH posle dodavanja cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u DPPC SUV-e na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ i $45,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ prikazani su na slikama 4.63 do 4.66.

Da bi se proučio efekat cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na osobine DPPC SUV-a u gel-kristalnom stanju, izvedena su merenja polarizacije stacionarnog stanja DPH i TMA-DPH na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Polarizacija DPH pre dodavanja cijanidina ili cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u DPPC SUV-e bila je 0,396. Dodavanje cijanidina u DPPC povećava polarizaciju DPH u celokupnom području koncentracija, sve do molarnog odnosa 2,0 (slika 4.63). Ovi podaci ukazuju na to da cijanidin ima blagi efekat uređenja membrane na DPPC

SUV-e u gel stanju. U poređenju sa njim, cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid ima niži uticaj na hidrofobni region lipida, gde je DPH ne specifična proba locirana (slika 4.64).

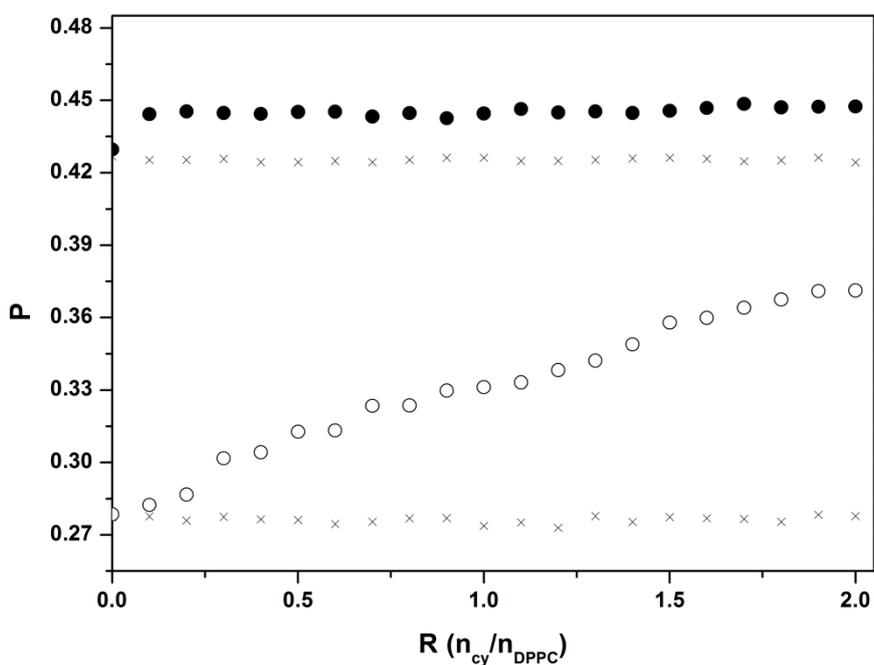


Slika 4.63: Polarizacija (P) DPH fluorofore (\times) pri dodavanju cijanidina u različitom molarnom odnosu (R) u DPPC SUV-e na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (\bullet) i $45,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (\circ).

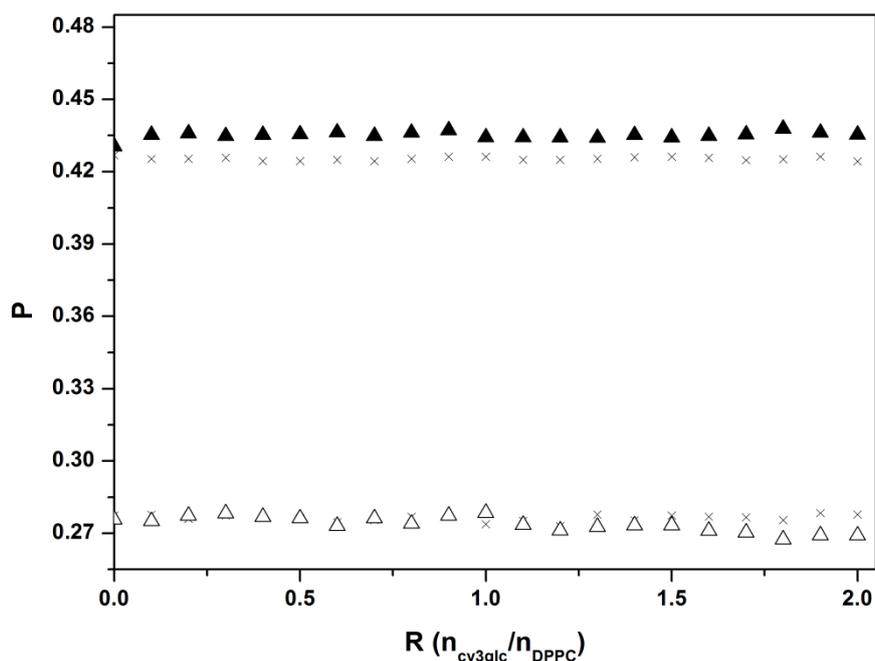


Slika 4.64: Polarizacija (P) DPH fluorofore (\times) pri dodavanju cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u različitom molarnom odnosu (R) u DPPC SUV-e na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (\blacktriangle) i $45,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (\triangle).

Polarizacija TMA-DPH u DPPC SUV-ima na $25,0 \pm 0,1$ °C, pre dodavanja cijanidina ili cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je 0,430, i samo se neznatno povećala nakon dodavanja cijanidina ili cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (slike 4.65 i 4.66). Kao što ukazuje fluorescentna polarizacija na međufazi između hidrofilnog i hidrofobnog dela DPPC SUV membrana (tj. na nivou na kome se TMA-DPH proba inkorporira), cijanidin izaziva mali i konstantan porast polarizacije (uređenje) DPPC SUV-a (slika 4.65).



Slika 4.65: Polarizacija (P) TMA-DPH fluorofore (\times) pri dodavanju cijanidina u različitom molarnom odnosu (R) u DPPC SUV-e na $25,0 \pm 0,1$ °C (\bullet) i $45,0 \pm 0,1$ °C (\circ).



Slika 4.66: Polarizacija (P) TMA-DPH fluorofore (\times) pri dodavanju cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u različitom molarnom odnosu (R) u DPPC SUV-e na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (\blacktriangle) i $45,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (\triangle).

Da bi se proučio efekat cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na osobine DPPC SUV-a u tečnom stanju, izvedena su merenja polarizacije stacionarnog stanja DPH na $45,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (slike 4.63 i 4.64). Temperatura tranzicije DPPC-a je 41°C , tako da su na temperaturi od 45°C DPPC SUV-i u tečnom neuređenom stanju. Pre dodavanja cijanidina ili cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, polarizacija DPH u DPPC SUV-ima na $45,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ bila je 0,147. Sa povećanjem dodavanja cijanidina, DPH polarizacija u DPPC SUV-ima raste, ukazujući da je cijanidin imao jak efekat uređenja membrane u tečnom stanju DPPC SUV-a (slika 4.63), dok cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid nije imao uticaj (slika 4.64).

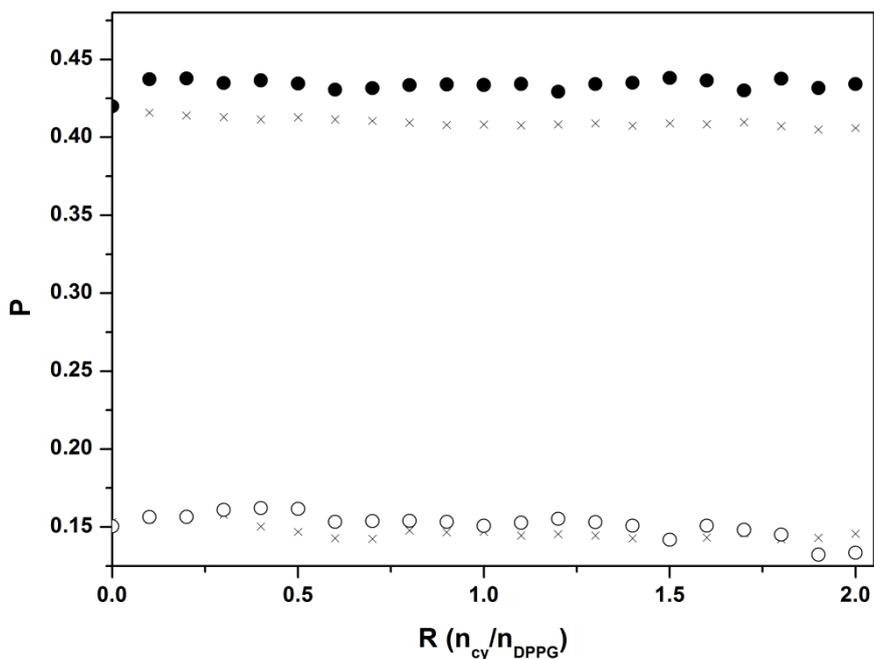
Pre dodavanja cijanidina ili cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, polarizacija TMA-DPH u DPPC SUV-ima u tečnom stanju na $45,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ bila je 0,277, i nakon dodavanja cijanidina, polarizacija raste u celokupnom opsegu koncentracija (slika 4.65). Međutim, pri dodavanju cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida nije bilo efekta na polarizaciju TMA-DPH u DPPC SUV-ima na $45 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (slika 4.66).

Poređenje cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida može objasniti ove efekte, s obzirom na to da cijanidin ima polarnu površinu od 114,29 Å² i particioni koeficijent između oktanol i vode ($\log P_3$) od 3,05, i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid ima polarnu površinu od 193,44 Å² i $\log P_3$ od 0,39. Dakle, cijanidin je manje polaran i manji molekul u poređenju sa cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozidom i ovi podaci ukazuju na to da se na temperaturi od $45 \pm 0,1^\circ\text{C}$, na kojoj su DPPC SUV membrane u tečnom stanju, cijanidin može lakše umetnuti (insertovati) u vodeno-lipidnu međufazu, i možda između ne polarnih acil lanaca DPPC-a.

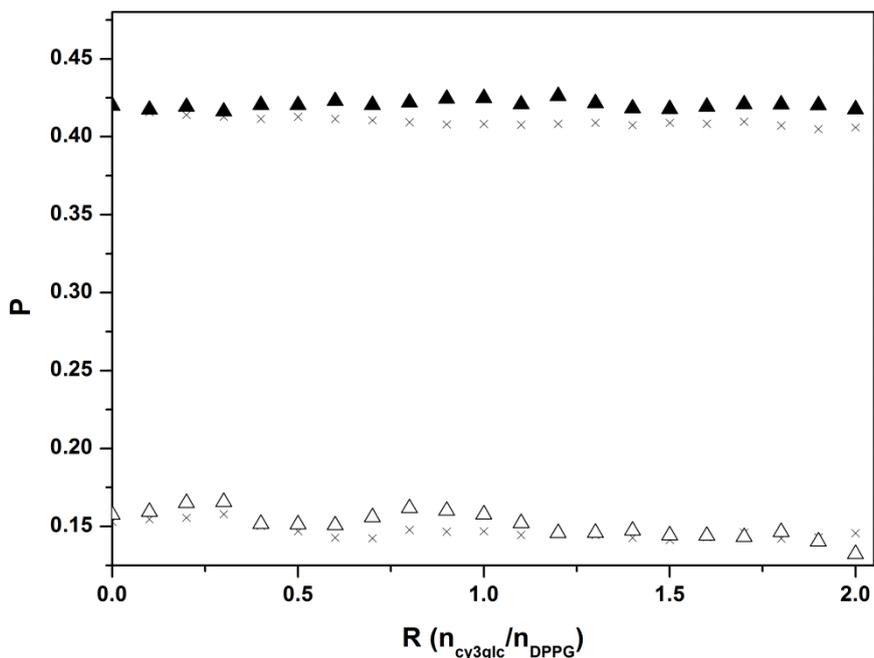
Zbog toga se može postulirati da cijanidin postaje koncentrovaniji u hidrofobnom delu DPPC SUV-a i u prelaznom regionu između hidrofobnog i hidrofilnog dela membrane. Prema Arora et al. (Arora et al., 2000), veći stepen strukturnog uređenja i rigidnosti membrane može redukovati mobilnost slobodnih radikala u lipidnom dvostrukom sloju. Shodno tome, ovo opadanje fluidnosti membrane bi rezultiralo inhibicijom lipidne peroksidacije zbog usporavanja slobodno-radikalnih reakcija (Arora et al., 2000). Interesantno je da ove interakcije nemaju nikakav uticaj na termičku stabilnost DPPC SUV-a, kao što se može videti iz DSC podataka pri molarnom odnosu 2 mol cijanidina prema 1 mol lipida.

Pored neutralnih DPPC lipozoma, ispitali smo efekte cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na lipozome anjonskog lipida DPPG-a. Gornja DSC studija (slika 4.62) pokazala je slično kao što je to primećeno za DPPC lipozome, da cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid nemaju značajan uticaj na termodinamičke parametre "gel - tečno" tranzicije DPPG MLV-a (tabela 4.8). U skladu sa tim, izvedena su merenja polarizacije DPH i TMA-DPH u prisustvu DPPG SUV-a na $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ za model membrane u gel stanju, na $45 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (podaci nisu prikazani) i $55 \pm 0,1^\circ\text{C}$ za model membrane u tečnom-ne uređenom stanju.

Da bi se proučili efekti cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na osobine DPPG membrana u gel stanju, izveli smo merenja polarizacije DPH stacionarnog stanja na $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ sa SUV-ima sastavljenim od DPPG-a (slike 4.67 i 4.68). Polarizacija DPH u ovim DPPG SUV-ima pre dodavanja cijanidina ili cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je 0,420. Dodavanje cijanidina izazvalo je početni porast polarizacije sve do 0,437, dok dodavanje cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida nije izazvalo nikakve promene u polarizacije DPH u DPPG lipidima (slike 4.67 i 4.68). Ovi podaci ukazuju na to da cijanidin povećava uređenost i smanjuje dinamiku fosfolipidnih alkil lanaca u DPH okruženju ili drugim rečima, membrane na početku postaju uređenije kada inkorporiraju cijanidin.

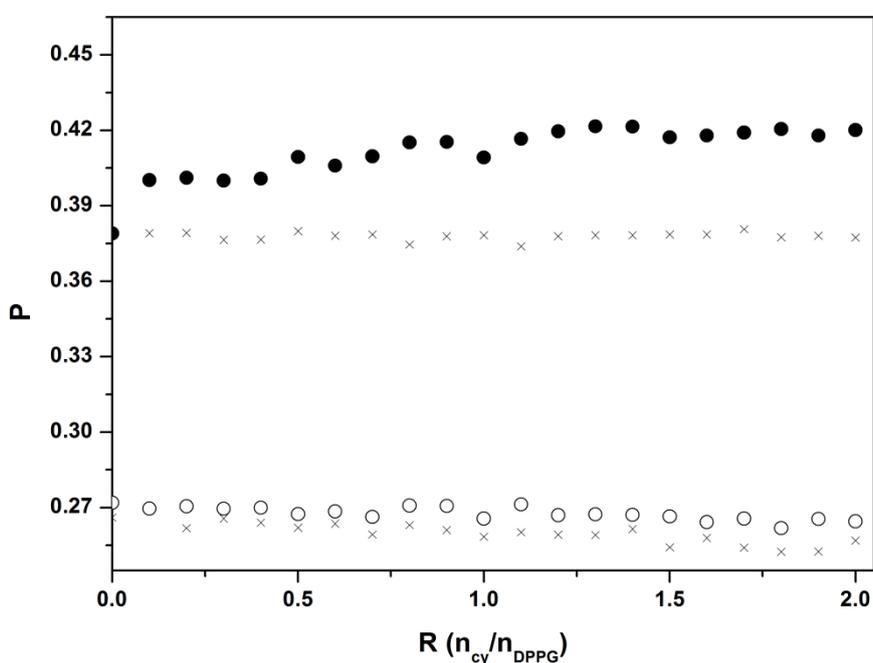


Slika 4.67: Polarizacija (P) DPH fluorofore (\times) pri dodavanju cijanidina u različitom molarnom odnosu (R) u DPPG SUV-e, na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (●) i $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (○).

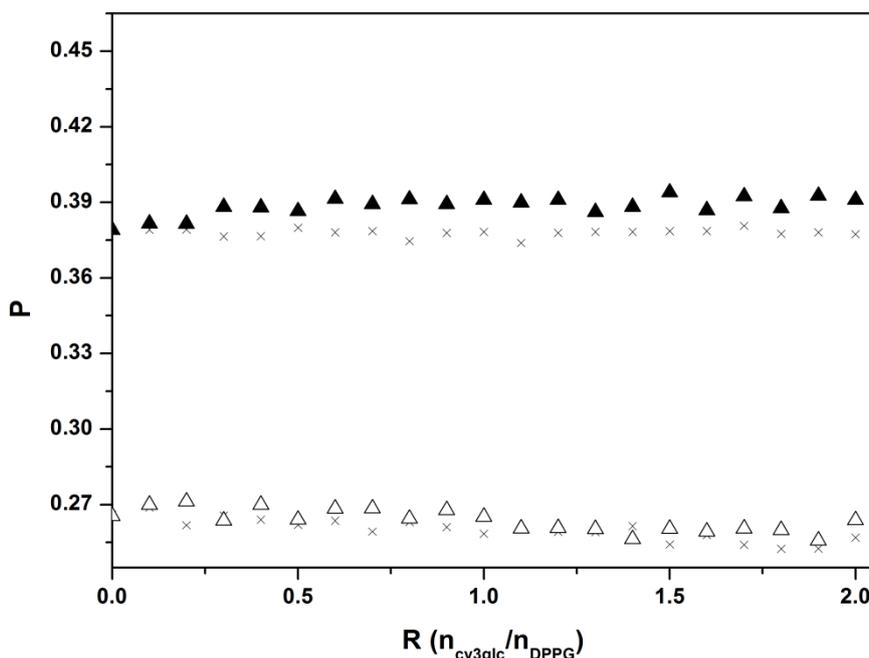


Slika 4.68: Polarizacija (P) DPH fluorofore (\times) pri dodavanju cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u različitom molarnom odnosu (R) u DPPG SUV-e, cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (▲) i $55 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (Δ).

Polarizacija TMA-DPH u DPPG SUV-ima na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, pre dodavanja cijanidina ili cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je 0,379. Cijanidin je izazivao povećanje polarizacije TMA-DPH, dok cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid nije imao značajan efekat na polarizaciju u celokupnom koncentracionom području (slike 4.69 i 4.70). Pošto se TMA-DPH proba locira na međufazi između hidrofobnog i hidrofilnog dela membrane, to ukazuje da na ovaj deo lipidnog dvosloja u gel stanju utiče cijanidin, ali ne i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid.



Slika 4.69: Polarizacija (P) TMA-DPH fluorofore (\times) pri dodavanju cijanidina u različitom molarnom odnosu (R) u DPPG SUV-e, na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (\bullet) i $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (\circ).



Slika 4.70: Polarizacija (P) TMA-DPH fluorofore (\times) pri dodavanju cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u različitom molarnom odnosu (R) u DPPG SUV-e, cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (\blacktriangle) i $55 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (\triangle).

Kao što je gore naznačeno, uticaj cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na osobine DPPG SUV-a u tečnom stanju, ispitivan je na temperaturi od $55 \pm 0,1^\circ\text{C}$, gde je DPH polarizacija pre dodavanja cijanidina ili cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila 0,154. Ovi DPPG SUV-i bili su tečnom neuređenom stanju, i dodavanje cijanidina ili cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida nije imalo značajan efekat na DPH polarizaciju (slike 4.67 i 4.68). Ovi podaci ukazuju da cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid nemaju uticaj na osobine DPPG SUV membrana na ovoj temperaturi. Slični rezultati dobiveni su upotrebom TMA-DPH probe. Polarizacija TMA-DPH u DPPG SUV-ima na $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ pre dodavanja cijanidina ili cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je 0,270, i nije se menjala nakon njihovog dodavanja (slike 4.69 i 4.70).

Dakle na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, cijanidin utiče na strukturu DPPG lipozoma u gel stanju, dok cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid ne utiče. Nikakav efekat cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na polarizaciju nije uočen u celokupnom koncentracionom području upotrebom DPH ili TMA-DPH membranskih proba. Vrlo je verovatno da cijanidin i pogotovu cijanidin 3-*O*- β -

glukopiranozid, koji su na pH 7,0 u neutralnom obliku, ne interaguju sa negativno naelektrisanim grupama DPPG-a. Oni mogu da interaguju pri površini ovih lipozoma (što bi na početku povećalo rigidnost površine), a zatim da se delimično umetnu između vodeno-lipidne međufaze, izazivajući time povećanje rigidnosti acil lanaca, dublje u lipozomskom dvosloju. Ovaj zaključak objašnjava podatke dobijene DSC merenjima, koji pokazuju da cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid ne utiču na termičku stabilnost DPPG lipozoma (nije uočeno povećanje T_m).

Naši podaci sugerišu da cijanidin utiče na hidrofobni deo i prelazni region između hidrofobnog i hidrofilnog dela DPPC lipozoma u tečnom stanju modifikovanjem uređenosti pakovanja lipida. Cijanidin tako povećava uređenost i smanjuje dinamiku fosfolipidnih acil lanaca lipozoma u tečnom neuređenom stanju. Izgleda da se to dešava, zbog toga što kada su membrane lipozoma u tečnom stanju, manje polarni i manji molekuli cijanidina (u poređenju sa molekulima cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida) mogu lakše da se umetnu (insertuju) između nepolarnih acil lanaca DPPC-a, i na taj način lakše interagovati sa njima. Polarniji i glomazniji molekuli cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida (u poređenju sa molekulima cijanidina) imaju veoma malo uticaja na strukturu i energiju ovih neutralnih DPPC lipozoma, bez obzira na to da li se oni nalaze u gel ili tečnom obliku. Slični podaci su prijavljeni od strane Bonarska-Kujawa za određene interakcije antocijanina sa eritrocitima i membranama lipozoma (Bonarska-Kujawa, Pruchnik, Oszmiański, Sarapuk, & Kleszczyńska, 2011). Oni su zaključili da antocijanini izazivaju neznatne promene u strukturi membrane i da je njihovo delovanje ograničeno na površinu membrane, što ukazuje da su supstance efikasni i bezbedni antioksidansi (Bonarska-Kujawa, Pruchnik, Oszmiański, Sarapuk, & Kleszczyńska, 2011).

Prethodno je pokazano da ekstrakt borovnice ne utiče na polarizaciju DPH u sistemu model membrana (u tečnom stanju) sastavljenih od fosfatidilholina i sfingomijelina u molarnom odnosu 2,4:1 (Bornsek et al., 2012). Pored toga, nije uočena promena u polarizaciji pri upotrebi cijanidin 3-glukozida, delfinidin 3-glukozida i njihovih aglikona (Bornsek et al., 2012).

Cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid nisu imali značajne efekte na termičku stabilnost neutralnih DPPC ili negativno naelektrisanih DPPG lipozoma pri molarnim odnosima do 2:1. U prisustvu cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, entalpija glavnog prelaza DPPC i DPPG lipozoma se ne menja. Podaci iz polarizacionih merenja, uz upotrebu DPH i TMA-DPH proba, sa DPPC lipozomima u gelu i tečnom stanju pokazali su da

cijanidin može uticati na uređenost pakovanja lipida DPPC lipozoma koji se nalaze i u gel i tečnom stanju, dok je u slučaju DPPG lipozoma uočena interakcija samo sa lipozomima u gel stanju. Cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid, nije imao značajne efekte na pakovanje lipida DPPC lipozoma bez obzira na to da li su oni u gel ili tečnom stanju.

Cijanidin pokazuje izvesne površinske interakcije sa DPPC i DPPG lipozomima, dok cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid nema afinitet za vezivanje na površinu neutralnih DPPC i negativno naelektrisanih DPPG lipozoma. Na pH vrenosti 7,0 cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid se nalaze u obliku neutralnog hemiacetalnog oblika i neutralnih hinonoidalnih baza. Neznatne promene u entalpiji glavne tranzicije, ΔH_{cal} , koje uočene za cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid mogu biti posledica površne interakcije cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid i lipida na nivou polarnih glava DPPC-a i DPPG-a. Površinsko vezivanje cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida za neutralne liposome može biti odgovorno za njihovu sposobnost da spreče oksidaciju lipida, a samim tim i za njihovu zaštitu ćelijskih membrana. U stvari, sugerisano je da sposobnost antocijanina da particioniraju u ćelijske membrane i rezultirajuće ograničenje fluidnosti ovih membrana može sterno ometati difuziju slobodnih radikala (Arora et al. 2000, 1998). Uočeni nedostatak efekata cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na polarizaciju DPH i TMA-DPH proba u DPPG lipozomima u tečnom neuređenom stanju na $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, izgleda da je posledica kinetičke nestabilnosti cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ i njihovih negativno naelektrisanih proizvoda razgradnje.

Ukupna polarna površina i polarnost flavonoida su dve glavne karakteristike koje utiču na većinu interakcija sa modelima lipidnih membrana, a flavonoida se vezuju na površinu membrana pretežno vodoničnim vezama. Ovde smo prvi put pokazali da površinsko naelektrisanje membrane i naelektrisanje na cijanidinu i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozidu igraju važnu ulogu u vezivanju. Zbog toga su pored ispitivanja sastava i strukture flavonoida od velikog značaja i dalja istraživanja o ulozi membranskog naelektrisanja u njihovoj interakciji sa flavonoidima.

5. ZAKLJUČAK

- Veza između strukture, spektralnih karakteristika i boje aglikona - cijanidina i uticaj njegove 3-glukozidne supstitucije do cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida proučavani su u funkciji pH vrednosti, uz upotrebu kombinacije tehnika (ultraljubičaste i vidljive spektrofotometrija (UV-Vis spektrofotometrija), kolorimetrija i tačne hromatografije visokih performansi (HPLC-ESI/MS)).
- Uticaj uvođenja glukozil grupe u C-3 položaj cijanidina, do oblika cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, veoma zavisi od pH vrednosti, i imao je različite efekte na strukturu, spektralne karakteristike i boju, u zavisnosti od pH vrednosti.
- Pomoću UV-Vis spektrofotometrije utvrđeno je, da je u pH području od 1 do 13, cijanidin pretežno postojao u tri spektroskopski stabilna oblika, dok je cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid pokazivao dva stabilna oblika. U slučaju cijanidina, prvi prelaz javljao se na pH 4,0, drugi na pH 9,0, a treći na pH > 12,0, dok se za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid prvi, relativno širok prelaz nalazio u pH oblasti od 3,5 do 7,0, a drugi na pH > 12,0.
- Cijanidin je pokazao veću otpornost na promenu boje u većem delu pH područja nego cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid.
- Glukozidna supstitucija aglikona u položaju 3 (cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid) u poređenju sa ne supstituisanim aglikonom (cijanidinom), indukuje relativno veliki pad ugla tona boje (h_{ab}) u pH oblasti od 3 do 8, i u alkalnim rastvorima na pH > 9.
- Kolorimetrijska analiza rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida pokazala je da ovi rastvori pokazuju ogromne varijacije u hromatskim tonalitetima (h_{ab}), mada je njihov spektralni položaj apsorpcionih maksimuma u vidljivoj oblasti ($\lambda_{max-vis}$) ostao stabilan; važi i obrnuto, rastvori sa pomerenim spektrima imali su isti osnovni tonalitet. Zbog toga su $\lambda_{max-vis}$ rastvora cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na različitim pH vrednostima bile u lošoj korelaciji odgovarajućim h_{ab} vrednostima.
- Cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid imao je značajno veće vrednosti hrome (C^*) od cijanidina u skoro celokipnom pH području, što ukazuje na uticaj 3-glukozidacije na zasićenost boje; Naime, prisustvo 3-glukozidne supstitucije snažno utiče na povećanje C^* , što je u dobroj saglasnosti sa obrazacem promene molanih absorptivnosti (ϵ).

- Za rastvore cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida uočen je potpuno različit obrazac u promeni svetline boje (L^*) sa pH vrednošću. U ovom slučaju nismo našli jasan obrazac o uticaju 3-glukozidne supstitucije na svetlinu boje.
- U poređenju sa cijanidinom, ukupna razlika boja, (ΔE^*_{ab}), bila je viša za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid u skoro celokupnoj pH oblasti (osim najkiselije i najalkalnije oblasti), što je dokaz niže stabilnosti boje (veće osetljivosti na promene pH vrednosti) cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u poređenju sa cijanidinom, a to je posledica formiranja različitih formi iz cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida.
- pH vrednost rastvora u kome je vršeno rastvaranje imala je veliki uticaj na različite forme cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, dobijene posle rastvaranja u izabranim puferima pre elektrosprej jonizacije/maseno spektrometrijske (ESI-MS) analize.
- Pomoću HPLC i ESI-MS, za cijanidin na pH 2,0; 4,0; 7,0 i 9,0, ispitivan je pik sa m/z 286. Na pH 9,0, ovaj pik bio je kinetički nestabilan. Na svim ovim ispitivanim pH vrednostima cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid se u masenoj spektrometriji pojavljivao kao pik sa m/z 448.
- Pik karakterističan za aglikonski deo, cijanidin javljao se na pH 2,0; 4,0 i 7,0 sa m/z 286. Tokom 1090 minuta, ovaj aglikonski pik, karakterističan za cijanidin sa m/z 286 na pH 2,0; 4,0 i 7,0 opao je za 97,0%; 77,5% i 47,8%, respektivno. Pik sa m/z 286 uočen je na pH 9,0 neposredno nakon rastvaranja cijanidina, mada je tokom vremenskog perioda od 218 minuta u potpunosti nestao.
- Na svim ispitivanim pH vrednostima, cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid se javljao kao pik sa m/z 448. Analiza je pokazala da je tokom 1090 min, cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid degradirao 2,8% na pH 2,0; 12,5% na pH 4,0; 35,5% na pH 7,0 i 85,5% na pH 9,0. Razlika od m/z 162 između pikova sa m/z 448 i 286, odgovara glukozi.
- Stabilnost aglikonskog dela, povećavala se povećanjem pH vrednosti, do pH 9,0, dok je 3-glukozidna supstitucija aglikona rezultira suprotnim efektom, stabilnost cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida opadala je sa povećanjem pH vrednosti.

- Glukozidacija ima različit efekat u zavisnosti od pH vrednosti. Na pH < 4, 3-glukozidna supstitucija rezultira ekstremno visokim hiperhromnim efektom.
- Rezultati dobijeni merenjima pomoću UV-Vis spektrofotometrije potvrđeni su rezultatima merenja boje. Molarne absorptivnosti (ϵ) cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na pH < 4 pratile su sličan obrazac promene jačine boje kao i hroma. Cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je imao značajno veće vrednosti hrome na pH < 4 nego nego cijanidin. U isto vreme na pH < 3, cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je pokazao veću otpornost na promene u boji od cijanidina. Ovo je potvrđeno rezultatima HPLC-DAD-ESI/MS analize, koji jasno pokazuju da 3-glukozidna supstitucija jako poboljšava stabilnost aglikonskog dela na pH 2,0 i pH 4,0.
- Prisustvo ove 3-glukozidne grupe jako favorizuje hidrataciju pirilijum jezgra na pH > 4, što rezultata visokim hipohromnim efektom, koji se javlja kao posledica visokih količina formiranih bezbojnih struktura (hemiacetalnog i halkonskog oblika). U skladu sa tim, merenja boje pokazuju niske vrednosti hrome za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid u ovom regionu.
- Rezultati HPLC-DAD-ESI/MS pokazuju nisku stabilnost i za cijanidin i za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid.
- Uvođenje glukozidne grupe u C-3 položaj aglikonskog dela, do oblika cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, jako zavisi od pH vrednosti, i ima različite efekte na strukturu, spektralne karakteristike i boju, u zavisnosti od pH vrednosti.
- Apsorpcioni i fluorescentni emisioni spektari cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida proučavani su u vodenom rastvoru na pH 5,5. Poređenje apsorpcionih spektara cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na pH 5,5 sa odgovarajućim apsorpcionim spektrima njihovih flavilijum katjona (pH 0,4) pokazuje da u vodenom rastvoru, na pH 5,5, uglavnom postoje bezbojni oblici cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida. Talasne dužine za najefikasniju ekscitaciju fluorescencije molekula cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, nalazile su se u UV oblasti spektra.

- U skladu sa UV-Vis apsorpcionim spektrima, najefikasnija ekscitacija molekula cijanidina izmerena je na prvom UV apsorpcionom maksimumu na 220 i 230 nm, gde je molarna apsorptivnost jedinjenja najveća. Drugi UV apsorpcioni maksimum cijanidina, manjeg intenziteta nalazio se na oko 280 nm, i u skladu sa tim, druga efikasna ekscitacija molekula cijanidina bila je na 270 i 280 nm. Utvrđeno je da cijanidin ima fluorescentni emisioni spektar sa dve trake, prvu u UV oblasti sa maksimumom na 310 nm i drugu manjeg fluorescentnog emisionog intenziteta u vidljivoj oblasti sa maksimumom na 615 nm.
- U skladu sa UV-Vis apsorpcionim spektrima, najefikasnija ekscitacija molekula cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida izmerena je na 220 i 230 nm, gde je molarna apsorptivnost jedinjenja najveća. Drugi UV apsorpcioni maksimum cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, manjeg intenziteta nalazio se na oko 280 nm, i u skladu sa tim, druga efikasna ekscitacija molekula cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bila je na 300 i 310 nm. Utvrđeno je da cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid ima fluorescentni emisioni spektar sa maksimumom na 380 nm, ali ne pokazuje fluorescentnu emisiju u vidljivoj oblasti.
- Ako se uporede fluorescentni emisioni spektri cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida može se videti da je intenzitet fluorescentne emisije cijanidina značajno veći od intenziteta fluorescentne emisije cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida. Ovi rezultati ukazuju na uticaj 3-glukozidne supstitucije na C-3 atomu aglikona (do oblika cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida) na značajano smanjenje intenziteta fluorescentne emisije i gašenje fluorescencije u oblasti talasnih dužina vidljivog dela spektra.
- Fluorescentna spektroskopija je korisna, visoko osetljiva tehnika za ne destruktivno praćenje antocijaninskih jedinjenja u hrani i piću.
- Varijacija i intenzitet boje i stabilnost cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na različitim pH vrednostima ispitivani su (2,0; 4,0; 7,0 i 9,0) tokom inkubacije na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, u periodu od 8 sati. Dobijeni rezultati ukazuju na visok uticaj pH vrednosti vodenog rastvora na dobijene spektroskopske profile cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida.

- Na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid su pokazali velike razlike u varijaciji i intenzitetu boje, stabilnosti i BI. Pri određenoj pH vrednosti, te razlike uglavnom rezultiraju iz strukture (prisustva šećera na aglikonu).
- Počevši od najkiselijeg rastvorana na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, porast pH vrednosti izaziva batohromno pomeranje apsorpcionih maksimuma u vidljivoj oblasti spektra za sve ispitivane pH vrednosti (osim pH 4,0 za cijanidin), dok prisustvo 3-glukozidne supstitucije dovodi do hipsohromnog pomeranja.
- Poređenjem molarnih apsorptivnosti cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, uočen je visoki uticaj 3-glukozidne supstitucije: 3-glukozidna supstitucija je jako povećavala molarnu apsorptivnost aglikonskog dela i uticala na povećanje intenziteta boje u alkalnom regionu. Tokom stajanja, prisustvo 3-glukozidne supstitucije jako je uticalo na povećanje molarne apsorptivnosti na svim ispitivanim pH vrednostima kao i na povećanje stabilnosti na pH 2,0 i 4,0.
- Neočekivano, spektroskopska analiza na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ je pokazala nisku stabilnost aglikona na pH 2,0, bez obzira na činjenicu da se nalazi u obliku flavilijum katjona. Posle 8 sati inkubacije cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida i cijanidina na pH 2,0 i $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$, 99% cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida i samo 27% cijanidina ostalo je nepromenjeno.
- Samo na pH 7,0 stabilnost cijanidina bila je veća od stabilnosti cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, dok je na svim ostalim pH vrednostima cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid pokazivao veću stabilnost na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.
- Sa strukturne tačke gledišta, može se pretpostaviti da 3-glukozidna supstitucija jako povećava stabilnost aglikonskog dela prema nukleofilnom napadu molekula vode na C-2 položaj aglikona, koji dovodi do formiranja bezbojnih oblika. Ove činjenice su važne sa tačke gledišta moguće upotrebe ovih jedinjenja kao prehrambenih boja, ukazujući na veću moć bojenja i veću stabilnost cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u odnosu na cijanidin, pri većini pH vrednosti (sa izuzetkom neutralne sredine, pH 7,0) na sobnoj temperaturi. 3-glukozidna supstitucija je odgovorna za intenzitet boje cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u alkalnom regionu.

- Na osnovu dobijenih rezultata smatramo da je BI osetljivi pokazatelj stabilnosti cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na različitim pH vrednostima i na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Na pH 2,0 i 4,0 cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je bio stabilan i imao je veoma niske i konstantne BI vrednosti. Na pH 7,0 i 9,0 cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je bio nestabilan, dok su BI vrednosti sve vreme postepeno rasle. Cijanidin je bio nestabilan pri svim ispitivanim pH vrednostima, što je bilo praćeno postepenim porastom BI vrednosti tokom stajanja. Tokom vremena cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid je dobio žućkastu nijansu na pH 7,0, dok je cijanidin dobio žućkastu nijansu na pH vrednostima 4,0 i 9,0.
- Varijacije boje, intenzitet boje, termička stabilnost i braon indeks (BI) cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u neutralnom vodenom rastvoru (na pH 7,0) i u uslovima povišene temperature ($55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$), koji simuliraju ubrzano starenje hrane bili su različiti.
- Na $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ vidljivi apsorpcioni maksimumi cijanidina imali su više vrednosti nego kod cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, ukazujući na uticaj 3-glukozidne supstitucije na hipsohromno pomeranje vidljivih apsorpcionih maksimuma u neutralnoj sredini. Oba proučavana jedinjenja pokazivala su hipsohromni pomak u vidljivom delu spektra tokom stajanja. Molarne apsorptivnosti (ϵ) cijanidina bile su znatno veće od onih za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid sve vreme. Prisustvo 3-glukozidnog ostatka značajno je smanjivalo intenzitet boje cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida u odnosu na cijanidin pod datim uslovima (neutralni rastvor i povišena temperatura).
- Cijanidin je pokazao veću termičku stabilnost u odnosu na cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid. Ovi rezultati ukazuju na uticaj 3-glukozidne supstitucije na smanjenje stabilnosti cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida pod uslovima povišene temperature u neutralnom vodenom rastvoru. Ovi podaci jasno ukazuju na veću moć bojenja cijanidina u odnosu na cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid u neutralnim vodenim rastvorima (pH 7,0).

- Postepeni gubitak boje na $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ rastvora cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida bio je praćen povećanjem BI. Za cijanidin BI je bio 0,63 i < od 1, dok je za cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid BI bio 1,09 i > od 1 sve vreme, dajući žućkastu nijansu vodenom rastvoru cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida. Cijanidin je pokazao znatno veći intenzitet boje i veću termičku stabilnost u odnosu na cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid. Ove činjenice su važne sa tačke gledišta moguće upotrebe ovih jedinjenja kao prehrambenih boja, ukazujući na veću moć bojenja i veću stabilnost cijanidina u odnosu na cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid, u neutralnoj sredini (pH 7,0).
- Interakcije cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida sa modelima lipidnih membrana koji se međusobno razlikuju u površinskom naelektrisanju i faznom stanju ispitivani su pomoću diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i fluorescentne emisije polarizacione spektrometrije.
- Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija pokazala je da cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid nemaju uticaj na fazni prelaz cviterjonskih lipozoma sastavljenih od 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoholina (DPPC) i negativno naelektrisanih lipozoma sastavljenih od 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerola (DPPG) na pH 7,0. Cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid nisu imali značajne efekte na termičku stabilnost neutralnih DPPC ili negativno naelektrisanih DPPG lipozoma pri molarnim odnosima do 2:1. U prisustvu cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida, entalpija glavnog prelaza DPPC i DPPG lipozoma se nije menjala.
- Emisiona polarizaciona spektrometrija je uz upotrebu 1,6-difenil-1,3,5-heksatriena (DPH) i N,N,N-trimetil-4-(6-fenil-1,3,5-heksatrien-1-il)fenilamonijum p-toluensulfonata (TMA-DPH), pokazala da cijanidin blago povećava polarizaciju DPPC i DPPG lipozoma u gel stanju na $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Uz upotrebu DPH i TMA-DPH proba uočen je značajan uređujući efekat cijanidina na DPPC lipozome u tečnom stanju na $45,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, dok na DPPG lipozome u tečnom stanju na $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ cijanidin nije imao uticaj. Cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid nije izazvao nikakve promene u polarizaciji DPPC ili DPPG lipozoma, bez obzira na to da li su se nalazili u gel ili tečnom neuređenom stanju.

- Podaci iz polarizacionih merenja, uz upotrebu DPH i TMA-DPH proba, sa DPPC lipozomima u gel i tečnom stanju pokazali su da cijanidin može uticati na uređenost pakovanja lipida DPPC lipozoma koji se nalaze i u gel i tečnom stanju, dok je u slučaju DPPG lipozoma uočena interakcija samo sa lipozomima u gel stanju. Cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid, nije imao značajne efekte na pakovanje lipida DPPC lipozoma bez obzira na to da li su oni u gel ili tečnom stanju.
- Cijanidin pokazuje izvesne površinske interakcije sa DPPC i DPPG lipozomima, dok cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid nema afinitet za vezivanje na površinu neutralnih DPPC i negativno naelektrisanih DPPG lipozoma. Neznatne promene u entalpiji glavne tranzicije (ΔH_{cal}), koje su u principu uočene za cijanidin i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozid mogu biti posledica površinske interakcije cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida i lipida na nivou polarnih glava DPPC-a i DPPG-a.
- Površinsko vezivanje cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida za neutralne liposome može biti odgovorno za njihovu sposobnost da spreče oksidaciju lipida, a samim tim i za njihovu zaštitu ćelijskih membrana.
- Uočeni nedostatak efekata cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na polarizaciju DPH i TMA-DPH proba u DPPG lipozomima u tečnom neuređenom stanju na $55,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, izgleda da je posledica kinetičke nestabilnosti cijanidina i cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida na ovoj temperaturi i njihovih negativno naelektrisanih proizvoda razgradnje.
- Ukupna polarna površina i polarnost flavonoida su dve glavne karakteristike koje utiču na većinu interakcija sa modelima lipidnih membrana, a flavonoidi se vezuju na površinu membrana pretežno vodoničnim vezama. Ovde smo prvi put prikazali da površinsko naelektrisanje membrane i u slučaju cijanidina i u slučaju cijanidin 3-*O*- β -glukopiranozida igra važnu ulogu u vezivanju. Zbog toga su pored ispitivanja sastava i strukture flavonoida od velikog značaja i dalja istraživanja o ulozi membranskog naelektrisanja u njihovoj interakciji sa flavonoidima.

6. SUMMARY

- The relationships between structure, spectral characteristics, and colour of the aglycone moiety of cyanidin and its 3-glucosidic substitution in cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside were studied as a function of pH, using a combination of techniques (ultraviolet and visible spectrophotometry (UV-Vis spectrophotometry), colorimetry, high-performance liquid chromatography (HPLC-ESI/MS)).
- The influence of the introduction glucosyl group at the C-3 position of cyanidin, to form cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside, is highly pH dependant, and had a different effect on the structure, spectral characteristics, and colour, depending on the pH value.
- Using UV-Vis spectrophotometry, it has been found, that in the pH range from 1 to 13, cyanidin exists predominantly in three spectroscopic stable forms, while cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside shows only two. In the case of cyanidin, the first transition appeared at pH 4.0, the second at pH 9.0, and the third at a pH > 12.0, while for cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside the first the relatively broad transition was in the pH range from 3.5 to 7.0, and the second at a pH > 12.0.
- Cyanidin shows a greater resistance to colour changes for most of the pH range than cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside.
- The glucosidic substitution at the aglycone in the 3 position (cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside) compared to the non-substituted aglycone (cyanidin), induced a relatively large decrease in the hue angle (h_{ab}) in the pH range from 3 to 8, and in alkaline solutions with pH > 9.
- The colorimetric analysis of the cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside solutions demonstrate that these solutions show huge variations in their chromatic tonalities (h_{ab}), although their spectral positions of absorbance maxima in the visible range of spectra ($\lambda_{\max\text{-vis}}$) effectively remained stable; then, *vice versa*, these solutions with shifted spectra share the same basic tonality, so $\lambda_{\max\text{-vis}}$ of the cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside solutions at the various pHs correlated poorly with the corresponding h_{ab} .

- Cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside had significantly higher chroma values (C^*) than cyanidin across almost the entire pH range, which reveals the impact of the 3-glucosylation on the colour saturation; namely, the presence of the 3-glucosidic substitution strongly affects the increase in C^* , which is in agreement with the pattern of molar absorptivities (ϵ).
- Different patterns in the changes in the lightness, (L^*) with pH were observed for cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside. A clear pattern of the impact of the 3-glucosidic substitution on L^* was not apparent.
- The colour differences (ΔE^*_{ab}), were higher for cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside compared to cyanidin across the whole pH range (except for the most acidic and most alkaline regions), which is evidence of the lower colour stability (higher sensitivity to pH changes) of cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside compared to cyanidin, due to the formation of different forms from cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside.
- The pH of dissolution has a large influence on the different forms of cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside obtained after dissolution in the selected buffers prior to the electro spray ionisation/ mass spectrometry (ESI-MS) analysis.
- Using HPLC and ESI-MS, for cyanidin at pH 2.0, 4.0, 7.0 and 9.0, the peak with m/z 286 was examined. At pH 9.0, this peak was kinetically unstable. At all of these examined pH's, cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside appears in mass spectrometry as a peak with m/z 448.
- The peak characteristic for the aglycone moiety is observed for cyanidin at pH 2.0, 4.0 and 7.0, with m/z 286. During the 1090-min, this cyanidin aglycone peak with m/z 286 at pH 2.0, 4.0 and 7.0 decreased by 97.0%, 77.5% and 47.8%, respectively. The peak with m/z 286 is observed at pH 9.0 immediately after the dissolution of cyanidin, although during the time period of 218 min this completely disappeared.
- At all of the pH's examined, cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside appears as a peak with m/z 448. The analysis revealed that during the 1090-min, cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside was degraded by 2.8% at pH 2.0, 12.5% at pH 4.0, 35.5% at pH 7.0 and 85.5% at pH 9.0. The difference of m/z 162 seen between the peaks with m/z 448 and 286 corresponds to the glucose.

- In summary, introduction of the glucosyl group at C-3 at the aglycone moiety of cyanidin, to form cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside, results in a slight hypochromic effect. This glucosidation has different effects according to pH. At a pH < 4, this 3-glucosidic substitution results in an extremely high hyperchromic effect.
- The glucosidation has different effects according to pH. At a pH < 4, this 3-glucosidic substitution results in an extremely high hyperchromic effect.
- These results of UV-Vis spectrophotometry measurement are confirmed by results of colour measurements. The molar absorptivities (ϵ) of cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside at pH < 4 followed a similar colour-strength pattern to chroma. The cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside had a significantly higher chroma value at a pH < 4 than cyanidin. At the same time at pH < 3, cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside shows a greater resistance to colour changes than cyanidin. These are confirmed by results of HPLC-DAD-ESI/MS, which clearly show that 3-glucosidic substitution strongly improved stability of aglycone moiety at pH 2.0 and pH 4.0.
- The presence of this 3-glucosyl group strongly favours hydration of the pyrylium nucleus, which at pH > 4 results in a high hypochromic effect, caused by the high amounts of colourless structures formed (the hemiacetal and the chalcone forms). Accordingly, color measurements show low values of chroma for cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside in this region.
- The results of HPLC-DAD-ESI/MS show low stability for the both, cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside.
- The influence of the introduction glucosyl group at C-3 at the aglycone moiety, to form cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside, is highly pH dependant, and had different effects on the structure, spectral characteristics, and colour, depending of the pH value.

- The absorption and fluorescence emission spectra of cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside at pH 5.5 in aqueous solution have been studied. The comparison of absorption spectra of cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside at pH 5.5 with the corresponding absorption spectra of their flavylium cations (at pH 0.4) shows that in water at pH 5.5, mainly cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside colorless forms exist. The wavelengths for the most effective excitation of fluorescence of cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside were in the UV range.
- According to the UV-Vis absorption spectra, the most effective fluorescence excitations for cyanidin were measured at the first UV absorption maxima 220 and at 230 nm, where molar absorptivities of the compound are high. The second less intensive UV absorption maxima of cyanidin was at around 280 nm, and accordingly, the second effective fluorescence excitation were at 270 and 280 nm. It was found that cyanidin has fluorescence emission spectra with two bands, the first one in UV range, with the fluorescence emission maximum at 310 nm and the second one in the visible range with a lower fluorescence emission intensity and with maximum at 615 nm.
- According to the UV-Vis absorption spectra, the most effective excitation of fluorescence is measured at 220 and at 230 nm, where molar absorptivities of the compound are high. The second less intensive UV absorption maxima of cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside was at around 280 nm, and accordingly, the second effective excitation of fluorescence were at 300 and 310 nm. It was found that cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside has fluorescence emission spectra with maximum at 380 nm, and does not show fluorescence emission in the visible range.
- If we compare fluorescence emission spectra of cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside it can be seen that fluorescence emission intensity for cyanidin is significantly higher than that for cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside. These results reveal the impact of 3-glucosidic substitution at C-3 of aglycone (to form cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside) on the significant decrease in fluorescence emission intensity, and the disappearance of the fluorescence emission in visible wavelength range.
- Fluorescence spectroscopy is a useful high sensitive technique for a non destructive monitoring of anthocyanin compounds in food and drinks.

- The colour variation, colour intensity and stability at various pH values (2.0, 4.0, 7.0 and 9.0) of cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside was investigated during a period of 8 hours incubation at $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. The obtained results indicated a high impact of the pH value of the aqueous solution on obtained spectroscopic profiles of cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside.
- At $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside display great differences in colour variation, colour intensity, stability and BI. At an obtained pH value, such differences mainly result from the structure (presence of the sugar moieties at aglycone).
- Starting with the most acidic solutions, at $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$, increments in pH induce bathochromic shifts of absorbance maximum in the visible range for all the examined pH values (except pH 4.0 for cyanidin), while the presence of the 3-glucosidic substitution induces a hypsochromic shift.
- Comparing the molar absorptivities for cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside at $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ there is an evident high impact of the 3-glucosidic substitution on the molar absorptivity of the aglycone moiety: the 3-glucosidic substitution strongly increases molar absorptivity of the aglycone moiety, and it is favorable for colour intensity in the alkaline region. During the storage, the presence of the 3-glucosidic substitution strongly increases molar absorptivities at all the examined pH values and improves stability at pH 2.0 and 4.0.
- Surprisingly, spectrometric analysis at $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ revealed a low stability for aglycone at pH 2.0 nevertheless being findings in the form of flavylum cation. After 8 hours incubation of cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside and cyanidin at pH 2.0 and 25°C , 99% of Cy3Glc and only 27% of cyanidin remains unchanged.
- Only at pH 7.0 the stability of cyanidin became higher than that of cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside, while at all the other pH values cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside showed a higher stability at $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

- From a structural viewpoint, it seems that the presence of the 3-glucosidic substitution strongly increases the stability of aglycone moiety, possibly by protecting the flavylum nucleus from a nucleophilic attack of water molecule at C-2 that leads to the colorless forms. These facts are important from the point of view of using these compounds as food colorants, indicating a higher tinctorial power and higher stability of cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside compared to the cyanidin at majority pH values (with the exception of the neutral region, pH 7.0) at room temperature. The 3-glucosidic substitution is responsible for colour intensity of cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside in the alkaline region.
- The BI appears to be a sensitive indicator of the stability cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside at different pH values and $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. At pH 2.0 and 4.0 cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside is stable and it has very low and constant BI values, while at pH 7.0 and 9.0 was unstable and BI values gradually increased all the time. The cyanidin was unstable at all examined pH values which was accompanied by a gradual increase in BI values during storage. With time, the cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside turned yellow at pH 7.0, while cyanidin at pH 4.0 and 9.0.
- The color variation, colour intensity, thermal stability and brown index (BI) of the cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside in the neutral aqueous solution (at pH 7.0) and under the conditions of the elevated temperature ($55.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$) which simulate the rapid food ageing were different.
- At the $55.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ the visible absorbance maxima for cyanidin was higher than that for cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside, indicating the influence of the 3-glucosidic substitution on a hypsochromic shift of the visible absorbance maxima in the neutral media. Both studied compounds showed a hypsochromic shift in the visible range during the storage. The molar absorptivities (ϵ) for cyanidin were significantly higher than those for cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside all the time. The presence of 3-glucosidic residue significantly decreased the colour intensity of cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside compared to cyanidin under the given conditions (neutral solution and elevated temperature).

- Cyanidin showed a greater thermal stability compared to cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside. It seems that the presence of 3-glucosidic substitution decreased the stability of cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside under the condition of elevated temperatures in a neutral aqueous solution. These data clearly indicated a higher tinctorial power of cyanidin compared to cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside in a neutral aqueous solution (pH 7.0).
- The gradual loss of the colour at $55.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ of the cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside solution was accompanied by the increase in BI. The BI for cyanidin was 0.63 and < than 1 while for cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside it was 1.09 and > than 1 all the time, thus giving yellowish shades to the cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside aqueous solution. The cyanidin showed a significantly higher colour intensity and greater thermal stability compared to cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside. These facts are important from the point of view of using these compounds as food colorants, indicating a higher tinctorial power and higher stability of cyanidin compared to the cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside in a neutral range (pH 7.0).
- The interactions of cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside with model lipid membranes differing in surface charge and phase state were investigated using differential scanning calorimetry (DSC) and fluorescence emission polarization spectrometry.
- Differential scanning calorimetry shows that cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside have no effects on the phase transition of zwitterionic liposomes composed of the 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) and negatively charged liposomes composed of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG) at pH 7.0. Cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside have no significant effects on the thermal stabilization of the neutral DPPC or negatively charged DPPG liposomes at molar ratios up to 2:1, respectively. In the presence of cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside, the enthalpy of the main transition of the DPPC and DPPG liposomes does not change.

- Emission polarization spectrometry using 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) and N,N,N-trimethyl-4-(6-phenyl-1,3,5-hexatrien-1-yl)phenylammonium p-toluenesulfonate (TMA-DPH) probes show that cyanidin slightly increases the polarization of DPPC and DPPG liposomes in the gel state at $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Significant ordering effects of cyanidin on DPPC liposomes in the liquid state at $45.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ and no effect on the liquid state of DPPG at $55.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ was observed using the DPH and TMA-DPH probes. Cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside causes no change in polarization regardless the gel or liquid disordered state of DPPC or DPPG liposomes.
- The data from the polarization measurements using DPH and TMA-DPH with the DPPC liposomes in the gel and liquid states show that cyanidin can influence the lipid packing order of the DPPC liposomes in both the gel and liquid states, while only the interactions with DPPG in gel state were observed. Cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside, instead, has no significant effects on the lipid packing of the DPPC liposomes irrespective of whether they are in the gel or liquid states.
- Cyanidin shows some surface interactions with DPPC and DPPG liposomes, while cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside has no affinities for binding to the surface of the neutral DPPC and negatively charged DPPG liposomes. Cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside are at pH 7.0 in the neutral form of quinonoidal bases and hemiacetal form. The negligible changes in the enthalpy of the main transition (ΔH_{cal}), that are generally seen for cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside might be due to a superficial interaction of cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside with lipids at the level of the polar headgroups of DPPC and DPPG.
- Surface binding of cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside to neutral liposomes might be responsible for their ability to prevent lipid oxidation, and therefore for their protection of cell membranes.
- The observed lack of effects of cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside on the polarization of DPH and TMA-DPH in the DPPG liposomes in the liquid unordered state at $55.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ appears to be due to the kinetic instability of cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside at $55.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ and their negatively charged degradation products.

- The total polar surface area and polarity of flavonoids are the two main characteristics which influence the most the properties of model lipid membranes and the flavonoids were bounded to the membrane surface predominantly via hydrogen bonds. Here we have shown for the first time that the surface charge on the membrane and on the cyanidin and cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside play an important role in binding, therefore further studies about the role of membrane charge additionally to the composition and the structure of flavonoids in their interactions with membranes is of great importance.

7. LITERATURA

- Abuja, P. M., & Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*, 306(1-2), 1–17.
- Agati, G., D'Onofrio, C., Ducci, E., Cuzzola, A., Remorini, D., Tuccio, L., ... Mattii, G. (2013). Potential of a Multiparametric Optical Sensor for Determining in Situ the Maturity Components of Red and White *Vitis vinifera* Wine Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(50), 12211–12218. doi:10.1021/jf405099n
- Agati, G., Matteini, P., Oliveira, J., de Freitas, V., & Mateus, N. (2013). Fluorescence Approach for Measuring Anthocyanins and Derived Pigments in Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(42), 10156–10162. doi:10.1021/jf402398a
- Arora, A., Byrem, T. M., Nair, M. G., & Strasburg, G. M. (2000). Modulation of Liposomal Membrane Fluidity by Flavonoids and Isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373(1), 102–109. doi:10.1006/abbi.1999.1525
- Arora, A., Nair, M. G., & Strasburg, G. M. (1998). Structure–Activity Relationships for Antioxidant Activities of a Series of Flavonoids in a Liposomal System. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(9), 1355–1363.
- Bishayee, A., Mbimba, T., Thoppil, R. J., Háznagy-Radnai, E., Sipos, P., Darvesh, A. S., ... Hohmann, J. (2011). Anthocyanin-rich black currant (*Ribes nigrum* L.) extract affords chemoprevention against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(11), 1035–1046. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.09.001
- Bonarska-Kujawa, D., Pruchnik, H., Oszmiański, J., Sarapuk, J., & Kleszczyńska, H. (2011). Changes Caused by Fruit Extracts in the Lipid Phase of Biological and Model Membranes. *Food Biophysics*, 6(1), 58–67. doi:10.1007/s11483-010-9175-y
- Bordignon-Luiz, M. T., Gauche, C., Gris, E. F., & Falcão, L. D. (2007). Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT - Food Science and Technology*, 40(4), 594–599. doi:10.1016/j.lwt.2006.02.022
- Bornsek, S. M., Ziberna, L., Polak, T., Vanzo, A., Ulrih, N. P., Abram, V., ... Passamonti, S. (2012). Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chemistry*, 134(4), 1878–84. doi:10.1016/j.foodchem.2012.03.092
- Bridle, P., & Timberlake, C. F. (1997). Anthocyanins as natural food colours—selected aspects. *Food Chemistry*, 58(1-2), 103–109. doi:10.1016/S0308-8146(96)00222-1
- Brouillard, R. (1982). *Anthocyanins as Food Colors*. (P. Markakis, Ed.) (pp. 1–38). New York London: Academic Press.
- Brouillard, R., Iacobucci, G. A., & Sweeny, J. G. (1982). Chemistry of Anthocyanin Pigments. 9. UV-Visible Spectrophotometric Determination of the Acidity Constants of

- Apigeninidin and Three Related 3-Deoxyflavylium Salts. *Journal of the American Chemical Society*, 104(26), 7585–7590. doi:10.1021/ja00390a033
- Brouillard, R., Mazza, G., Saad, Z., Albrecht-Gary, A. M., & Cheminat, A. (1989). The Copigmentation Reaction of Anthocyanins: A Microprobe for the Structural Study of Aqueous Solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 111(7), 2604–2610. doi:10.1021/ja00189a039
- Brouillard, Raymond. (1982). Chemical Structure of Anthocyanins. In P. Markakis (Ed.), *Anthocyanins As Food Colors* (pp. 1–40). New York: Academic Press.
- Brouillard, Raymond. (1988). Flavonoids and flower colour. In J. B. Harbone (Ed.), *The Flavonoids. Advances in Research Since 1980* (p. 525). London: Chapman and Hall.
- Brouillard, Raymond, Delaporte, B., & Dubois, J.-E. (1978). Chemistry of Anthocyanin Pigments. 3. Relaxation Amplitudes in pH-Jump Experiments. *Journal of the American Chemical Society*, 100(19), 6202–6205. doi:10.1021/ja00487a041
- Cabrita, L., Fossen, T., & Andersen, Ø. M. (2000). Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 68(1), 101–107. doi:10.1016/S0308-8146(99)00170-3
- Cater, B. R., Chapman, D., Hawes, S. M., & Saville, J. (1974). Lipid phase transition and drug interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 363, 54–69.
- Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B., & Sengupta, P. K. (2007). Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(1), 42–48. doi:10.1016/j.ijbiomac.2006.12.003
- Chen, P.-N., Chu, S.-C., Chiou, H.-L., Chiang, C.-L., Yang, S.-F., & Hsieh, Y.-S. (2005). Cyanidin 3-Glucoside and Peonidin 3-Glucoside Inhibit Tumor Cell Growth and Induce Apoptosis In Vitro and Suppress Tumor Growth In Vivo. *Nutrition and Cancer*, 53(2), 232–243. doi:10.1207/s15327914nc5302_12
- Cherepy, N. J., Smestad, G. P., Grätzel, M., & Zhang, J. Z. (1997). Ultrafast Electron Injection: Implications for a Photoelectrochemical Cell Utilizing an Anthocyanin Dye-Sensitized TiO₂ Nanocrystalline Electrode. *Journal of Physical Chemistry. Part B: Condensed Matter, Materials, Surfaces, Interfaces and Biophysical*, 101(45), 9342–9351. doi:10.1021/jp972197w
- Chong, M. F.-F., Macdonald, R., & Lovegrove, J. A. (2010). Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *The British Journal of Nutrition*, 104 Suppl, S28–39. doi:10.1017/S0007114510003922
- Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1063–1072. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)

- Cuevas-Rodríguez, E. O., Yousef, G. G., García-Saucedo, P. a, López-Medina, J., Paredes-López, O., & Lila, M. A. (2010). Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Wild and Domesticated Mexican Blackberries (*Rubus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7458–64. doi:10.1021/jf101485r
- Da Silva, P. F., Lima, J. C., Quina, F. H., & Maçanita, A. L. (2004). Excited-State Electron Transfer in Anthocyanins and Related Flavylum Salts. *Journal of Physical Chemistry A*, 108(46), 10133–10140.
- Dangles, O., Saito, N., & Brouillard, R. (1993). Kinetic and thermodynamic control of flavylum hydration in the pelargonidin-cinnamic acid complexation. Origin of the extraordinary flower color diversity of *Pharbitis nil*. *Journal of the American Chemical Society*, 115(11), 3125–3132. doi:DOI: 10.1021/ja00061a011
- Del Carpio Jiménez, C., Serrano Flores, C., He, J., Tian, Q., Schwartz, S. J., & Giusti, M. M. (2011). Characterisation and preliminary bioactivity determination of *Berberis boliviana* Lechler fruit anthocyanins. *Food Chemistry*, 128(3), 717–724. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.094
- Deleu, M., Crowet, J.-M., Nasir, M. N., & Lins, L. (2014). Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: A review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(12), 3171–3190. doi:10.1016/j.bbamem.2014.08.023
- Downham, A., & Collins, P. (2000). Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science & Technology*, 35(1), 5–22. doi:10.1046/j.1365-2621.2000.00373.x
- Drabent, Regina, Pliszka, B., & Olszewska, T. (1999). Fluorescence properties of plant anthocyanin pigments. I. Fluorescence of anthocyanins in *Brassica oleracea* L. extracts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 50(1), 53–58. doi:10.1016/S1011-1344(99)00070-6
- Drabent, Regina;, Pliszka, B., Huszcza-Ciołkowska, G., & Smyk, B. (2007). Ultraviolet Fluorescence of Cyanidin and Malvidin Glycosides in Aqueous Environment. *Spectroscopy Letters*, 40(1), 165–182. doi:10.1080/00387010600854279
- Dugo, P., Mondello, L., Errante, G., Zappia, G., Dugo, G., Sperone, S., & Farmaco-chimico, D. (2001). Identification of Anthocyanins in Berries by Narrow-Bore High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3987–3992. doi:10.1021/jf001495e
- Figueiredo, P., Elhabiri, M., Toki, K., Saito, N., Dangles, O., & Brouillard, R. (1996). New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for colour loss? *Phytochemistry*, 41(1), 301–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8588872>
- Figueiredo, Paulo, Elhabiri, M., Saito, N., & Brouillard, R. (1996). Anthocyanin Intramolecular Interactions. A New Mathematical Approach To Account for the

- Remarkable Colorant Properties of the Pigments Extracted from *Matthiola incana*. *Journal of the American Chemical Society*, 118(20), 4788–4793. doi:10.1021/ja9535064
- Figueiredo, Paulo, Lima, J. C., Santos, H., Wigand, M., Brouillard, R., Maqanita, A. L., & Pina, F. (1994). Photochromism of the Synthetic 4',7-Dihydroxyflavylium Chloride. *Journal of the American Chemical Society*, 116(4), 1249–1254. doi:10.1021/ja00083a011
- Figueiredo, Paulo, Pina, F., Vilas-Boas, L., & Macanita, A. L. (1990). Fluorescence spectra and decays of malvidin 3,5-diglucoside in aqueous solutions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 52(3), 411–424.
- Fossen, T., Cabrita, L., & Andersen, M. (1998). Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*, 63(4), 435–440.
- Friedman, M., & Jürgens, H. S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(6), 2101–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10888506>
- George, F., Figueiredo, P., & Brouillard, R. (1999). Malvin Z-chalcone: An unexpected new open cavity for the ferric cation. *Phytochemistry*, 50(8), 1391–1394. doi:10.1016/S0031-9422(98)00427-0
- Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(7), 618–626. doi:10.1016/j.jfca.2007.03.002
- Gonnet, J.-F. (1998). Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited-1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. *Food Chemistry*, 63(3), 409–415.
- Gonnet, J.-F. (1999). Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited-2 . A colorimetric look at the solutions of cyanin co-pigmented by rutin using the CIELAB scale. *Food Chemistry*, 66(3), 387–394.
- Gonnet, J.-F. (2001). Colour effects of co-pigmentation of anthocyanin revisited — 3 . A further description using CIELAB differences and assessment of matched colours using the CMC model. *Food Chemistry*, 75(4), 473–485.
- Grace, M. H., Ribnicky, D. M., Kuhn, P., Poulev, A., Logendra, S., Yousef, G. G., ... Lila, M. A. (2009). Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine*, 16(5), 406–415. doi:10.1016/j.phymed.2009.02.018
- Heredia, F. J., Francia-Aricha, E. M., Rivas-Gonzalo, J. C., Vicario, I. M., & Santos-Buelga, C. (1998). Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes - I. pH effect □. *Food Chemistry*, 63(4), 491–498.

- Hurtado, N. H., Morales, A. L., González-Miret, M. L., Escudero-Gilete, M. L., & Heredia, F. J. (2009). Colour, pH stability and antioxidant activity of anthocyanin rutosides isolated from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chemistry*, *117*(1), 88–93. doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.081
- Joiner, A. (2004). Tooth colour: a review of the literature. *Journal of Dentistry*, *32*, 3–12. doi:10.1016/j.jdent.2003.10.013
- Jordheim, M., Enerstvedt, K. H., & Andersen, Ø. M. (2011). Identification of Cyanidin 3-O-β-(6''-(3-Hydroxy-3-methylglutaroil)glucoside) and Other Anthocyanins from Wild and Cultivated Blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(13), 7436–7440. doi:10.1021/jf201522b
- Kadivec, M., Može Bornšek, S., Polak, T., Demšar, L., Hribar, J., & Požrl, T. (2013). Phenolic Content of Strawberry Spreads during Processing and Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(38), 9220–9. doi:10.1021/jf4035767
- Kähkönen, M. P. H., & Johanna; Ollilainen, Velimatti; Heinonen, M. (2003). Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *83*(14), 1403–1411. doi:10.1002/jsfa.1511
- Kammerer, D., Gajdos Kljusuric, J., Carle, R., & Schieber, A. (2005). Recovery of anthocyanins from grape pomace extracts (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Mitos) using a polymeric adsorber resin. *European Food Research and Technology*, *220*(3-4), 431–437. doi:10.1007/s00217-004-1078-z
- Keller, R. B. (Ed.). (2009). *Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources*. New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Lakowicz, J. R. (Ed.). (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (3rd ed.). New York: Springer US. doi:10.1007/978-0-387-46312-4
- Laleh, G. H., Frydoonfar, H., Heidary, R., Jameei, R., & Zare, S. (2006). The Effect of Light, Temperature, pH and Species on Stability of Anthocyanin Pigments in Four Berberis Species. *Pakistan Journal of Nutrition*, *5*(1), 90–92. doi:10.3923/pjn.2006.90.92
- Lasic, D. D. (1993). *Liposomes: from physics to applications* (pp. 63–107). Amsterdam: Elsevier.
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., & Billot, J. (1990). *Fruit Phenolics* (1 edition.). Boca Raton: CRC Press, Inc.
- Malien-Aubert, C, Dangles, O., & Amiot, M. J. (2001). Color Stability of Commercial Anthocyanin-Based Extracts in Relation to the Phenolic Composition. Protective Effects by Intra- and Intermolecular Copigmentation. *Journal of agricultural and food chemistry*, *49*(1), 170–176. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11170573>

- Malien-Aubert, Céline, Dangles, O., & Amiot, M. J. (2002). Influence of Procyanidins on the Color Stability of Oenin Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3299–3305. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010001>
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 suppl), 230S–242S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15640486>
- Marczylo, T. H., Cooke, D., Brown, K., Steward, W. P., & Gescher, A. J. (2009). Pharmacokinetics and metabolism of the putative cancer chemopreventive agent cyanidin-3-glucoside in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64(6), 1261–1268. doi:10.1007/s00280-009-0996-7
- Mazza, G., & Brouillard, R. (1987). Color Stability and Structural Transformations of Cyanidin 3,5-Diglucoside and Four 3-Deoxyanthocyanins in Aqueous Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(3), 422–426. doi:10.1021/jf00075a034
- Mazza, G., & Brouillard, R. (1990). The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry*, 29(4), 1097–1102.
- Mazza, Giuseppe, & Miniati, E. (1993). *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains*. Boca Raton: CRC Press, Inc. doi:10.1002/food.19940380317
- McGhie, T. K., & Walton, M. C. (2007). The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(6), 702–713. doi:10.1002/mnfr.200700092
- Mertz, C., Cheynier, V., Günata, Z., & Brat, P. (2007). Analysis of Phenolic Compounds in Two Blackberry Species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8616–24. doi:10.1021/jf071475d
- Miljkovic, M., Purenovic, M., Djordjevic, D., & Petrovic, M. (2011). Influence of Different Acids for Adjusting the Dye bath pH Value on the Dyeability of Polyester Knitwear Dyed with Disperse Yellow 23. *Hemijska industrija*, 65(3), 257–261. doi:10.2298/HEMIND110124015M
- Miljković, N. M. (1994). *Uticaj organskih i neorganskih kiselina na obojenost i mehanizam bojenja poliestarskih vlakana disperznim bojama*. Univerzitet u Nišu.
- Oteiza, P. I., Erlejman, A. G., Verstraeten, S. V., Keen, C. L., & Fraga, C. G. (2005). Flavonoid-membrane Interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clinical and Developmental Immunology*, 12(1), 19–25. doi:10.1080/10446670410001722168

- Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Poste, G., & Shepherd, G. (1975). Effects of local anesthetics on membrane properties I. Changes in the fluidity of phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 394(4), 504–519.
- Passamonti, S., Terdoslavich, M., Franca, R., Vanzo, A., Tramer, F., Braidot, E., ... Vianello, A. (2009). Bioavailability of Flavonoids: A Review of Their Membrane Transport and the Function of Bilirubin Translocase in Animal and Plant Organisms. *Current Drug Metabolism*, 10(4), 369–394. doi:http://dx.doi.org/10.2174/138920009788498950
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., & Mattivi, F. (2003). The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters*, 544(1-3), 210–213. doi:10.1016/S0014-5793(03)00504-0
- Prior, R. L., & Wu, X. (2006). Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, 40(10), 1014–1028. doi:10.1080/10715760600758522
- Riske, K. A., Barroso, R. P., Vequi-Suplicy, C. C., Germano, R., Henriques, V. B., & Lamy, M. T. (2009). Lipid bilayer pre-transition as the beginning of the melting process. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(5), 954–963. doi:10.1016/j.bbamem.2009.01.007
- Sadilova, E., Carle, R., & Stintzing, F. C. (2007). Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(12), 1461–71. doi:10.1002/mnfr.200700179
- Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., & Castelli, F. (1995). Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(4), 481–486.
- Santos, H., Turner, D. L., Lima, J. C., Figueiredo, P., Pina, F. S., & Maçanita, A. L. (1993). Elucidation of the Multiple Equilibria of Malvin in Aqueous Solution by One- and Two-Dimensional NMR. *Phytochemistry*, 33(5), 1227–1232.
- Sarić, A., Sobocanec, S., Balog, T., Kusić, B., Sverko, V., Dragović-Uzelac, V., ... Marotti, T. (2009). Improved Antioxidant and Anti-inflammatory Potential in Mice Consuming Sour Cherry Juice (*Prunus Cerasus* cv. Maraska). *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(4), 231–237. doi:10.1007/s11130-009-0135-y
- Sepcic, K., Berne, S., Potrich, C., Turk, T., Macek, P., & Menestrina, G. (2003). Interaction of ostreolysin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, with lipid membranes and modulation by lysophospholipids. *European Journal of Biochemistry*, 270(6), 1199–1210. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03480.x
- Shih, P.-H., Chan, Y.-C., Liao, J.-W., Wang, M.-F., & Yen, G.-C. (2010). Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *The Journal of nutritional biochemistry*, 21(7), 598–605. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.03.008

- Sun, C., Zheng, Y., Chen, Q., Tang, X., Jiang, M., Zhang, J., ... Chen, K. (2012). Purification and anti-tumour activity of cyanidin-3-O-glucoside from Chinese bayberry fruit. *Food Chemistry*, 131(4), 1287–1294. doi:10.1016/j.foodchem.2011.09.121
- Sun, J., Bai, W., Zhang, Y., Liao, X., & Hu, X. (2011). Effects of electrode materials on the degradation, spectral characteristics, visual colour, and antioxidant capacity of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-sophoroside during pulsed electric field (PEF) treatment. *Food Chemistry*, 128(3), 742–747. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.099
- Tarozzi, A., Morroni, F., Merlicco, A., Bolondi, C., Teti, G., Falconi, M., ... Hrelia, P. (2010). Neuroprotective effects of cyanidin 3-O-glucopyranoside on amyloid beta (25-35) oligomer-induced toxicity. *Neuroscience Letters*, 473(2), 72–76. doi:10.1016/j.neulet.2010.02.006
- Timberlake, C. F., & Henry, B. S. (1986). Plant pigments as natural food colours. *Endeavour*, 10(1), 31–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2422009>
- Torskangerpoll, K., & Andersen, Ø. M. (2005). Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chemistry*, 89(3), 427–440. doi:10.1016/j.foodchem.2004.03.002
- Tremblay, F., Waterhouse, J., Nason, J., & Kalt, W. (2013). Prophylactic neuroprotection by blueberry-enriched diet in a rat model of light-induced retinopathy. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(4), 647–655. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.03.011
- Tripoli, E., Guardia, M. La, Giammanco, S., Majo, D. Di, & Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104(2), 466–479. doi:10.1016/j.foodchem.2006.11.054
- Wang, H., Nair, M. G., Strasburg, G. M., Chang, Y.-C., Booren, A. M., Gray, J. I., & DeWitt, D. L. (1999). Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Anthocyanins and Their Aglycon, Cyanidin, from Tart Cherries. *Journal of Natural Products*, 62(2), 294–6. doi:10.1021/np980501m
- Watts, A., Harlos, K., Maschke, W., & Marsh, D. (1978). Control of the structure and fluidity of phosphatidylglycerol bilayers by pH titration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 510(1), 63–74.
- Wesołowska, O., Gąsiorowska, J., Petrus, J., Czarnik-Matusiewicz, B., & Michalak, K. (2014). Interaction of prenylated chalcones and flavanones from common hop with phosphatidylcholine model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838(1 Pt B), 173–184. doi:10.1016/j.bbamem.2013.09.009
- Xu, X., & London, E. (2000). The Effect of Sterol Structure on Membrane Lipid Domains Reveals How Cholesterol Can Induce Lipid Domain Formation. *Biochemistry*, 39(5), 843–849. doi:10.1021/bi992543v

- Yang, X., Yang, L., & Zheng, H. (2010). Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2374–2379. doi:10.1016/j.fct.2010.05.074
- Yao, N., Lan, F., He, R.-R., & Kurihara, H. (2010). Protective Effects of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Extract against Endotoxin-Induced Uveitis in Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4731–4736. doi:10.1021/jf904572a
- Zawistowski, J., Kopec, A., & Kitts, D. D. (2009). Effects of a black rice extract (*Oryza sativa* L. indica) on cholesterol levels and plasma lipid parameters in Wistar Kyoto rats. *Journal of Functional Foods*, 1(1), 50–56. doi:10.1016/j.jff.2008.09.008

8. PRILOG I

Plodovi bogati antocijaninima



Slika 7.1: Plodovi kruške (*Pyrus communis*)

(Photo: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cf/Pears.jpg>)



Slika 7.2: Plodovi breskve (*Prunus persica*)

(Photo: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9a/Breskva_gori%C4%8Dna.jpg)



Slika 7.3: Plodovi kajsije (*Prunus armeniaca*)

(Photo: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f9/Apricots.jpg>)



Slika 7.4: Plod šljive (*Prunus domestica*)

(Photo: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8d/Plum_on_tree.jpg)



Slika 7.5: Plodovi trnjine (*Prunus spinosa*)

(Photo:

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7f/Closeup_of_blackthorn_aka_sloe_aka_prunus_spinosa_sweden_20050924.jpg)



Slika 7.6: Plodovi kupine (*Rubus fruticosus*)

(Photo:

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/78/Ripe%2C_ripening%2C_and_green_blackberries.jpg)



Slika 7.7: Plodovi maline (*Rubus sp.*)

(Photo: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cb/Framboos_vruchten.jpg)



Slika 7.8: Plodovi crvene ribizle (*Ribes rubrum*)

(Photo: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a5/Ribes_rubrum_1.jpg)



Slika 7.9: Plodovi crne ribizle (*Ribes nigrum*)

(Photo: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a8/Schwarzejohannisbeere.jpg>)



Slika 7.10: Plodovi dudu (*Morus nigra*)

(Photo: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ad/Morus_alba_FrJPG.jpg)



Slika 7.11: Plodovi zove (*Sambucus nigra*)

(Photo: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a9/Sambucus-berries.jpg>)



Slika 7.12: Plodovi dunje (*Cydonia oblonga*)

(Photo: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d6/Cydonia.jpg>)



Slika 7.13: Plodovi jebuke (*Malus domestica*)

(Photo: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b2/Sampion_cultivar.jpg)



Slika 7.14: Plodovi borovnice (*Vaccinium corymbosum*)

(Photo: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/28/Maturing_blueberry.jpg)



Slika 7.15: Plodovi vinove loze (*Vitis vinifera*)

(Photo: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f2/Vitis-vinifera-2.JPG>)



Slika 7.16: Plodovi jagode (*Fragaria* \times *ananassa*)

(Photo: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b0/Chandler_strawberries.jpg)



Slika 7.17: Plodovi trešnje (*Prunus avium*)

(Photo: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/49/Prunus_avium_fruit.jpg)



Slika 7.18: Plodovi višnje (*Prunus cerasus*)

(Photo: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/0/0a/Meggy1.jpg>)



Slika 7.19: Plodovi smokve (*Ficus carica*)

(Photo: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/74/Ficus_carica0.jpg)



Slika 7.20: Plodovi brusnice (*Vaccinium sp.*)

(Photo: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3a/Cranberry_bog.jpg)



Slika 7.21: Plodovi aronije (*Aronia sp.*)

(Photo: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/58/Chokeberries.jpg>)



Slika 7.22: Plodovi severnoameričke borovnice (*Ericaceae sp.*)

(Photo: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3c/Bog_huckleberry.jpg)



Slika 7.23: Plodovi plavog patlidžana (*Solanum melongena*)

(Photo:

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/76/Solanum_melongena_24_08_2012_%281%29.JPG)



Slika 7.24: Ljubičasti kupus (*Brassica oleracea*)

(Photo: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/85/Brassica_oleracea_var_capitata_Rubyball.jpg)

9. PRILOG II



Scientific paper

Investigation of fluorescence properties of cyanidin and cyanidin 3-O-β-glucopyranoside

Violeta P. Rakić^{1,*}, Ajda M. Ota², Mihaela A. Skrt², Milena N. Miljković³, Danijela A. Kostić³, Dušan T. Sokolović⁴, Nataša E. Poklar Ulrih^{2,5}

¹College of Agriculture and Food Technology, Ćirila i Metodija 1, SRB-18400 Prokuplje, Serbia

²Department of Food Science and Technology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

³Department of Chemistry, Faculty of Science and Mathematics, University of Niš, Višegradska 33, SRB-18000 Niš, Serbia

⁴Faculty of Medicine, University of Niš, Blvd. Dr Zorana Djindjica 81, SRB-18000 Niš, Serbia

⁵Centre of Excellence for Integrated Approaches in Chemistry and Biology of Proteins (CipKeBiP), Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

Paper received: 03 February 2014

Paper accepted: 09 April 2014

*Corresponding author: Violeta Rakić, College of Agriculture and Food Technology, Ćirila i Metodija 1, SRB-18400 Prokuplje, Serbia, Tel: +381- 27-324-311, Fax: +381-27-324-311, Email: violetachem@gmail.com

Abstract

The absorption and fluorescence emission spectra of cyanidin and cyanidin 3-O- β glucopyranoside (Cy3Glc) at pH 5.5 in aqueous solution have been studied. The most effective fluorescence excitations of cyanidin were at the UV absorption maxima at 220 and at 230 nm and at higher wavelengths at 270 and at 280 nm. Cyanidin exhibits fluorescence emission maxima at 310 nm and in the visible range at 615 nm. For the Cy3Glc most effective fluorescence excitation was at 220 and at 230 nm and at higher wavelengths at 300 and at 310 nm. Cy3Glc has fluorescence emission spectra with the maximum at 380 nm and does not show fluorescence emission in the visible range. If compare fluorescence emission spectra of cyanidin and Cy3Glc it can be seen that fluorescence emission intensity for cyanidin is significantly higher than that for Cy3Glc. These results reveals the impact of 3-glucosidic substitution at C-3 of aglycone (to form Cy3Glc) on the significantly decrease in fluorescence emission intensity, and disappearance of the fluorescence emission in visible wavelength range.

PAPER ACCEPTED

INTRODUCTION

Anthocyanins are glycosylated polyhydroxy and polymethoxy derivatives of 2-phenylbenzopyrylium (flavylium) salts, where the 3-hydroxyl group is replaced by glucose or another sugar. Cyanidin 3-O- β -glucopyranoside (Cy3Glc) is a simple anthocyanin that is found in different berries, such as elderberries, blueberries, cowberries, whortleberries, blackcurrants, roselle, and black chokeberries [1,2].

Anthocyanins have several biological activities, including antioxidant, antihepatocarcinogenic, anti-inflammatory, anti-tumor, neuroprotective, antihemolytic, antidiabetic, hypolipidemic and cancer chemopreventive [3–17]. Epidemiological studies have suggested that anthocyanins have cardioprotective functions in human [18], and other studies have suggested that anthocyanins inhibit tumor-cell growth *in vitro* and suppress tumor growth *in vivo* [19].

These are natural, water soluble, non-toxic pigments that can show a variety of colours, from orange to blue [20–22]. Today, there is considerable interest in the development of food colorants from natural sources to replace synthetic food colorants [23,24]. The reason behind this is to develop safe, economical, and efficient food colorants to replace the banned coal tar and azo dyes [23,25]. Here, coloured anthocyanins have some advantages: they are safe, coloured especially in the red region, and relatively soluble, which simplifies their incorporation into aqueous food systems [1,23].

However, there are some limitations to the use of anthocyanins as food colorants, which include their chemical instability, their need for purification, and their tinctorial power, which is nearly 100-fold lower than that of the coal tar dyes. In food products, a number of reactions can occur, and pH can affect their colours, although the major problem associated with the

use of anthocyanins as food colorants is their temperature, oxygen, light and enzymatic instability [1,21,23,26–29].

Similar to the other anthocyanidins and anthocyanins, cyanidin and Cy3Glc exist in various structural forms in aqueous environments, which depend on the pH (Figure 1). Spectral investigations have revealed the coexistence of the flavylium cation (Figure 1, AH⁺), quinonoid base (Figure 1, A), two hemiacetal forms (Figure 1, B), and two chalcone forms (Figure 1, C). The equilibrium between these structures is highly pH dependent, and except for the *cis-trans* chalcone isomerisation, all of these transformations are fully reversible, with reaction half-times of several minutes or less. At pH < 2, the anthocyanins exist predominately as orange, red or purple flavylium cations, which are characterised by an extended π -electron system, and consequently show electronic absorption in the visible region [1,23,30–35].

Upon elevation of pH 4-6 kinetic and thermodynamic competition occurs between the hydration reaction on position 2 of the flavylium cation (AH⁺) and the proton transfer reactions related to the acidic hydroxyl groups of the aglycone. First reaction, hydration via the nucleophilic attack, leading to colorless hemiacetal structure (B) (hydration equilibrium); the latter can subsequently undergo ring-opening, forming pale yellow *cis*-chalcone (*C_{cis}*) with restituted large π -electron system (see Figure 1), with possibility of further (usually slow) isomerisation to the *trans*-chalcone (*C_{trans}*). Second reactions, the fast deprotonation of flavylium cation (AH⁺) leading to tautomeric more violet quinonoid bases (A) (prototropic tautomeric equilibrium). Further deprotonation of the quinonoid bases (A) can take place at pH between 6 and 7 with the formation of purplish, resonance-stabilised quinonoid anions (A) [1,2,23,30].

The transformations of cyanidin and Cy3Glc which undergo in aqueous media are illustrated in Figure 1 [23,30–32,36].

Fig. 1

Some anthocyanins show measurable fluorescence, but information on this topic in the literature is scarce. The study of Drabent and coworkers [37] with red cabbage extracts, containing mainly cyanidin derivatives, were shown that the colorless compounds present in these extracts fluoresce, and that this emission is pH dependent. The fluorescence emission of anthocyanins has usually been investigated using excitation in the visible region and near UV, that is, at excitation wavelength, $\lambda_{exc} > 270$ nm [31,37–39]. Low fluorescent quantum yield, especially of colored forms of anthocyanins, is one of the reasons why it is rarely applied in analytics [31].

Previously published monographs describe fluorescence of various forms of anthocyanins in aqueous environment at various pH. In particular, it was found that chalcones (C) have fluorescence emission in the spectral range 420–450 nm (λ_{exc} =320–340 nm), while hemiacetal form (B) at 370 nm. The flavylum cation (AH^+) show weak fluorescence emission in the spectral range 570–620 nm (λ_{exc} =520 nm). The quinonoid base (A) as anion (A^-) have fluorescence emission spectra in the range 600–665 nm [31,37–39].

The fluorescence techniques are highly sensitive and non-destructive. It can add useful information on anthocyanin content in food and drinks. This technique is a useful tool for non-destructive monitoring of anthocyanin compounds [40,41]. In the presented study we investigated the absorption and fluorescence properties of the non-sugar, aglycone, moiety of cyanidin, and the impact of its 3-glucosidic substitution (to form Cy3Glc) on the spectral parameters. An attempt has been made to correlate the absorption and emission spectra. The fluorescence of cyanidin and Cy3Glc were excited in the UV range (210 - 350 nm, at every 10 nm). The low concentration of dyes indicates that anthocyanin exists as monomers in these solutions.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

The chloride salts of cyanidin (2-(3,4-dihydroxyphenyl)chromenylium-3,5,7-triol chloride, CAS Number: 528-58-5, C₁₅H₁₁O₆Cl, molecular weight 322.7 g/mol) and Cy3Glc ((2S,3R,4S,5S,6R)-2-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxychromenylium-3-yl]oxy-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol chloride, CAS Number: 7084-24-4, C₂₁H₂₁O₁₁Cl, molecular weight is 484.8 g/mol) were from Polyphenols Laboratories AS (Sandnes, Norway). Hydrochloric acid and sodium hydroxide were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Aqueous solutions were prepared from Milli-Q water (resistivity >18 M Ω cm) (Millipore, Bedford, MA, USA).

Fluorescence emission measurements of cyanidin and cyanidin 3-O- β -glucopyranoside

The chloride salts of the cyanidin and Cy3Glc were dissolved in Milli-Q water to 2×10^{-5} mol dm⁻³. The fluorescence emission spectra of cyanidin and Cy3Glc were measured at pH 5.5. This pH is chosen according to the procedure of Drabent et al. [31]. The required pH was achieved by addition of hydrochloric acid or sodium hydroxide, and measured using a Seven Easy pH meter (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) equipped with an InLab micro electrode (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland). These solutions were equilibrated in the dark at 25°C, following the procedure of Brouillard et al. [30,42]. The fluorescence emission spectra of the cyanidin and Cy3Glc solutions were recorded at $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$, using a Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Varian, Mulgrave, Victoria, Australia) in a thermostated 10-mm-path-length fluorescence cell, with slit widths with a normal band-pass of 5 nm for both excitation and emission. The excitation wavelengths used for cyanidin and

Cy3Glc were in the UV range (210 - 350 nm, at every 10 nm). Each spectrum was multiplied by the dilution factor.

UV-vis spectrometry of cyanidin and cyanidin 3-O- β -glucopyranoside

The chloride salts of the cyanidin and Cy3Glc were dissolved in Milli-Q water to 2×10^{-4} mol dm^{-3} . The UV-visible spectra of cyanidin and Cy3Glc were measured at pH 0.4 and 5.5, according to the procedure of Drabent et al. and Figueiredo et al. [31,38]. At $\text{pH} < 2$, the anthocyanins exist as flavylium cations, which show absorption in the visible region [1,23,30–35], at pH 5.5 anthocyanins exist as colorless hemiacetal structure [1,21,23,30,31,43,44]. The required pH was achieved by addition of hydrochloric acid or sodium hydroxide, and measured using a Seven Easy pH meter (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) equipped with an InLab micro electrode (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland). These solutions were equilibrated in the dark at 25°C , following the procedure of Brouillard et al. [30,42]. The absorption spectra (190-900 nm) of the cyanidin and Cy3Glc solutions were recorded at specified pH at $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$, using a Cary 100 Bio UV-visible spectrophotometer (Varian, Mulgrave, Victoria, Australia) in a thermostated 10-mm-pathlength quartz cell, with Milli-Q water as the reference. Each spectrum had the solvent spectrum subtracted and was multiplied by the dilution factor.

RESULTS AND DISCUSSION

The absorption and fluorescence emission spectra of cyanidin and Cy3Glc at pH 5.5 in aqueous solution have been examined. The impact of the 3-glucosidic substitution at the aglycone moiety of cyanidin was examined in terms of the fluorescence emission properties.

This allowed the impact of the 3-glucosidic substitution at the aglycone moiety of cyanidin to be examined in terms of the spectral properties.

The self-association of cyanidin and Cy3Glc occur at high concentrations ($>10^{-3}$ mol dm⁻³) [39]. In our investigations, cyanidin and Cy3Glc were dissolved to final concentrations of 2×10^{-5} for fluorescence, and 2×10^{-4} mol dm⁻³ for absorption measurements. At low concentrations cyanidin and Cy3Glc exists as monomers in the studied solutions [31].

Absorption and fluorescence properties of cyanidin

The UV-vis absorption spectra of cyanidin in aqueous solution at pH 0.4 and 5.5 are presented in Figure 2. Fluorescence emission spectra of cyanidin in aqueous solution at pH 5.5 for different excitation wavelength are shown at Figure 3.

Fig. 2

At pH 0.4, the absorption band in the visible spectra for cyanidin was narrow, with a visible absorption maximum ($\lambda_{\text{max-vis}}$) at 516 nm (Figure 2), which corresponds to the flavylium cation (Figure 1, AH⁺) [1,23]. At this pH value, the flavylium cation is essentially the sole species present in solution [1]. The band corresponds to the flavylium cation disappear at pH 5.5, whereby it completely shifts towards the colorless hemiacetal form and the coloured quinonoid bases. At the pH 5.5, the broad absorption band indicates that cyanidin is likely to be present in a few similar equilibrium structures in this pH range. There was a change in the spectral band, or a bathochromic shift, in the $\lambda_{\text{max-vis}}$ spectra of cyanidin, from 516 nm (at pH 0.4) to 560 nm (at pH 5.5). In the literature, this shift has been ascribed to the equilibrium between the flavylium cation and the quinonoid bases [1]. In the fast proton-transfer

diffusion-controlled reactions, the protons are transferred from the oxygen atoms of the C-3, C-5, C-7, C-3' and C-4' hydroxyl groups of the flavylum cation to a water molecule. Deprotonation occurs to some extent at all of the hydroxyl groups of the flavylum cation [1,30] (Figure 1). Both the flavylum cation and the quinonoid bases strongly absorb visible light [1,30]. The colourless hemiacetal form arises due to nucleophilic addition of water to the positively charged pyrylium ring at C-2 (Figure 1). Equilibration of this reaction occurs much slower than the proton transfer reaction, as it takes a few minutes for completion at room temperature.

Comparison of absorption spectra of cyanidin at pH 5.5 with the absorption spectra of the flavylum cation (at pH 0.4) shows that in water at pH 5.5, mainly cyanidin colorless form exist (Figure 2). Their absorption spectra in UV region differ from that of the flavylum cation especially at 270-280 nm (the range used to excite the fluorescence). At the pH of 0.4 cyanidin show band in UV range with a $\lambda_{\text{max-uv}}$ at 270 nm, while at pH 5.5 the $\lambda_{\text{max-uv}}$ is at 284 nm. This absorption bands previously assigned to the hemiacetal forms indicating the expected formation of hemiacetal form on the expense of flavylum cation [1,38]. In the UV range exists another absorption band of very high intensity at low wavelengths. The maxima of this absorption band do not change with pH and appears at around 210 nm and is characteristic for polyphenolic compounds [45]. This wavelength is later used for fluorescence excitation. These results agree with the literature data reported for anthocyanins [33,38,46].

The excitation wavelengths for recording fluorescence emission spectra of cyanidin in aqueous solution at pH 5.5 were in the UV range (210 - 350 nm, at every 10 nm). According to the UV-vis absorption spectra (Figure 2), the most effective excitation of fluorescence is measured at the first UV absorption maxima of cyanidin at 220 and at 230 nm (Figure 3A). At this wavelengths the molar absorptivities of the compound are high ($\epsilon = 14731.35$ and

11581.60 dm³ mol⁻¹ cm⁻¹, respectively). The second less intensive UV absorption maxima of cyanidin was at around 280 nm, and accordingly, the second most effective fluorescence excitation were at 270 and 280 nm (Figure 3B), the characteristic absorption band of the flavonoids with no π-electron coupling between the two rings system (e.g., hemiacetal forms) [36,38]. Obtained results are in accordance with obtained spectroscopic data ($\epsilon = 4886.70$ dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ at 270 nm and 5565.1 dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ at 280 nm). It was found that cyanidin has fluorescence emission in the wavelength from 280 to 700 nm with two bands, the first one with the maximum at $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}} \sim 310$ nm and the second one in visible range with lower fluorescence emission intensity with maximum at $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}} \sim 615$ nm (Figure 3A and B). The fluorescence emission spectral band of cyanidin in the visible range is assigned to the quinonoid bases [38].

Fig. 3

Absorption and fluorescence emission properties of cyanidin 3-O-β-glucopyranoside

The UV-vis absorption spectra of Cy3Glc in aqueous solution at pH 0.4 and 5.5 are presented in Figure 4. Fluorescence emission spectra of Cy3Glc in aqueous solution at pH 5.5 for different excitation wavelength are shown at Figure 5.

Fig. 4

Similar to cyanidin, at the lowest pH values, the absorption band in the visible spectrum for Cy3Glc was narrow with $\lambda_{\text{max-vis}}$ at 509 nm (Figure 4), and it corresponds to the flavylum cation (Figure 1, AH⁺) [1,24,30]. Previously, the absorbance maximum of Cy3Glc

determined in aqueous solution in the pH range from 0.8 to 3.7 was reported as 511 (\pm 1) nm [2,21,24,47], which is in good agreement with our result here.

At pH 5.5, there was an extremely large decrease in the absorbance of Cy3Glc in the visible range in comparison with pH 0.4 (Figure 4). The band characteristic of the flavylum cation disappears at pH 5.5. This reflects the conversion of the coloured flavylum cation into the colourless hemiacetal form [1,23,30]. The main process in this pH range is the nucleophilic addition of water to the coloured flavylum cation. Comparison of the spectra at pH 5.5 with the absorption spectra of the flavylum cation at pH 0.4 (Figure 4) indicates that Cy3Glc exists mainly in a colourless hemiacetal and chalcone forms, formed at this pH which is in good agreement with result of Drabent et al. [31]. The values of molar absorptivities in visible range at 520 nm for cyanidin and Cy3Glc at pH 0.4 ($\epsilon = 5216.00$ and $18544.65 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectively) indicates the high impact of the 3-glucosidic substitution on the absorptivity of the aglycone moiety. In the pH range from 0.4 to 5.5, a bathochromic shift in the UV-vis spectra of Cy3Glc was observed, where the visible absorption maximum is shifted from 509 nm to 530 nm. This indicates that the deprotonation/protonation equilibrium that occurs corresponds to the deprotonation of the small remaining amounts of the flavylum cation, into the quinonoid bases.

Beside the visible absorption maxima, Cy3Glc show two bands in UV range with the almost constant position of absorption maxima regardless of the pH value. The first band with lower intensity has absorption maxima at 277 nm at pH 0.4 and 278 nm at pH 5.5. The maximum of the second absorption band of very high intensity and low wavelengths not change with pH and appears at 204 nm, characteristic for polyphenolic compounds [45]. This wavelength is later used for fluorescence excitation. These results are in good agreement with the previously published data [33,38,46].

The excitation wavelengths for recording fluorescence emission spectra of Cy3Glc in aqueous solution at pH 5.5 were in the UV range (210 - 350 nm, at every 10 nm). According to the UV-vis absorption spectra (Figure 4), the most effective excitation of fluorescence is measured at the first UV absorption maxima of Cy3Glc at 220 and at 230 nm (Figure 5A). At this wavelengths the molar absorptivities of the compound are high ($\epsilon = 23333.00$ and $21718.45 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectively). The second less intensive UV absorption maxima of cyanidin was at around 280 nm, and accordingly, the second most effective excitation of fluorescence were at 300 and 310 nm (Figure 5B). Obtained results are in accordance with obtained spectroscopic data ($\epsilon = 5791.20 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 300 nm and $3404.50 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 310 nm). It was found that cyanidin has fluorescence emission spectra in the wavelength from 320 to 550 nm. The fluorescence emission spectra obtained here are in accordance with results of Drabent et al. [31]. It was found that Cy3Glc has a fluorescence emission intensity maximum at $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}} \sim 380 \text{ nm}$ (Figure 5). The absence of the fluorescence emission band in visible range can be due to the very low concentrations of quinonoid bases, as can be seen from the absorption spectra.

Fig. 5

If compare fluorescence emission spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 230 \text{ nm}$) of cyanidin and Cy3Glc it is seen that the fluorescence emission intensity for cyanidin is significant higher than for Cy3Glc (around 170 a.u. for cyanidin and 20 a.u. for Cy3Glc) (Figures 3 and 5). Similar results were obtained by applying $\lambda_{\text{exc}} = 270 \text{ nm}$. The obtained fluorescence emission intensity of cyanidin is significant higher than for Cy3Glc (around 70 a.u. for cyanidin and around 20 a.u. for Cy3Glc). Our results reveals the impact of its 3-glucosidic substitution at C-3 of aglycone (to

form Cy3Glc) on the significantly decrease in fluorescence emission intensity, and disappearance of the fluorescence emission band in visible wavelength range. The cyanidin glycosides are regarded as non-fluorescent or exhibit very faint fluorescence, at least in neutral and weakly acidic aqueous media [32,34,36,39,46,48]. We found that both studied compounds have fluorescence emission spectra. Best to our knowledge, this work presented here is the first fluorescence characterization of cyanidin.

CONCLUSION

The results of our work presented in this paper show that cyanidin in aqueous solution at pH 5.5 exhibits fluorescence emission spectra with the maximum of the fluorescence intensity at $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}} \sim 310$ nm and surprisingly the second low intensity maxima at $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}} \sim 615$ nm in the visible wavelength range. The most effective fluorescence excitation wavelengths of cyanidin were at the UV absorption maxima, the first at 220 and 230 nm and the second at the 270 and 280 nm. The fluorescence emission spectra can be obtained for Cy3Glc in aqueous solution with the maximum in the fluorescence emission at $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}} \sim 380$ nm by using the excitation wavelengths 220 and 230 nm and at higher wavelengths at 300 and 310 nm. If compare fluorescence emission spectra of cyanidin and Cy3Glc, the fluorescence emission intensity for cyanidin is significantly higher than that for Cy3Glc. The Cy3Glc does not show fluorescence emission band in the visible range. These results reveals the impact of its 3-glucosidic substitution at C-3 of aglycone (to form Cy3Glc) on the significantly decrease of fluorescence emission intensity in UV range, and disappearance of the fluorescence emission band in visible range. Thus, fluorescence spectroscopy as a high sensitive technique can be useful for non destructive monitoring of anthocyanin compounds, especially in food and drinks.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude for financial support from the Slovenian Research Agency through the P4-0121 Research Programme and the Bilateral Project between the Republic of Slovenia and the Republic of Serbia BI-RS/12-13-015. V.R. was partly financed by a CEEPUS SI-8402/2010 Bilateral Scholarship.

PAPER ACCEPTED

REFERENCES

- Abuja, P. M., & Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*, 306(1-2), 1–17.
- Agati, G., D'Onofrio, C., Ducci, E., Cuzzola, A., Remorini, D., Tuccio, L., ... Mattii, G. (2013). Potential of a Multiparametric Optical Sensor for Determining in Situ the Maturity Components of Red and White *Vitis vinifera* Wine Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(50), 12211–12218. doi:10.1021/jf405099n
- Agati, G., Matteini, P., Oliveira, J., de Freitas, V., & Mateus, N. (2013). Fluorescence Approach for Measuring Anthocyanins and Derived Pigments in Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(42), 10156–10162. doi:10.1021/jf402398a
- Arora, A., Byrem, T. M., Nair, M. G., & Strasburg, G. M. (2000). Modulation of Liposomal Membrane Fluidity by Flavonoids and Isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373(1), 102–109. doi:10.1006/abbi.1999.1525
- Arora, A., Nair, M. G., & Strasburg, G. M. (1998). Structure–Activity Relationships for Antioxidant Activities of a Series of Flavonoids in a Liposomal System. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(9), 1355–1363.
- Bishayee, A., Mbimba, T., Thoppil, R. J., Háznagy-Radnai, E., Sipos, P., Darvesh, A. S., ... Hohmann, J. (2011). Anthocyanin-rich black currant (*Ribes nigrum* L.) extract affords chemoprevention against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(11), 1035–1046. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.09.001
- Bonarska-Kujawa, D., Pruchnik, H., Oszmiański, J., Sarapuk, J., & Kleszczyńska, H. (2011). Changes Caused by Fruit Extracts in the Lipid Phase of Biological and Model Membranes. *Food Biophysics*, 6(1), 58–67. doi:10.1007/s11483-010-9175-y
- Bordignon-Luiz, M. T., Gauche, C., Gris, E. F., & Falcão, L. D. (2007). Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT - Food Science and Technology*, 40(4), 594–599. doi:10.1016/j.lwt.2006.02.022
- Bornsek, S. M., Ziberna, L., Polak, T., Vanzo, A., Ulrich, N. P., Abram, V., ... Passamonti, S. (2012). Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chemistry*, 134(4), 1878–84. doi:10.1016/j.foodchem.2012.03.092
- Bridle, P., & Timberlake, C. F. (1997). Anthocyanins as natural food colours—selected aspects. *Food Chemistry*, 58(1-2), 103–109. doi:10.1016/S0308-8146(96)00222-1

- Brouillard, R. (1982). *Anthocyanins as Food Colors*. (P. Markakis, Ed.) (pp. 1–38). New York London: Academic Press.
- Brouillard, R., Iacobucci, G. A., & Sweeny, J. G. (1982). Chemistry of Anthocyanin Pigments. 9 . UV-Visible Spectrophotometric Determination of the Acidity Constants of Apigeninidin and Three Related 3-Deoxyflavylium Salts. *Journal of the American Chemical Society*, *104*(26), 7585–7590. doi:10.1021/ja00390a033
- Brouillard, R., Mazza, G., Saad, Z., Albrecht-Gary, A. M., & Cheminat, A. (1989). The Copigmentation Reaction of Anthocyanins: A Microprobe for the Structural Study of Aqueous Solutions. *Journal of the American Chemical Society*, *111*(7), 2604–2610. doi:10.1021/ja00189a039
- Brouillard, Raymond. (1982). Chemical Structure of Anthocyanins. In P. Markakis (Ed.), *Anthocyanins As Food Colors* (pp. 1–40). New York: Academic Press.
- Brouillard, Raymond. (1988). Flavonoids and flower colour. In J. B. Harbone (Ed.), *The Flavonoids. Advances in Research Since 1980* (p. 525). London: Chapman and Hall.
- Brouillard, Raymond, Delaporte, B., & Dubois, J.-E. (1978). Chemistry of Anthocyanin Pigments. 3. Relaxation Amplitudes in pH-Jump Experiments. *Journal of the American Chemical Society*, *100*(19), 6202–6205. doi:10.1021/ja00487a041
- Cabrera, L., Fossen, T., & Andersen, Ø. M. (2000). Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry*, *68*(1), 101–107. doi:10.1016/S0308-8146(99)00170-3
- Cater, B. R., Chapman, D., Hawes, S. M., & Saville, J. (1974). Lipid phase transition and drug interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *363*, 54–69.
- Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B., & Sengupta, P. K. (2007). Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, *41*(1), 42–48. doi:10.1016/j.ijbiomac.2006.12.003
- Chen, P.-N., Chu, S.-C., Chiou, H.-L., Chiang, C.-L., Yang, S.-F., & Hsieh, Y.-S. (2005). Cyanidin 3-Glucoside and Peonidin 3-Glucoside Inhibit Tumor Cell Growth and Induce Apoptosis In Vitro and Suppress Tumor Growth In Vivo. *Nutrition and Cancer*, *53*(2), 232–243. doi:10.1207/s15327914nc5302_12
- Cherepy, N. J., Smestad, G. P., Grätzel, M., & Zhang, J. Z. (1997). Ultrafast Electron Injection: Implications for a Photoelectrochemical Cell Utilizing an Anthocyanin Dye-Sensitized TiO₂ Nanocrystalline Electrode. *Journal of Physical Chemistry. Part B: Condensed Matter, Materials, Surfaces, Interfaces and Biophysical*, *101*(45), 9342–9351. doi:10.1021/jp972197w
- Chong, M. F.-F., Macdonald, R., & Lovegrove, J. A. (2010). Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *The British Journal of Nutrition*, *104* Suppl, S28–39. doi:10.1017/S0007114510003922

- Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1063–1072. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)
- Cuevas-Rodríguez, E. O., Yousef, G. G., García-Saucedo, P. a, López-Medina, J., Paredes-López, O., & Lila, M. A. (2010). Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Wild and Domesticated Mexican Blackberries (*Rubus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7458–64. doi:10.1021/jf101485r
- Da Silva, P. F., Lima, J. C., Quina, F. H., & Maçanita, A. L. (2004). Excited-State Electron Transfer in Anthocyanins and Related Flavylium Salts. *Journal of Physical Chemistry A*, 108(46), 10133–10140.
- Dangles, O., Saito, N., & Brouillard, R. (1993). Kinetic and thermodynamic control of flavylium hydration in the pelargonidin-cinnamic acid complexation. Origin of the extraordinary flower color diversity of *Pharbitis nil*. *Journal of the American Chemical Society*, 115(11), 3125–3132. doi:DOI: 10.1021/ja00061a011
- Del Carpio Jiménez, C., Serrano Flores, C., He, J., Tian, Q., Schwartz, S. J., & Giusti, M. M. (2011). Characterisation and preliminary bioactivity determination of *Berberis boliviana* Lechler fruit anthocyanins. *Food Chemistry*, 128(3), 717–724. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.094
- Deleu, M., Crowet, J.-M., Nasir, M. N., & Lins, L. (2014). Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: A review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(12), 3171–3190. doi:10.1016/j.bbamem.2014.08.023
- Downham, A., & Collins, P. (2000). Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science & Technology*, 35(1), 5–22. doi:10.1046/j.1365-2621.2000.00373.x
- Drabent, Regina, Pliszka, B., & Olszewska, T. (1999). Fluorescence properties of plant anthocyanin pigments. I. Fluorescence of anthocyanins in *Brassica oleracea* L. extracts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 50(1), 53–58. doi:10.1016/S1011-1344(99)00070-6
- Drabent, Regina, Pliszka, B., Huszcza-Ciołkowska, G., & Smyk, B. (2007). Ultraviolet Fluorescence of Cyanidin and Malvidin Glycosides in Aqueous Environment. *Spectroscopy Letters*, 40(1), 165–182. doi:10.1080/00387010600854279
- Dugo, P., Mondello, L., Errante, G., Zappia, G., Dugo, G., Sperone, S., & Farmaco-chimico, D. (2001). Identification of Anthocyanins in Berries by Narrow-Bore High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3987–3992. doi:10.1021/jf001495e
- Figueiredo, P., Elhabiri, M., Toki, K., Saito, N., Dangles, O., & Brouillard, R. (1996). New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for

- colour loss? *Phytochemistry*, 41(1), 301–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8588872>
- Figueiredo, Paulo, Elhabiri, M., Saito, N., & Brouillard, R. (1996). Anthocyanin Intramolecular Interactions. A New Mathematical Approach To Account for the Remarkable Colorant Properties of the Pigments Extracted from *Matthiola incana*. *Journal of the American Chemical Society*, 118(20), 4788–4793. doi:10.1021/ja9535064
- Figueiredo, Paulo, Lima, J. C., Santos, H., Wigand, M., Brouillard, R., Maqanita, A. L., & Pina, F. (1994). Photochromism of the Synthetic 4',7-Dihydroxyflavylium Chloride. *Journal of the American Chemical Society*, 116(4), 1249–1254. doi:10.1021/ja00083a011
- Figueiredo, Paulo, Pina, F., Vilas-Boas, L., & Macanita, A. L. (1990). Fluorescence spectra and decays of malvidin 3,5-diglucoside in aqueous solutions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 52(3), 411–424.
- Fossen, T., Cabrita, L., & Andersen, M. (1998). Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*, 63(4), 435–440.
- Friedman, M., & Jürgens, H. S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(6), 2101–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10888506>
- George, F., Figueiredo, P., & Brouillard, R. (1999). Malvin Z-chalcone: An unexpected new open cavity for the ferric cation. *Phytochemistry*, 50(8), 1391–1394. doi:10.1016/S0031-9422(98)00427-0
- Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(7), 618–626. doi:10.1016/j.jfca.2007.03.002
- Gonnet, J.-F. (1998). Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited-1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. *Food Chemistry*, 63(3), 409–415.
- Gonnet, J.-F. (1999). Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited-2 . A colorimetric look at the solutions of cyanin co-pigmented by rutin using the CIELAB scale. *Food Chemistry*, 66(3), 387–394.
- Gonnet, J.-F. (2001). Colour effects of co-pigmentation of anthocyanin revisited — 3 . A further description using CIELAB differences and assessment of matched colours using the CMC model. *Food Chemistry*, 75(4), 473–485.
- Grace, M. H., Ribnicky, D. M., Kuhn, P., Poulev, A., Logendra, S., Yousef, G. G., ... Lila, M. A. (2009). Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine*, 16(5), 406–415. doi:10.1016/j.phymed.2009.02.018

- Heredia, F. J., Francia-Aricha, E. M., Rivas-Gonzalo, J. C., Vicario, I. M., & Santos-Buelga, C. (1998). Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes - I. pH effect □. *Food Chemistry*, 63(4), 491–498.
- Hurtado, N. H., Morales, A. L., González-Miret, M. L., Escudero-Gilete, M. L., & Heredia, F. J. (2009). Colour, pH stability and antioxidant activity of anthocyanin rutosides isolated from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chemistry*, 117(1), 88–93. doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.081
- Joiner, A. (2004). Tooth colour: a review of the literature. *Journal of Dentistry*, 32, 3–12. doi:10.1016/j.jdent.2003.10.013
- Jordheim, M., Enerstvedt, K. H., & Andersen, Ø. M. (2011). Identification of Cyanidin 3-O-β-(6''-(3-Hydroxy-3-methylglutaroyl)glucoside) and Other Anthocyanins from Wild and Cultivated Blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7436–7440. doi:10.1021/jf201522b
- Kadivec, M., Može Bornšek, S., Polak, T., Demšar, L., Hribar, J., & Požrl, T. (2013). Phenolic Content of Strawberry Spreads during Processing and Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(38), 9220–9. doi:10.1021/jf4035767
- Kähkönen, M. P. H., & Johanna; Ollilainen, Velimatti; Heinonen, M. (2003). Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(14), 1403–1411. doi:10.1002/jsfa.1511
- Kammerer, D., Gajdos Kljusuric, J., Carle, R., & Schieber, A. (2005). Recovery of anthocyanins from grape pomace extracts (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Mitoš) using a polymeric adsorber resin. *European Food Research and Technology*, 220(3-4), 431–437. doi:10.1007/s00217-004-1078-z
- Keller, R. B. (Ed.). (2009). *Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources*. New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Lakowicz, J. R. (Ed.). (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (3rd ed.). New York: Springer US. doi:10.1007/978-0-387-46312-4
- Laleh, G. H., Frydoonfar, H., Heidary, R., Jameei, R., & Zare, S. (2006). The Effect of Light, Temperature, pH and Species on Stability of Anthocyanin Pigments in Four Berberis Species. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5(1), 90–92. doi:10.3923/pjn.2006.90.92
- Lasic, D. D. (1993). *Liposomes: from physics to applications* (pp. 63–107). Amsterdam: Elsevier.
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., & Billot, J. (1990). *Fruit Phenolics* (1 edition.). Boca Raton: CRC Press, Inc.
- Malien-Aubert, C., Dangles, O., & Amiot, M. J. (2001). Color Stability of Commercial Anthocyanin-Based Extracts in Relation to the Phenolic Composition. Protective Effects by Intra- and Intermolecular Copigmentation. *Journal of agricultural and food*

- chemistry*, 49(1), 170–176. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11170573>
- Malien-Aubert, Céline, Dangles, O., & Amiot, M. J. (2002). Influence of Procyanidins on the Color Stability of Oenin Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3299–3305. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010001>
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 suppl), 230S–242S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15640486>
- Marczylo, T. H., Cooke, D., Brown, K., Steward, W. P., & Gescher, A. J. (2009). Pharmacokinetics and metabolism of the putative cancer chemopreventive agent cyanidin-3-glucoside in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64(6), 1261–1268. doi:10.1007/s00280-009-0996-7
- Mazza, G., & Brouillard, R. (1987). Color Stability and Structural Transformations of Cyanidin 3,5-Diglucoside and Four 3-Deoxyanthocyanins in Aqueous Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(3), 422–426. doi:10.1021/jf00075a034
- Mazza, G., & Brouillard, R. (1990). The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry*, 29(4), 1097–1102.
- Mazza, Giuseppe, & Miniati, E. (1993). *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains*. Boca Raton: CRC Press, Inc. doi:10.1002/food.19940380317
- McGhie, T. K., & Walton, M. C. (2007). The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(6), 702–713. doi:10.1002/mnfr.200700092
- Mertz, C., Cheynier, V., Günata, Z., & Brat, P. (2007). Analysis of Phenolic Compounds in Two Blackberry Species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8616–24. doi:10.1021/jf071475d
- Miljkovic, M., Purenovic, M., Djordjevic, D., & Petrovic, M. (2011). Influence of Different Acids for Adjusting the Dye bath pH Value on the Dyeability of Polyester Knitwear Dyed with Disperse Yellow 23. *Hemijska industrija*, 65(3), 257–261. doi:10.2298/HEMIND110124015M
- Miljković, N. M. (1994). *Uticaj organskih i neorganskih kiselina na obojenost i mehanizam bojenja poliestarskih vlakana disperznim bojama*. Univerzitet u Nišu.
- Oteiza, P. I., Erlejman, A. G., Verstraeten, S. V., Keen, C. L., & Fraga, C. G. (2005). Flavonoid-membrane Interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clinical and Developmental Immunology*, 12(1), 19–25. doi:10.1080/10446670410001722168

- Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Poste, G., & Shepherd, G. (1975). Effects of local anesthetics on membrane properties I. Changes in the fluidity of phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 394(4), 504–519.
- Passamonti, S., Terdoslavich, M., Franca, R., Vanzo, A., Tramer, F., Braidot, E., ... Vianello, A. (2009). Bioavailability of Flavonoids: A Review of Their Membrane Transport and the Function of Bilirubin Translocase in Animal and Plant Organisms. *Current Drug Metabolism*, 10(4), 369–394. doi:http://dx.doi.org/10.2174/138920009788498950
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., & Mattivi, F. (2003). The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters*, 544(1-3), 210–213. doi:10.1016/S0014-5793(03)00504-0
- Prior, R. L., & Wu, X. (2006). Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, 40(10), 1014–1028. doi:10.1080/10715760600758522
- Riske, K. A., Barroso, R. P., Vequi-Suplicy, C. C., Germano, R., Henriques, V. B., & Lamy, M. T. (2009). Lipid bilayer pre-transition as the beginning of the melting process. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(5), 954–963. doi:10.1016/j.bbamem.2009.01.007
- Sadilova, E., Carle, R., & Stintzing, F. C. (2007). Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(12), 1461–71. doi:10.1002/mnfr.200700179
- Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., & Castelli, F. (1995). Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(4), 481–486.
- Santos, H., Turner, D. L., Lima, J. C., Figueiredo, P., Pina, F. S., & Maçanita, A. L. (1993). Elucidation of the Multiple Equilibria of Malvin in Aqueous Solution by One- and Two-Dimensional NMR. *Phytochemistry*, 33(5), 1227–1232.
- Sarić, A., Sobocanec, S., Balog, T., Kusić, B., Sverko, V., Dragović-Uzelac, V., ... Marotti, T. (2009). Improved Antioxidant and Anti-inflammatory Potential in Mice Consuming Sour Cherry Juice (*Prunus Cerasus* cv. Maraska). *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(4), 231–237. doi:10.1007/s11130-009-0135-y
- Sepcic, K., Berne, S., Potrich, C., Turk, T., Macek, P., & Menestrina, G. (2003). Interaction of ostreolysin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, with lipid membranes and modulation by lysophospholipids. *European Journal of Biochemistry*, 270(6), 1199–1210. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03480.x
- Shih, P.-H., Chan, Y.-C., Liao, J.-W., Wang, M.-F., & Yen, G.-C. (2010). Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *The Journal of nutritional biochemistry*, 21(7), 598–605. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.03.008

- Sun, C., Zheng, Y., Chen, Q., Tang, X., Jiang, M., Zhang, J., ... Chen, K. (2012). Purification and anti-tumour activity of cyanidin-3-O-glucoside from Chinese bayberry fruit. *Food Chemistry*, 131(4), 1287–1294. doi:10.1016/j.foodchem.2011.09.121
- Sun, J., Bai, W., Zhang, Y., Liao, X., & Hu, X. (2011). Effects of electrode materials on the degradation, spectral characteristics, visual colour, and antioxidant capacity of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-sophoroside during pulsed electric field (PEF) treatment. *Food Chemistry*, 128(3), 742–747. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.099
- Tarozzi, A., Morroni, F., Merlicco, A., Bolondi, C., Teti, G., Falconi, M., ... Hrelia, P. (2010). Neuroprotective effects of cyanidin 3-O-glucopyranoside on amyloid beta (25-35) oligomer-induced toxicity. *Neuroscience Letters*, 473(2), 72–76. doi:10.1016/j.neulet.2010.02.006
- Timberlake, C. F., & Henry, B. S. (1986). Plant pigments as natural food colours. *Endeavour*, 10(1), 31–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2422009>
- Torskangerpoll, K., & Andersen, Ø. M. (2005). Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chemistry*, 89(3), 427–440. doi:10.1016/j.foodchem.2004.03.002
- Tremblay, F., Waterhouse, J., Nason, J., & Kalt, W. (2013). Prophylactic neuroprotection by blueberry-enriched diet in a rat model of light-induced retinopathy. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(4), 647–655. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.03.011
- Tripoli, E., Guardia, M. La, Giammanco, S., Majo, D. Di, & Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104(2), 466–479. doi:10.1016/j.foodchem.2006.11.054
- Wang, H., Nair, M. G., Strasburg, G. M., Chang, Y.-C., Booren, A. M., Gray, J. I., & DeWitt, D. L. (1999). Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Anthocyanins and Their Aglycon, Cyanidin, from Tart Cherries. *Journal of Natural Products*, 62(2), 294–6. doi:10.1021/np980501m
- Watts, A., Harlos, K., Maschke, W., & Marsh, D. (1978). Control of the structure and fluidity of phosphatidylglycerol bilayers by pH titration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 510(1), 63–74.
- Wesołowska, O., Gašiorowska, J., Petrus, J., Czarnik-Matusiewicz, B., & Michalak, K. (2014). Interaction of prenylated chalcones and flavanones from common hop with phosphatidylcholine model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838(1 Pt B), 173–184. doi:10.1016/j.bbamem.2013.09.009
- Xu, X., & London, E. (2000). The Effect of Sterol Structure on Membrane Lipid Domains Reveals How Cholesterol Can Induce Lipid Domain Formation. *Biochemistry*, 39(5), 843–849. doi:10.1021/bi992543v

- Yang, X., Yang, L., & Zheng, H. (2010). Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2374–2379. doi:10.1016/j.fct.2010.05.074
- Yao, N., Lan, F., He, R.-R., & Kurihara, H. (2010). Protective Effects of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Extract against Endotoxin-Induced Uveitis in Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4731–4736. doi:10.1021/jf904572a
- Zawistowski, J., Kopec, A., & Kitts, D. D. (2009). Effects of a black rice extract (*Oryza sativa* L. *indica*) on cholesterol levels and plasma lipid parameters in Wistar Kyoto rats. *Journal of Functional Foods*, 1(1), 50–56. doi:10.1016/j.jff.2008.09.008

PAPER ACCEPTED

Izvod

Proučavanje fluorescentnih svojstava cijanidina i cijanidin 3-O- β -glukopiranozida

Violeta P. Rakić^{1,*}, Ajda M. Ota², Mihaela A. Skrt², Milena N. Miljković³, Danijela A. Kostić³, Dušan T. Sokolović⁴, Nataša E. Poklar Ulrih^{2,5}

¹Visoka poljoprivredno-prehrambena škola strukovnih studija, Ćirila i Metodija 1, SRB-18400 Prokuplje, Srbija

²Departman za prehrambenu tehnologiju, Biotehnički fakultet, Univerzitet u Ljubljani, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

³Departman za hemiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Višegradska 33, SRB-18000 Niš, Srbija

⁴Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, Bulevar dr Zorana Đinđića 81, SRB-18000 Niš, Srbija

⁵Centar veštine za integrisane pristupe u hemiji i biologiji proteina (CipKeBiP), Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

(Naučni rad)

U ovom radu ispitivana su apsorpciona i fluorescentna svojstva aglikona bez šećera, cijanidina i uticaj njegove 3-glukozidne supstitucije (do oblika Cy3Glc) na spektralne parametre. Učinjen je pokušaj da se utvrdi korelacija između apsorpcionih i fluorescentnih emisionih spektara. Ekscitacija molekula cijanidina i Cy3Glc vršena je talasnim dužinama iz UV oblasti spektra (210 - 350 nm, na svakih 10 nm). Poređenje apsorpcionog spektra cijanidina pri pH 5.5 sa apsorpcionim spektrom flavilijum katjona (pH 0.4) pokazuje da u

vodenom rastvoru, pri pH 5.5, uglavnom postoji bezbojna forma cijanidina. Emisioni spektri cijanidina proučavani su pri ekscitaciji molekula talasnim dužinama iz UV oblasti spektra, koje su odgovarale talasnim dužinama apsorpcionih maksimuma. U skladu sa UV-vis apsorpcionim spektrima, najefikasnija ekscitacija molekula cijanidina izmerena je na 220 i 230 nm, gde je molarna apsorptivnost jedinjenja najveća. Druga efikasna ekscitacija molekula cijanidina bila je na 270 i 280 nm. Utvrđeno je da cijanidin ima fluorescentni emisioni spektar sa dve trake, prvu u UV oblasti sa maksimumom na 310 nm i drugu u vidljivoj oblasti sa maksimumom na 615 nm. Poređenje apsorpcionog spektara Cy3Glc pri pH 5.5 sa apsorpcionim spektrom flavilijum katjona (pri pH 0.4) ukazuje da Cy3Glc uglavnom postoji u bezbojnom obliku pri ovoj pH vrednosti. U skladu sa UV-vis apsorpcionim spektrima, najefikasnija ekscitacija molekula Cy3Glc izmerena je na 220 i 230 nm, gde je molarna apsorptivnost jedinjenja najveća. Druga efikasna ekscitacija molekula Cy3Glc bila je pri 300 i 310 nm. Utvrđeno je da Cy3Glc ima fluorescentni emisioni spektar sa maksimumom na 380 nm, ali ne pokazuje fluorescentnu emisiju u vidljivoj oblasti. Ako se uporede fluorescentni emisioni spektri cijanidina i Cy3Glc može se videti da je intenzitet fluorescentne emisije cijanidina značajno veći od intenziteta fluorescentne emisije Cy3Glc. Ovi rezultati ukazuju na uticaj 3-glukozidne supstitucije na C-3 atomu aglikona (do oblika Cy3Glc) na značajano smanjenje intenziteta fluorescentne emisije i gašenje fluorescencije u oblasti talasnih dužina vidljivog dela spektra.

Keywords: anthocyanins, anthocyanidins, cyanidin, cyanidin 3-glucopyranoside, fluorescence emission spectra, UV-Vis absorption spectra.

Ključne reči: antocijanini, antocijanidini, cijanidin, cijanidin 3-glukopiranozid, fluorescentni emisijski spektar, UV-Vis apsorpcioni spektar.

Figure captions

Figure 1. Transformations of cyanidin and Cy3Glc in aqueous solutions at different pH values. At C-3 for cyanidin R = H, for Cy3Glc R = Glc [23,30–32,36]

Figure 2. UV-vis spectra of cyanidin in aqueous solution at pH 0.4 (—) and 5.5 (·····). The concentration of cyanidin was 2×10^{-4} mol dm⁻³, and the temperature was 25.0°C.

Figure 3. Fluorescence emission spectra of cyanidin in aqueous solution at pH 5.5. Excitation wavelength $\lambda_{\text{exc}}=220$ (—) and $\lambda_{\text{exc}}=230$ (·····) (A); Excitation wavelength $\lambda_{\text{exc}}=270$ (—) and $\lambda_{\text{exc}}=280$ (·····) (B). The concentration of cyanidin was 2×10^{-5} mol dm⁻³, and the temperature was 25.0°C.

Figure 4. UV-vis spectra of Cy3Glc in aqueous solution at pH 0.4 (—) and 5.5 (·····). The concentration of cyanidin was 2×10^{-4} mol dm⁻³, and the temperature was 25.0°C.

Figure 5. Fluorescence emission spectra of Cy3Glc in aqueous solution at pH 5.5. Excitation wavelength $\lambda_{\text{exc}}=220$ (—) and $\lambda_{\text{exc}}=230$ (·····) (A); Excitation wavelength $\lambda_{\text{exc}}=300$ (—) and $\lambda_{\text{exc}}=310$ (·····) (B). The concentration of cyanidin was 2×10^{-5} mol dm⁻³, and the temperature was 25.0°C.

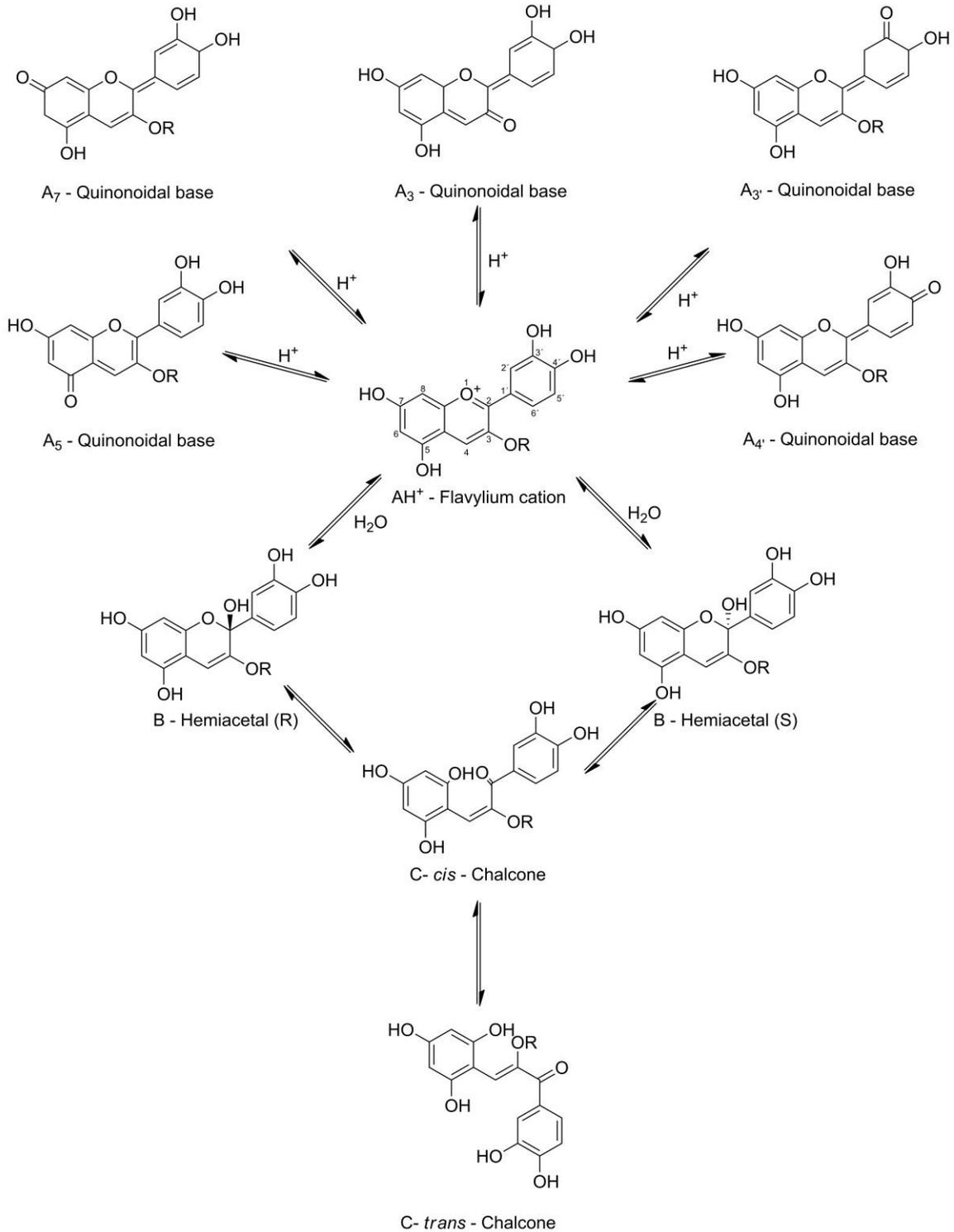


Figure 1.

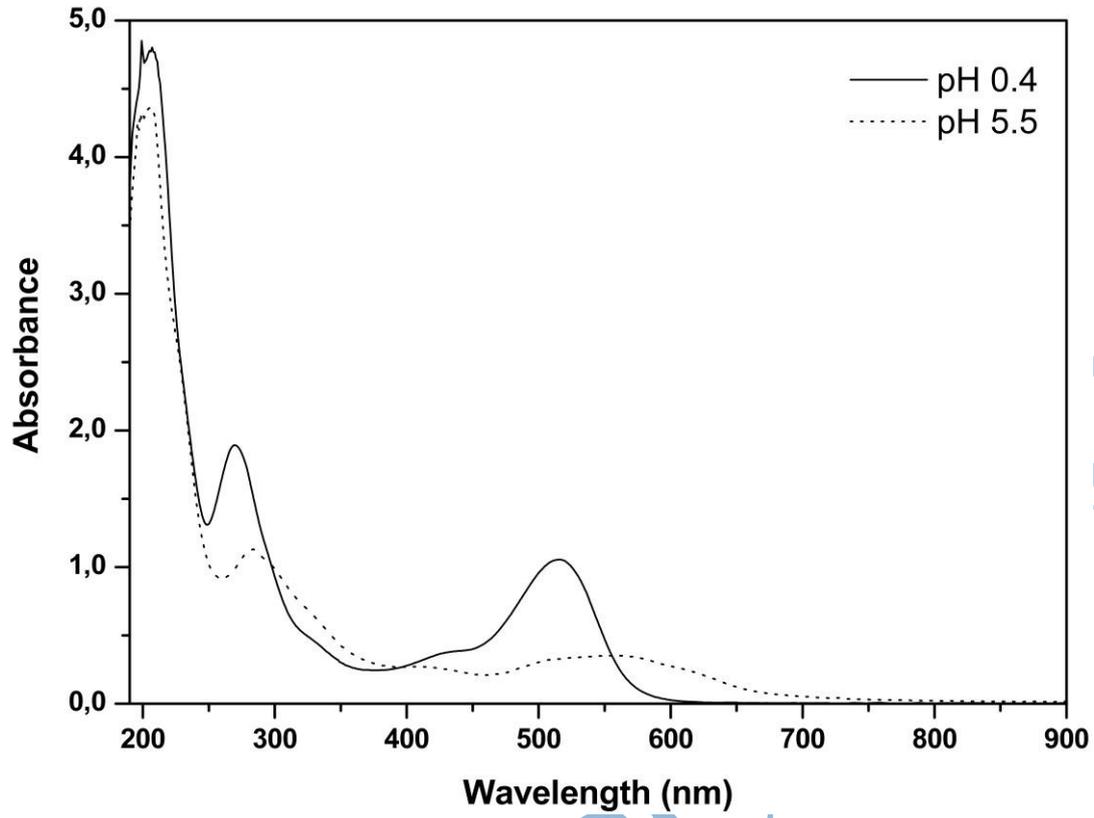


Figure 2.

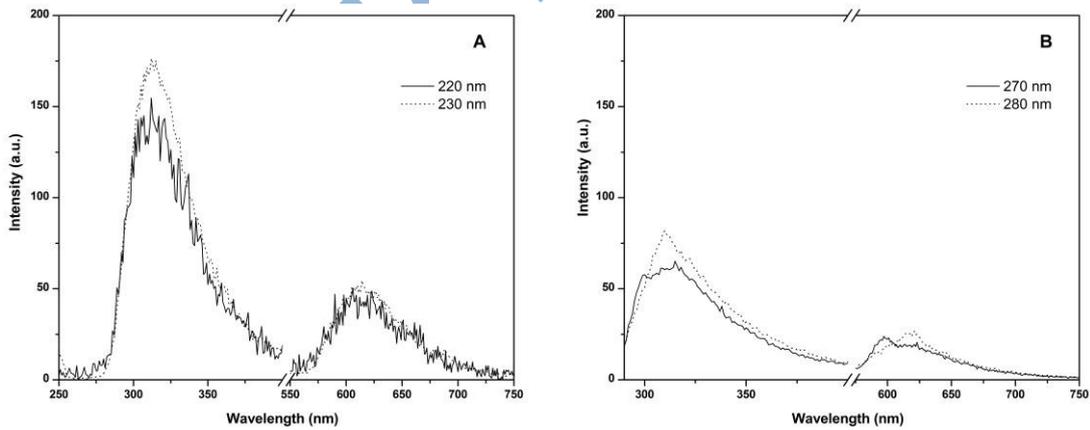


Figure 3.

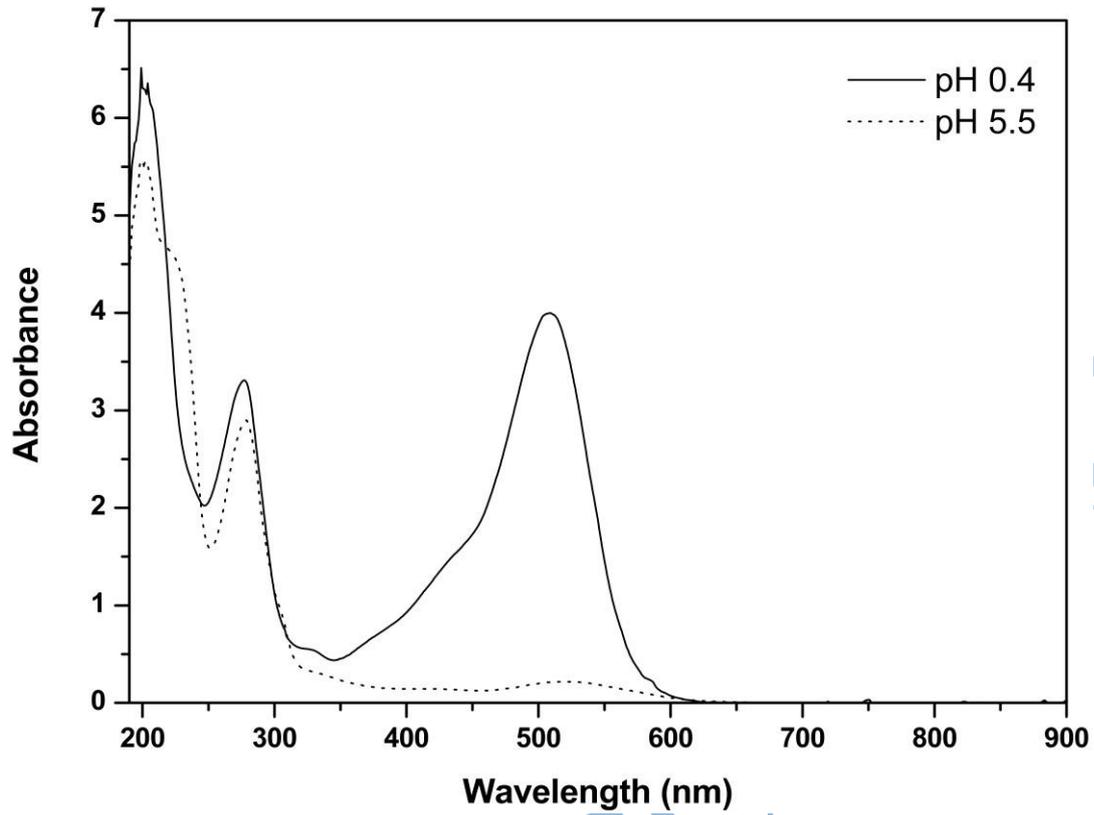


Figure 4.

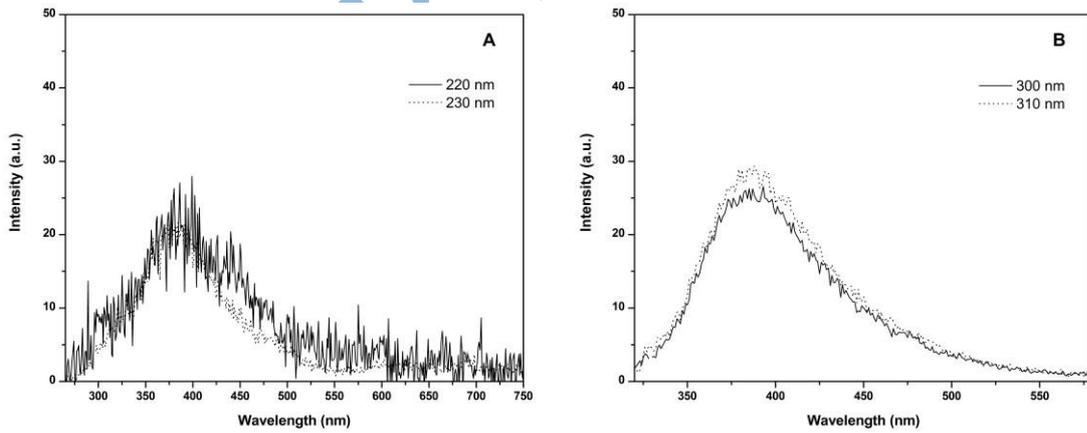


Figure 5.

Scientific paper

Effects of pH on the stability of Cyanidin and Cyanidin 3-O- β -glucopyranoside in aqueous solution

Violeta P. Rakić^{1,*}, Mihaela A. Skrt², Milena N. Miljković³, Danijela A. Kostić³, Dušan T. Sokolović⁴, Nataša E. Poklar Ulrih^{2,5}

¹College of Agriculture and Food Technology, Ćirila i Metodija 1, SRB-18400 Prokuplje, Serbia

²Department of Food Science and Technology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

³Department of Chemistry, Faculty of Science and Mathematics, University of Niš, Višegradska 33, SRB-18000 Niš, Serbia

⁴Faculty of Medicine, University of Niš, Blvd. Dr Zorana Djindjica 81, SRB-18000 Niš, Serbia

⁵Centre of Excellence for Integrated Approaches in Chemistry and Biology of Proteins (CipKeBiP), Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

Paper received: 11 July 2014

Paper accepted: 25 September 2014

*Corresponding author: Violeta Rakić, College of Agriculture and Food Technology, Ćirila i Metodija 1, SRB-18400 Prokuplje, Serbia, Tel: +381- 27-324-311, Fax: +381-27-324-311, Email: violetachem@gmail.com

Abstract

The colour variation, colour intensity and stability at various pH values (2.0, 4.0, 7.0 and 9.0) of cyanidin 3-*O*- β -glucopyranoside (Cy3Glc) and its aglycone cyanidin was investigated during a period of 8 hours storage at 25 °C. Our data showed that pH of aqueous solution had impact on spectroscopic profile of cyanidin and Cy3Glc. Beginning with the most acidic solutions, increasing the pH induce bathochromic shifts of absorbance maximum in the visible range for all examined pH values (with the exception pH 4.0 for cyanidin), while the presence of the 3-glucosidic substitution induce hypsochromic shift. Compared to cyanidin, Cy3Glc has higher colour intensity and higher stability in the whole pH range, except at pH 7.0. The 3-glucosidic substitution influences on the colour intensity of Cy3Glc in the alkaline region. After 8-hour incubation of Cy3Glc and cyanidin at pH 2.0 and 25 °C, 99% of Cy3Glc and only 27% of cyanidin remained unchanged.

Keywords: anthocyanins, anthocyanidins, cyanidin, cyanidin 3-glucopyranoside, colour variation, colour intensity, stability, Brown index, UV-Vis absorption spectra.

INTRODUCTION

The anthocyanins are the large water-soluble group of natural pigments responsible for the attractive colours - ranging from strawberry red to blue - of most fruits, flowers, leaves, and some vegetables. More than 225 individual compounds are known. Chemically, they are glycosides of 2-phenylbenzopyrylium or flavylum salts. Anthocyanin sugars comprise monosides (glucose, galactose, rhamnose, and arabinose), biosides, and trisides (linear and branched chain). Additionally, the sugars can be acylated, notably with phenolic acids such as para-coumaric and caffeic acids which impart stability on the molecule by intra-molecular interactions [1].

Anthocyanins are commercially used in acid solutions such as soft drinks (usually within the pH range 2.5-3.8) where they are red (due to the flavylum cation). At higher pH values (6 and upwards) they turn blue, due to formation of quinonoidal bases [1]. Since anthocyanins form the red and blue colours of most fruits and vegetables they provide, the attractive colours of many fruit juices, wines, jams and preserves [2,3].

Commercial applications of anthocyanins include sugar confectionery, jams, and bakery toppings as well as soft drinks [1]. There is worldwide interest in additional use of anthocyanins as a consequence of perceived consumer preferences as well as legislative action, which has continued the delisting of approved artificial dyes [2]. Today, there is considerable interest in the development of food colourants from natural sources to replace synthetic food colourants [4,5]. The reason behind this is to develop safe, economical, and efficient food colourants to replace the banned coal tar and azo dyes [4,6]. Many of the products so coloured are exported to countries where regulations do not permit the use of artificial colours or where there is consumer resistance to artificial additives [1]. Here, coloured anthocyanins have some advantages: they are safe, coloured especially in the red

region, and relatively soluble, which simplifies their incorporation into aqueous food systems [4,7].

However, there are some limitations to the use of anthocyanins as food colourants, which include their chemical instability, their need for purification, and their tinctorial power, which is nearly 100-fold lower than that of the coal tar dyes. In food products, a number of reactions can occur, although the major problem associated with the use of anthocyanins as food colourants is their temperature, oxygen, light and enzymatic instability [4,7–12]. A particular problem is the pH influence on their behavior [3,7]. Based on observation of a few relatively simple anthocyanins *in vitro*, the following scheme is generally accepted [7,13,14]: at a pH \leq 3, the orange, red or purple flavylium cation predominates. As the pH increases, kinetic and thermodynamic competition occurs between the hydration reaction on position 2 of the flavylium cation and the proton transfer reactions related to the acidic hydroxyl groups of the aglycone. While the first reaction gives a colourless hemiacetal form, which can undergo ring opening to a yellow chalcone, the latter reactions give rise to more violet quinonoidal bases. Further deprotonation of the quinonoidal bases can take place at pH values between 6 and 7 with the formation of purplish, resonance-stabilised quinonoid anions. It is generally accepted that anthocyanins exhibit their most intense colour when they are in their flavylium cation form [7]. At the pH values typical for fresh and processed fruits and vegetables, each anthocyanin will thus most probably be represented by a mixture of equilibrium forms [8]. The anthocyanins has great importance because of their demonstrated pharmacological activities [15,16]. Numerous studies have reported the beneficial health effects of consuming dietary fruits and vegetables containing anthocyanins [17–19]. They have attracted much attention in relation to their physiological activities, and their role has become an important issue in the relationship between health and human diet. In particular, the potential positive effects associated with consumption of fruit-derived foods are attributed to the presence of

such natural compounds [20]. The anthocyanins have several biological activities, including antioxidant, antihepatocarcinogenic, anti-inflammatory, anti-tumor, neuroprotective, antihemolytic, anti-diabetic, hypolipidemic and cancer chemopreventive [21–35]. Epidemiological studies have suggested that anthocyanins have cardioprotective functions in human [36], and other studies have suggested that anthocyanins inhibit tumor-cell growth *in vitro* and suppress tumor growth *in vivo* [37].

An intensive research has been done to identify the content of potential anthocyanin sources [9], and the content of the principal commercial available colourant sources covers a variety of different anthocyanins: grape (*Vitis vinifera*), red cabbage (*Brassica oleraceae*), elderberry (*Sambucus nigra*, *S. canadensis*), purple carrot (*Daucus carota*), red radish (*Raphanus sativus*), blackcurrant (*Ribes nigrum*), roselle (*Hibiscus sabdariffa*), black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) [1,38]. All these products may be characterized as crude or partially purified extracts containing a mixture of anthocyanins in addition to other components. The information regarding characteristics and the stability of these extracts has increased in recent years. However, there remain few data in the literature related to the properties and stability of pure anthocyanins, and especially of the anthocyanidins during storage. The major reason for this is that most anthocyanins are difficult to purify and have limited commercial accessibility, especially in large quantities [3]. It is important to know how the structural transformations according to pH and the structural modifications such as glucosidation influence the colour and stability of the anthocyanins. These facts are important from the viewpoint of the possibility to use these compounds as natural food colourants.

Cyanidin 3-O- β -glucopyranoside (Cy3glc) is a typical representative for the simple type of anthocyanins found in elderberry, blueberry, cowberry, whortleberry, blackcurrant, roselle, black chokeberry, etc. [3]. In this paper the colour and stability of Cy3Glc and his aglycone moiety of cyanidin (Figure 1), in aqueous solutions, were examined at four pH values

between 2.0 and 9.0. The colour and stability changes were measured during incubation at different pH values in the period of 8 hours at 25 °C. Thus, it has been possible to compare under various pH conditions and times impacts of 3-glucosidic substitution, on colour and stability. The results vary tremendously, and this emphasizes the importance of structure on anthocyanin and anthocyanidin properties.

Figure 1.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

The chloride salts of cyanidin (2-(3,4-dihydroxyphenyl)chromenylium-3,5,7-triol chloride, CAS Number: 528-58-5, $C_{15}H_{11}O_6Cl$, molecular weight 322.7 g/mol) and cyanidin 3-O- β glucopyranoside ((2S,3R,4S,5S,6R)-2-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxychromenylium-3-yl]oxy-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol chloride, CAS Number: 7084-24-4, $C_{21}H_{21}O_{11}Cl$, molecular weight 484.8 g/mol) were from Polyphenols Laboratories AS (Sandnes, Norway). Acetic acid, ammonium acetate, citric acid monohydrate, formic acid, sodium citrate and methanol were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ammonium formate and ammonium hydroxide were obtained from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). Aqueous solutions were prepared from Milli-Q water (resistivity $>18 M\Omega$ cm) (Millipore, Bedford, MA, USA).

Measurements of colour and stability

To determine the colour and stability the spectrophotometric analysis of cyanidin and Cy3Glc kept at different pH values were performed in specified time intervals in the period of 8 hours.

Buffer solutions of four different pH values with 2.5×10^{-2} mol dm⁻³ concentration were prepared for dilution of cyanidin and Cy3Glc. The following buffers were used: ammonium formate/formic acid (pH 2.0), sodium acetate/acetic acid (pH 4.0), sodium citrate/citric acid (pH 7.0) and ammonium acetate/ammonium hydroxide (pH 9.0). The pH values of the various samples did not change during storage. The colour and stability of cyanidin and Cy3Glc were determined at $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. The chloride salts of the cyanidin and Cy3Glc were dissolved in each buffer to a final concentration of 5×10^{-5} mol dm⁻³. The visible absorption spectra (380-800 nm) of the cyanidin and Cy3Glc solutions were recorded at specified pH values at $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Pure buffers were used as blank. Spectrophotometric measurements were made immediately after dissolution and then after specified time intervals in the period of 8 hours. The absorbencies in the visible range of the freshly made samples were between 0.01 and 0.96 absorbance units, and none sample were diluted before measurements. The spectral behavior of anthocyanins is dependent on solvent [2], and substances present in the solution may influence on the colour and stability. The impacts of atmospheric oxygen and other factors, such as the composition of the buffer solutions, were not examined in this study.

Instruments

The accurate pH values for each buffer solution were measured with a Mettler Toledo S20 Seven Easy pH meter (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) equipped with Mettler Toledo InLab electrode (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland).

The spectrophotometric measurements were performed using a Cary 100 Bio UV-visible Spectrophotometer (Varian, Mulgrave, Victoria, Australia) in a thermostated 10-mm-pathlength quartz cell.

RESULTS AND DISCUSSION

According to Cabrita et al. and Fossen et al. [2,3], the colour variation of cyanidin and Cy3Glc were expressed as the changes in the positions of the absorbance maximum in the visible range ($\lambda_{\text{max-vis}}$), colour intensities were measured as absorbance values at visible absorbance maximum $\lambda_{\text{max-vis}}$ immediately after dissolution (t_0) and after a certain time interval and expressed as molar absorptivities (a , in $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), and the stability was expressed as the percentage of the absorbance remained after a certain time interval, measured at initial $\lambda_{\text{max-vis}}$. Brown index (BI) was expressed as the absorbance ratio at 430 nm by that at 520 nm according to the Malien-Aubert et al. [38,39]. The pH values of the dissolution have a large influence on the spectroscopic profiles of the cyanidin and Cy3Glc obtained after dissolution in the selected buffers prior to the analysis. The self-association of cyanidin and Cy3Glc occur at high concentrations ($>10^{-3} \text{mol dm}^{-3}$) [40]. In our investigations, cyanidin and Cy3Glc were dissolved to final concentration of $5 \times 10^{-5} \text{mol dm}^{-3}$. At this low concentrations cyanidin and Cy3Glc exists as monomers in the studied solutions [41].

Colour variation of cyanidin and cyanidin 3-O- β -glucopyranoside

The most common way to indicate anthocyanin colours is based on presentation of visible $\lambda_{\text{vis-max}}$ values from UV/Vis absorption spectra. By plotting the $\lambda_{\text{vis-max}}$ values (Table 1) obtained for the cyanidin and Cy3Glc immediately after dissolution in aqueous solutions at different pH values, a similar pattern was achieved (Figure 2). The following tendency was established for Cy3Glc: beginning with the most acidic solution, increase in pH produced bathochromic shifts (Figure 2). This pattern correlates well with earlier reports for Cy3Glc [2,3,8]. At the pH 4.0, cyanidin showed no spectral band in the visible spectrum. At the other pH values,

especial higher pH values, maxima of absorbance in the visible range for cyanidin resulted in bathochromic shift (Figure 2). The visible absorbance maxima for cyanidin were in all instances (except pH 4.0) higher than the corresponding $\lambda_{\text{vis-max}}$ values for Cy3Glc (Table 1). This reveals the impact of the 3-glycosylation in Cy3Glc on the position of the visible absorption maximum: the presence of the 3-glucosidic substitution cause hypsochromic shift.

Figure 2.

Table 1.

Colour intensity of cyanidin and cyanidin 3-O- β -glucopyranoside

The pH variation affects the colour intensities of the cyanidin and Cy3Glc (Table 1). Comparing the molar absorptivities of spectral bands in the visible range for cyanidin and Cy3Glc (Figure 3) it can be seen that 3-glucosidic substitution strongly increases the molar absorptivity of the aglycone moiety. The molar absorptivities were highest at pH 2.0 for the both pigments and strongly decreased toward pH 4.0, where local minimum for Cy3Glc are achieved, while cyanidin shows no spectral band in the visible spectrum. According to the previously published data simple anthocyanins, like Cy3Glc, are unstable and are quickly decolourized by hydration at the 2-position of the anthocyanidin skeleton in the pH region 5-7 [3,13], which is in good agreement with our results here. Further pH increase cause increase in molar absorptivities for the both pigments. The similarity between the curves indicates that the both pigments have the same type and distribution of equilibrium forms: the colourful favylum form dominates at pH 2.0, and the occurrence of colourless hemiacetal forms increases toward pH 4.0 [2,3,7,13,41,42]. At pH values above 7.0, cyanidin and Cy3Glc

shows a hyperchromic effect until pH 9.0, when anthocyanins are expected to occur mainly in their quinonoidal and quinonoidal anion forms [2,7,13,41,42]. It was noticed that Cy3Glc showed relatively high a values in alkaline solutions. The ratio between the absorbance at the local maximum in the alkaline region at pH 9.0 and at pH 2.0 for cyanidin was 0.32, while the ratio for Cy3Glc was 0.65 indicating that 3-glucosidic substitution is favorable for colour intensity in the alkaline region. Obtained results for molar absorptivities of Cy3Glc (Table 1) is in good accordance with previously published data [2,3].

Figure 3.

Molar absorptivities of Cy3Glc solution during storage at pH 2.0 and 25 °C were high and constant, according to the flavylium cationic structure [7,13,41,42] (Figure 4A). Surprisingly, molar absorptivities of cyanidin solution during storage at pH 2.0 and 25 °C, decrease, although it is in the form of flavylium cation [7,13] (Figure 4A). This indicated the shift of the coloured flavylium cation into the other structures. Molar absorptivities of Cy3Glc solution at pH 4.0 and 25 °C were significantly lower compared to the pH 2.0, but were constant during storage (Figure 4B). At pH 4.0 cyanidin does not show the spectral band in the visible spectrum (Figure 4B). At pH 7.0 Cy3Glc show two bands with visible absorbance maximum at 441 and 549 nm (Figure 4C). The Cy3Glc show great decrease in molar absorptivities with time at 25°C. At the same conditions cyanidin shows low and almost constant molar absorptivity values (Figure 4C). At pH 9.0 the initial, relatively high value of Cy3Glc molar absorptivity decreases during storage at 25°C. The molar absorptivity of cyanidin at pH 9.0 was low and slightly decreases during storage. This reveals the impact of the 3-glycosylation in Cy3Glc on the molar absorptivities: the presence of the 3-glucosidic substitution strongly

increase molar absorptivities at all examined pH values and improve stability at pH 2.0 and 4.0.

Figure 4.

Cyanidin and cyanidin 3-O β -glucopyranoside stability on storage at 25 °C

The stabilities of cyanidin and Cy3Glc highly depend on pH and structure. The cyanidin and Cy3Glc were incubated for 8 hours in buffered solutions at 4 different pH values at 25 °C, and their visible absorption spectra were registered at determined time intervals. According to Cabrita et al. [2] stability was described on the basis of absorbance changes measured at the cyanidin and Cy3Glc $\lambda_{\text{vis-max}}$ for each pH value. During incubation at 25 °C (Table 2) and at pH 2.0, Cy3Glc showed significantly higher visible absorption values in comparison with those of cyanidin. According to the Brouillard [7], in water, for ordinary anthocyanins, the only stable coloured species is the flavylium cation, which is generally obtained for pH values lower than 3. The Cy3Glc, in accordance with this, showed stability above 98% after 8 hours at 25 °C and at pH 2.0 (Figure 6A and 7A). At pH 4.0 after 8 hours Cy3Glc showed stability above 90%, although the corresponding colour intensities are modest (Table 2, Figure 6B and 7B). During incubation Cy3Glc at pH 7.0 and 25 °C a strong decrease in visible absorbance took place (Figure 6C and 7C). After 8 hours of incubation it was found that stability decreased rapidly as pH increased toward pH 7.0, with stability values around 30% (Figure 7C). The stability of Cy3Glc slightly increased as pH increased into the alkaline region, and at pH 9.0 displayed around 50% stability after 8 hours at this pH value (Figure 6D and 7D). Spectrophotometric analysis at pH 2.0 during 8 hours revealed strong decrease of the absorption band in visible range for cyanidin solution. At this pH cyanidin exhibited low stability, despite being findings in the form of flavylium cation [7,13]. Cyanidin kept only

27% of their initial absorbance after 8 hours incubation at 25 °C (Figure 5A and 7A). Figure 7A and Table 2 clearly shows that the Cy3Glc is much more stable than his aglycone cyanidin. According to the Brouillard [7], since anthocyanidins have been shown to be unstable in water and much less soluble than anthocyanins, glycosilation is assumed to confer solubility and stability to the pigment. At pH 4.0 cyanidin shows no spectral band in the visible spectrum (Figure 5B). However, the stability of cyanidin improved as pH increased toward pH 7.0 (Figure 5C and 7C). In fact, cyanidin showed some degree of stability only at this pH value, although the corresponding colour intensities are low. Cyanidin displayed around 50% stability after 8 hours at this pH value. On the other hand, cyanidin was very unstable at alkaline values, and kept only around 17% of their initial absorbance at pH 9.0 (Figure 5D and 7D). Only at pH 7.0 the stability of cyanidin became higher than that of Cy3Glc, while at all the other pH values Cy3Glc showed higher stability. From a structural point of view, it seems that the presence of the 3-glucosidic substitution strongly increase stability of aglycone moiety, possibly by protecting the flavylum nucleus from nucleophilic attack of water molecule at C-2 that, which leads to the colourless forms, hemiacetals and chalcones (Table 2, Figure 5 and 6).

Figure 5.

Table 2.

Figure 6.

Figure 7.

Brown index of cyanidin and cyanidin 3-O β -glucopyranoside on storage at 25 °C

The initial brown index (BI, absorbance ratio at 430 nm divided by at 520 nm), for cyanidin and Cy3Glc at lowest pH were similar and amounted around 0.3 (Figure 8). At pH 2.0 cyanidin and Cy3Glc exist predominately as red-orange flavylium cations ($\lambda_{\text{vis-max}}$ for cyanidin was at 517 nm and $\lambda_{\text{vis-max}}$ for Cy3Glc was at 508 nm, Table 1) [7,41,42]. The cyanidin and Cy3Glc displayed very low BI values at pH 2.0 during 8 hours of storage at 25 °C. The BI for Cy3Glc remained the same during experiment (Figure 8A). The cyanidin showed very gradually increase of BI, which was accompanied with decrease in absorbance at $\lambda_{\text{vis-max}}$ (Figure 5A and 8A). At pH 4.0 Cy3Glc was stabile (Figure 6B) with initial BI below 0.48 (Figure 8B). At this pH value BI for Cy3Glc remained almost constant during 8 hours of storage at 25 °C. At the pH 4.0 cyanidin showed no spectral bands in the visible spectrum (Figure 5B), and displayed BI values >1 . The cyanidin solution at pH 4.0 thus was colourless with yellowish shades. At pH 7.0 Cy3Glc showed two spectral bands in the visible region with absorbance maximum at 441 and 549 nm (Figure 6C). Accordingly to the high absorbance values at 441 nm the BI (absorbance ratio at 430 nm divided by at 520 nm) for Cy3Glc was 1.09, thus giving yellowish shades [38]. The gradually increase in BI values with time (Figure 8C) was accompanied with decrease in visible absorbance at these two absorbance maxima and change in the absorbance ratio at these two wavelengths (Figure 6C). The initial BI value for cyanidin at pH 7.0 was 0.89 and gradually increases with the time (Figure 8C). The increase in BI values with time was accompanied with very gradual loss of colour in the visible range (decrease in absorbance, Figure 5C). However cyanidin displayed BI values <1 during experiment. The initial BI for Cy3Glc at pH 9.0 was 0.55 and gradually increase during 8 hours (Figure 8D) accompanied by decrease in visible absorbance (Figure 6D). However, BI values were low and remained <1 all the time. At pH 9.0 cyanidin displayed very low absorbance values (Figure 5D) and initial BI values 0.98. The BI values

after 15 min became >1 , and were remained higher than 1 during experiment. The gradually increase in BI values with time (Figure 8D) was accompanied with gradually decrease in visible absorption bands and changes in their position. The BI appears to be sensitive indicator of the stability cyanidin and Cy3Glc at different pH values. By comparing Figures 6, 7 and 8 it can be seen that at pH 2.0 and 4.0 Cy3Glc is stabile and it has very low and constant BI values, while at pH 7.0 and 9.0 was unstable and BI values gradually increased all the time. The cyanidin was unstable at all examined pH values, which was accompanied by gradual increase in BI values during storage. After a while, the Cy3glc turned on yellow at pH 7.0, while some effect was seen for cyanidin at pH 4.0 and 9.0.

Figure 8.

CONCLUSION

The cyanidin and Cy3Glc display great differences in colour variation, colour intensity, stability and BI. At an obtained pH values, such differences mainly result from the structure (presence of the sugar moieties at aglycone). Increasing the pH induce bathochromic shifts of absorbance maxima in the visible range for the both. The visible absorbance maxima for cyanidin were in all instances (with the exception pH value 4.0) higher than the corresponding visible absorbance maxima for Cy3Glc, indicating that 3-glucosidic substitution of aglycone cause hypsochromic shift. Comparing the molar absorptivities for cyanidin and Cy3Glc there is an evident high impact of the 3-glucosidic substitution on the molar absorptivity of the aglycone moiety: the 3-glucosidic substitution strongly increases molar absorptivity of the aglycone moiety, and it is favorable for colour intensity in the alkaline region. During storage the presence of the 3-glucosidic substitution strongly increase molar absorptivities at all

examined pH values and improve stability at pH 2.0 and 4.0. Surprisingly, spectrometric analysis revealed low stability for aglycone at pH 2.0 nevertheless being findings in the form of flavylium cation. Only at pH 7.0 the stability of cyanidin became higher than that of Cy3Glc, while at all the other pH values Cy3Glc showed higher stability. From a structural point of view, it seems that the presence of the 3-glucosidic substitution strongly increase stability of aglycone moiety, possibly by protecting the flavylium nucleus from nucleophilic attack of water molecule at C-2 that leads to the colourless forms. The BI appears to be sensitive indicator of the stability cyanidin and Cy3Glc at different pH values. At pH 2.0 and 4.0 Cy3Glc is stabile and it has very low and constant BI values, while at pH 7.0 and 9.0 was unstable and BI values gradually increased all the time. The cyanidin was unstable at all examined pH values which was been accompanied by gradual increase in BI values during incubation. During some time period, the Cy3glc turned yellow at pH 7.0, while cyanidin at pH 4.0 and 9.0.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude for financial support from the Slovenian Research Agency through the P4-0121 Research Programme and the Bilateral Project between the Republic of Slovenia and the Republic of Serbia BI-RS/12-13-015. V.R. was partly financed by a CEEPUS SI-8402/2010 Bilateral Scholarship.

REFERENCES

- [1] C.F. Timberlake, B.S. Henry, Plant pigments as natural food colours, *Endeavour*. **10** (1986) 31–36.
- [2] L. Cabrita, T. Fossen, Ø.M. Andersen, Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions, *Food Chem.* **68** (2000) 101–107.
- [3] T. Fossen, L. Cabrita, M. Andersen, Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region, *Food Chem.* **63** (1998) 435–440.
- [4] G. Mazza, R. Brouillard, Color Stability and Structural Transformations of Cyanidin 3,5-Diglucoside and Four 3-Deoxyanthocyanins in Aqueous Solutions, *J. Agric. Food Chem.* **35** (1987) 422–426.
- [5] F.J. Heredia, E.M. Francia-Aricha, J.C. Rivas-Gonzalo, I.M. Vicario, C. SantosBuelga, Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes - I. pH effect, *Food Chem.* **63** (1998) 491–498.
- [6] C. Del Carpio Jiménez, C. Serrano Flores, J. He, Q. Tian, S.J. Schwartz, M.M. Giusti, Characterisation and preliminary bioactivity determination of *Berberis boliviana* Lechler fruit anthocyanins, *Food Chem.* **128** (2011) 717–724.
- [7] R. Brouillard, Chemical Structure of Anthocyanins, in: P. Markakis (Ed.), *Anthocyanins As Food Color*, Academic Press, New York, 1982: pp. 1–40.
- [8] K. Torskangerpoll, Ø.M. Andersen, Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values, *Food Chem.* **89** (2005) 427–440.

- [9] G. Mazza, E. Miniati, *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*, CRC Press, London, 1993.
- [10] G.H. Laleh, H. Frydoonfar, R. Heidary, R. Jameei, S. Zare, The Effect of Light, Temperature, pH and Species on Stability of Anthocyanin Pigments in Four *Berberis* Species, *Pakistan J. Nutr.* **5** (2006) 90–92.
- [11] M.T. Bordignon-Luiz, C. Gauche, E.F. Gris, L.D. Falcão, Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems, *LWT - Food Sci. Technol.* **40** (2007) 594–599.
- [12] A. Downham, P. Collins, Colouring our foods in the last and next millennium, *Int. J. Food Sci. Technol.* **35** (2000) 5–22.
- [13] R. Brouillard, Flavonoids and flower colour, in: J.B. Harbone (Ed.), *Flavonoids. Adv. Res. Since 1980*, Chapman and Hall, London, 1988: p. 525.
- [14] R. Brouillard, B. Delaporte, Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside, *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 8461–8468.
- [15] H. Wang, G. Cao, R.L. Prior, Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.* **45** (1997) 304–309.
- [16] T. Tsuda, K. Shiga, K. Ohshima, S. Kawakishi, T. Osawa, Inhibition of Lipid Peroxidation and the Active Oxygen Radical Scavenging Effect of Anthocyanin Pigments Isolated from *Phaseolus vulgaris* L., *Biochem. Pharmacol.* **52** (1996) 1033–1039.

- [17] C. Del Bo', D. Martini, S. Vendrame, P. Riso, S. Ciappellano, D. Klimis-Zacas, M. Porrini, Improvement of lymphocyte resistance against H₂O₂-induced DNA damage in Sprague–Dawley rats after eight weeks of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) enriched diet, *Mutat. Res.* **703** (2010) 158–62.
- [18] I. Edirisinghe, K. Banaszewski, J. Cappozzo, D. McCarthy, B.M. Burton-Freeman, Effect of Black Currant Anthocyanins on the Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) in Vitro in Human Endothelial Cells, *J. Agric. Food Chem.* **59** (2011) 8616–8624.
- [19] Y.P. Hwang, J.H. Choi, J.M. Choi, Y.C. Chung, H.G. Jeong, Protective mechanisms of anthocyanins from purple sweet potato against *tert*-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity, *Food Chem. Toxicol.* **49** (2011) 2081–2089.
- [20] N.-E. Es-Safi, V. Cheynier, M. Moutounet, Interactions between Cyanidin 3-*O*Glucoside and Furfural Derivatives and Their Impact on Food Color Changes, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 5586–5595.
- [21] A. Saija, M. Scalese, M. Lanza, D. Marzullo, F. Bonina, F. Castelli, Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes, *Free Radic. Biol. Med.* **19** (1995) 481–486.
- [22] J. Azevedo, I. Fernandes, A. Faria, J. Oliveira, A. Fernandes, V. De Freitas, N. Mateus, Antioxidant properties of anthocyanidins, anthocyanidin-3-glucosides and respective portisins, *Food Chem.* **119** (2010) 518–523.

- [23] C. Sun, Y. Zheng, Q. Chen, X. Tang, M. Jiang, J. Zhang, X. Li, K. Chen, Purification and anti-tumour activity of cyanidin-3-*O*-glucoside from Chinese bayberry fruit, *Food Chem.* **131** (2012) 1287–1294.
- [24] A. Tarozzi, F. Morroni, A. Merlicco, C. Bolondi, G. Teti, M. Falconi, G. CantelliForti, P. Hrelia, Neuroprotective effects of cyanidin 3-*O*-glucopyranoside on amyloid beta (25-35) oligomer-induced toxicity, *Neurosci. Lett.* **473** (2010) 72–76.
- [25] A. Tarozzi, F. Morroni, S. Hrelia, C. Angeloni, A. Marchesi, G. Cantelli-Forti, P. Hrelia, Neuroprotective effects of anthocyanins and their in vivo metabolites in SHSY5Y cells, *Neurosci. Lett.* **424** (2007) 36–40.
- [26] S. Chaudhuri, A. Banerjee, K. Basu, B. Sengupta, P.K. Sengupta, Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects, *Int. J. Biol. Macromol.* **41** (2007) 42–48.
- [27] M.H. Grace, D.M. Ribnicky, P. Kuhn, A. Poulev, S. Logendra, G.G. Yousef, I. Raskin, M.A. Lila, Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton, *Phytomedicine.* **16** (2009) 406–415.
- [28] H.A. Hassan, A.F. Abdel-Aziz, Evaluation of free radical-scavenging and anti-oxidant properties of black berry against fluoride toxicity in rats, *Food Chem. Toxicol.* **48** (2010) 1999–2004.
- [29] N. Yao, F. Lan, R.-R. He, H. Kurihara, Protective Effects of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Extract against Endotoxin-Induced Uveitis in Mice, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 4731–4736.

- [30] A. Bishayee, T. Mbimba, R.J. Thoppil, E. Háznagy-Radnai, P. Sipos, A.S. Darvesh, H.G. Folkesson, J. Hohmann, Anthocyanin-rich black currant (*Ribes nigrum* L.) extract affords chemoprevention against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis in rats, *J. Nutr. Biochem.* **22** (2011) 1035–1046.
- [31] F. Tremblay, J. Waterhouse, J. Nason, W. Kalt, Prophylactic neuroprotection by blueberry-enriched diet in a rat model of light-induced retinopathy, *J. Nutr. Biochem.* **24** (2013) 647–655.
- [32] T.H. Marczylo, D. Cooke, K. Brown, W.P. Steward, A.J. Gescher, Pharmacokinetics and metabolism of the putative cancer chemopreventive agent cyanidin-3-glucoside in mice, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **64** (2009) 1261–1268.
- [33] J. Zawistowski, A. Kopec, D.D. Kitts, Effects of a black rice extract (*Oryza sativa* L. *indica*) on cholesterol levels and plasma lipid parameters in Wistar Kyoto rats, *J. Funct. Foods.* **1** (2009) 50–56.
- [34] A. Sarić, S. Sobocanec, T. Balog, B. Kusić, V. Sverko, V. Dragović-Uzelac, B. Levaj, Z. Cosić, Z. Macak Safranko, T. Marotti, Improved Antioxidant and Antiinflammatory Potential in Mice Consuming Sour Cherry Juice (*Prunus Cerasus* cv. Maraska), *Plant Foods Hum. Nutr.* **64** (2009) 231–237.
- [35] X. Yang, L. Yang, H. Zheng, Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats, *Food Chem. Toxicol.* **48** (2010) 2374–2379.
- [36] M.F.-F. Chong, R. Macdonald, J. a Lovegrove, Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies, *Br. J. Nutr.* **104** (2010) S28–S39.

- [37] P.-N. Chen, S.-C. Chu, H.-L. Chiou, C.-L. Chiang, S.-F. Yang, Y.-S. Hsieh, Cyanidin 3-Glucoside and Peonidin 3-Glucoside Inhibit Tumor Cell Growth and Induce Apoptosis In Vitro and Suppress Tumor Growth In Vivo, *Nutr. Cancer.* **53** (2005) 232–243.
- [38] C. Malien-Aubert, O. Dangles, M.J. Amiot, Color Stability of Commercial Anthocyanin-Based Extracts in Relation to the Phenolic Composition. Protective Effects by Intra- and Intermolecular Copigmentation, *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 170–176.
- [39] C. Malien-Aubert, O. Dangles, M.J. Amiot, Influence of Procyanidins on the Color Stability of Oenin Solutions, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 3299–3305.
- [40] N.J. Cherepy, G.P. Smestad, M. Grätzel, J.Z. Zhang, Ultrafast Electron Injection: Implications for a Photoelectrochemical Cell Utilizing an Anthocyanin Dye-Sensitized TiO₂ Nanocrystalline Electrode, *J. Phys. Chem. B* **101** (1997) 9342–9351.
- [41] R. Drabent, B. Pliszka, G. Huszcza-Ciołkowska, B. Smyk, Ultraviolet Fluorescence of Cyanidin and Malvidin Glycosides in Aqueous Environment, *Spectrosc. Lett.* **40** (2007) 165–182.
- [42] R. Brouillard, G.A. Iacobucci, J.G. Sweeny, Chemistry of Anthocyanin Pigments. 9. UV-Visible Spectrophotometric Determination of the Acidity Constants of Apigeninidin and Three Related 3-Deoxyflavylium Salts, *J. Am. Chem. Soc.* **104** (1982) 7585–7590.
- [43] G. Mazza, R. Brouillard, The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions, *Phytochemistry.* **29** (1990) 1097–1102.

Izvod

Uticaj pH vrednosti sredine na stabilnost cijanidina i cijanidin 3-O- β -glukopiranozida u vodenom rastvoru

Violeta P. Rakić^{1,*}, Mihaela A. Skrt², Milena N. Miljković³, Danijela A. Kostić³, Dušan T. Sokolović⁴, Nataša E. Poklar Ulrih^{2,5}

¹Visoka poljoprivredno-prehrambena škola strukovnih studija, Ćirila i Metodija 1, SRB-18400 Prokuplje, Srbija

²Department za prehrambenu tehnologiju, Biotehnički fakultet, Univerzitet u Ljubljani, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

³Department za hemiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Višegradska 33, SRB-18000 Niš, Srbija

⁴Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, Bulevar dr Zorana Đinđića 81, SRB-18000 Niš, Srbija

⁵Centar veštine za integrisane pristupe u hemiji i biologiji proteina (CipKeBiP), Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

(Naučni rad)

U ovom radu ispitivani su varijacija i intenzitet boje i stabilnost cijanidina i cijanidin 3-O- β glukopiranozida (Cy3Glc) pri različitim pH vrednostima (2,0; 4,0; 7,0 i 9,0) tokom inkubacije na temperaturi od 25 °C, u periodu od 8 sati. Dobijeni rezultati pokazuju da pH vrednost vodenog rastvora ima uticaj na spektroskopski profil cijanidina i Cy3Glc. Cijanidin i Cy3Glc su pokazali velike razlike u varijaciji i intenzitetu boje, stabilnosti i BI. Pri određenoj pH vrednosti, te razlike uglavnom rezultiraju iz strukture (prisustva šećera na aglikonu). Porast pH vrednosti izaziva batohromno pomeranje apsorpcionih maksimuma u vidljivoj

oblasti spektra za sve ispitivane pH vrednosti (osim pH = 4,0 za cijanidin), dok je prisustvo 3glukozidne supstitucije dovodi do hipsohromnog pomeranja. Poređenjem molarnih apsorptivnosti cijanidina i Cy3Glc, uočen je veliki uticaj 3-glukozidne supstitucije: 3glukozidna supstitucija jako povećava apsorptivnost aglikonskog dela i utiče na povećanje intenziteta boje u alkalnom regionu. Tokom inkubacije, prisustvo 3-glukozidne supstitucije jako je uticalo na povećanje molarne apsorptivnosti na svim ispitivanim pH vrednostima kao i na povećanje stabilnosti na pH = 2,0 i 4,0. Spektroskopska analiza je pokazala nisku stabilnost aglikona na pH = 2,0, bez obzira na činjenicu da se nalazi u obliku flavilijum katjona. Samo na pH = 7,0 stabilnost cijanidina bila je veća od stabilnosti Cy3Glc, dok je na svim ostalim pH vrednostima Cy3Glc pokazivao veću stabilnost. Sa strukturne tačke gledišta, može se pretpostaviti da 3-glukozidna supstitucija jako povećava stabilnost aglikonskog dela prema nukleofilnom napadu molekula vode na C-2 položaj aglikona, koji dovodi do formiranja bezbojnih oblika. Na osnovu dobijenih rezultata smatramo da je BI osetljivi pokazatelj stabilnosti cijanidina i Cy3Glc na različitim pH vrednostima. Na pH = 2,0 i 4,0 Cy3Glc je bio stabilan i imao je veoma niske i konstantne BI vrednosti. Na pH = 7,0 i 9,0 Cy3Glc je bio nestabilan, dok su BI vrednosti postepeno rasle tokom eksperimenta. Cijanidin je bio nestabilan pri svim ispitivanim pH vrednostima, što je bilo praćeno postepenim porastom BI vrednosti tokom stajanja. Tokom eksperimenta, Cy3Glc je dobio žućkastu nijansu na pH = 7,0, dok je cijanidin dobio žućkastu nijansu na pH vrednostima 4,0 i 9,0.

Ključne reči: antocijanini, antocijanidini, cijanidin, cijanidin 3-glukopiranozid, varijacija boje, intenzitet boje, stabilnost, braon indeks, UV-Vis apsorpcioni spektar.

Table captions

Table 1. Visible absorbance maxima ($\lambda_{\text{vis-max}}$, nm) and molar absorptivities of spectral bands in the visible range (a , $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) for the cyanidin and Cy3Glc ($5 \times 10^{-5} \text{mol dm}^{-3}$) immediately after dissolution in buffered aqueous solutions at 25°C.

Table 2. Absorbance of cyanidin and Cy3Glc ($5 \times 10^{-5} \text{mol dm}^{-3}$) solutions, (measured at $\lambda_{\text{vis-max}}$) at pH 2-9 during 8 hours of storage at 25 °C, in the dark using air atmosphere.

Figure captions

Figure 1. Structures of the cyanidin and cyanidin 3- glucopyranoside.

Figure 2. Visible absorbance maxima ($\lambda_{\text{vis-max}}$, nm) at different pH values, for the cyanidin and Cy3Glc ($5 \times 10^{-5} \text{mol dm}^{-3}$) immediately after dissolution in buffered aqueous solutions at 25°C.

Figure 3. Molar absorptivities (a , $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) of spectral bands in the visible range for the cyanidin and Cy3Glc ($5 \times 10^{-5} \text{mol dm}^{-3}$) immediately after dissolution in buffered aqueous solutions at 25°C.

Figure 4. Molar absorptivities (a , $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) of spectral bands in the visible range (measured at $\lambda_{\text{vis-max}}$) for the cyanidin (●) and Cy3Glc (○, ▲) ($5 \times 10^{-5} \text{mol dm}^{-3}$) solutions after different time of storage at 25°C in buffered aqueous solutions at different pH values.

Figure 5. Visible spectra of cyanidin during 8-hour incubation at different pH values. (A) pH 2.0; (B) pH 4.0; (C) pH 7.0; (D) pH 9.0 during 8 hours of storage at 25 °C. The concentration of cyanidin was $5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, and the temperature was 25°C.

Figure 6. Visible spectra of Cy3Glc during 8-hour incubation at different pH values. (A) pH 2.0; (B) pH 4.0; (C) pH 7.0; (D) pH 9.0. The concentration of Cy3Glc was $5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, and the temperature was 25°C.

Figure 7. Percentages of remaining absorbance (measured at $\lambda_{\text{vis-max}}$) after different time of incubation at 25°C in buffered aqueous solutions at different pH values, for the cyanidin (●) and Cy3Glc (○, ▲) ($5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) solutions.

Figure 8. The brown index (BI) immediately after dissolution and after different time of incubation at 25°C in buffered aqueous solutions at different pH values, for the cyanidin (●) and Cy3Glc (○) ($5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) solutions.

Table 1.

pH	cyanidin		Cy3Glc			
	$\lambda_{\text{vis-max}}$ (nm)	a ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{vis-max}}$ (nm)		a ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	
2.0	517	5034.42	508		19297.16	
4.0	0	0	513		2429.10	
7.0	570	1467.17	549	441	7732.31	7904.24
9.0	591	1503.02	569		12349.24	

Table 2.

pH	Time ^a											
	0 h	1/4 h	1/2 h	1h	1.5 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
2.00	0.25	0.22	0.20	0.19	0.17	0.16	0.13	0.12	0.09	0.08	0.08	0.07
	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.95	0.96	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95
4.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.12	0.12	0.12	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
7.00	0.07	0.07	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
^b	0.40	0.35	0.32	0.30	0.27	0.25	0.21	0.18	0.16	0.14	0.13	0.13
^c	0.39	0.34	0.31	0.29	0.26	0.24	0.20	0.17	0.15	0.13	0.12	0.11
9.00	0.08	0.05	0.04	0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
	0.62	0.60	0.58	0.57	0.55	0.52	0.48	0.43	0.39	0.35	0.32	0.29

^a The upper and lower value in each interval correspond to cyanidin and Cy3Glc, respectively

^b 441 nm

^c 549 nm

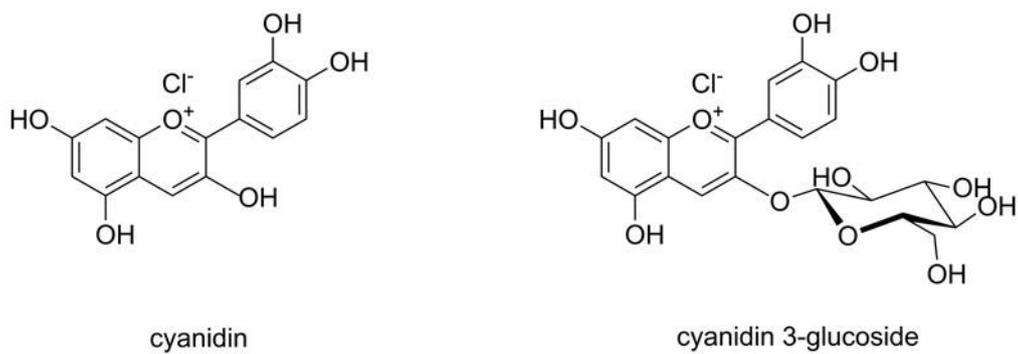


Figure 1.

PAPER ACCEPTED

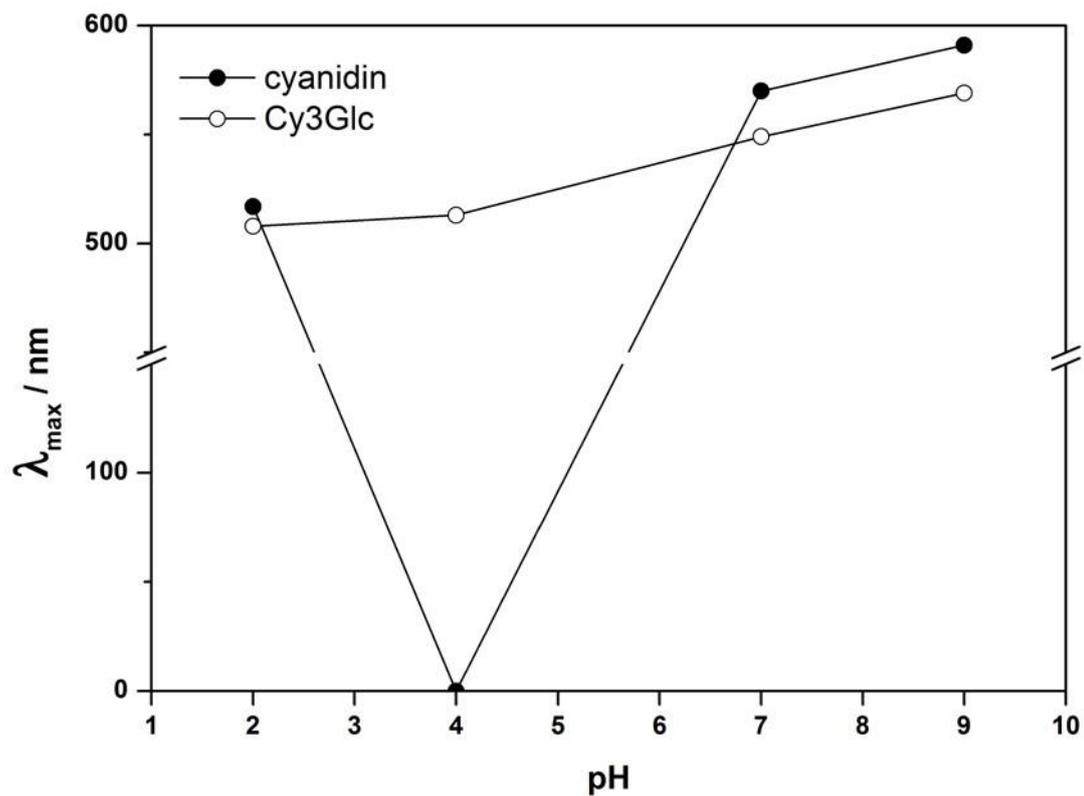


Figure 2.

PAPER ACC

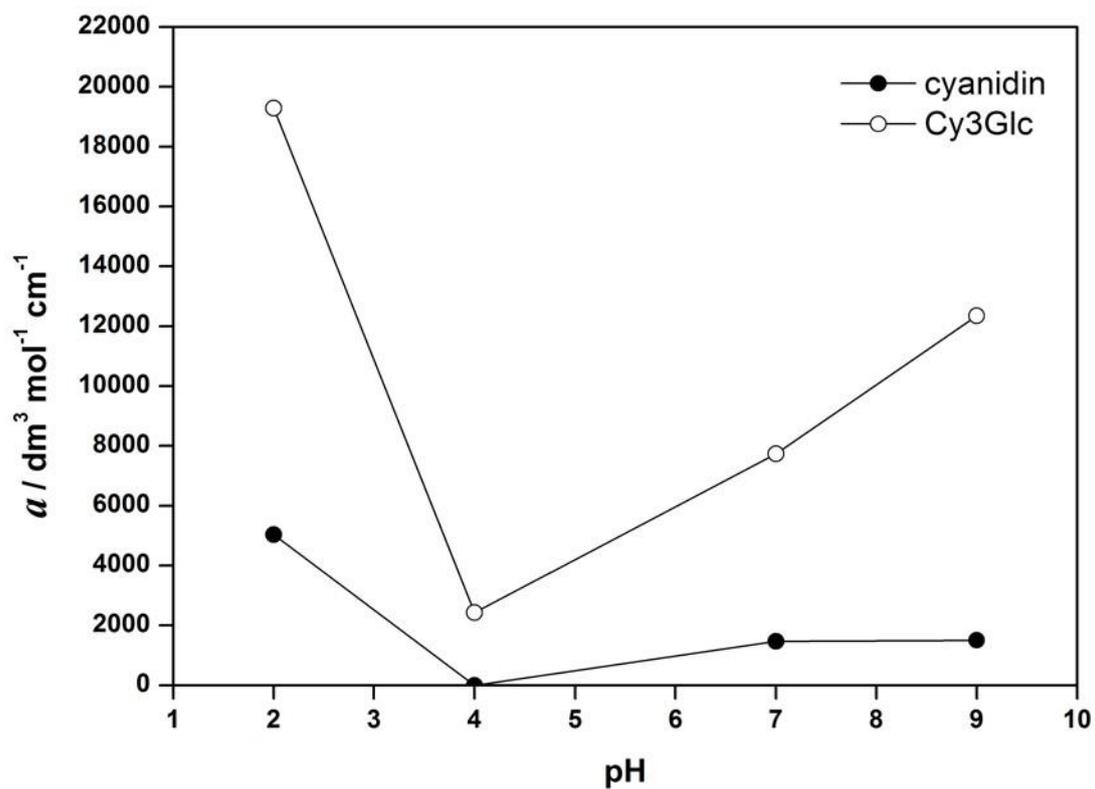


Figure 3.

PAPER ACC

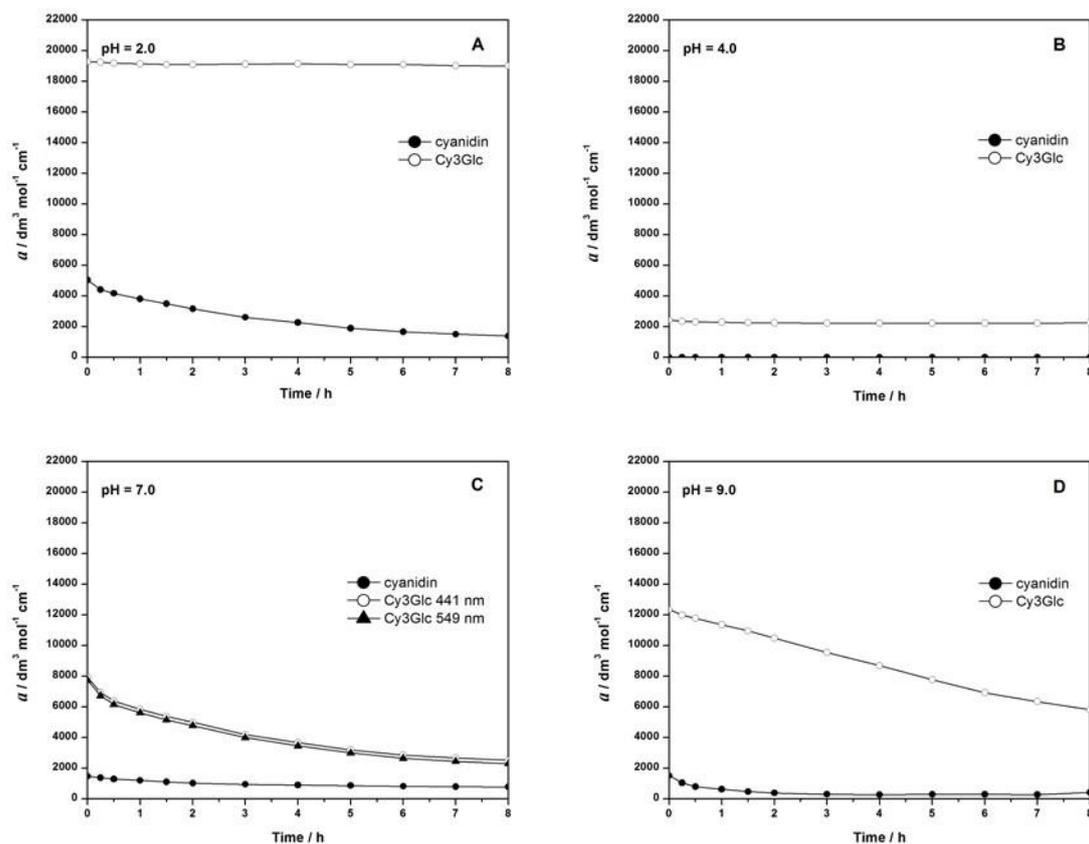


Figure 4.

PAPERAC

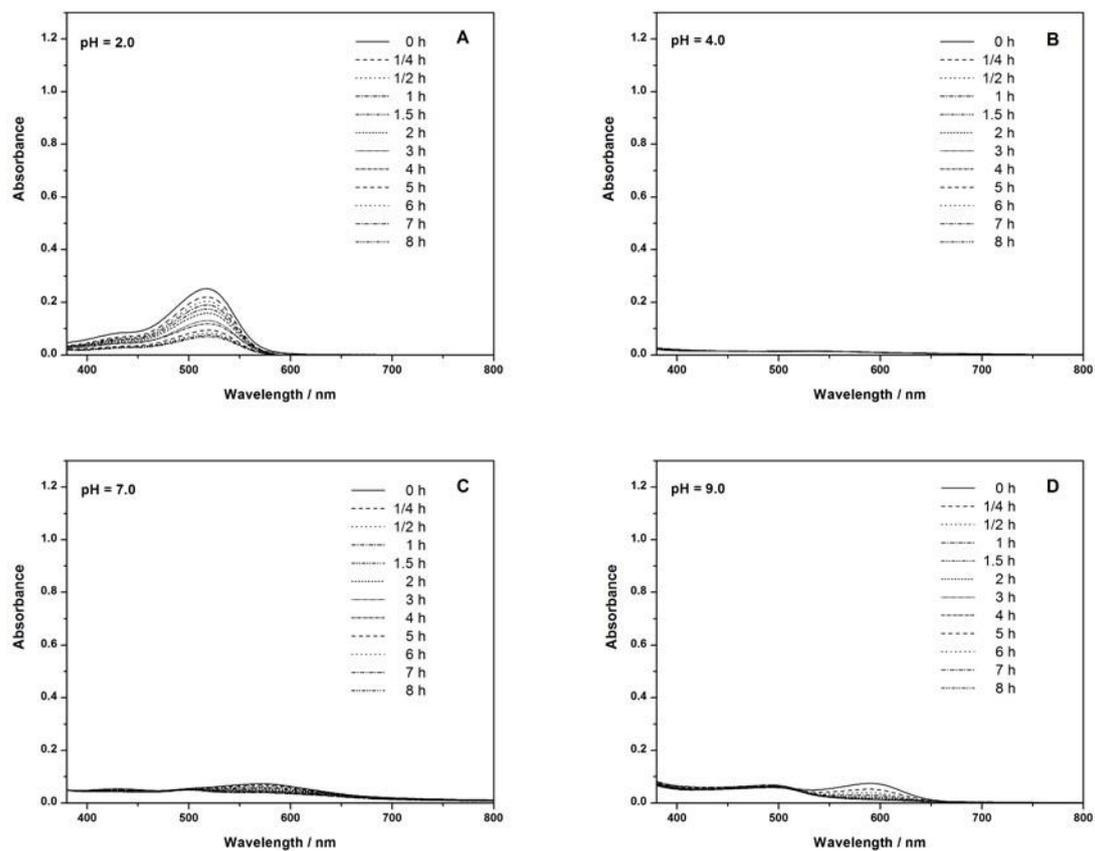


Figure 5.

PAPER AC

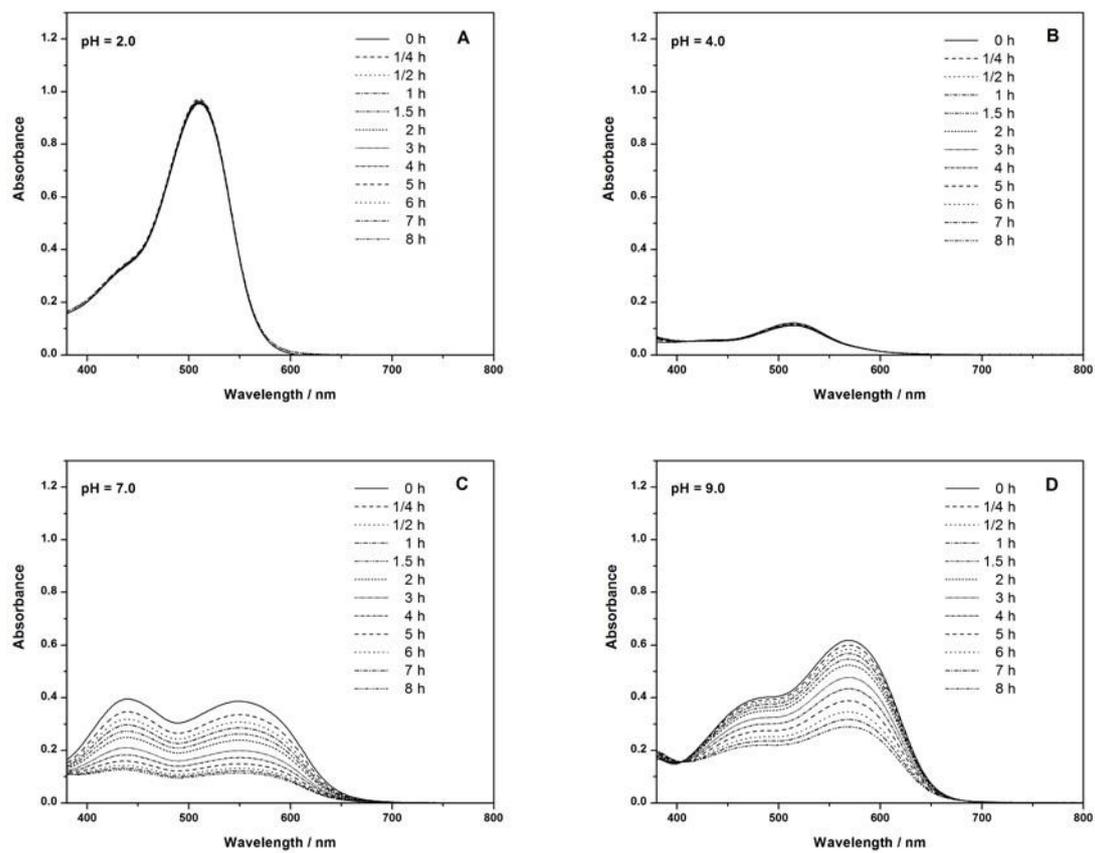


Figure 6.

PAPER AC

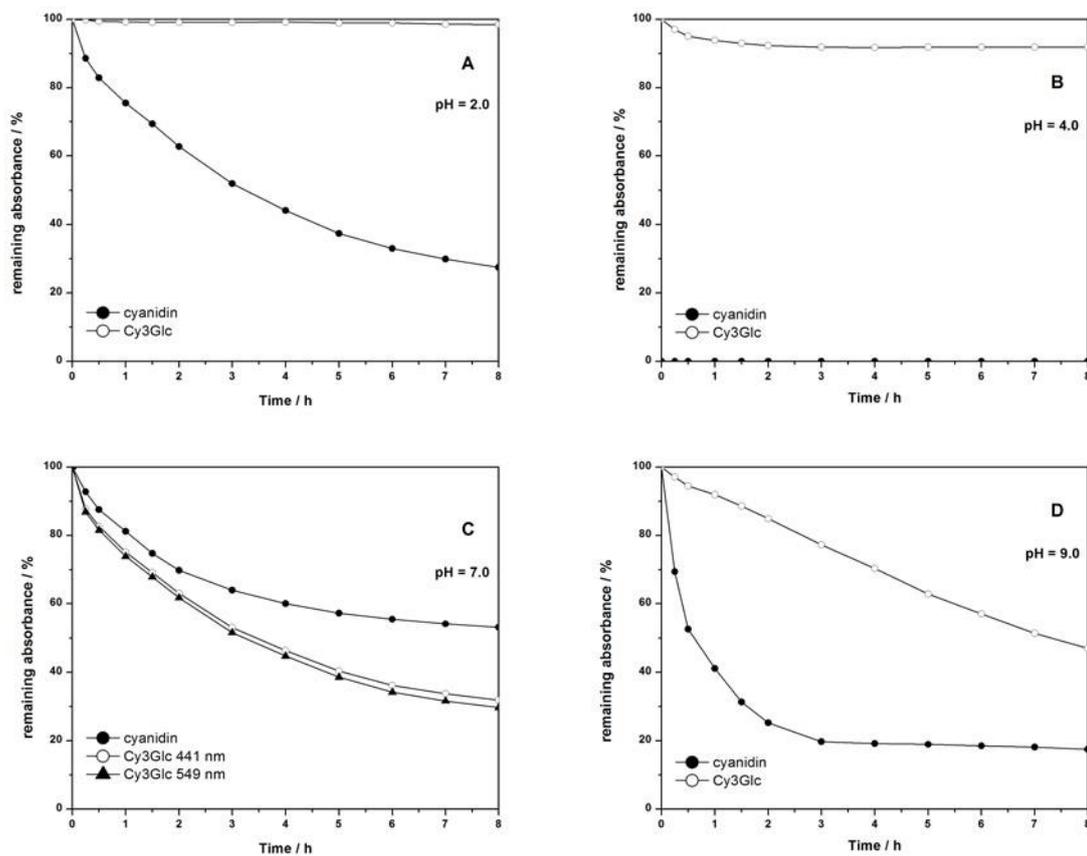


Figure 7.

PAPERAC

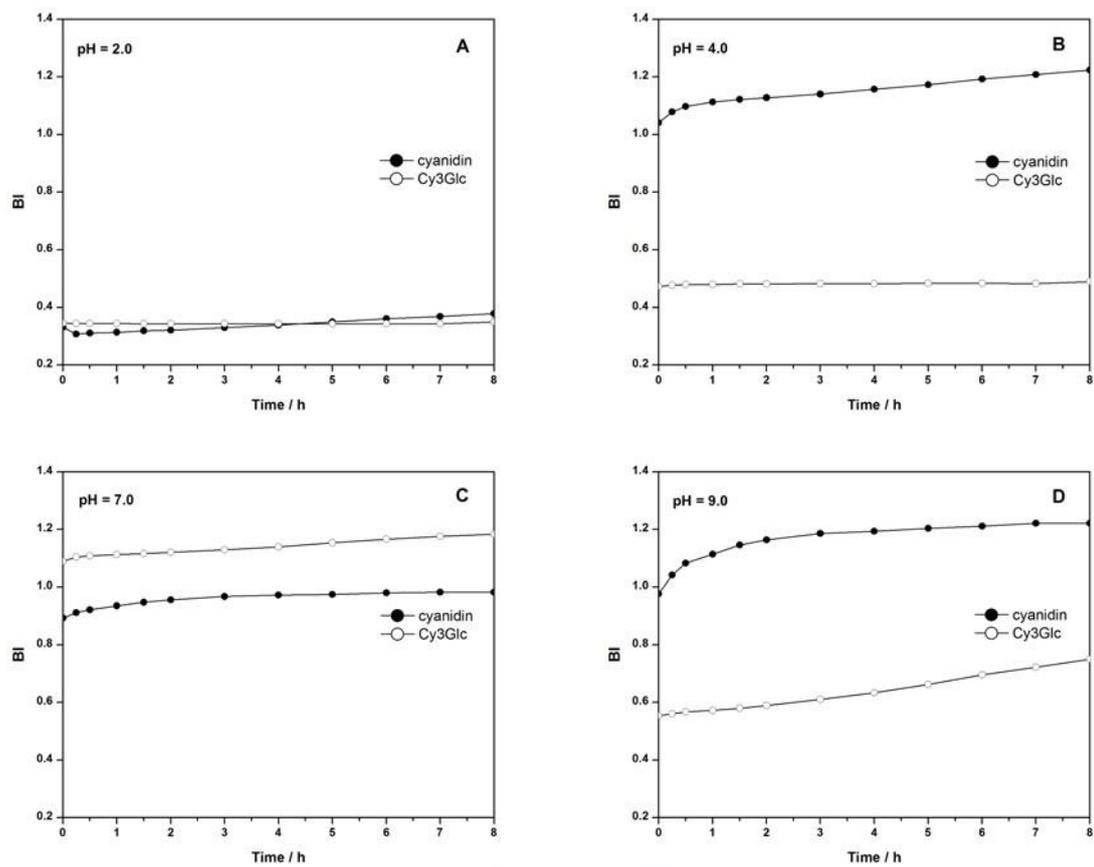


Figure 8.

PAPER AC

Violeta Rakić
Visoka poljoprivredno-prehrambena škola strukovnih studija
18400 Prokuplje
Ćirila i Metodija 1

AD-TECH-14/2-1

Poštovane kolege,

Sa zadovoljstvom Vas obavestavam da je Vaš rad **BOJA I STABILNOST CIJANIDINA I CIJANIDIN 3-O- β -GLUKOPIRANOZIDA** autora Violeta P. Rakić, Ajda M. Ota, Špela F. Može Bornšek, Milena N. Miljković, Dušan T. Sokolović, Nataša E. Poklar Ulrih prihvaćen za objavljivanje u časopisu Savremene tehnologije.

Kada rad bude pripremljen za štampu biće Vam poslat prelom na proveru i korekciju.

Nadam se da će Vaš interes biti da i dalje objavljujete radove u našem časopisu.

S poštovanjem,

Prof. dr Ljubiša Nikolić, urednik Časopisa

10. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM

Biografski podaci

Kandidat mr Violeta Rakić, rođena je 03.11.1974. god. u Nišu. Gimnaziju "Svetožar Marković" u Nišu završila je 1993. godine. Na Studijskoj grupi Hemija, Filozofskog fakulteta Univerziteta u Nišu diplomirala je 2000. godine. Na smeru Industrijska i primenjena hemija, na Odseku za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu završila je poslediplomske studije 2007. godine, i uspešno odbranila magistarsku tezu pod nazivom „Indeksacija i spektroskopska identifikacija prehrambenih boja u životnim namirnicama“. Doktorske akademske studije na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu upisala je 2009/2010. godine i položila sve ispite predviđene planom i programom.

Profesionalna karijera

Zvanje istraživača-saradnika Violeta Rakić je stekla odlukom Nastavno-naučnog veća Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu 06.07.2007. godine.

Nastavna aktivnost i pedagoško iskustvo

Mr Violeta Rakić od 2007. godine zaposlena je u Visokoj poljoprivredno-prehrambenoj školi strukovnih studija u Prokuplju, gde je najpre bila angažovana kao saradnik u nastavi za užu naučnu oblast Hemija, zatim je 2009. izabrana u zvanje predavača Visoke škole strukovnih studija za užu naučnu oblast - Hemija. Kao predavač strukovnih studija na Visokoj poljoprivredno-prehrambenoj školi strukovnih studija u Prokuplju, Violeta Rakić izvodil nastavu iz sledećih predmeta: Biohemija, Analitička hemija i Hemijska analiza stočne hrane na osnovnim studijama, kao i Instrumentalne metode u analitici hrane na specijalističkim strukovnim studijama.

Učešća u realizaciji projekata kandidata mr Violete Rakić

Naziv projekta: Anti-oksidativni i anti-apoptični efekat ekstrakta borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.): in vivo i in vitro eksperimentalno istraživanje - bilateralni projekat. Evidencioni broj projekta: 651-03-1251/2012-09/15. Rukovodilac projekta u Srbiji: Doc. dr Dušan Sokolović, Medicinski fakultet Univerziteta Nišu. Rukovodilac projekta u Sloveniji: Prof. dr Nataša Poklar Ulrih, Biotehnički fakultet Univerziteta u Ljubljani.

Bibliografski podaci

Violeta Rakić je do sada objavila dva rada u međunarodnom časopisu sa SCI liste, kategorije M23 i dva rada u časopisu nacionalnog značaja. Učestvovala je na međunarodnim i nacionalnim skupovima, na kojima je objavila dva saopštenja štampana u celini i šest saopštenja štampana u izvodu. Odbranila je magistarski rad. Autor je tri pomoćna udžbenika. Radovi sa SCI liste su iz naučne oblasti doktorske disertacije.

Rad u međunarodnom časopisu (M23)

1. **Violeta P. Rakić**, Ajda M. Ota, Mihaela A. Skrt, Milena N. Miljković, Danijela A. Kostić, Dušan T. Sokolović, Nataša E. Poklar Ulrih (2014) Investigation of fluorescence properties of cyanidin and cyanidin 3-O- β -glucopyranoside, *Hemijska industrija*, DOI:10.2298/HEMIND140203030R
2. **Rakić P. Violeta**, Skrt A. Mihaela, Miljković N. Milena, Kostić A. Danijela, Sokolović T. Dušan, Poklar-Ulrih E. Nataša. (2014) Effects of pH on the stability of cyanidin and cyanidin 3-O- β -glucopyranoside in aqueous solution, *Hemijska industrija*, DOI:10.2298/HEMIND140711072R

Rad u časopisu nacionalnog značaja (M52)

1. **Violeta Rakić**, Vojkan Miljković, Milan Momčilović, Dušan Sokolović, Novica Bojanić (2012) Uticaj nekih prehrambenih aditiva na spektrofotometrijsko određivanje boje Ponceau 4R, *Savremene tehnologije*, 1, (2), 71-76.
2. Violeta P. Rakić, Ajda M. Ota, Špela F. Može Bornšek, Milena N. Miljković, Dušan T. Sokolović, Nataša E. Poklar Ulrih (2014) Boja i stabilnost cijanidina i cijanidin 3-O- β -glukopiranozida, *Savremene tehnologije*, AD-TECH-14/2-1

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34)

1. Milena Miljkovic, **Violeta Rakić**, Vojkan Miljkovic, Biljana Arsic (2014) Influence of Additives on Absorption Spectra of Food Dye CI Food Blue 5 and Its Determination in Food Products, 14th International Multidisciplinary Scientific Geoconference & EXPO SGEM2014, Albena, Bulgaria, 17 - 26 June, Section: 20. Ecology and Environmental Protection
2. Miljkovic V, Bojanic V, Bojanic Z, Sokolovic D, Kostic D, **Rakić V.** (2012) The application of new kinetic-spectrophotometric method for determination of metronidazole in pharmaceutical formulation, 32nd Balkan Medical Week, Book of Programs and Abstracts, Nis, Serbia, 21-23. September, P67
3. **V. Rakić**, V. Miljkovic, D. Sokolovic, Z. Bojanic, V. Bojanic, N. Bojanic (2011) Quantitative Analysis Method use for Determination of food dye E110 in some foodstuffs, 18th Sesion of the Balkan Medical Days, Scripta Scientifica Medica, vol 43 (6), pp 76 – 78.
4. M. Miljković, M. Purenović, G. Nikolić, **V. Rakić**, (2005) Spectroscopic Structural and Quantitative Characteristics of the Artificial Food Dye E 124 in some Food Products, 6th European Meeting on Environmental Chemistry - EMEC6, Belgrade, Serbia, 2005, Book of Abstracts, pp 187.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u celini (M63)

1. M. Miljković, M. Purenović, **V. Rakić**, (2006) Spectroscopic Structural and Quantitative Characteristics of the Artificial Food Dye E122 in some Food Products, *ECOLOGICA* 13, 31-41.
2. M. Miljković, M. Purenović, **V. Rakić**, (2005) Concentrations of Synthetic Food Dyes E 110 and E 102 in Soft Drink Powders, *ECOLOGICA* 12, 10, 281-289.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)

1. Milena Miljković, Milovan Purenović i **Violeta Rakić** (2006) Spektroskopske, strukturne i kvantitativne karakteristike prehrambene boje E122 u nekim životnim namirnicama, Konferencija "Prirodni resursi – Osnova turizma" (sa međunarodnim učešćem), Beograd, Srbija, 2006, 40-41.
2. Milena Miljković, Milovan Purenović i **Violeta Rakić** (2005) Određivanje koncentracije veštačkih prehrambenih boja E110 i E102 u praškovima za osvežavajuća bezalkoholna pića, Conference on Environment and Human Health with international participation, Belgrade, Serbia 2005, 162-163.

Odbranjen magistarski rad (M72)

1. Violeta Rakić (2007), Indeksacija i spektroskopska identifikacija prehrambenih boja u životnim namirnicama, Magistarska teza, mart 2007.godine.

Knjige i udžbenici

1. **Violeta Rakić**, Nikola Stolić (2012) Hemijska analiza stočne hrane - praktikum, VPPŠ, Prokuplje.
2. Ljubiša Jovanović, **Violeta Rakić** (2009) Praktikum iz organske hemije, VPPŠ, Prokuplje.
3. Ljubiša Jovanović, **Violeta Rakić**, Biljana Ristić (2007) Praktikum iz opšte i neorganske hemije, VPPŠ, Prokuplje.

11. IZJAVE AUTORA



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом **Проучавање ефекта рН на структуру, боју и спектралне карактеристике цијанидина и цијанидин 3-О- β -глукопиранозида и испитивање њихове интеракције са моделима липидних мембрана**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била предложена за добијање било које дипломе, према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, 03.11.2014. године

Аутор дисертације:
Виолета П. Ракић

Потпис докторанда:

Виолета Ракић



Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора:

Виолета П. Ракић

Студијски програм:

Хемија

Наслов рада: Проучавање ефекта рН на структуру, боју и спектралне карактеристике цијанидина и цијанидин 3-О-β-глукопиранозида и испитивање њихове интеракције са моделима липидних мембрана

Ментор:

Милена Н. Миљковић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 03.11.2014. године

Аутор дисертације:

Виолета П. Ракић

Потпис докторанда:

Виолета Ракић



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом: Проучавање ефекта рН на структуру, боју и спектралне карактеристике цијанидина и цијанидин 3-О-β-глукопиранозида и испитивање њихове интеракције са моделима липидних мембрана која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 03.11.2014. године

Аутор дисертације:
Виолета П. Ракић

Потпис докторанда:

Виолета Ракић

ТИПОВИ ЛИЦЕНЦИ

1. Ауторство. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци (CC BY 3.0).

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-NC 3.0).

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела (CC BY-NC-ND 3.0).

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прераде (CC BY-NC-SA 3.0).

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-ND 3.0).

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода (CC BY-SA 3.0).