牡丹花色苷的热稳定性和降解动力学

樊金玲[a*]　朱文学[a]　巩卫东[b]　沈军卫[a]　马海乐[a]
([a] 河南科技大学食品与生物工程学院　洛阳 471003;[b] 河南省出入境检验检疫局检验检疫技术中心洛阳分中心　洛阳)

摘　要　研究了 pH 值和温度对牡丹花色苷热稳定性的影响。动力学数据分析表明,牡丹花色苷的热降解符合一级反应动力学模型。在 70 ~ 90 ℃条件下,当 pH 值为 2.6、3.0、3.6、4.0 和 4.6 时,牡丹花色苷的半衰期分别为 27.0 ~ 7.9、32.1 ~ 8.5、27.9 ~ 8.9、35.9 ~ 9.4 和 27.3 ~ 10.7 h。提高温度,花色苷降解反应速率增大;降解反应速率常数与温度的关系附合 Arrhenius 公式,反应活化能为 48.4 ~ 69.4 kJ/mol。牡丹花色苷单体的降解速率依次为矢车菊-3-*O*-二葡萄糖苷 > 芍药-3-*O*-葡萄糖苷 > 矢车菊-3,5-*O*-二葡萄糖苷 > 芍药-3,5-*O*-二葡萄糖苷。牡丹花色苷降解生成褐色物质,褐变指数随加热时间的延长、加热温度的升高、pH 值的增大而增大。

关键词　牡丹,花色苷,热稳定性,褐变,降解动力学
中图分类号:O643.1　　文献标识码:A　　文章编号:1000-0518(2010)02-0231-06
DOI:10.3724/SP.J.1095.2010.90159

花色苷是花青素与糖以糖苷键结合而成的一类化合物,广泛存在于植物的花和果实中,是替代合成食用红色素最理想的天然色素[1]。同时,由于花色苷具有提高视觉灵敏性、抑制脂质过氧化、防止血小板聚集等多种生理功能[2],因此在药品及化妆品等领域的应用前景广阔。但是,花色苷的稳定性较差,易受 pH 值、温度、有机酸、光照、氧等的影响而发生变化[3~5],一定程度上限制了它的开发利用。牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)为芍药科、芍药属牡丹组,牡丹花中富含花色苷类化合物。Wang 等[6]从不同品种群的牡丹花中鉴定了 6 种花色苷,分别为矢车菊-3,5-*O*-二葡萄糖苷、芍药-3,5-*O*-二葡萄糖苷、天竺葵素-3,5-*O*-二葡萄糖苷、矢车菊-3-*O*-葡萄糖苷、芍药-3-*O*-葡萄糖苷和天竺葵素-3-*O*-葡萄糖苷。作者[7]曾采用高效液相色谱与质谱联用技术研究了中原牡丹花中的花色苷,结果表明,中原牡丹不含天竺葵素-3-*O*-葡萄糖苷。朱文学等[8]对牡丹花色苷的提取工艺和理化性质进行了研究,发现牡丹花色苷在酸性条件下对光、热有很好的稳定性。本文在已有研究的基础上,进一步探讨了温度和 pH 值对牡丹花色苷的热降解动力学和褐变的影响,建立了牡丹花色苷热降解动力学模型,为牡丹花色苷的深加工利用及其相关产品的开发提供了理论依据。

1　实验部分

1.1　材料、试剂和仪器

牡丹花(洛阳市土桥花木种苗有限公司),品种为洛阳红。柠檬酸、磷酸氢二钠、柠檬酸三钠、浓盐酸等均为分析纯试剂,色谱分析用试剂为色谱纯。pHS-3C 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司);722s 型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);UV-2800 型扫描型紫外/可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司);Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

1.2　实验方法

1.2.1　*牡丹花色苷的提取与纯化*　取 1 kg 牡丹花瓣,用 10 L *V*(盐酸):*V*(甲醇) = 0.1:99.9 混合液 4 ℃提取,重复提取 2 次。合并提取液,减压浓缩至 1 000 mL。浓缩液用相同体积的石油醚萃取,除去脂溶性杂质。水相用 1 000 mL 乙酸乙酯萃取,萃取后的水相经 Amberlite XAD-7 柱色谱纯化,用水洗脱除糖、蛋白质、有机酸等杂质,盐酸-甲醇混合液洗脱花色苷。收集花色苷洗脱液,真空浓缩至 700 mL,得花色苷浓缩液。

2009-03-04 收稿,2009-05-14 修回
河南省教育厅自然科学研究计划项目(2009B180005),洛阳市科技攻关计划资助项目(983023)
通讯联系人:樊金玲,女,博士,副教授; E-mail:fan20032006@yahoo.com.cn; 研究方向:天然产物开发利用

1.2.2 牡丹花色苷样品液配制 配制 pH 值分别为 2.6、3.0、3.6、4.0、4.6 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液，用上述缓冲液与花色苷浓缩液按体积比 6∶1 混溶得到不同 pH 值的花色苷样品液。精确测定 pH 值，并校正后备用。

1.2.3 牡丹花色苷可见光吸收光谱扫描分析 将不同 pH 值的花色苷样品液在 400～700 nm 范围内进行全波长扫描，记录扫描曲线，确定最大吸收波长。

1.2.4 牡丹花色苷热稳定性实验 取不同 pH 值的花色苷样品液 7.5 mL 于具塞试管中，分别放入 70、80 和 90 ℃恒温水浴锅中。每隔 1 h 取出，迅速冷却后测定样品液在最大吸收波长 420 和 700 nm 处的吸光度值；平行测定 3 次。

1.2.5 牡丹花色苷单体热稳定性实验 取 pH = 4.0 花色苷样品液，90 ℃恒温水浴加热，间隔 1 h 取出，迅速冷却后进行高效液相色谱分析[7]。

2 结果与讨论

2.1 牡丹花色苷的最大吸收波长扫描

在可见光区 400～700 nm 范围内对牡丹花色苷样品液的吸收波长进行扫描分析，结果见图 1。从图 1可看出，样品液具有典型的花色苷的特征吸收峰，并随着 pH 值增大，最大吸收波长出现红移现象。因此，牡丹花色苷热降解动力学实验采用相应条件最大吸收波长下的吸光度值进行测定。

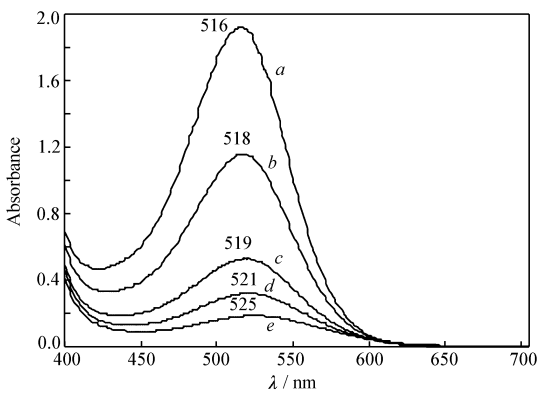


图 1 牡丹花色苷吸收波长扫描曲线

Fig. 1 Visible spectra of anthocyanin in tree peony flower at different pH values

pH: *a*. 2.6; *b*. 3.0; *c*. 3.6; *d*. 4.0; *e*. 4.6

2.2 牡丹花色苷的热稳定性

2.2.1 pH 值和温度对牡丹花色苷降解动力学的影响 研究了 pH 值为 2.6～4.6 和 70～90 ℃条件下牡丹花色苷降解的动力学过程。结果表明，牡丹花色苷样品液的吸光度 A 随加热时间的延长不断减小。将样品液初始时刻的吸光度 A_0 和加热 t 分钟后的吸光度 A_t 的比值取对数后与时间作图，结果见图 2。从图 2 可看出，不同 pH 值、不同加热温度条件下，$-\ln(A_t/A_0)$ 与时间呈良好的线性关系，相关系数均 >0.97(表 1)；由于 $-\ln(A_t/A_0) = -\ln(c_t/c_0)$(式中，$c_0$ 和 c_t 分别为初始时刻和加热 t min 后被测样品液中花色苷浓度)，因此，图 2 结果表明，牡丹花色苷热降解符合一级反应动力学规律。这与文献[9～11]报道的不同来源花色苷热降解动力学过程的研究结果相吻合。

按式(1)～式(3)计算动力学参数 k、$t_{1/2}$ 和 D 值，计算结果见表 1。

$$\ln(c_t/c_0) = \ln(A_t/A_0) = -kt \quad (1)$$

$$t_{1/2} = -\ln 0.5k^{-1} \quad (2)$$

$$D = \ln(10) \times k^{-1} \quad (3)$$

式中，c_0 为初始时刻被测样品液中花色苷浓度(mol/L)；c_t 为一定温度下加热 t min 后样品液中花色苷浓度(mol/L)；A_0 为初始时刻花色苷样品液在最大吸收波长处的吸光度；A_t 为一定温度下加热 t min 后花色苷样品液在最大吸收波长处的吸光度；k 为一级反应速率常数(h^{-1})；$t_{1/2}$ 为半衰期，即花色苷降解 50% 所需时间(h)；D 为花色苷降解 90% 所需时间(h)。

从表 1 可看出，在不同 pH 值条件下，花色苷热降解均随温度的升高而加快，表现为降解速率常数 k 增大，半衰期 $t_{1/2}$ 和 D 值相应减小。热处理温度不同，pH 值对牡丹花色苷热降解的影响不尽相同。70 和 80 ℃条件下的热降解速率常数随 pH 值变化在相对小的范围内波动。结果表明，该条件下 pH 值对牡丹花色苷的影响较弱。90 ℃处理时，随 pH 值增大，牡丹花色苷降解速率不断减小，降解速率常数呈线性下降趋势，半衰期由 7.9 h 逐渐增至 10.7 h，增幅为 35.4%，说明 pH 值增大，牡丹花色苷的稳定性增强。

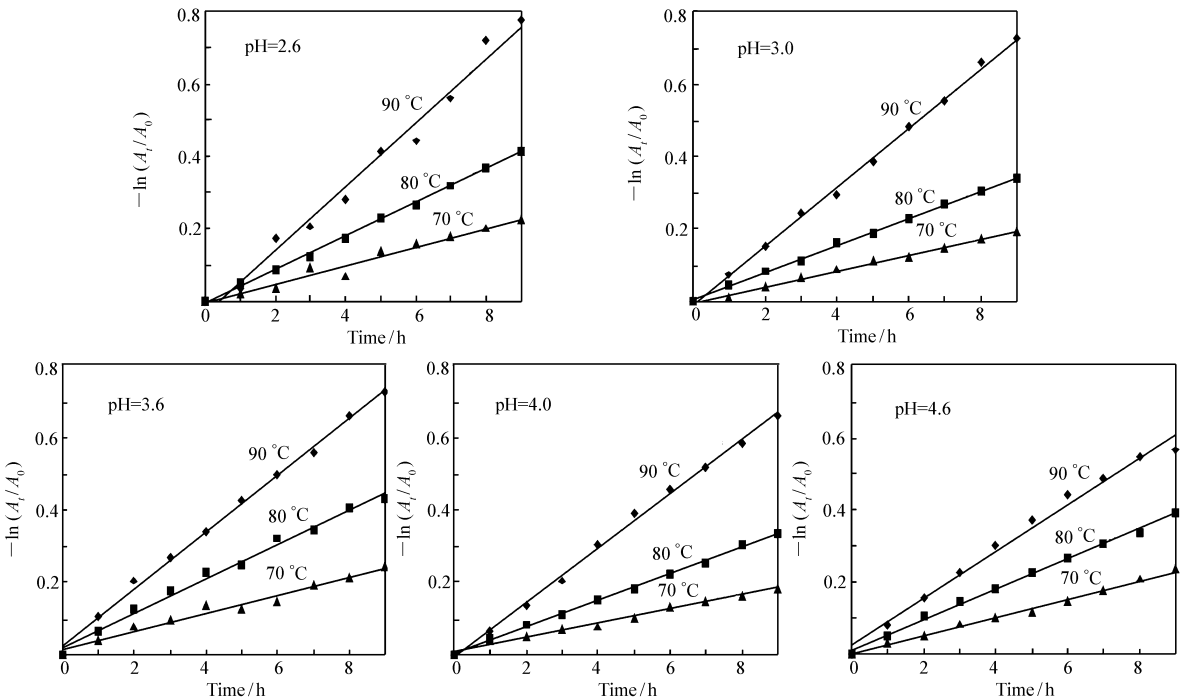


图 2　牡丹花色苷的热降解

Fig. 2　Degradation of individual anthocyanins in tree peony flower extract at different pH values during heating

这一结果可以用 pH 值影响花色苷分子在溶液中的存在形式来解释。较低 pH 值时,花色苷主要以红色的 2-苯基苯并吡喃阳离子形式存在,pH 值增大时,2-苯基苯并吡喃阳离子向蓝色的醌型碱(酸式平衡)和无色的醇型假碱(水化平衡)转化,而红色的 2-苯基苯并吡喃阳离子比无色的醇型假碱和蓝色的醌型碱更容易降解[3]。

表 1　不同 pH 值条件下牡丹花色苷热降解参数

Table 1　Thermal degradation parameters for tree peony anthocyanin extracts at different pH values

pH	t/℃	k/h^{-1}	$t_{1/2}$/ h	D/h	Z/℃	Q_{10} 70 ~ 80 ℃	Q_{10} 80 ~ 90 ℃	E_a/(kJ · mol^{-1})
2.6	70	0.025 7(0.972 5)	27.0	89.6	37.3	1.80	1.91	63.7(0.998 1)
	80	0.046 2(0.998 3)	15.0	49.8				
	90	0.088 1(0.983 7)	7.9	26.1				
3.0	70	0.021 6(0.994 8)	32.1	106.6	34.4	1.74	2.17	68.6(0.987 1)
	80	0.037 5(0.998 6)	18.5	61.4				
	90	0.081 5(0.997 6)	8.5	28.3				
3.6	70	0.024 8(0.971 4)	27.9	92.8	39.8	1.92	1.64	59.6(0.996 0)
	80	0.047 7(0.990 5)	14.5	48.3				
	90	0.078 3(0.996 5)	8.9	29.4				
4.0	70	0.019 3(0.993 6)	35.9	119.3	34.3	1.94	1.97	69.4(0.999 5)
	80	0.037 5(0.997 4)	18.5	61.4				
	90	0.073 8(0.997 5)	9.4	31.2				
4.6	70	0.025 4(0.993 1)	27.3	90.7	49.2	1.65	1.54	48.4(0.999 7)
	80	0.042(0.996 8)	16.5	54.8				
	90	0.064 7(0.987 9)	10.7	35.6				

k: the first order kinetic constant, coefficient of determination(R^2) shown in parenthesis; $t_{1/2}$: half-life, which is the amount of time required for half of the anthocyanins to degrade; D: the amount of time required for ninety percent of the anthocyanins to degrade; Z: the number of degree centigrade requied for half-life value to change 10 times; Q_{10}: temperature quotient; E_a: the activation energy.

将牡丹花色苷的热降解动力学参数与其它来源花色苷的降解动力学参数(见表 2)相比较可知,牡丹花色苷的稳定性强于黑色胡萝卜、紫肉马铃薯、葡萄、接骨木、黑醋栗花色苷,但比红肉马铃薯和紫色

胡萝卜弱。

表 2 不同来源花色苷热降解的动力学参数(pH = 3.0)

Table 2 Thermal degradation parameters of aqueous anthocyanin extracts at pH = 3.0

Extracts	80 ℃		E_a/(kJ · mol^{-1})	References
	k/h^{-1}	$t_{1/2}$/h		
Purple-flesh potato	0.046 3	15	72.5	[10]
Red-flesh potato	0.020 6	34	66.7	[10]
Grape	0.045 3	15	75.0	[10]
Purple carrot	0.021 2	33	81.3	[10]
Black carrot	0.069 3	10	72.4	[5]
Blackcurrant	0.043 0	16	69.0	[12]
Elderberry	0.090 0	7	89.0	[12]

牡丹花色苷的降解对温度的依赖性由反应活化能(E_a)、温度系数(Q_{10})以及 Z 值来确定。可分别按式(4)~式(6)计算,计算结果见表 1。

$$k = k_0 e^{-E_a/RT} \tag{4}$$

式中,k 为一级反应速率常数(h^{-1});k_0为频率常数;E_a 为反应活化能(kJ/mol);T 为温度(K);R 为气体常数(J/(mol · K))。式(4)(Arrhenius 方程)两边同时取对数,由式(1)可得不同温度 T 下的热降解反应常数 k,以 ln k 对 $1/T$ 作线性回归,直线斜率为 $-E_a/R$,截距为 ln k_0,由直线的斜率即可求出反应活化能 E_a。

$$Q_{10} = (k_1/k_2)^{10/(T_1-T_2)} \tag{5}$$

式中,Q_{10}为温度系数,表示温度每升高 10 ℃,反应速率增大的比例数。k_1和 k_2分别为温度 T_1和 T_2时的一级反应速率常数。

$$T = -Z\lg t_{1/2} + b \tag{6}$$

式中,Z 为半衰期($t_{1/2}$)变化 10 倍所需的温度变化(℃)。以 T 对 lg ($t_{1/2}$)作线性回归,由直线的斜率可得到 Z 值。

从表 1 可看出,牡丹花色苷热降解的反应速率常数 k 与温度 T 的关系符合 Arrhenius 方程($R^2 > 0.987\ 1$)。pH 值为 2.6~4.6 时,反应活化能 E_a 为 69.4~48.4 kJ/mol。在 pH = 4.6 时的 E_a 显著低于其它 pH 值时的 E_a,且 Z 值较高,Q_{10}值较小,表明在 pH = 4.6 时牡丹花色苷降解反应对温度变化的敏感性较弱。

2.2.2 *牡丹花色苷单体化合物的热降解动力学*

已利用高效液相色谱与质谱联用技术研究了牡丹花(洛阳红)中的花色苷类化合物,分离鉴定了 4 种花色苷,分别为矢车菊-3,5-*O*-二葡萄糖苷,芍药-3,5-*O*-二葡萄糖苷、矢车菊-3-*O*-葡萄糖苷、芍药-3-*O*-葡萄糖苷[7]。在此基础上,本文采用高效液相色谱法研究了 pH = 4.0、90 ℃时牡丹花色苷样品液中 4 种花色苷降解的动力学过程。将各种花色苷在初始时刻的色谱峰面积 S_0和加热 t min 后的色谱峰面积 S_t 的比值取对数后与时间作图,结果见图 3。从图中可看出,不同花色苷 $-\ln(S_t/S_0)$与时间呈良好的线性关系,相关系数均大于 0.99(表 3);由于色谱峰面积 S 与花色苷浓度 c 成正比,则有 $-\ln(S_t/S_0) = -\ln(c_t/c_0)$,因此,图 3 表明,牡丹花中的 4 种花色苷的降解符合一级反应动力学模型,动力学降解参数见表 3。表 3 表明,矢车菊-3,5-*O*-二葡萄糖苷和

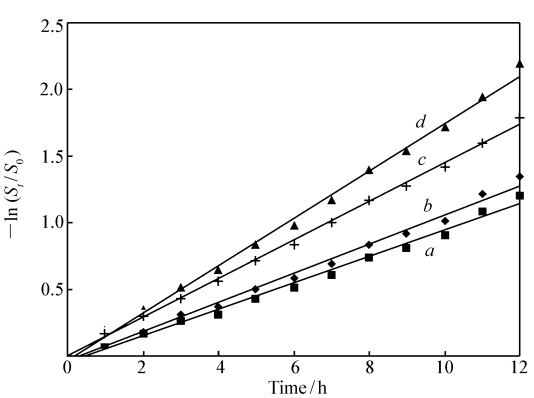


图 3 90 ℃条件下牡丹花色苷单体的热降解

Fig. 3 Thermal degradation of individual anthocyanins in tree peony flower extract at 90 ℃

a. Peonidin 3,5-di-*O*-glucoside; *b*. Cyanidin 3,5-di-*O*-glucoside; *c*. Peonidin 3-*O*-glucoside; *d*. Cyanindin 3-*O*-glucoside

芍药-3,5-*O*-二葡萄糖苷的热稳定性强于相应的单葡萄糖苷,而芍药-3,5-*O*-二葡萄糖苷和芍药-3-*O*-葡萄糖苷的热稳定性分别强于相应的矢车菊色素。

表 3　花色苷单体热降解动力学参数

Table 3　Thermal degradation parameters for individual anthocyanins in tree peony extract

Anthocyanin	k/h^{-1}	$t_{1/2}$/h	D/h
Cyanidin 3,5-di-*O*-glucoside	0.109 6(0.996 2)	21.01	6.324
Peonidin 3,5-di-*O*-glucoside	0.098 4(0.995 3)	23.40	7.044
Cyanidin 3-*O*-glucoside	0.177 5(0.998 2)	12.97	3.905
Peonidin 3-*O*-glucoside	0.144 9(0.999 2)	15.89	4.784

2.2.3　*牡丹花色苷加热过程中褐变指数的变化*　花色苷热降解可生成褐色化合物,可能的机制包括最初形成查耳酮,之后损失糖基部分和形成 α-二元酮等,末端产物有香豆苷衍生物、安息香酸衍生物和三羟基苯甲醛等[13]。褐变指数是评价花色苷降解的又一有效量度,其值不仅反映了花色苷在降解过程中因形成无色醇型假碱而引起的在 520 nm 处吸光度的减小,也反映出由于生成褐色物质引起 420 nm 处吸光度的增加。可按下式计算:

$$\text{褐变指数} = (A_{420} - A_{700})/(A_{\max} - A_{700}) \quad (7)$$

本文测定了不同条件下牡丹花色苷样品液褐变指数的变化,如图 4、图 5 所示。从图中可看出,牡丹花色苷提取液的褐变指数随加热时间的延长、pH 值的增大、加热温度的升高而增大。如加热 9 h、pH = 2.6 时,90、80 和 70 ℃的褐变指数分别为 0.45、0.34 和 0.30;pH = 4.6 时,褐变指数分别为 2.10、1.44 和 1.13。

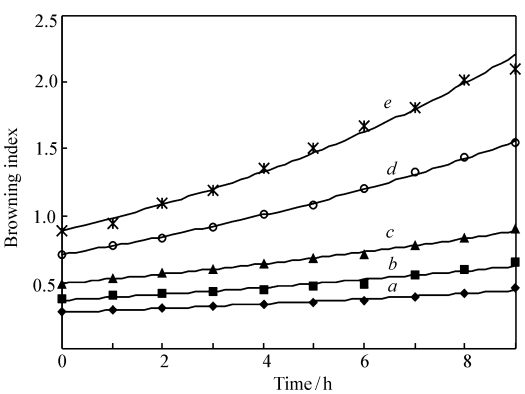


图 4　牡丹花色苷在 90 ℃加热过程中褐变指数的变化

Fig. 4　Change of browning index for anthocyanin of tree penoy during heating at 90 ℃ and different pH values

pH: *a*. 2.6; *b*. 3.0; *c*. 3.6; *d*. 4.0; *e*. 4.6

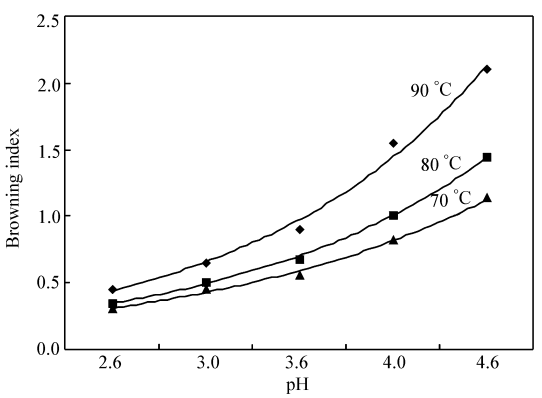


图 5　pH 值和温度对牡丹花色苷褐变指数的影响(9 h)

Fig. 5　Effects of pH and temperature on the browning index of tree peony anthocyanin during heating(9 h)

研究结果表明,牡丹花色苷的热降解符合一级反应动力学模型。70 ~ 90 ℃条件下,当 pH 值为 2.6、3.0、3.6、4.0 和 4.6 时,牡丹花色苷的半衰期分别为 27.0 ~ 7.9、32.1 ~ 8.5、27.9 ~ 8.9、35.9 ~ 9.4 和 27.3 ~ 10.7 h。提高温度,花色苷降解反应速率增大;降解反应速率常数与温度的关系附合 Arrhenius 公式,反应活化能为 48.4 ~ 69.4 kJ/mol。牡丹花色苷单体的降解速率依次为矢车菊-3-*O*-二葡萄糖 > 芍药-3-*O*-葡萄糖苷 > 矢车菊-3,5-*O*-二葡萄糖苷 > 芍药-3,5-*O*-二葡萄糖苷。牡丹花色苷降解生成褐色物质,褐变指数随加热时间的延长、加热温度的升高、pH 值的增大而增大。

参　考　文　献

1　Francis F J. *Crit Rev Food Sci Nutr*[J],1989,**28**(4):273

2　Wrolstad R E. *J Food Sci*[J],2004,**69**(5):419

3　Cevallos-casals B A,Cisneros-zevallos L. *Food Chem*[J],2004,**86**(1):69

4 Fossen T, Cabrita L, Andersen O M. *Food Chem*[J], 1998, **63**: 435
5 Kırca A, Özkan M, Cemeroğlu B. *Food Chem*[J], 2007, (101): 212
6 Wang L S, Hashimoto F, Shiraishi A, Aoki N, Li J J, Shimizu K, Sakata Y. *J Plant Res*[J], 2001, (114): 213
7 FAN Jin-Ling(樊金玲), ZHU Wen-Xue(朱文学), SHEN Jun-Wei(沈军卫). *Chinese Food Sci*(食品科学)[J], 2007, **28**(8): 367
8 ZHU Wen-Xue(朱文学), WU Long-Qi(吴龙奇), YI Jun-Peng(易军鹏), BAI Xi-Ting(白喜婷), XIAO Hai-Fang(肖海芳). *Trans CSAE*(农业工程学报)[J], 2006, **22**(6): 224
9 LI Jian-Rong(励建荣), CEN Pei-Lin(岑沛霖), Joyce D C. *Bull Sci Technol*(科技通报)[J], 2002, **18**(1): 1
10 Fernando Reyes L, Cisneros-zevallos L. *Food Chem*[J], 2007, **100**: 885
11 XIN Xiu-Feng(辛修锋), YU Xiao-Lin(余小林), HU Zhuo-Yan(胡卓炎), YU Kai(余恺). *Trans CSAE*(农业工程学报)[J], 2007, **23**(9): 251
12 Dyrby M, Westergaard N, Stapelfeldt H. *Food Chem*[J], 2001, **72**: 431
13 Seeram N P, Bourquin L D, Nair M G. *J Agr Food Chem*[J], 2001, **49**: 4 924

Thermal Stability and Degradation Kinetics of Anthocyanin in Tree Penoy Extract

FAN Jin-Ling[a*], ZHU Wen-Xue[a], GONG Wei-Dong[b], SHEN Jun-Wei[a], MA Hai-Le[a]
([a]*Food and Bioengineering College, Henan University of Science and Technology, Luoyang* 471003;
[b]*Inspection and Quarantine Technology Centre of Henan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of Luoyang Branch, Luoyang*)

Abstract Anthocyanin stability of tree penoy was evaluated under different pH and temperature conditions during heating. Analysis of kinetic data suggests a first-order reaction for the degradation of tree penoy anthocyanin with the half-lives of 27.0 to 7.9, 32.1 to 8.5, 27.9 to 8.9, 35.9 to 9.4 and 27.3 to 10.7 h for samples at pH 2.6, 3.0, 3.6, 4.0 and 4.6 between 70 and 90 ℃, respectively. Increasing temperature from 70 to 90 ℃, it enhanced the degradation of anthocyanin during heating. The temperature-dependent degradation was adequately modeled on the Arrhenius equation. The activation energy values for the degradation of tree penoy anthocyanin at different pH values(2.6 ~ 4.6) ranged from 48.4 to 69.4 kJ/mol. The first order kinetic constants show the following decreased order for individual anthocyanins: cyanidin 3-*O*-glucoside > peonidin 3-*O*-glucoside > cyanidin 3,5-di-*O*-glucoside > peonidin 3,5-di-*O*-glucoside. Tree penoy anthocyanin degradation involves in brown pigment formation. The browning index increased with increasing heating time, temperature and pH.

Keywords tree penoy, anthocyanin, thermal stability, browning, degradation kinetics