刺葡萄花色苷自聚合条件及水合动力学特性的研究

邓洁红[1]，位佳静[1]，刘永红[2]，王维茜[1]，魏一枝[1]
（1.湖南农业大学食品科技学院，湖南长沙 410128）（2.湖南生物机电职业技术学院，湖南长沙 410127）

摘要：花色苷自聚合是实现其稳定化的重要途径。研究了花色苷浓度、pH、温度、时间、纯度、溶剂体系等对刺葡萄花色苷自聚合效应的影响。结果表明：刺葡萄花色苷粗提液适宜的自聚合条件为：pH 3，时间 60 min，温度 20 ℃，浓度超过 0.24 mmo/L。在此条件下，聚合度达到 50.5433 以上。对于 3 种不同纯度的刺葡萄花色苷溶液，纯度越高，自聚合效应越强，且更易发生自聚合，提示刺葡萄花色苷分子间共色及辅色效应可能存在制约机制。模拟葡萄酒、葡萄汁的体系条件，发现刺葡萄花色苷在醇系中自聚合作用的强度大于在水系中，两者发生自聚合作用的初始浓度分别为 0.03 mmol/L 和 0.06 mmol/L。通过对花色苷溶液水合动力学分析，发现花色苷浓度增大，其表观水合系数 K 减小，解离常数 pK 增大,说明花色苷的自聚合加强了其疏水性，使解离更加困难，稳定性提高。

关键词：刺葡萄；花色苷；自聚合；水合动力学；纯化；溶液体系

文章篇号：1673-9078(2015)3-144-150 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.3.025

Self-association Conditions and Hydration Kinetics of Spine Grape Anthocyanins

DENG Jie-hong[1], WEI Jia-jing[1], LIU Yong-hong[2], WANG Wei-qian[1], WEI Yi-zhi[1]
(1.College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)
(2.Hunan Biological and Electromechanical Polytechnic, Changsha 410127, China)

Abstract: Self-association of anthocyanins is important for stability. The effects of anthocyanin concentration, pH, temperature, time, purity, and solvent system on the self-association of spine grape anthocyanins (SGA) were studied. The results showed that the optimum conditions for self-association of SGA crude extracts were pH 3, 60 min, 20 ℃, and an anthocyanin concentration of greater than 0.240 mmol/L. Under these conditions, the degree of self-association reached 50.5433. For three SGAs that differed in purity, a higher purity resulted in molecules that could self-associate more easily and more strongly, indicating a common mechanism underlying self-association and copigmentation for anthocyanin. Solution systems were established by simulating grape wine and grape juice. The strength of self-association of crude extracts containing SGA in an alcohol solvent was greater than that in an aqueous solvent, and the initial anthocyanin concentrations that resulted in self-association in the two solvent systems were 0.03 mmol/L and 0.06 mmol/L, respectively. The anthocyanin hydration kinetics were also analyzed. As the anthocyanin concentration increased, the apparent hydration coefficient *k* decreased and the dissociation constant p*K* increased, indicating that self-association strengthened the hydrophobic properties and reduced the dissociation of anthocyanins, and therefore improved its stability.

Key words: spine grape (*Vitis davidii* Foex); anthocyanin; self-association; hydration kinetics; purification; solvent system

花色苷是一类重要的植物天然色素，溶解性好、着色自然，且具有多种生理活性功能，是替代合成色素的一类重要食品添加剂。然而花色苷稳定性差一直是限制其在食品工业中广泛应用的瓶颈问题。多年来，国内外在如何提高花色苷稳定性方面做了大量研究。国外研究显示，自聚合作用是花色苷稳定化的一种有效途径。如新鲜红葡萄酒中主要是以花色苷的自聚反应为主，自聚反应使其颜色呈棕红色，稳定性增加。花色苷自聚合效应的影响因素主要有花色苷自身结构及浓度、pH、温度、光及溶剂体系等。就溶剂体系而言，乙醇对花色苷自聚合效应的影响越来越受到关注，González-Manzano 等[1~2]研究了模式酒中花色苷的自聚作用对葡萄酒颜色的影响，发现新鲜红葡萄酒颜色的增强主要取决于花色苷的自聚反应及其与辅色素的辅色作用，该研究进一步强调了自聚作用在红葡萄酒颜色表现过程中是不容忽视的。但也有研究发现[3]，

收稿日期：2014-07-17
基金项目：国家自然科学基金资助项目（31271836）
作者简介：邓洁红（1967-），女，博士，教授，博士生导师，研究方向：园艺产品深加工理论与技术

有机溶剂的添加会减弱花色苷分子间的疏水性，导致花色苷的辅色作用减弱或中断。花色苷自聚合的机理及效应尚未清晰。

目前花色苷自聚合研究只有少量文献报道，且只涉及到花色苷浓度对自聚合作用的影响，并且大多是在葡萄酒中发现的，而对水系中花色苷自聚合特性缺乏研究，国内还未有该方面的研究报道。

刺葡萄（Spine Grape）产量高，价格低，果皮富含花色苷，是一种有广泛开发潜力的色素资源，但花色苷普遍光热稳定性差，研究其稳定化理论和技术具有重要意义[4]。目前，对刺葡萄花色苷自聚合作用的研究还未见报道，本研究着力于刺葡萄花色苷自聚合条件及效应的研究，探讨不同花色苷纯度和不同溶液体系中花色苷自聚合作用的特性，研究结果预期为南方葡萄酒、葡萄汁的色泽稳定和强化提供一定的理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验原料

刺葡萄（*Vitis davidii* Foëx.）：购于湖南省芷江县白马铺果园，洗净、晾干表面水分，手工剥皮，在-26 ℃冷冻贮藏以备用。

1.1.2 主要仪器

电子分析天平，AEY-220，湘仪天平仪器设备有限公司；精密酸度计，pHS-3C 型，上海精密科学仪器有限公司；紫外分光光度计，UV-2450，日本岛津；石英比色皿，光程 1.0 cm、0.2 cm、0.1 cm；旋转蒸发器，RE-2000B，巩义市予华仪器有限责任公司；循环水式真空泵，SHZ-D（Ⅲ），巩义市予华仪器有限责任公司；数显恒温水浴锅，HH-8，上海浦东物理光学仪器厂；海尔变频冰箱，BCD-252KSL，青岛海尔股份有限公司；玻璃层析柱，φ1.6×30 cm；BZ24/29

1.1.3 主要试剂

浓盐酸、冰醋酸、无水乙醇、无水醋酸钠、氯化钾、氢氧化钠、甲醇、酒石酸等，均为分析纯；三氟醋酸（TFA）为色谱纯；大孔吸附树脂 HP-20，日本三菱公司；聚酰胺树脂，100~200 目，国药集团化学试剂有限公司

1.2 试验方法

1.2.1 刺葡萄花色苷的提取与测定

称取一定量的刺葡萄皮于烧杯中，以料液比 1:3 加入 80%乙醇（含 0.1%盐酸）提取，于 4 ℃冰箱中浸提，过夜，抽滤后，用旋转蒸发仪（温度≤40 ℃）真空浓缩，挥干乙醇，浓缩液进行抽滤，得到刺葡萄花色苷粗提液，称为 0 号粗提液。

花色苷含量测定参照 Giusti[5]、Wrolstad[6]的方法，采用 pH 示差法按如下公式计算。参照邓洁红[7]研究基础，选择 520 nm 为最大吸收波长。

$$总花色苷含量(mg/L)=\frac{A\times MW\times DF\times 1000}{\varepsilon\times L} \quad (1)$$

注：$A=(A_{max}-A_{700nm})pH_{1.0}-(A_{max}-A_{700nm})pH_{4.5}$；Mw-花色苷的相对分子质量，以矢车菊素-3-葡萄糖苷计，449.2；DF-稀释因子；ε-花色苷的摩尔消光系数，以矢车菊素-3-葡萄糖苷计，26900；L-光程，cm。

1.2.2 花色苷自聚合程度的检识指标

1.2.2.1 聚合度

参照 Susana[1]的方法，公式如下：

$$聚合度=\frac{A-A_d}{A}\times 100 \quad (2)$$

注：A-花色苷溶液在最大吸收波长处的吸光度；A_d-花色苷溶液稀释一定倍数后在最大吸收波长处的吸光度乘以相应的稀释倍数；若聚合度>0，表示花色苷发生了自聚合效应；若聚合度≤0，说明花色苷未发生自聚合反应。为使图形更紧凑，本文图形中聚合度≤0 的情形一概记为 0[1]。

1.2.2.2 表观水合常数 K 和解离常数 pK

参照 Dangles[8]的方法，公式如下：

$$\frac{A_0}{A_0-A}=\frac{K_h+K_a}{K_h+K_a(1-r_A)}+\frac{10^{-pH}}{K_h+K_a(1-r_A)} \quad (3)$$

注：A_0-花色苷在强酸性溶液中（pH≤1）以黄烊盐阳离子形式存在时的吸光度；A-花色苷在给定的酸性溶液中的吸光度；r_A-花色苷以醌式碱形式和黄烊盐阳离子形式存在时的摩尔吸光系数；K_h-水化常数；K_a-酸度常数；K-表观水合常数，$K=K_h+K_a$。

1.2.3 花色苷浓度对花色苷自聚合作用的影响

将 0 号粗提液（$c=1.2\times10^{-2}$ mol/L）用蒸馏水稀释（调酸 pH 1.72）至浓度梯度分别为 1.200 mmol/L、0.600 mmol/L、0.240 mmol/L、0.120 mmol/L、0.060 mmol/L、0.030 mmol/L、0.012 mmol/L 和 0.006 mmol/L，室温避光静置 1 h 后，测定最大吸收波长处的吸光度，代入公式（2）计算聚合度。

1.2.4 pH 值对花色苷自聚合作用的影响

0 号粗提液分别用 pH 为 1~5 的蒸馏水稀释至浓度为 0.240 mmol/L，蒸馏水的 pH 值用 1 mol/L 的 HCl 调节得到，室温避光静置 1 h 后，测定聚合度。

1.2.5 时间对花色苷自聚合作用的影响

0 号粗提液用 pH 为 3 的缓冲液稀释至浓度为 0.240 mmol/L，室温避光静置时间分别设定为 20 min、

40 min、60 min、80 min、100 min、120 min、180 min 和 240 min，测定聚合度。

1.2.6 温度对花色苷自聚合作用的影响

0 号粗提液用 pH 为 3 的缓冲液稀释至浓度为 0.240 mmol/L，然后分别放入设定好的温度环境中（10 ℃、20 ℃、30 ℃、40 ℃、50 ℃），避光静置 1 h 后，测定聚合度。

1.2.7 表观水合常数 K 的计算

0 号粗提液分别用 pH 为 1~5 的缓冲液梯度稀释，室温避光静置 1 h 后，测最大吸收波长处的吸光度，代入公式（3）计算表观水合常数 K。

1.2.8 花色苷纯度对自聚合作用的影响

1.2.8.1 大孔树脂 HP20 纯化液制备

刺葡萄花色苷的吸附解吸工艺参数，参照邓洁红[7]研究得出的条件。

称取一定量经预处理的 HP-20 大孔树脂湿法上柱（φ1.6×30 cm），将 0 号粗提液用蒸馏水稀释（调酸 pH 3.0），测得花色苷浓度为 2.3632 mg/mL，以 4.5 BV/h 的流速加入树脂层，共处理色素液 200 mL。等树脂吸附达到饱和后，以 2BV 蒸馏水冲柱，去除糖、蛋白质等水溶性成分，用洗脱剂（80%乙醇+0.05%盐酸）冲柱，控制流速为 3BV/h，直至树脂层近乎无色，收集流出液，真空浓缩、抽滤后得到刺葡萄花色苷浓缩液，称为 1 号纯化液。

1.2.8.2 聚酰胺纯化液制备

聚酰胺树脂→95%乙醇浸泡 12 h→过滤→5% NaOH 溶液浸泡 2 h→蒸馏水冲洗至 pH 中性→10%醋酸溶液浸泡 2 h→蒸馏水冲洗至 pH 中性，备用

聚酰胺树脂经预处理后，湿法装柱（BZ24/29）。将部分 1 号纯化液过聚酰胺柱，吸附达到饱和后，用 50%甲醇（含 0.1% TFA）洗脱，收集有色部分，去除单宁等辅色素的影响，真空浓缩后抽滤，得到花色苷纯化液，称为 2 号纯化液。

1.2.8.3 不同纯度的刺葡萄花色苷自聚合作用的特性

分别将 0 号粗提液、1 号纯化液、2 号纯化液用 pH3 的缓冲液稀释至浓度各为 1.200 mmol/L、0.600 mmol/L、0.240 mmol/L、0.120 mmol/L、0.060 mmol/L、0.030 mmol/L、0.012 mmol/L 和 0.006 mmol/L，在 20 ℃下避光静置 1 h 后，测定聚合度。

1.2.9 刺葡萄花色苷在不同溶液体系中自聚合作用的特性

1.2.9.1 葡萄汁水系条件和葡萄酒醇系条件的模拟

水系条件（模拟葡萄汁）：花色苷粗提液用 1 mol/L 的 HCl 溶液调节 pH 为 3.6。

醇系条件（模拟葡萄酒）：参照 Susana[1]的方法，花色苷粗提液中加入 12%乙醇+5 g/L 酒石酸，再用 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 为 3.6。

1.2.9.2 刺葡萄花色苷在水系中自聚合作用的特性

模拟葡萄汁的条件，将花色苷粗提液梯度稀释，室温避光静置 1 h 后，测定聚合度。

1.2.9.3 刺葡萄花色苷在醇系中自聚合作用的特性

模拟葡萄酒的条件，将花色苷粗提液梯度稀释，室温避光静置 1h 后，测定聚合度。

1.2.10 数据处理方法

每个处理重复 3 次，试验数据的结果以平均数表示。试验数据分析采用 SPSS17.0 统计软件处理。不同大写字母表示组间差异极显著（P<0.01），不同小写字母表示组间差异显著（P<0.05），相同小写字母表示组间差异不显著（P>0.05）。

2 结果与讨论

2.1 花色苷浓度对刺葡萄花色苷自聚合作用的影响

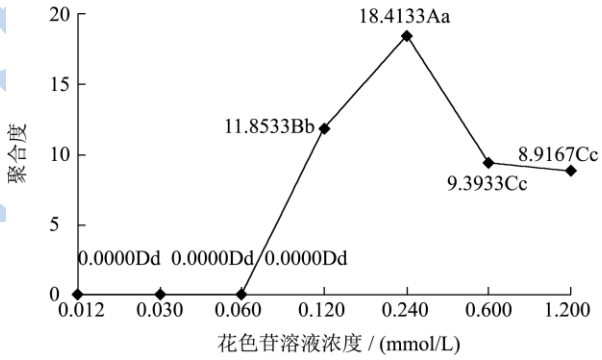


图 1 花色苷浓度对刺葡萄花色苷自聚合作用的影响

Fig.1 The effect of concentration on the self-association of SGA

图 1 是在 Ph 1.72 的条件下得到的。计算聚合度时，先将花色苷浓度为 0.012 和 0.006 mmol/L 下的吸光度代入公式（2）计算，聚合度小于 0，说明浓度为 0.012 mmol/L 的花色苷溶液未发生自聚合，再将浓度为 0.012 和 0.030 mmol/L 下的吸光度代入公式计算，聚合度小于 0，说明浓度为 0.030 mmol/L 的花色苷溶液也未发生自聚合，直至将浓度为 0.120 和 0.060 mmol/L 下的吸光度代入公式计算，得到聚合度大于 0，说明 0.120 mmol/L 的花色苷溶液发生了自聚合反应，然后以花色苷浓度为 0.060 mmol/L 下的吸光度作为基准，计算剩余浓度下的聚合度，如图 1 所示。

从图 1 可以看出，聚合度随着花色苷浓度的增大而增加，当花色苷浓度为 0.240 mmol/L 时，达到最大，也就是说，此时花色苷自聚合作用最强。继续提高花

色苷浓度，聚合度反而下降，并且由方差分析可知，花色苷浓度在0.600 mmol/L和1.200 mmol/L时差异不显著。原因可能是，花色苷自聚合作用除了与花色苷自身浓度有关外，还受到自身结构和 pH 等因素的影响，在强酸性溶液中，花色苷主要以黄烊盐阳离子形式存在，当浓度过高时，花色苷分子之间的流动性会受到一定的影响，影响分子间的疏水性和堆叠作用，进而导致自聚合作用降低[9]。也有可能是，花色苷粗提液中含有一些杂质，如黄酮类物质可以充当辅色素，能与花色苷发生辅色，不过当浓度过高时，辅色作用与自聚合反应会出现一定的竞争效应，导致自聚合效应下降。后续试验中选择花色苷浓度为0.240 mmol/L。

2.2 pH对刺葡萄花色苷自聚合作用的影响

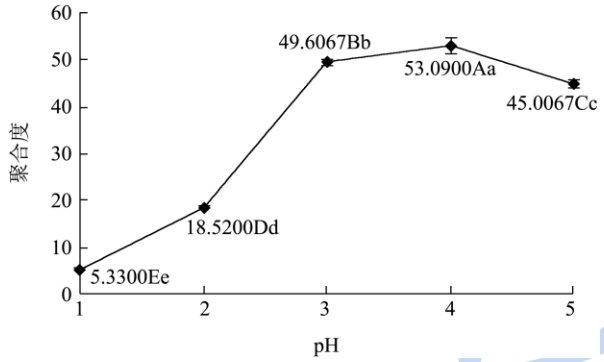


图 2 pH 对刺葡萄花色苷自聚合作用的影响

Fig.2 The effect of pH on the self-association of SGA

经方差分析得出，pH值对花色苷自聚合作用的影响是极显著的。观察图2，随着pH的增大，聚合度先增加后减少，pH 1~3时，上升较快，pH 3~4时，趋于平稳，颜色呈紫红色，pH 4~5时，反而下降，色素液略带蓝色。pH为4时，图中出现最高点，说明pH为4时花色苷自聚合作用最强。不过在此pH下，刺葡萄花色苷溶液的吸光度较小，并且颜色呈现为紫色中略带蓝色，这可能是花色苷的结构形式发生了变化，由红色的黄烊盐阳离子形式转变为蓝色的醌式碱形式。结合花色苷在不同pH值条件下的稳定性，认为pH 3~4较为有利于花色苷的自聚合。

2.3 时间对刺葡萄花色苷自聚合作用的影响

从图3可以看出，随着作用时间的延长，聚合度先上升，直至60 min时，出现最高点，此时花色苷自聚合作用最强，然后聚合度开始下降。由方差分析可知，每个相邻时间段间的聚合度差异都不显著。由此可知，花色苷的自聚合反应与辅色作用一样，是一个循序渐进的过程，而不是即时反应[10]。原因可能是，反应刚开始的一段时间，花色苷分子之间未充分接触，还未完全建立起垂直堆叠的结构，随着时间的逐渐延长，直至60 min时，花色苷自聚合作用最大，而后继续延长时间，聚合度出现稍许下降的现象，这可能是花色苷在自然状态下缓慢分解造成的，也可能是别的原因导致，具体机制还有待进一步研究。

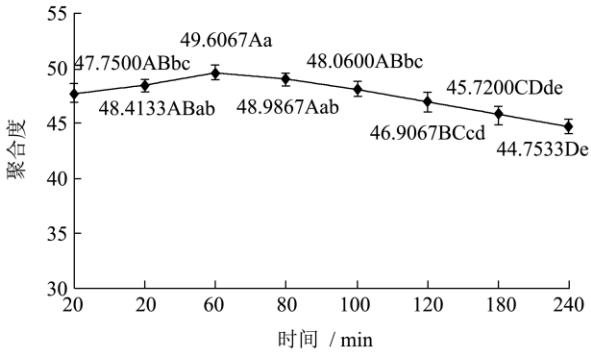


图 3 时间对刺葡萄花色苷自聚合的影响

Fig.3 The effect of time on the self-association of SGA

2.4 温度对刺葡萄花色苷自聚合作用的影响

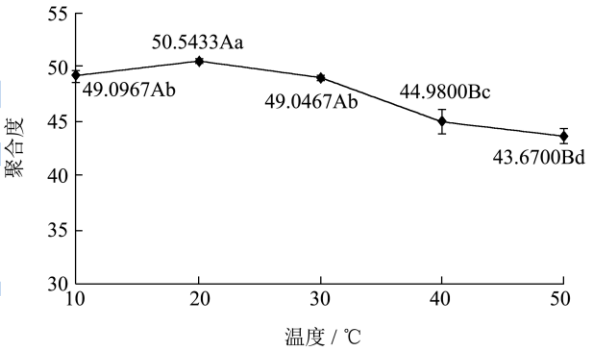


图 4 温度对刺葡萄花色苷自聚合作用的影响

Fig.4 The effect of temperature on the self-association of SGA

由图4可知，在20 ℃之前，聚合度随着温度的升高逐渐上升，温度为20 ℃时，图中出现最高点，在20 ℃之后，聚合度随着温度的升高反而下降，说明温度在20 ℃时花色苷的自聚合作用最大。原因可能是，随着温度的升高，尤其是温度超过40 ℃后，刺葡萄花色苷发生一定程度的降解，花色苷受到损失，导致吸光度减小，降解后生成一些较复杂的物质，干扰花色苷的自聚合作用，所以聚合度变小。

2.5 表观水合常数K的计算

Dueñas等[11]研究发现，pH值从0.9到4.2，在最稀的花色苷溶液（浓度0.020 mmol/L）中，在可见光波段几乎观察不到光谱，也没有增色效应，表明花色苷在此pH范围内进行纯水化，那么$K_a<<K_h$，根据$K=K_h+K_a$，所以K近似等于K_h，pK近似等于pK_h。Susana等[1]通过研究发现，pK随着花色苷浓度的增加

而增加，他们认为，在此种方案中由于没有其它化合物能与花色苷相互作用，所以只能解释为花色苷的自聚合作用。

将公式（3）变形，pH 为 1 时测定的吸光值作为 A_0，pH 为 2~5 时测定的吸光值作为 A，以 $A_0/(A_0-A)$ 为因变量，10^{-pH} 为自变量，做直线图，并进行线性回归，如图 5 所示，通过直线斜率和截距求出表观水合常数 K，然后对 K 值取负对数，得出解离常数 pK，如表 1 所示。

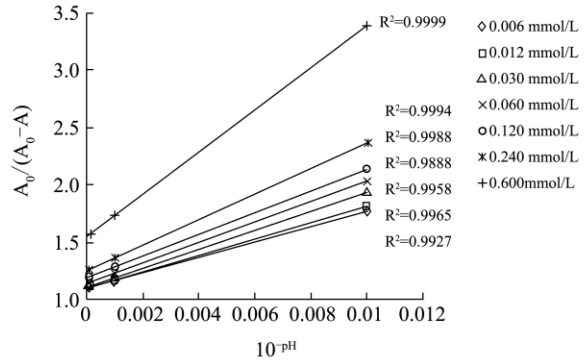


图 5 刺葡萄花色苷水合动力学方程 $A_0/(A_0-A)-10^{-pH}$的关系

Fig.5 The relationship between hydration kinetics of SGA estimated as $A_0/(A_0-A)$ and 10^{-pH}

图 5 结果表明，$A_0/(A_0-A)$与 10^{-pH} 线性关系良好（$R^2>0.98$）。文献显示，水化常数 K_h 反映花色苷通过水化平衡由黄烊盐阳离子形式转化为甲醇假碱形式的程度，酸度常数 Ka 反映花色苷通过酸式平衡由黄烊盐离子形式转换为醌式碱形式的程度，K_h 值越小，说明水化反应的程度越小，花色苷分子间的疏水性增强，进一步促使垂直层叠的色素分子的形成。解离常数 pK 是指水溶液中具有一定离解度的溶质的极性参数，pK 值越大，说明花色苷离解能力越弱。

表 1 表观水合常数 K 和解离常数 pK 与刺葡萄花色苷溶液浓度的关系

Table 1 The relationship between *K* values and p*K* values and the concentration of SGA

花色苷溶液浓度/(mmol/L)	K	pK
0.006	0.0165	1.78
0.012	0.0155	1.81
0.030	0.0133	1.87
0.060	0.0132	1.88
0.120	0.0127	1.90
0.240	0.0111	1.96
0.600	0.0085	2.07

表 1 可以看出，随着刺葡萄花色苷溶液浓度的增加，K 值逐渐减少，而 pK 值逐渐增加。试验得出的结果与 Susana[1]研究的结论相一致，这进一步验证了刺葡萄花色苷确实发生了自聚合作用。

2.6 不同纯度的刺葡萄花色苷自聚合作用的特性

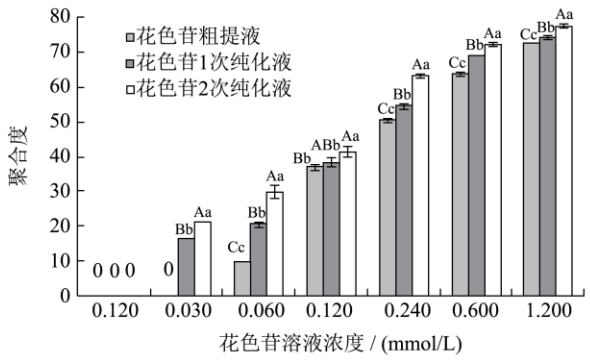


图 6 不同纯度的刺葡萄花色苷自聚合作用的特性

Fig.6 The characteristics of the self-association of SGA with different purities

由图 6 可知，随着花色苷浓度的升高，各纯度的花色苷溶液的聚合度都随之升高。数据统计分析表明，浓度对花色苷聚合度的影响极显著。为避免图中字母过多，图 6 中仅标注纯度对聚合度的影响差异性分析结果。在浓度 0.12 mmol/L 条件下，1 号与 0 号聚合度差异不显著，2 号与 0 号、1 号均差异显著，其他浓度条件下，纯度对聚合度影响均极显著。0 号、1 号和 2 号样品发生自聚合作用的最低花色苷浓度依次为 0.060 mmol/L、0.030 mmol/L 和 0.030 mmol/L，说明 1 号和 2 号纯化液对比 0 号粗提液更容易发生自聚合效应。各纯度样品自聚合效应的强弱顺序为：2 号纯化液>1 号纯化液>0 号粗提液。原因可能是，刺葡萄花色苷粗提液中除了主要成分花色苷外，还含有糖类、蛋白质、有机酸、单宁、果胶及一些非花色苷酚等杂质，经过 1 次纯化后，只是洗脱了一些糖、蛋白质等水溶性成分，杂质的存在影响着花色苷的色泽、品质和稳定性[11~12]。而聚酰胺纯化后，去除了单宁等辅色物质，表现出更强的自聚合效应。这个线索可作为刺葡萄花色苷分子间共色-辅色效应相互制约机制的一个证据。另外，由图 6 和图 1 对比可见，不同 pH 值条件下，花色苷浓度对自聚合度的影响规律不一致。pH≤2 强酸性条件下，浓度过高反而自聚合度下降，而 pH3 温和酸性条件下，浓度越高，自聚合度越高。可见，强酸性条件不利于花色苷的自聚合，且 pH 值与花色苷浓度对自聚合产生交互影响，以后的研究中值得深入探讨。

2.7 刺葡萄花色苷在水系和醇系中自聚合作

用的特性

表 2 刺葡萄花色苷在不同溶液体系中的吸光值

Table 2 The absorbance of SGAfor different solution systems

花色苷浓度 /(mmol/L)	吸光度 A	
	水系	醇系
0.006	0.020±0.000	0.010±0.000
0.012	0.035±0.000	0.015±0.000
0.030	0.080±0.000	0.040±0.000
0.060	0.175±0.000	0.092±0.003
0.120	0.483±0.008	0.268±0.008
0.240	1.250±0.031	0.593±0.023
0.600	4.492±0.045	1.897±0.030
1.200	11.302±0.049	5.587±0.023

注：表中数据为 mean+SD，n=3。

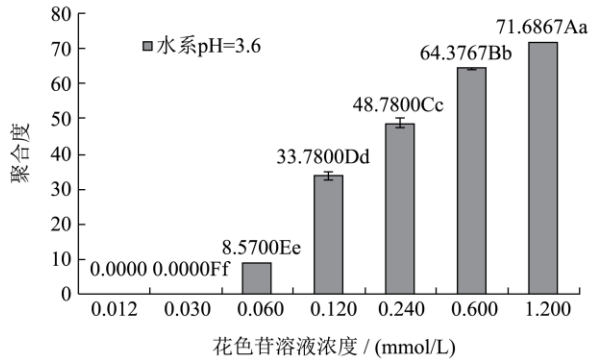


图 7 刺葡萄花色苷在水系中发生自聚合作用的特性

Fig.7 The characteristics of self-association of SGAin an aqueous system

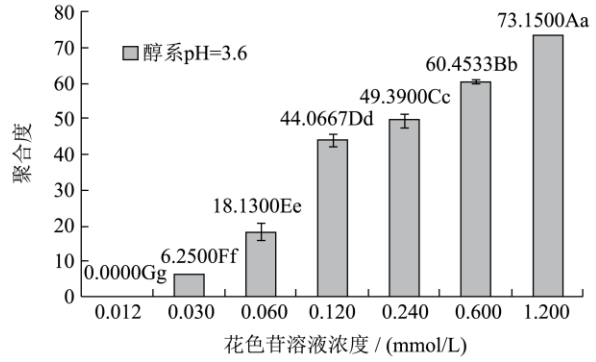


图 8 刺葡萄花色苷在醇系中发生自聚合作用的特性

Fig.8 The characteristics of self-association of SGAin an alcohol system

不同浓度的刺葡萄花色苷在水系和醇系中的吸光值见表 2。在相同的花色苷浓度下，花色苷在水系和醇系中的吸光值差异很大。就两者比较而言，从溶液颜色上观察，前者深于后者，反映在吸光值上，前者大于后者，正如表 2 所示。原因可能是，刺葡萄中的花色苷主要为锦葵啶和芍药啶[13]，有机溶剂乙醇可与之结合，在一定程度上影响了花色苷的显色。所以，同种花色苷浓度下，在醇系中的颜色要略淡一些。

图 7 是刺葡萄花色苷在水系中自聚合作用的情况。随着花色苷溶液浓度的增加，聚合度逐渐增大，自聚合作用逐渐增强。花色苷在水系中自聚合作用的最低花色苷浓度为 0.060 mmol/L，此时聚合度为 8.5700，当花色苷浓度为 1.200 mmol/L 时，该值增至 71.6867。另外，当花色苷浓度从 0.060 mmol/L 增至 0.120 mmol/L 时，聚合度增加的最多，自聚合强度相对增加的最快。

刺葡萄花色苷在醇系中自聚合作用的特性见图 8。聚合度随着花色苷浓度的增加而增加，自聚合作用的强度越来越大。并且花色苷浓度为 0.030 mmol/L 时，花色苷就发生了自聚合效应，此时聚合度为 6.2500，当花色苷浓度为 1.200 mmol/L 时，该值升至为 73.1500。同样的，当花色苷浓度从 0.060 mmol/L 增至 0.120 mmol/L 时，聚合度增加了约 26，增加的最多，自聚合强度相对增加的最快。

比较图 7、8 可知，整体而言，刺葡萄花色苷在水系中自聚合作用的强度小于其在醇系中的自聚合效应，并且在醇系中较易发生自聚合作用。

3 结论

3.1 聚合度和表观水合常数 K 的计算结果均表明，当花色苷浓度达到一定程度，刺葡萄花色苷溶液确实发生了自聚合效应。刺葡萄花色苷粗提液发生自聚合作用的初始浓度为 0.120 mmol/L（pH 1.72），适宜的自聚合条件为：pH 3，时间 60 min，温度 20 ℃，花色苷浓度 0.240 mmol/L 以上。在此条件下，聚合度达到 50.5433 以上。

3.2 花色苷对 pH 较敏感。本试验也发现 pH 1.72 与 pH 3.0 条件下，花色苷浓度对自聚合度的影响规律不一致。pH 1.72 强酸性条件下，花色苷浓度在 0.24 mmol/L 时达到最佳自聚合效应，浓度过高反而自聚合度下降，而 pH 3 温和酸性条件下，浓度越高，自聚合度越高。试验中观察到的 pH 值对花色苷的颜色变化结果与 Dao[14]和邓洁红[4]的研究报道相一致，这种现象可以解释为，在溶液中，花色苷随 pH 不同发生结构上的转换，导致颜色随之变化。

3.3 溶液的纯度对花色苷自聚合效应产生影响。2 号纯化液、1 号纯化液及 0 号粗提液的初始聚合浓度分别为 0.03 mmol/L、0.03 mmol/L 及 0.06 mmol/L，表明花色苷纯化液对比粗提液更容易发生自聚合效应。且各纯度样品自聚合效应的强弱顺序为：2 号纯化液>1 号纯化液>0 号粗提液。

3.4 刺葡萄花色苷粗提液中含有一定的糖、蛋白质等水溶性成分及部分果胶、单宁等杂质，这些杂质的存在会对花色苷的色泽和稳定性产生一定的影响。去除单宁等辅色素后的花色苷表现出更好的自聚合特性，提示刺葡萄花色苷分子间共色-辅色效应可能存在相互制约机制。

3.5 溶剂体系对花色苷自聚合效应产生影响。相比水系溶剂，刺葡萄花色苷在醇系中更容易发生自聚合效应，且醇系中的自聚合强度大于水系。

3.6 溶剂体系也是研究花色苷自聚合作用时需要考虑的一个重要因素。花色苷在质子型的溶剂中呈单体状态，颜色呈红色，而在非质子型的溶剂中以二聚体形式存在，颜色为黄色[15]。前人的研究成果充分说明了乙醇对花色苷自聚合效应的影响主要取决于花色苷结构、溶液 pH 及乙醇的浓度等。本试验结果显示，在水系中，花色苷溶液显色深、吸光值较大；在醇系中显色浅，吸光值偏小。不过，整体来说，花色苷在醇系中自聚合的强度大于水系中，且比在水系中容易发生自聚合现象。这一结果与 Mirabel 等[16]和 Boulton[17]的研究结果一致，原因可能是，本试验中使用的乙醇浓度为 12%、溶液 pH 为 3.6，在此体系条件下，低浓度的乙醇增强了花色苷分子之间的疏水相互作用，进而促使垂直堆叠的花色苷分子的大量形成，增强了它们之间的聚合作用。

参考文献

[1] Gonz ález-Manzano Susana, Santos-Buelga C, Duenas M, et al. Colour implications of self-association processes of wine anthocyanins [J]. European Food Research and Technology, 2008, 226(3): 483-490

[2] Gonz ález-Manzano S, Duenas M, Rivas-Gonzalo J C, et al. Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine [J]. Food Chemistry, 2009, 114(2): 649-656

[3] Somers T C, Evans M E. Grape pigment phenomena:Interpretation of major colour losses during vinification [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1979, 30(6): 623-633

[4] 邓洁红,谭兴和,王峰,等.刺葡萄皮花色苷的光热降解特性研究[J].食品与机械,2010,26(5):56-61
DENG Jie-hong, TAN Xing-he, WANG Feng, et al. Studies on the photic and thermal degradation characteristics of vitis skin anthocyanins [J]. Food and Machinery, 2010, 26(5): 56-61

[5] Giusti M M, Wrolstad R E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy [M]. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. New York: Wiley, 2001

[6] Wrolstad R E, Robert W D, Jungmin L. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products [J]. Trends in Food Science and Technology, 2005, 16(9): 423-428

[7] 邓洁红.刺葡萄皮色素的研究[D].长沙:湖南农业大学,2007
DENG Jie-hong. Studies on the brier grape (vitis davidii foëx.) skin pigment [D]. Changsha: Hunan Agricutural University, 2007

[8] Olivier Dangles, Norio Saito, Raymond Brouillard. Kinetic and thermodynamic control of flavylium hydration in the pelargonidin-cinnamic acid complexation. origin of the extraordinary flower color diversity of pharbitis nil [J]. American Chemical Society, 1993, 115(8): 3125-3132

[9] Hoshino T, Matsumoto U, Goto T, et al. Evidence for the self-association of anthocyanins IV: PMR spectroscopic evidence for the vertical stacking of anthocyanin molecules [J]. Tetrahedron Letters, 1982, 23(4): 433-436

[10] 刘丽媛,苑伟,刘延琳.红葡萄酒中花色苷辅助成色作用的研究进展[J].中国农业科学,2010,43(12):2518-2526
LIU Li-yuan, YUAN Wei, LIU Yan-lin. Advances in research of red wine's anthocyanin copigmentation [J]. Scientia Agricutura Sinica, 2010, 43(12): 2518-2526

[11] Duenas M, Salas E, Cheynier V, et al. UV-visible spectroscopic investigation of the 8,8-methylmethine catechin-malvidin 3-glucoside pigments in aqueous solution structural transformations and molecular complexation with chlorogenic acid [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2006, 54(1): 189-196

[12] 张明霞,刘崇怀,张静,等.桑叶葡萄和刺葡萄果皮中酚类物质的组成分析[J].食品科学,2011,32(14):264-267
ZHANG Ming-xia, LIU Chong-huai, ZHANG Jing, et al. Composition analysis of phenols in vitis ficifolia bge and vitis davidii foex fruit skins [J]. Food Science in China, 2011, 32(14): 264-267

[13] 邓洁红,谭兴和,王峰,等.刺葡萄皮花色苷的分离及检定[J].中国食品学报,2010,10(1):200-205
DENG Jie-hong, TAN Xing-he, WANG Feng, et al. Isolation and detection of anthocyanins from vitis skin [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2010, 10(1): 200-205

[14] Dao L T, Takeoka G R, Edwards R H,et al. Improved method for the stabilization of anthocyanidins [J]. Agriculture and Food Chemistry, 1998, 46(9): 3564-3569

[15] Ito F, Tanaka N, Katsuki A, et al. Why do flavylium salts show so various colors in solution?: Effect of concentration and water on the flavylium's color changes [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2002, 150(1-3): 153-157

[16] Mirabel M, Saucier C, Guerra C, et al. Copigmentation in model wine solutions:occurrence and relation to wine aging [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1999, 50(2): 211-218

[17] Boulton R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2001, 52(2): 67-87

现代食品科技