

有机酸对桑椹花色苷的辅色作用 及其热降解动力学规律

陈湘粤^{1,2}, 高群玉^{1*}, 李倩^{2*}, 廖森泰², 邹宇晓²

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东广州 510610)

摘要: 为探究不同结构有机酸对桑椹花色苷的辅色作用及其热稳定性的影响, 采用超高效液相色谱-质谱法分析花色苷组成, 以对羟基苯甲酸、原儿茶酸、没食子酸、绿原酸、苹果酸为辅色剂, 考察 pH 值、温度、有机酸质量浓度对辅色反应的影响, 并分别在 60、70、80 °C 水浴中模拟食品中花色苷的热降解过程, 探究热降解动力学规律。结果表明, 在 pH=3.5、20 °C、960 mg/L 质量浓度条件下, “增色效应”和“红移效应”达到最大, 辅色效果依次为苹果酸>绿原酸>没食子酸>原儿茶酸>对羟基苯甲酸, 苹果酸比空白组 $A_{\lambda_{max}}$ 增加 45.04%。反应化学计量比 (n)、平衡常数 (K)、吉布斯自由能 ΔG° 显示辅色过程均自发进行, 苹果酸的平衡常数 (K) 最大, 吉布斯自由能 ΔG° 最小, 分别为 26.85、-8.02 kJ/mol。热降解实验表明添加有机酸能延长花色苷半衰期 ($T_{1/2}$), 减小降解常数 (k), 60 °C 时, 没食子酸可将花色苷溶液半衰期 ($T_{1/2}$) 从 17.50 h 延长至 26.23 h, 降解常数 (k) 从 $6.6 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$ 减小至 $4.4 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$ 。因此, 有机酸辅色作用有助于提高桑椹花色苷的稳定性。

关键词: 桑椹花色苷; 有机酸; 辅色作用; 超高效液相色谱-质谱 (UPLC-MS/MS); 热力学参数; 热降解动力学

文章编号: 1673-9078(2022)06-116-125

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.6.1006

Co-pigmentation of Mulberry Anthocyanins with Organic Acids: Color Enhancement and Thermal Degradation Kinetics

CHEN Xiangyue^{1,2}, GAO Qunyu^{1*}, LI Qian^{2*}, LIAO Sentai², ZOU Yuxiao²

(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Key Laboratory of Functional Food, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Sericultural & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China)

Abstract: The effects of different organic acids on the pigmentation and thermal stability of anthocyanins from mulberries were investigated. First, UPLC-MS/MS was used to analyze the composition of mulberry anthocyanins. Then, 4-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, gallic acid, chlorogenic acid, and malic acid were used as co-pigments to determine the influence of pH, temperature, and organic acid concentration on the pigmentation of the mulberry anthocyanins. The thermal degradation of anthocyanins in food was simulated in water baths at 60, 70 and 80 °C to explore the effects of the organic acids on the thermal degradation kinetics of the mulberry anthocyanins. The most significant color enhancement and red-shifting effects were observed at anorganic acid concentration of 960 mg/L, pH of 3.5, and temperature of 20 °C. The co-pigmentation effects of the five organic acids were in the following order: malic acid>chlorogenic acid>gallic acid>protocatechuic acid>4-hydroxybenzoic acid. Compared with that of the blank group, the absorbance at λ_{max} of the group treated with malic acid increased by

引文格式:

陈湘粤,高群玉,李倩,等.有机酸对桑椹花色苷的辅色作用及其热降解动力学规律[J].现代食品科技,2022,38(6):116-125

CHEN Xiangyue, GAO Qunyu, LI Qian, et al. Co-pigmentation of mulberry anthocyanins with organic acids: color enhancement and thermal degradation kinetics [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(6): 116-125

收稿日期: 2021-09-08

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2020B020225005); 广东省农业科学院“十四五”农业优势产业学科团队建设项目 (202119TD)

作者简介: 陈湘粤 (1997-), 女, 硕士, 研究方向: 食品科学, E-mail: xychen1817@163.com

通讯作者: 高群玉 (1965-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 谷物科学、淀粉改性及碳水化合物, E-mail: qygao@scut.edu.cn; 共同通讯作者: 李倩 (1989-),

女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品科学、蚕桑与药食资源加工利用, E-mail: Liqian.hubei@163.com

45.04%。The stoichiometric ratio (n), equilibrium constant (K), and Gibbs free energy (ΔG°) indicated that the co-pigmentation reactions were all spontaneous. Malic acid, demonstrating the best co-pigmentation effect, had the largest K value (26.85) and the smallest ΔG° value (-8.02 kJ/mol). Through degradation experiments, it was found that the addition of organic acids could prolong the half-life ($T_{1/2}$) of the anthocyanins and reduce their degradation constant (k). At 60 °C, gallic acid prolonged the $T_{1/2}$ of the anthocyanins from 17.50 h to 26.23 h and reduced the k value from $6.6 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$ to $4.4 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$. Therefore, co-pigmentation with organic acids can effectively improve the stability of anthocyanins from mulberries.

Key words: mulberry anthocyanins; organic acids; co-pigmentation; UPLC-MS/MS; thermodynamic parameters; thermal degradation kinetics

桑椹, 别名乌椹、桑椹子、桑枣等, 为桑树的成熟果实。桑椹在食用方面可以为人体提供多种营养, 同时因含有芦丁、花青素等活性物质可作为药材使用。桑椹是第一批由国家卫生部认定为“药食同源”的植物^[1], 其中富含的花青素约是蓝莓的两倍, 因此对桑椹进行深加工是开发利用资源的重要渠道之一^[2]。植物来源的花色苷是具有优良应用前景的天然着色剂^[3], 具有抗氧化^[4]、抗炎^[5]、清除自由基^[6]、保护视力^[7]、降血糖^[8,9]、降血脂^[10]和抗动脉硬化^[11]等生理活性功能。但天然的花色苷在食品加工和贮藏过程中容易受到 pH 值、温度、光照、金属离子、氧气微生物等外界因素的影响而发生降解, 生成无色的查尔酮或其同分异构体 α -二酮^[12], 目前提高花色苷稳定性的途径主要有: 分子辅色作用、化学结构修饰、生物工程技术等^[13]。而花色苷分子辅色作用方式主要包括分子内辅色、分子间辅色、金属络合和自聚合作用 4 种, 常用的辅色剂有酚类化合物、生物碱、金属离子以及有机酸等^[14]。

已有研究表明有机酸对花色苷有明显的增色效应与红移效应, 然而以桑椹花色苷为对象, 考察有机酸对其辅色作用的研究还较少, 且桑椹汁等加工制品在加工过程中容易因花色苷的不稳定而失去美观色泽。常用的有机酸包括咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸等, 但由于其在水溶液中的低溶解性不适用于食品体系, 因此选用对羟基苯甲酸、原儿茶酸、没食子酸、绿原酸、苹果酸 5 种可溶于水的有机酸作为辅色剂, 从有机酸自身结构特点出发, 探究有机酸苯环结构上所连羟基数不同以及酚酸与脂肪酸对花色苷辅色效果的差异。此外, 这几种酸都具有功能性, 其中, 没食子酸、绿原酸是桑属植物重要的酚类物质, 常见于水果、蔬菜、谷物中, 具有抗菌、降压、增高白血球、抗氧化等多种功效, 是具有开发价值的潜在天然抗氧化剂^[15]。此研究将对开发天然植物辅色剂具有重大的实际意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

桑椹花色苷购于天津市尖峰天然产物研究开发有限公司 (花色苷含量 250 mg/g)。对羟基苯甲酸、原儿茶酸、没食子酸、绿原酸、苹果酸 (分析纯) 均购于上海瑞永生物有限公司; 磷酸、无水乙酸钠、氢氧化钠均为分析纯。

1.2 仪器与设备

数显恒温水浴锅, 金坛市富华仪器有限公司; UV-9100 紫外可见分光光度计, 北京瑞利分析仪器公司; FA2004N 赛多利斯精密电子天平, 上海精密仪器科学有限公司; Ekspert 超高效液相色谱-Triple TOF 5600 高分辨率精确质量四极杆飞行时间质谱联用仪。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱-质谱条件

参考 Khalifa 等^[16]的方法并做修改, 液相条件: 色谱柱 C18 ($2.1 \times 100 \text{ mm}^2$, $1.7 \mu\text{m}$, Waters, USA); 流动相: A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为纯甲醇, 洗脱程序 0~10 min: 5%~20% B, 保留 5 min; 15~30 min: 20%~25% B, 保留 5 min; 35~40 min: 25%~33% B; 40~42 min: 33%~5% B, 保留 5 min; 42~47 min: 5% B; 流速为 0.3 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 2 μL ; 进样前平衡 5 min。

质谱条件: ESI 源; 正离子模式; 氮气作为气帘气 (CUR), 35 psi; 离子源气体 (GS1 和 GS2), 50 psi; 离子化温度, 500 °C; 喷雾电压, 5500 V (+); 碰撞能量 (CE), 45 (+); 扫描范围, 50~1000 m/z 。

1.3.2 pH 值对桑椹花色苷溶液的影响

配置磷酸缓冲溶液 (0.02 mol/L 乙酸钠溶液、0.06 mol/L 磷酸溶液), 用 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节缓冲溶液 pH 值 (2.28~10.29), 用不同 pH 值的缓冲溶液配置成浓度为 2.5×10^{-4} mol/L 的桑椹花色苷溶液。在 400~700 nm 范围内, 扫描反应溶液的紫外可见光谱。

1.3.3 pH 值对辅色反应的影响

分别用 pH 值 2.5、3.5、4.5、5.5 的磷酸缓冲溶液配成桑椹花色苷溶液以及五种辅色剂溶液, 最终辅色反应体系中桑椹花色苷溶液浓度为 2.5×10^{-4} mol/L, 辅

色剂质量浓度为 960 mg/L。将混合溶液置于室温下黑暗中反应 30 min，在 400~700 nm 范围内，扫描反应溶液的紫外可见光谱。

1.3.4 温度对辅色反应的影响

用 pH 值为 3.5 的磷酸缓冲溶液配置桑椹花色苷与辅色剂的混合溶液，花色苷浓度为 2.5×10^{-4} mol/L，辅色剂质量浓度为 960 mg/L。混合均匀后，分别置于 20、30、40、50 °C 水浴中避光反应 30 min。在 400~700 nm 范围内，扫描反应溶液的紫外可见光谱。

1.3.5 辅色剂浓度对辅色反应的影响

辅色实验参考 Molaeafard 等^[17]的方法，配置磷酸缓冲溶液（0.02 mol/L 乙酸钠溶液、0.06 mol/L 磷酸溶液），用 1 mol/L NaOH 将溶液 pH 调至 3.5。用磷酸缓冲溶液配成浓度约为 2.5×10^{-4} mol/L 的花色苷溶液，分别加入对羟基苯甲酸、原儿茶酸、没食子酸、绿原酸、苹果酸五种辅色剂，每种有机酸质量浓度分别为 120、240、480、960 mg/L。将混合均匀后的辅色反应体系置于室温下黑暗中反应 30 min。在 400~700 nm 范围内，扫描反应溶液的紫外可见光谱。

1.3.6 热力学参数计算

根据式（1）进行直线拟合求出平衡常数（K）、化学计量比（n）。

$$\ln \frac{A - A_0}{A_0} = \ln K + n \ln [C_p]_0 \quad (1)$$

式中：

A——添加不同浓度的辅色剂的花色苷溶液在室温下暗反应 30 min 后 515 nm 处的吸光值；

A₀——未添加辅色剂的花色苷溶液在室温下暗反应 30 min 后 515 nm 处的吸光值；

n——辅色剂与花色苷的化学计量比；

[C_p]₀——辅色剂的浓度。

根据式（2）计算吉布斯自由能 ΔG°

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (2)$$

式中：

R——气体摩尔常数，8.314 J/(mol·K)；

T——开尔文温度，K；

K——平衡常数。

1.3.7 辅色剂对桑椹花色苷热降解过程的影响

将样品在恒温水浴锅中加热 250 min，每隔 50 min 取一次样，测定溶液最大吸收波长处的吸光值 A_{λmax}，计算降解速率常数 k 和半衰期 T_{1/2}。

$$\ln \frac{A_t}{A_0} = -kt \quad (3)$$

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (4)$$

式中：

A_t——t 时刻后溶液中花色苷的 A_{λmax}；

A₀——加热前溶液的 A_{λmax}；

t——加热时间。

1.3.8 可见吸收光谱的测定

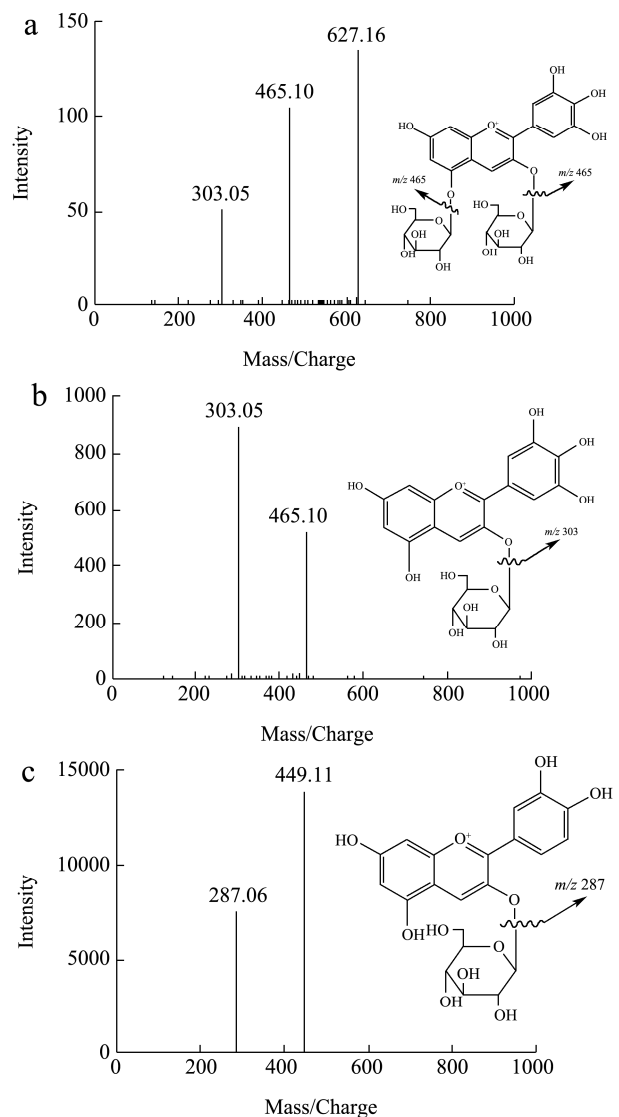
可见吸收光谱采用紫外-可见分光光度计进行测定。取样品 3 mL，在 400~700 nm 范围内扫描，扫描间隔为 1 nm，以蒸馏水调零，比色皿长度为 1 cm。

1.3.9 统计分析

每个样品设置 3 个平行，采用 Excel 和 SPSS 软件进行比较分析。测定结果以平均值±标准差表示。实验数据采用 ANOVA 进行 turkey 差异分析，以 p<0.05 为差异显著。

2 结果与讨论

2.1 桑椹花色苷 UPLC-MS/MS 分析



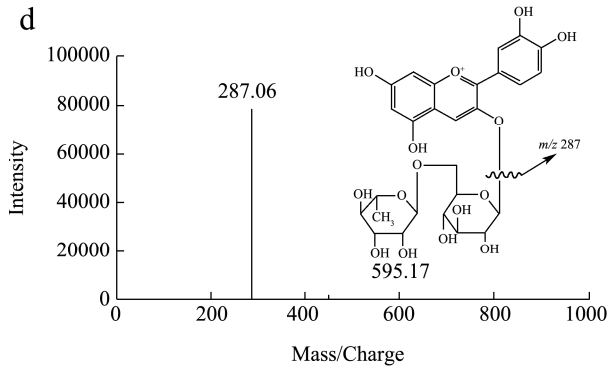


图1 桑椹花色苷单体在正离子模式下的二级质谱图

Fig.1 The MS/MS spectrum of mulberry anthocyanin monomer in positive ion mode

由图1和表1可见,样品中鉴定出4种花色苷单体, a中碎片离子为 m/z 465.10和303.05, 母离子 m/z 627.16 脱去一分子葡萄糖(162)得到碎片离子 m/z 465.10, 脱去第二个葡萄糖分子(162)得到碎片离子 m/z 303.05, 因此推断a为飞燕草素-3,5-葡萄糖苷^[16]; b中碎片离子为 m/z 303.15, 母离子 m/z 465.10 脱去一分子葡萄糖(162)得到碎片离子 m/z 303.15, 因此推断b为飞燕草素-3-葡萄糖苷^[17]; c中碎片离子为 m/z 287.06, 母离子 m/z 449.11 脱去一分子葡萄糖(162)得到碎片离子 m/z 287.06, 因此推断c为矢车菊素-3-葡萄糖苷^[18]; d中碎片离子为 m/z 287.06, 母离子 m/z 595.17 脱去一分子葡萄糖(162)得到碎片离子 m/z 287.06, 因此推断d为矢车菊素-3-芸香糖苷^[19]。

表1 桑椹花色苷的二级质谱结果分析

Table 1 UPLC-MS/MS on mulberry anthocyanins

| TR/min | [M+](m/z) | MS/MS(m/z) | 成分鉴定 | |
|--------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| a | 11.79 | 627.16 | 465.10/303.05 | 飞燕草素-3,5-葡萄糖苷 |
| b | 32.27 | 465.10 | 303.05 | 飞燕草素-3-葡萄糖苷 |
| c | 13.42 | 449.11 | 287.06 | 矢车菊素-3-葡萄糖苷 |
| d | 16.47 | 595.17 | 287.06 | 矢车菊素-3-芸香糖苷 |

2.2 pH值对桑椹花色苷吸收光谱的影响

桑椹花色苷溶液在不同pH值下的颜色变化规律

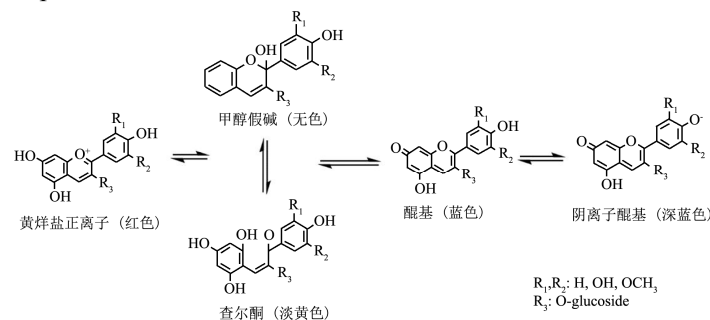


图4 花色苷在不同pH条件下的结构及颜色变化

Fig.4 The structure and color changes of anthocyanins under different pH conditions

见图3。pH=2.28时,花色苷溶液的颜色为亮红色。pH从2.28变化到10.29过程中,溶液颜色由亮红变为粉红,再变为紫红色,最后变为深紫色,原因是溶液pH值的变化引起花色苷分子结构变化从而引发溶液的颜色变化^[20]。不同pH值桑椹花色苷溶液在400~700nm范围内的紫外可见光扫描图见图2。pH=2.28时,溶液在514nm处呈现一个很强的吸收峰,最大吸收波长处吸光值达到1.89,对应图3中亮红色。pH值从2.28变化到3.26时,吸收光谱强度明显下降,最大吸收波长未发生明显偏移。当pH上升到6.28时,最大吸收波长处吸光值下降到0.35,且吸收峰明显变宽,最大吸收波长红移至547nm。当pH=7.25时,溶液最大吸收波长红移至563nm, pH=8.25时,溶液最大吸收波长红移至575nm。当pH从8.25上升到10.29过程中,吸收峰逐渐变窄且吸收强度逐渐增强,最大吸收波长未发生明显偏移。

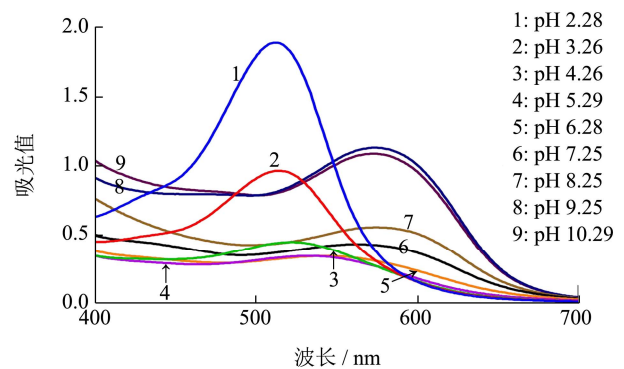


图2 pH值对桑椹花色苷紫外吸收光谱的影响

Fig.2 Effect of pH value on the visible absorption spectra of

mulberry anthocyanins

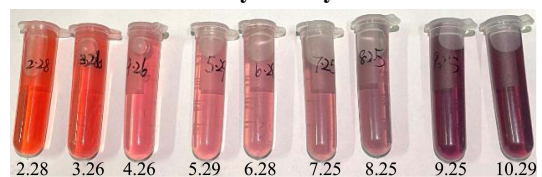


图3 pH值对桑椹花色苷颜色的影响

Fig.3 The effect of pH value on the color of mulberry anthocyanins

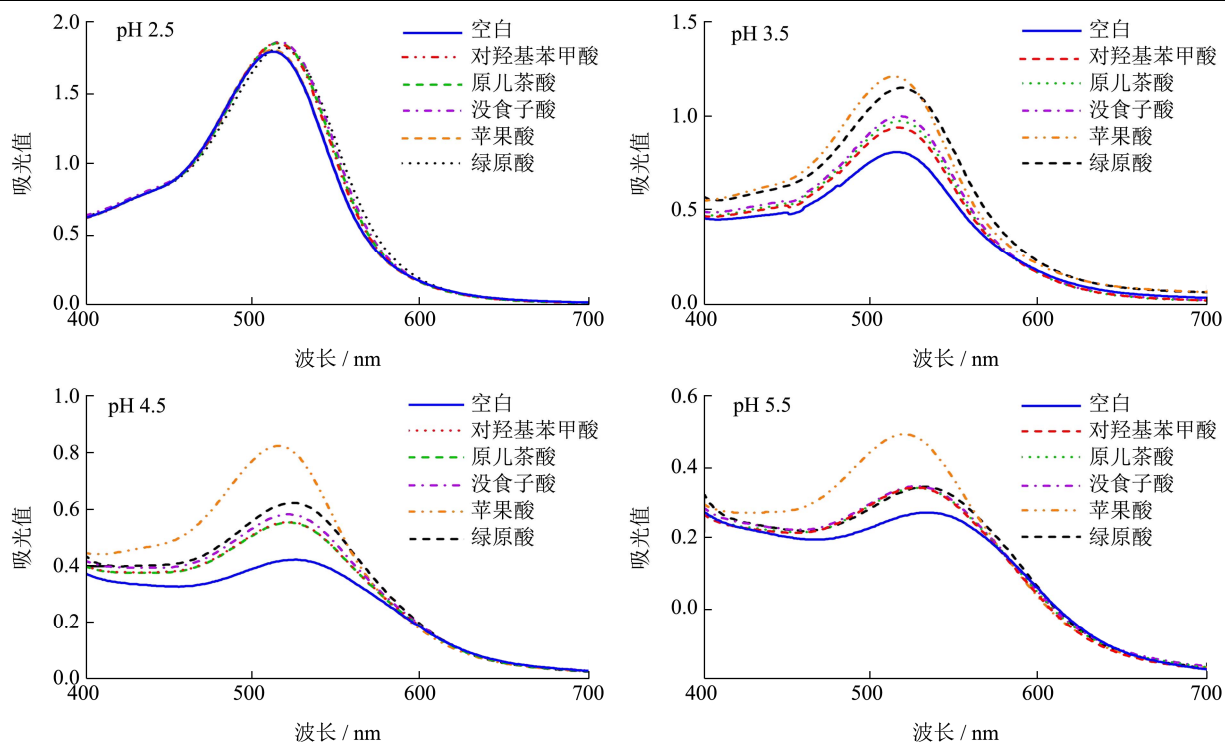


图5 不同 pH 值下辅色剂 (960 mg/L, 20 °C) 与桑椹花色苷辅色后的紫外吸收光谱

Fig.5 Visible absorption spectra of the co-pigmentation of mulberry anthocyanin with co-pigments (960 mg/L, 20 °C) at different pH value

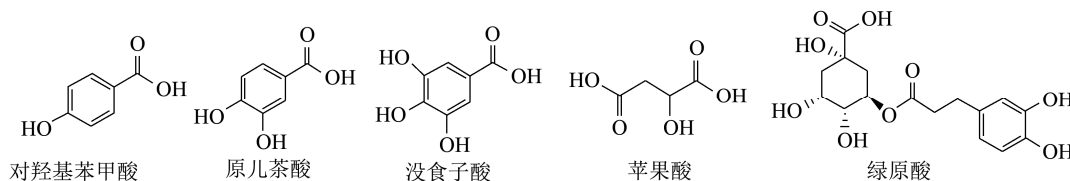


图6 辅色剂 (有机酸) 结构图

Fig.6 Structure diagram of each organic acid

2.3 pH 值对辅色反应的影响

不同 pH 值 (2.5、3.5、4.5、5.5) 下对羟基苯甲酸、原儿茶酸、没食子酸、绿原酸、苹果酸与桑椹花色苷发生辅色反应的紫外可见光吸收谱图见图 5。当 pH=2.5 时, 花色苷主要以黄烺盐阳离子形式存在, 且与空白组相比仅有轻微的增色效应和红移效应。随着 pH 值的升高, 体系最大吸光值都明显下降, 说明 pH 值是影响辅色反应的重要因素。其原因是 pH 值的变化改变了溶液中花色苷的存在形式, 使平衡向形成无色物质移动, 且五种辅色剂的添加减缓了平衡向生成无色物质移动。5 种有机酸均在 pH 值为 3.5~4.5 之间时有较好的辅色效果。当 pH=3.5 时, 对羟基苯甲酸、原儿茶酸、没食子酸、苹果酸、绿原酸 $A_{i,max}$ 分别比空白组高 15.89%、20.07%、23.15%、49.26%、41.50%。前期研究表明, 辅色反应在弱酸条件下, pH 值约为 3.6 时有更好的辅色效果^[21]。在酸性环境下, 溶液平衡向形成

无色物质移动, 而辅色剂的添加使得平衡向生成有色基团转变, 从而阻止了桑椹花色苷的降解^[22]。

在 pH=3.5 时, 其有机酸“护色”效果依次为苹果酸>绿原酸>没食子酸>原儿茶酸>对羟基苯甲酸。有机酸与花色苷辅色反应后生成酰基, 其空间位阻阻碍了消色差假碱基和查尔酮结构的形成^[23], 且不同有机酸参与的辅色反应均有其最适反应 pH, 如绿原酸反应的最佳 pH 范围为 3.2~3.7^[22]。因此最终“护色”效果受到有机酸结构及最适 pH 条件两方面影响。

2.4 温度对辅色反应的影响

在 pH 值为 3.5, 辅色剂质量浓度为 960 mg/L 的条件下, 研究了在 20、30、40、50 °C 下辅色反应。由图 7 可见, 温度对辅色反应有影响。随着温度的升高, 辅色效果逐步下降。如温度从 20 °C 升高到 30 °C, 空白组与对羟基苯甲酸、原儿茶酸、没食子酸、苹果酸、绿原酸组 $A_{i,max}$ 分别下降了 8.80%、9.50%、10.04%、

10.17%、7.79%、9.36%；温度升高至 40 °C，六种体系 $A_{\lambda_{max}}$ 分别下降了 15.30%、16.57%、16.22%、15.73%、10.51%、14.35%；体系温度升高至 50 °C，六种体系 $A_{\lambda_{max}}$ 分别下降了 19.39%、25.32%、24.78%、24.00%、16.00%、17.89%。由以上结果可以推断桑椹花色苷与五种辅色剂的反应属于放热反应，高温会减弱辅色效果。在此研究中，五种辅色剂均在 20 °C 时对桑椹花色苷有较好的辅色效果。

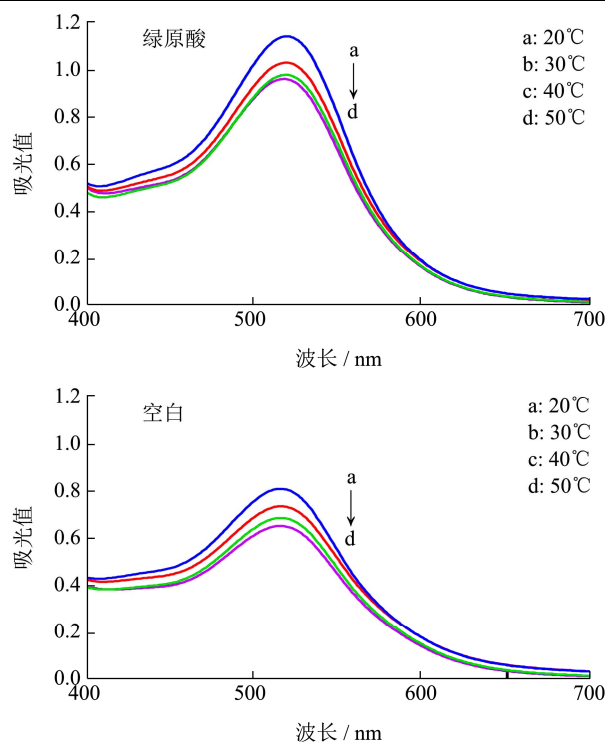
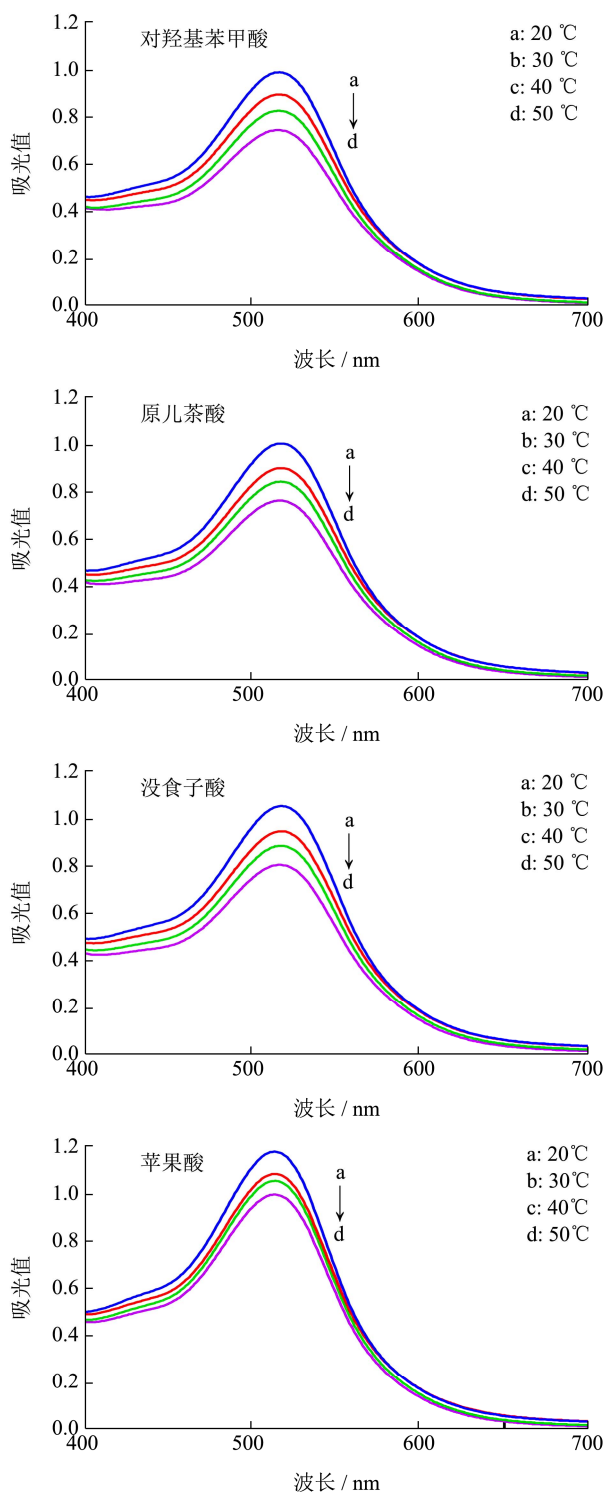
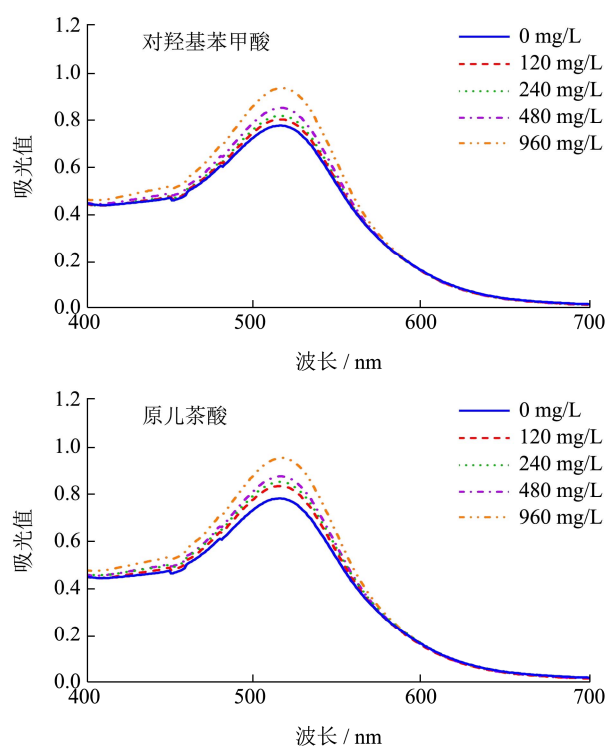


图7 不同温度下辅色剂 (960 mg/L, pH=3.5) 与桑椹花色苷辅色后的紫外吸收光谱

Fig.7 Visible absorption spectra of the co-pigmentation of mulberry anthocyanin with co-pigments (960 mg/L, pH=3.5) at different temperature

2.5 辅色剂质量浓度对辅色反应的影响



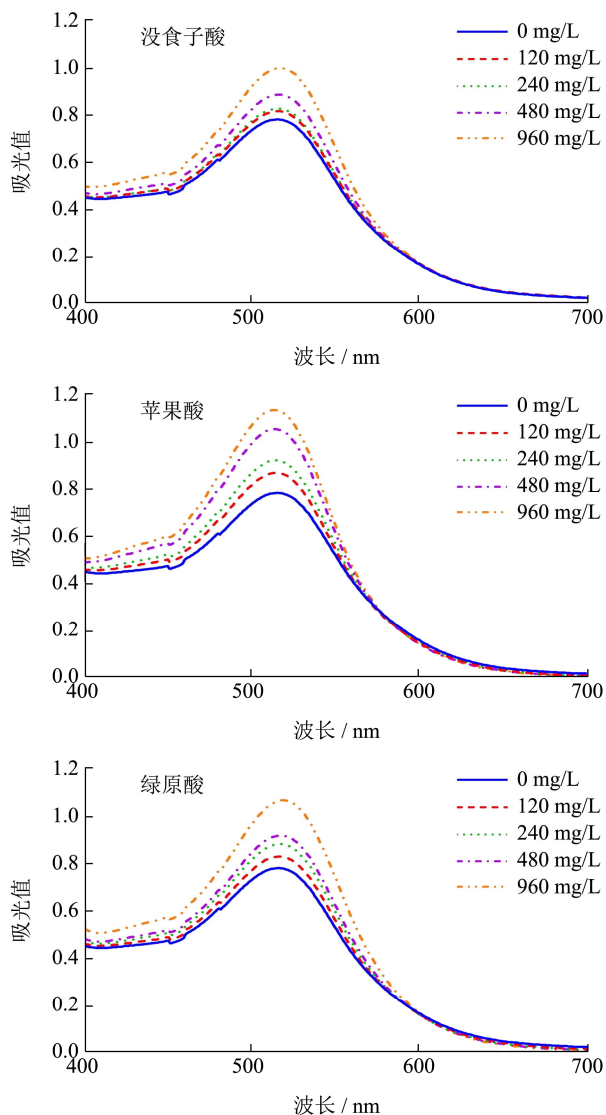
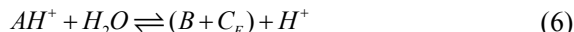
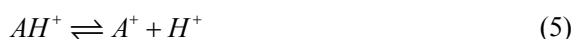


图8 不同质量浓度的辅色剂(20 °C, pH=3.5)与桑椹花色苷辅色后的紫外吸收光谱

Fig.8 Visible absorption spectra of the co-pigmentation of mulberry anthocyanin with different concentration and co-pigments at 20 °C and pH 3.5 in the range of 400~700 nm

辅色剂浓度对辅色效果的影响见图 8, 对羟基苯甲酸、原儿茶酸、没食子酸、绿原酸、苹果酸这 5 种有机酸均对桑椹花色苷有增色作用, 且随着辅色剂质量浓度从 120 mg/L 升高到 960 mg/L, 体系的 $A_{\lambda_{max}}$ 逐渐增大, 辅色作用增强。当辅色剂质量浓度为 120 mg/L 时, 与空白组相比, 添加对羟基苯甲酸、原儿茶酸、没食子酸、绿原酸、苹果酸的体系 $A_{\lambda_{max}}$ 分别增加了 2.17%、2.84%、2.72%、6.61%、8.11%。质量浓度为 960 mg/L 时, 体系 $A_{\lambda_{max}}$ 分别增加了 17.86%、20.79%、24.84%、37.10%、45.04%。增色效应伴随红移效应, 溶液 λ_{max} 发生 1~4 nm 的偏移, 且随着浓度的升高, 偏移越多。这与 Zhu 等^[24]的文章描述一致。



在花色苷混合体系中存在以上三种平衡, 其中 AH^+ 为黄烊盐离子, CP 为辅色剂。无色的辅色剂溶液与花色苷的黄烊盐离子结合导致平衡朝着生成黄烊盐离子方向移动。随着辅色剂浓度升高, 生成的增色复合物越多, 体系的 $A_{\lambda_{max}}$ 越大。因更高浓度的辅色剂中有更多羧基与花色苷母核发生酰化反应, 从而式(7)中平衡朝生成增色复合物的方向移动, 产生增色效应。

由表 2 可见, 当质量浓度为 120 mg/L 时, 对羟基苯甲酸、原儿茶酸、没食子酸组与空白组相比, $A_{\lambda_{max}}$ 没有差异 ($p \geq 0.05$), 绿原酸与苹果酸组与空白组的 $A_{\lambda_{max}}$ 有差异 ($p < 0.05$), 说明绿原酸与苹果酸辅色作用优于三种酚酸。当辅色剂质量浓度为 960 mg/L 时, 5 个辅色组与空白组的 $A_{\lambda_{max}}$ 都有差异 ($p < 0.05$), 说明在此质量浓度下 5 种辅色剂对桑椹花色苷均有辅色效果, 且 5 个辅色组间也有差异 ($p < 0.05$)。辅色剂的化学结构对辅色反应有很大影响^[25], 对于 4 种酚酸, 苯环上的 $\pi-\pi$ 共轭是酚酸与花色苷分子间发生辅色反应的内在驱动力, 此外苯环上的羟基可与花色苷分子相互作用形成氢键或发生电荷转移^[17], 因此羟基最多的绿原酸辅色效果最好, 对羟基苯甲酸辅色效果最弱。苹果酸是短链脂肪酸, 在 5 种酸中辅色效果最佳, 据文献报道^[13]有机酸与花色苷分子形成的结合物由于疏水作用使花色苷母核和酰基平面残基形成了上下垂直的多层重叠结构, 形成类似“三明治”的“夹心”结构, 折叠的酰基紧紧缠绕在 2-苯基苯并吡喃骨架的表面, 通过空间位阻效应保护了夹在两个有机酸分子间的花色苷母核, 而苹果酸较好的辅色效果可能与此结构有关。

2.6 辅色反应的热力学参数

根据方程 (1) (2), 拟合 $\ln[(A-A_0)/A_0]$ 与 $\ln[C_P]_0$ 的方程 ($R^2 > 0.90$), $\ln k$ 为拟合方程的截距。计算得到辅色反应的化学计量比 n 、平衡常数 K 、吉布斯自由能 ΔG° 如表 3 所示。化学计量比 n 代表桑椹花色苷黄烊阳离子连接每个色素的分子数^[26], 平衡常数 K 表示辅色剂与花色苷之间发生辅色反应的强度^[27], ΔG° 表示发生辅色反应所需的能量^[17]。表中所有的 ΔG° 都小于 0, 说明五种辅色剂与花色苷的反应都是自发反应。辅色剂的分子结构和带电性质的不同可能导致反应的平衡常数 K 与 ΔG° 产生差异^[25], 平衡常数 K 值和 ΔG° 与辅色剂辅色效果表现出一致性, 即辅色效果越好的酸其反应平衡常数越大, ΔG° 值越小, 说明其与花色苷反应强度越大, 辅色反应所需的能量越小。反应的 n 值在 0.78~1.06 之间, 与前期研究结果相一致^[21,28]。

表 2 不同质量浓度的辅色剂与桑椹花色苷辅色后的 $A_{\lambda_{max}}$

Table 2 The $A_{\lambda_{max}}$ of the co-pigmentation of mulberry anthocyanin with different concentration and co-pigments at 20 °C and pH 3.5

| 项目 | 辅色剂质量浓度/(mg/L) | 辅色剂种类 | | | | |
|---------------------|----------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | 对羟基苯甲酸 | 原儿茶酸 | 没食子酸 | 苹果酸 | 绿原酸 |
| $A_{\lambda_{max}}$ | 0 | 0.79±0.02 ^a | 0.80±0.02 ^a | 0.80±0.02 ^a | 0.80±0.02 ^a | 0.80±0.02 ^a |
| | 120 | 0.81±0.02 ^a | 0.82±0.01 ^a | 0.82±0.02 ^a | 0.86±0.04 ^b | 0.85±0.01 ^b |
| | 240 | 0.84±0.01 ^a | 0.84±0.11 ^a | 0.85±0.01 ^a | 0.98±0.05 ^c | 0.92±0.05 ^b |
| | 480 | 0.87±0.01 ^a | 0.88±0.01 ^a | 0.90±0.01 ^b | 1.07±0.02 ^c | 0.96±0.02 ^d |
| | 960 | 0.94±0.01 ^b | 0.96±0.01 ^c | 1.00±0.01 ^d | 1.16±0.01 ^e | 1.10±0.01 ^f |

注: 各组不同质量浓度下的数据, 上标字母不同表示差异显著, $p < 0.05$ 。

表 3 各辅色剂参与辅色反应的热力学常数

Table 3 Thermodynamic properties for the co-pigmentation reactions of mulberry anthocyanin with different co-pigments

| 辅色剂 | 方程 | n | K | ΔG° /(kJ/mol) |
|--------|-----------------------|------|-------|----------------------------|
| 对羟基苯甲酸 | $y=1.00x+3.24(0.992)$ | 1.00 | 25.57 | -7.90 |
| 原儿茶酸 | $y=0.95x+3.26(0.998)$ | 0.95 | 25.94 | -7.93 |
| 没食子酸 | $y=1.06x+3.28(0.999)$ | 1.06 | 26.53 | -7.99 |
| 苹果酸 | $y=0.80x+3.29(0.906)$ | 0.80 | 26.85 | -8.02 |
| 绿原酸 | $y=0.78x+3.28(0.959)$ | 0.78 | 26.63 | -8.00 |

表 4 辅色剂 (960 mg/L, 20 °C, pH=3.5) 与桑椹花色苷辅色后在 60、70、80 °C 下的热降解动力学

Table 4 First-order kinetic parameters for thermal degradation of the co-pigmentation reaction of mulberry anthocyanin with different

| co-pigments | | | | |
|-------------|-------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| 辅色剂 | 温度/°C | 方程 | $K \times 10^3 / \text{min}^{-1}$ | $T_{1/2} / \text{h}$ |
| 无 | 60 | $\text{Ln}(A_t/A_0)=-0.66t-0.11$ | 0.66(0.96) | 17.50 |
| | 70 | $\text{Ln}(A_t/A_0)=-1.04t-0.19$ | 1.04(0.87) | 11.07 |
| | 80 | $\text{Ln}(A_t/A_0)=-1.42t-0.16$ | 1.42(0.93) | 8.13 |
| 对羟基苯甲酸 | 60 | $\text{Ln}(A_t/A_0)=-0.55t-0.12$ | 0.55(0.94) | 20.84 |
| | 70 | $\text{Ln}(A_t/A_0)=-0.81t-0.16$ | 0.82(0.82) | 14.18 |
| | 80 | $\text{Ln}(A_t/A_0)=-1.18t-0.12$ | 1.18(0.98) | 9.80 |
| 原儿茶酸 | 60 | $\text{Ln}(A_t/A_0)=-0.60t-0.12$ | 0.60(0.88) | 19.27 |
| | 70 | $\text{Ln}(A_t/A_0)=-0.98t-0.11$ | 0.98(0.99) | 11.84 |
| | 80 | $\text{Ln}(A_t/A_0)=-1.00t-0.18$ | 1.00(0.82) | 11.54 |
| 没食子酸 | 60 | $\text{Ln}(A_t/A_0)=-0.44t-0.13$ | 0.44(0.95) | 26.23 |
| | 70 | $\text{Ln}(A_t/A_0)=-0.81t-0.08$ | 0.81(0.92) | 14.21 |
| | 80 | $\text{Ln}(A_t/A_0)=-1.14t-0.14$ | 1.14(0.98) | 10.11 |
| 苹果酸 | 60 | $\text{Ln}(A_t/A_0)=-0.53t-0.06$ | 0.53(0.83) | 21.93 |
| | 70 | $\text{Ln}(A_t/A_0)=-0.89t-0.12$ | 0.89(0.92) | 13.01 |
| | 80 | $\text{Ln}(A_t/A_0)=-0.97t-0.07$ | 0.97(0.99) | 11.92 |
| 绿原酸 | 60 | $\text{Ln}(A_t/A_0)=-0.50t-0.12$ | 0.50(0.98) | 23.29 |
| | 70 | $\text{Ln}(A_t/A_0)=-0.83t-0.16$ | 0.83(0.86) | 13.84 |
| | 80 | $\text{Ln}(A_t/A_0)=-0.96t-0.11$ | 0.96(0.97) | 12.02 |

2.7 辅色剂对桑椹花色苷热降解过程的影响

分别将空白组与添加辅色剂的样品置于 60、70、80 °C 水浴中加热 250 min, 每隔 50 min 取样, 比较空白组与加入辅色剂组的热降解特性。在加热过程中,

空白组与添加辅色剂组的最大吸收光值随着加热时间增加而降低, 原因是高温易导致花色苷发生降解, 使花色苷含量降低, 这与前面 2.3 中结果一致。其热降解动力学参数符合一级动力学方程。

根据式 (3) (4) 可以计算得出表 4 数据, 分析可

知,温度对花色苷的降解有重要影响,随着温度升高,对照组与实验组的降解常数(k)值都升高,而半衰期($T_{1/2}$)都随之降低。这表明温度升高,热降解速率增加,最终导致花色苷的半衰期减小。这一结果得到Qian等^[29]的研究验证。除此之外,实验组的降解速率都小于对照组,半衰期都大于对照组。由此可以推断以有机酸作为辅色剂,可以一定程度上改善花色苷的热稳定性。Kanha等^[26]选用阿魏酸、多巴胺、儿茶素作为辅色剂,研究了其对C-3-g热稳定性的影响,发现辅色剂可以明显改善C-3-g的热稳定性。

3 结论

桑椹花色苷中主要含有四种花色苷单体,分别是飞燕草素-3,5-葡萄糖苷、飞燕草素-3-葡萄糖苷、矢车菊素-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3-芸香糖苷。五种有机酸均可以通过辅色作用提高桑椹花色苷溶液的颜色强度,溶液pH、温度、辅色剂浓度及其结构均是辅色反应的重要影响因素。其中苹果酸在pH=3.5、20℃、960 mg/L浓度下增色效果最佳,比空白组 $A_{\lambda_{max}}$ 增加45.04%,且有机酸苯环结构上所连羟基越多辅色效果越强。此外,有机酸可以降低花色苷溶液降解常数(k),延长半衰期($T_{1/2}$),从而提高桑椹花色苷的热稳定性。因此在桑椹花色苷溶液中添加适量有机酸是缓解花色苷因pH值、高温等外界因素发生降解的有效方法,是一种安全有效的改善桑椹饮品颜色品质的方法,对改善果酒及果汁饮品生产厂家利用天然色素调节产品色泽具有重要的理论和实际意义。

参考文献

- [1] 张荷兰,陆鸿奎,郭晓敏,等.桑葚保健食品的研究与分析[J].食品与发酵科技,2018,54(5):125-128
ZHANG Helan, LU Hongkui, GUO Xiaomin, et al. Study and analysis of mulberry health food [J]. Food and Fermentation Technology, 2018, 54(5): 125-128
- [2] 栾琳琳.桑葚果渣花青素的提取及稳定性研究[D].贵州:贵州大学,2020
LUAN Linlin. Study on the extraction and stability of anthocyanins from mulberry pomace [D]. Guizhou: Guizhou University, 2020
- [3] 龚辉.超声处理对蓝莓花色苷稳定性的影响[D].杭州:浙江大学,2018
GONG Hui. Effect of ultrasonic treatment on the stability of blueberry anthocyanins [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018
- [4] Zafra S, Yasmin T, Bagchi M, et al. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention [J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2007, 51(6): 675-683
- [5] Zhu Y, Ling W, Guo H, et al. Anti-inflammatory effect of purified dietary anthocyanin in adults with hypercholesterolemia: a randomized controlled trial [J]. Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2013, 23(9): 843-849
- [6] Zhou S H, Fang Z X, Lue Y, et al. Phenolics and antioxidant properties of bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) pomace [J]. Food Chemistry, 2009, 112(2): 394-399
- [7] Mok J W, Chang D J, Joo C K. Antiapoptotic effects of anthocyanin from the seed coat of black soybean against oxidative damage of human lens epithelial cell induced by H_2O_2 [J]. Current Eye Research, 2014, 39(11): 1090-1098
- [8] Matsukawa T, Inaguma T, Han J, et al. Cyanidin-3-glucoside derived from black soybeans ameliorate type 2 diabetes through the induction of differentiation of preadipocytes into smaller and insulin-sensitive adipocytes [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2015, 26(8): 860-867
- [9] 张朝红,柏广玲,李巨秀,等.桑椹花色苷对晚期糖基化末端产物抑制作用及其机制分析[J].现代食品科技,2014,30(5): 38-43
ZHANG Chaohong, BO Guangling, LI Juxiu, et al. Inhibitory effect of mulberry anthocyanins on terminal products of advanced glycosylation and its mechanism analysis [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(5): 38-43
- [10] Zhang P W, Chen F X, Li D, et al. A Consort-compliant, randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial of purified anthocyanin in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Medicine, 2015, 94(20): 8-19
- [11] Aboonabi A, Singh I. Chemopreventive role of anthocyanins in atherosclerosis via activation of Nrf2-ARE as an indicator and modulator of redox [J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2015, 72(30): 6-18
- [12] Faria A, Fernandes I, Norberto S, et al. Interplay between anthocyanins and gut microbiota [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(29): 6898-6902
- [13] 邹宇晓,王思远,刘凡,等.花色苷基于分子辅色机制的稳态化制备与应用技术研究进展[J].现代食品科技,2016,32(6): 328-339
ZOU Yuxiao, WANG Siyuan, LIU Fan, et al. Research progress of steady-state preparation and application technology of anthocyanins based on molecular co-color

- mechanism [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(6): 328-339
- [14] 张波,祝霞,盛文军,等.红葡萄酒中花色苷辅色化反应研究进展[J].*中国农业科技导报*,2017,19(8):92-104
ZHANG Bo, ZHU Xia, SHENG Wenjun, et al. Research progress on co-colorization of anthocyanins in red wine [J]. *China Agricultural Science and Technology Review*, 2017, 19(8): 92-104
- [15] 王鹏,郭丽,刘爽,等.绿原酸提取物的抗氧化活性协同增效作用[J].*北方园艺*,2021,15:106-111
WANG Peng, GUO Li, LIU Shuang, et al. Synergistic effect of chlorogenic acid extract on antioxidant activity [J]. *Northern Horticulture*, 2021, 15: 106-111
- [16] Khalifa I, Xia D, Dutta K, et al. Mulberry anthocyanins exert anti-AGEs effects by selectively trapping glyoxal and structural-dependently blocking the lysyl residues of beta-lactoglobulins [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 96(11): 62-66
- [17] Molaeafard S, Jamei R, Poursattar Marjani A. Co-pigmentation of anthocyanins extracted from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) with some organic acids: Color intensity, thermal stability, and thermodynamic parameters [J]. *Food Chemistry*, 2020, 12(8): 270-277
- [18] Ha T J, Park J E, Lee K S, et al. Identification of anthocyanin compositions in black seed coated Korean adzuki bean (*Vigna angularis*) by NMR and UPLC-Q-Orbitrap-MS/MS and screening for their antioxidant properties using different solvent systems [J]. *Food Chemistry*, 2021, 346(128882): 708-715
- [19] Fischer U A, Carle R, Kammerer D R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(2): 807-821
- [20] Tang B, He Y, Liu J, et al. Kinetic investigation into pH-dependent color of anthocyanin and its sensing performance [J]. *Dyes and Pigments*, 2019, 170(107643): 2370-2376
- [21] Malaj N, De Simone B C, Quartarolo A D, et al. Spectrophotometric study of the copigmentation of malvidin 3-O-glucoside with p-coumaric, vanillic and syringic acids [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(4): 3614-3620
- [22] Zhang B, He F, Zhou P P, et al. The color expression of copigmentation between malvidin-3-O-glucoside and three phenolic aldehydes in model solutions: the effects of pH and molar ratio [J]. *Food Chemistry*, 2016, 199(1): 220-228
- [23] Liu J, Zhuang Y, Hu Y, et al. Improving the color stability and antioxidation activity of blueberry anthocyanins by enzymatic acylation with p-coumaric acid and caffeic acid [J]. *Food Science and Technology*, 2020, 130(109673): 1164-1170
- [24] Zhu Y, Chen H, Lou L, et al. Copigmentation effect of three phenolic acids on color and thermal stability of Chinese bayberry anthocyanins [J]. *Food Science and Nutrition*, 2020, 8(7): 3234-3242
- [25] 闫怀峰.有机酸、酚醛对甘蔗花色苷辅色作用的研究[D].广州:华南理工大学,2017
YAN Huaifeng. Study on the co-color effect of organic acids and phenolics on sugarcane anthocyanins [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017
- [26] Kanha N, Surawang S, Pitchakarn P, et al. Copigmentation of cyanidin 3-O-glucoside with phenolics: thermodynamic data and thermal stability [J]. *Food Bioscience*, 2019, 30(100419): 2212-2219
- [27] Klisurova D, Petrova I, Ognyanov M, et al. Co-pigmentation of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) anthocyanins with phenolic co-pigments and herbal extracts [J]. *Food Chemistry*, 2019, 279(2): 162-170
- [28] Sun J, Cao X, Bai W, et al. Comparative analyses of copigmentation of cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-sophoroside from red raspberry fruits [J]. *Food Chemistry*, 2010, 120(4): 1131-1137
- [29] Qian B J, Liu J H, Zhao S J, et al. The effects of gallic/ferulic/caffeic acids on colour intensification and anthocyanin stability [J]. *Food Chemistry*, 2017, 228(8): 526-532