

中药口服液体制剂中花青素不稳定机制及稳定剂研究进展

黄浩洲¹, 张定堃^{1*}, 姜红¹, 林俊芝², 贺亚男¹, 许润春¹, 杨明³, 韩丽^{1*}

(1. 成都中医药大学药学院, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137;
2. 成都中医药大学附属医院中心实验室, 四川 成都 610072; 3. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004)

摘要: 花青素具有很高的健康益处与生物活性, 将其制备成口服液, 能使溶液色泽鲜明、性状美观, 并易于吸收。然而由于其本身特殊的抗氧化活性, 使其易受外界理化因素的影响而发生氧化、聚合和降解等不稳定现象, 严重影响产品的稳定性与货架寿命。传统的 pH 调节、去氧和避光等方法不能满足稳定花青素的需求, 添加稳定剂与花青素分子形成复合物以提高其稳定性成为新的有效方案。本文系统梳理了相关学科运用花青素稳定剂的作用原理及应用方法, 以期探索中药与天然药物口服溶液澄清稳定的关键技术, 为口服液开发和利用花青素稳定剂提供理论支持及技术参考。

关键词: 花青素; 口服液; 稳定剂; 澄明度; 降解

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 10-1524-09

Research progress in instability mechanism and stabilizer of anthocyanins in oral liquid preparation of traditional Chinese medicine

HUANG Hao-zhou¹, ZHANG Ding-kun^{1*}, JIANG Hong¹, LIN Jun-zhi², HE Ya-nan¹,
XU Run-chun¹, YANG Ming³, HAN Li^{1*}

(1. Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research and Utilization on Chinese Material Medical Resources Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Central Laboratory, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China; 3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: Anthocyanins has a high health benefits and biological activity, which can make the solution easily absorbed and has a bright color, beautiful appearance in oral liquid. However, due to its particularity antioxidant activity, it is easy to be affected by the external physical and chemical factors, and then oxidation, polymerization, degradation and other unstable phenomena occurs that seriously affect the stability of products and shelf life. The traditional methods of pH regulation, deoxygenation and light avoidance could not meet the demand of stable anthocyanins. Addition of stabilizer to anthocyanins is a new effective way to improve the stability of anthocyanins. This paper is prepared to summarize systematically the principle and application methods of anthocyanins stabilizers to explore the key technology of clarification and stabilization of traditional Chinese medicine in the natural oral liquid, which may provide theoretical support and technical reference for the development and utilization of anthocyanins stabilizer.

Key words: anthocyanins; oral liquid; stabilizer; clarity; degradation

收稿日期: 2017-04-07; 修回日期: 2017-05-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81403115); 国家基础科学人才培养基金资助项目 (J13100340-19); 成都中医药大学科技发展基金.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-28-61800231, E-mail: 465790643@qq.com;

Tel / Fax: 86-28-61800231, E-mail: hanliyx@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0331

花青素 (anthocyanidins) 又称为花色素, 是广泛存在于植物中的水溶性天然色素, 属酚类化合物中的类黄酮化合物, 是黄酮类代谢途径的分支产物^[1]。药理研究表明, 花青素具有抗氧化、抗炎和清除自由基等活性, 尤其能有效降低肿瘤和心脑血管疾病的风险^[2], 具有很高的健康益处和应用价值。由于花青素能在不同 pH 条件下呈现出各种鲜明的色泽, 具有良好的市场卖点。因此, 无论药品还是保健品, 常将其制备成口服溶液制剂, 如含五味子的安神宁口服液、复方山茱萸口服液及含覆盆子的益视口服液等。然而花青素在溶液状态下表现出物理与化学的双重不稳定性, 易受各种因素的影响而发生氧化、降解、自缩合等变化而使液体变色、褪色、澄明度下降、沉淀甚至失效^[3], 严重影响了口服溶液的储存稳定性、生理活性、服用顺应性与货架寿命。传统的花青素的稳定方法多从 pH 调节、去氧和避光等角度控制不稳定的外界因素, 效果并不十分理想。近年来, 随着对其溶液状态下物理、化学不稳定机制的深入研究, 以辅色素、蛋白质、果胶、阿拉伯胶和 β -环糊精为代表的诸多稳定剂不断被发现, 为改善其稳定性提供了新的思路与方法。为此, 本文以不稳定的花青素为代表, 综述食品、药品和饮料等领域运用各种稳定剂处理花青素的作用原理与应用方法, 以期提升花青素类液体制剂的品质, 探索中药与天然药物口服溶液澄清稳定的关键技术, 为丰富与发展口服液的稳定性与货架期提供参考及理论支持。

1 花青素结构的不稳定机制

花青素基本结构为多羟基-2-苯基苯并吡喃型阳离子及其糖苷, 是含糖基黄烷-3-醇的黄烺盐, 多以花色苷形式存在。目前已知的花青素超过 500 种, 天然存在的花色苷有 250 多种, 主要以天竺葵色素、矢车菊色素、飞燕草色素、芍药花色素、牵牛花色素和锦葵色素最为普遍^[4] (图 1)。花青素在口服溶液中呈现出物理不稳定性如褪色、变色及化学不稳定性如聚合沉淀、降解等。研究发现, 导致这些不稳定现象的内外因素主要有温度、浓度、光照、pH、酶、氧气、抗坏血酸、糖及其降解产物、金属粒子和自身结构等^[5]。目前认为花青素的主要褪色及降解过程可能是花青素的 C3 糖苷首先水解, 然后花青素苷元发生水合反应生成花青素假碱形式, 再异构化生成查耳酮及其同分异构体 α -二酮^[6]; 或首先生成假碱葡萄糖苷, 然后开环生成查耳酮糖苷, 再脱去糖苷成为查耳酮及其同分异构体 α -二酮, 最后彻底降解成为酚酸和醛类^[5], 其主要平衡和降解途径如图 2 及图 3 所示。

Furtado 等^[7]研究了 4 种花青素在酸性溶液中的降解过程, 并分析和确定了降解产物 (表 1)。

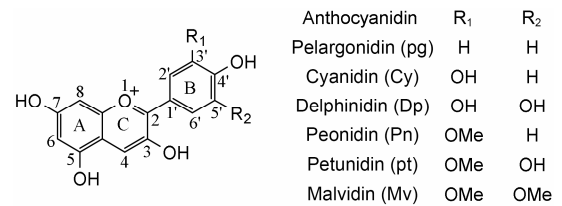


Figure 1 Nuclear structure of anthocyanins and 6 common kinds of anthocyanins

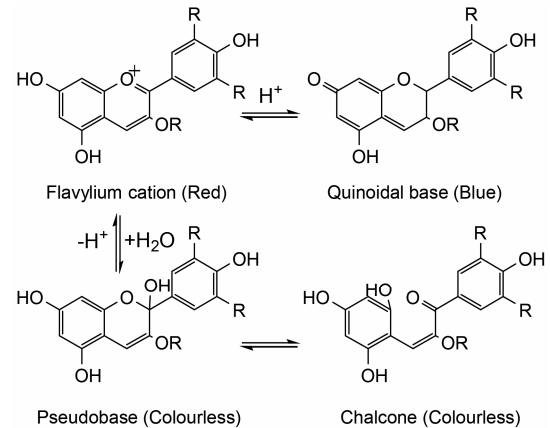


Figure 2 Four structures of anthocyanins in acidic solution

Table 1 Degradation products of four kinds of anthocyanins

Anthocyanins	Degradation product
Cyanidin	2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde; 3,4-dihydroxybenzoic acid
Pelargonidin	2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde; 4-hydroxybenzoic acid
Malvidin	2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde; 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid
Delphinidin	2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde; 3,4,5-trihydroxybenzoic acid

在中药口服液中, 同时存在与花青素结构相似的黄烷-3-醇结构儿茶素类成分及黄烷-4-醇或黄烷-3,4-二-醇结构的无色花色素 (单体原花青素) 类成分, 这类成分在强酸性条件下催化氧化, 能产生 C₄-C₈ 或 C₄-C₆ 连接的二聚甚至寡聚的原花青素。由于其二聚体和寡聚体仍具有亲电中心, 可继续和黄烷-3,4-二-醇发生缩合, 生成缩合单宁, 再进一步加热氧化能形成红色的沉淀^[8], 进而导致口服液的澄明度降低或产生沉淀。

2 提高花青素稳定性方法

2.1 辅色素法

辅色素 (copigments) 是指能够在弱酸性溶液中修饰和加强花色苷颜色表现的一类物质, 具有丰富的电子云系统, 当溶液中含两种不同电子密度的芳

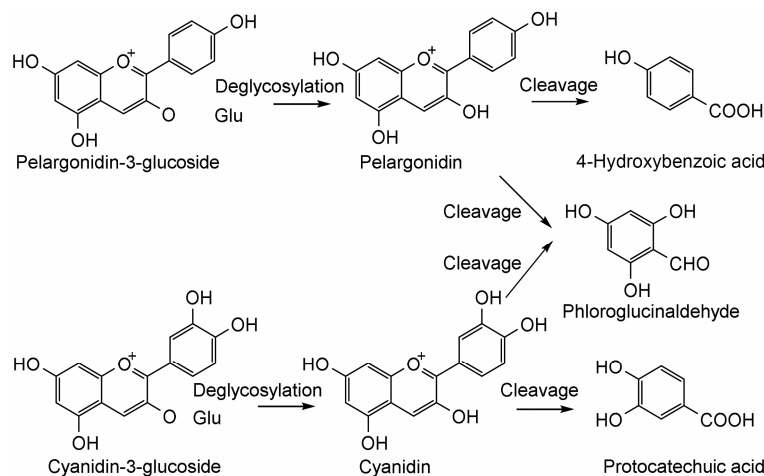


Figure 3 Possible degradation mechanism of two common anthocyanins

香环物质时, 伴随氢键、范德华力和疏水相互作用等能发生花色苷的辅助成色作用形成三明治结构的 $\pi-\pi$ 复合物 (图 4), 可在一定程度上排除水分子对花青素的水合和亲核攻击, 进而提高其稳定性^[9]。辅色作用通过以下 4 种途径实现: 花青素自聚作用、金属络合作用、分子内辅色和分子间辅色作用, 其中分子间和分子内辅色是最主要的辅色机制^[10]。分子内辅色作用是通过花色苷与自身相连的芳香酰基间的酰化作用, 保护花色苷母核免受水分子的攻击从而实现稳定花色苷的呈色效果; 而分子间辅色作用是辅色素分子与花色苷间以氢键、范德华力、疏水及离子相互作用为主要驱动力形成的水平或垂直重叠的“花色苷-辅色素”复合物实现^[11]。辅色素由于具有不同的结构而显示各自辅色特性, 如阿魏酸、咖啡酸、绿原酸、羟基肉桂酸、精氨酸及脯氨酸等具有强辅色作用^[12]; 类黄酮和非类黄酮聚合物、生物碱、氨基酸、羧基酸和有机酸等具有中等辅色作用; 儿茶素和表儿茶素等仅有弱的辅色作用^[9]。由于辅色素多为天然添加剂, 是一种绿色自然且相对安全的增色方法, 因而在食品和药品中对提升花青素颜色和稳定性具有重要的现实意义, 目前研究主要是类黄酮、酚类和酚酸等物质。

2.1.1 酚类化合物及酚酸 酚类化合物是芳香烃中苯环上氢原子被羟基取代的化合物, 分为一元或多元酚, 呈弱酸性且易被氧化, 在此基础上带有酚环的有机酸称为酚酸。早期 Bakowska 等^[12]选择 5'-磺酸槲皮素、5'-磺酸莫兰钠盐、绿原酸、槲皮素、单宁酸、芦丁和中药黄芩根部提取的多酚物质作为辅色素, 研究温度、紫外和 3 个月的储存 (有光和无光) 对花青素稳定性的影响, 发现黄芩多酚提取物在 pH 3.5 时对花青素稳定性提升最多, 辅色效果最强, 说明天然多酚提取物具有良好的辅色作用。后来 Colon 等^[13]在研究一种天然提取物绿茶多酚和没食子儿茶素、没食子酸酯协同作用时发现绿茶多酚具有绿茶的总抗氧化能力; 基于此, Chung 等^[14]调查了天然皂树皂苷和含香草醛、表没食子儿茶素没食子酸酯、绿茶提取物和原儿茶醛的多酚饮料中花青素的色值下降情况, 与对照组相比, 饮料在添加多酚后延迟了褪色, 其中茶多酚组花青素半衰期从 2.9 天增加到 6.7 天, 效果最显著; 荧光淬灭显示其与花青素可能通过疏水相互作用形成复合物。Gras 等^[15]考察了其他天然提取物辅色作用。使用富含酚类的绿色咖啡豆水提取物加入黑色胡萝卜花青素提取物, 研究添加比例在 1:0~1:162、pH 为 3.6 时其颜色强度和稳定性受分子间

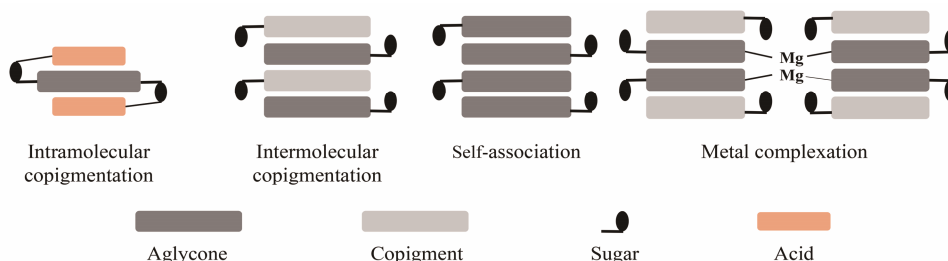


Figure 4 Sandwich configuration of copigmentation complexes

辅色作用的影响。结果显示, 在 90 °C 加热 5 h 期间内只有共色素的添加比例高于 1:9.4 时花青素稳定性才有明显改善。

此外, 酿酒行业中也常应用此方法使葡萄酒所含花色苷颜色更深、色泽更稳定, 增强葡萄酒品质。Bimpilas 等^[16]利用迷迭香酸和富含羟基肉桂酸的自然提取物作为梅洛葡萄酒的辅色素, 在 6 个月储存期间研究对花青素辅色和葡萄酒颜色的影响, 观察到花青素颜色强度增加 15%~50%, 证实羟基肉桂酸酯辅色的能力; 与对照葡萄酒相比, 添加了辅色素的样品在长达 3 个月的时间里能保留更多的花青素和色度, 同时还发现添加提取物诱导的辅色素和花色苷之间平衡变化并不影响聚合反应速率。

2.1.2 类黄酮 类黄酮又称作生物类黄酮, 以结合态或自由态存在于植物中, 包括黄酮类、黄烷醇、黄酮醇和黄烷酮等。Pacheco-Palencia 等^[17]考察了富含类黄酮-C-糖苷 (flavonoid C-glycoside, FCGE) 的 Rooibos 茶提取物与多酚的辅色作用, 对比证实了 FCGE 在富含花色苷的食品和果汁混合物饮料中具有辅色剂和稳定剂的潜力。为寻找更经济的来源, Pan 等^[18]使用来自木豆提取的 FCGE、牡荆素和荜草素研究了其对蓝莓汁颜色和花青素热稳定性影响, 发现加入提取物能提高果汁的颜色强度及持续时间。花青素半衰期在 FCGE、荜草素和牡荆素中分别增加 87%、79% 和 62%, 且含以上辅料的果汁样品具有较高的总酚含量和 1,1-二苯基-2-苦肼基 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基清除活性。Hernández-Herrero 等^[19]发现芸香苷 (芦丁) 能显著改善在 20 °C 下黑暗中储存 17 周的含花青素 3-葡萄糖苷和花青素 3-芸香糖苷的浓缩李子花色苷提取物的模型果汁稳定性和颜色。Xu 等^[20]使用葡萄皮花青素结合热稳定性和光稳定性实验, 在 pH 值分别为 3、4 和 5 条件下研究槲皮素的作用, 结果显示槲皮素存在时花青素的降解反应遵循一级动力学模型。在相同条件下, 与表没食子儿茶素没食子酸酯、茶多酚、杨梅苷和芦丁相比, 槲皮素是相对最有效的葡萄皮花青素辅色剂和稳定剂。

2.1.3 氨基酸和多肽类 氨基酸和多肽是较为理想的辅色剂, 辅色机制为巯基与花色苷的相互作用, 也可以是羧基或羧基群对阳离子部分或其他部分的相互作用 (图 5)。Eidenberger 等^[21]在其专利中使用谷胱甘肽、二氢硫辛酸、半胱氨酸和半胱氨酸衍生物作为花青素辅色素, 检测到稳定后的花青素复合物含至少 1 个 -SH 基团, 且生物利用度至少是对照的 2 倍。

实验还观察到谷胱甘肽和二氢硫辛酸在所有测试浓度下都对花青素具有保护效果, 并在 pH 5~6 时以 1:1 的比例观察到最佳效果。Chung 等^[22]使用 L-苯丙氨酸、L-酪氨酸和 L-色氨酸和多肽 (ϵ -聚-L-赖氨酸) 延长紫色胡萝卜花青素在含抗坏血酸、柠檬酸的模型饮料中的稳定性时, 观察到空白组在 7 天、40 °C 环境下花青素以一级反应速率降解, 而添加氨基酸或肽增加了花青素的颜色稳定性, 其中以 L-色氨酸最显著。荧光淬灭测量显示 L-色氨酸主要通过氢键与花青素相互作用, 也可能涉及疏水相互作用。

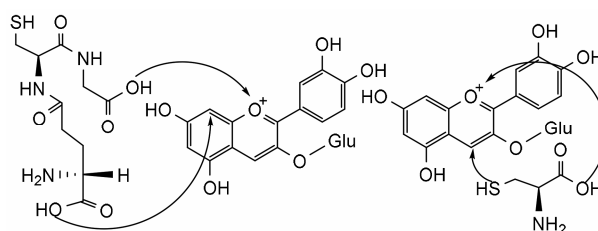


Figure 5 Binding mechanism of amino acids and anthocyanins

虽然辅助成色技术在食品中应用广泛, 但其稳定性除受乙醇、温度、分子结构、辅色素及花色苷浓度影响外, 还受 pH 的强烈影响, 主要由于低 pH 环境下花色苷能变花色阳离子形式从而更好接收富电子的辅色素。由于辅色剂的种类较多, 应根据其所属的化合物类型的理化性质特点来选用合适的辅色剂。因此, 辅色剂在用于口服液时应依据结构特点进行筛选。

2.2 蛋白质类

蛋白质 (protein) 表面分布电荷, 同时具有大量的氨基酸及复杂的空间构象, 这为构建蛋白质-花青素复合物提供了物质结构基础。由于花青素含有酚羟基及苯环, 这使其同时具有一定的疏水性和亲水性并形成氢键和疏水键, 且后者是复合物形成的主要驱动力; 此外, 蛋白质的氨基酸残基比较集中的区域, 常因疏水作用而形成疏水性空腔, 因此, 具有一定疏水作用的花青素分子首先进入疏水腔^[23], 再与蛋白质极性基团作用形成氢键, 协同形成复合物, 而花青素分子在蛋白质疏水空腔内被有效保护。最近, Tang 等^[24]使用荧光光谱和圆二色光谱等结合分子模拟技术, 研究牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 和矢车菊花色苷的相互作用, 发现蛋白质二级结构已被相互作用改变, 分子模拟的结果显示花色苷结合到 BSA 的亚结构域 IIA 的疏水空腔中 (图 6)。该课题组还进一步证实花色苷和蛋白质分子间自发地以较强的氢键、疏水键和较弱的静电力支配结合, 其

中 A 环 7 位羟基和 B 环羟基及糖基和蛋白质形成多个氢键, 而花色苷 B 环的羟基数目与蛋白质结合起重要作用^[25], 同时发现蛋白质 α -螺旋比改变, 说明蛋白质二级结构部分被花色苷破坏, 但复合物的自由基清除率影响不显著, 这提示蛋白质具有提高花青素稳定性的潜力^[26]。

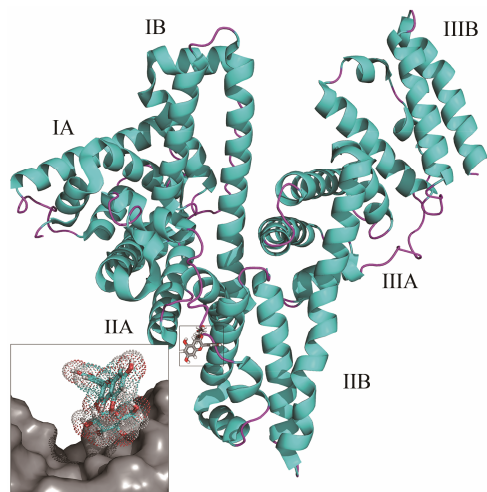


Figure 6 Schematic diagram of anthocyanins gets into hydrophobic cavity of protein to form complex

目前, 食品蛋白如酵母甘露糖蛋白、牛奶中的乳清蛋白、 β -乳球蛋白和 α 、 β -酪蛋白等被开发用于花青素的稳定剂。Arroyo-Maya 等^[27]研究天竺葵素和几种乳制品蛋白质之间的相互作用时证明了乳制品蛋白质适用于提高花青素稳定性, 且与蛋白质构象相关。Chung 等^[28]在加速条件 (40 °C、7 天) 下研究天然乳清蛋白、变性乳清蛋白、柑橘果胶和甜菜果胶对包含花青素、抗坏血酸和钙盐的模型饮料的物理和化学稳定性的影响, 通过吸光度、颜色和视觉外观评价其物理稳定性, 发现热变性乳清蛋白效果最显著。荧光淬灭显示花青素可能与乳清蛋白通过氢键形成复合物。He 等^[29]发现牛 β -乳球蛋白显著地降低了在储存期间高温、 H_2O_2 氧化和强光光照条件下葡萄皮花色苷提取物溶液中花色苷的褪色和降解过程; 进一步发现, 牛奶中 α 、 β -酪蛋白分别通过亲水 (范德华力或氢键) 和疏水相互作用与花色苷结合, 其二级结构随花色苷浓度增加而改变, 且 α -酪蛋白结合力强于 β -酪蛋白^[30]。此外, Wu 等^[31]评价了在 pH 7.0 下酵母甘露糖蛋白对花色苷的热稳定性影响, 在 80 °C 和 126 °C 下其降解遵循一级动力学, 添加甘露糖蛋白后将半衰期和色泽稳定性延长或提高 4 至 5 倍, 保持了花青素抗氧化能力; 可见光吸收、荧光光谱和 zeta 电位结果表明, 花青素与甘露糖蛋白的蛋白质部分通过疏

水相互作用结合。

需要指出的是, 蛋白质不宜在其等电点附近 pH 值下加入, 否则会出现沉淀。而在某些情况下, 如金属离子、氧和酸会导致接近的花青素分子和蛋白质形成共价键而导致不可逆结合。同时, 若蛋白质添加过量, 蛋白质分子会被花青素分子连接成聚集体, 形成交联而易沉淀; 相反, 若蛋白质浓度较低, 其表面结合大量花青素分子形成单分子的疏水层并到达一定数量时使蛋白质表面的疏水性足够大, 也会导致沉淀; 况且蛋白质也会因为其他理化因素, 如强酸强碱、重金属盐、辐射、剧烈振荡或搅拌等而不稳定。因此, 应用中应详细考察加工和储存的适用条件, 并控制蛋白质浓度和结合程度。

2.3 天然甜味剂

天然甜味剂 (natural sweeteners) 是指赋予食品或药品以甜味的一类天然添加剂, 多为植物提取物, 目前广泛应用于食品和药品中作为甜味剂、矫味剂来改善食品口感和药品的顺应性。天然甜味剂分为糖醇类、苷类和糖类, 而糖类是最常用的添加剂。然而在实际应用中发现, 天然甜味剂不仅可以改善口感, 当添加到一定的浓度和比例时天然甜味剂和花青素分子间的氢键和疏水相互作用能提高其稳定性。

Kopjar 等^[32]在黑莓汁中添加蔗糖、果糖、葡萄糖、海藻糖和绿原酸研究了储存期间对其花青素含量、多酚含量、抗氧化活性和颜色变化的影响, 观察到藻糖和葡萄糖对花青素含量具有积极影响。然而, 由于这类糖本身具有大量的热能, 对于糖尿病和肥胖病患不利。因此, 甜菊素和木糖醇等作为一种既有花青素稳定作用, 又不产生热能且不被人体吸收的天然添加物而被广泛开发和利用。Pérez-Ramírez 等^[33]评价甜菊素和柠檬酸对玫瑰果饮料储存期间酚类化合物的稳定性、抗氧化能力和碳水化合物水解酶抑制作用, 发现甜菊素增强了果汁颜色表现和一些多酚的稳定性, 同时还发现甜菊素具有抑制 DPPH 自由基清除率损失和抑制 α -淀粉酶活性能力。Nowicka 等^[34]研究了添加蔗糖、棕榈糖、赤藓糖醇、木糖醇、甜菊糖苷、罗汉果提取物和菊粉的情况下酸樱桃原液的酚类化合物、颜色和抗氧化活性的变化, 在 4 °C 和 30 °C 下贮存 6 个月后共有 18 种多酚化合物通过高效液相色谱四级杆飞行时间质谱 (high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, HPLC-Q-Tof-MS) 分析鉴定, 总酚含量测定发现在添加甜味剂的样品中, 酚类化合物的含量范围在每 100 毫克 725.6 mg (含赤藓糖) 至 1133.1 mg

(含甜菊糖苷) 之间, 且具有强烈抗氧化活性。该结果表明棕榈糖、赤藓糖醇、甜菊糖苷、木糖醇和菊粉对多酚类, 特别是花色苷具有良好的保护效果, 显示天然甜味剂在食品和制药方面具有更高的应用价值。Dhaouadi 等^[35]研究了添加薄荷和石榴糖浆的绿茶在冷藏中的化学稳定性, 并使用液质联用检测其酚类物质。在 4 °C 下储存 15 天后, 不含上述物质的绿茶酚类明显减少, 说明具有稳定酚类的作用。色谱检验证明一些化合物如咖啡因能被薄荷和石榴糖浆保留, 自由基清除实验显示其抑制了绿茶抗氧化能力的衰退, 且抑菌实验证实了其抑制葡萄球菌的生物活性, 从而科学地支持这种流行在地中海国家的做法。

由于天然甜味剂是一种较为绿色的添加剂, 已被用于药用辅料, 同时还能够改善液体制剂的不良口感, 且近年来关于此类物质的其他药剂学作用也被研究和开发, 因此该类物质是一种较为理想的花青素稳定剂, 但其稳定效果仍然受到浓度和热处理等影响, 其药用稳定性价值有待进一步的研究。

2.4 果胶与阿拉伯胶

2.4.1 果胶

果胶 (pectin) 是一种线形的多糖聚合物, 含约 100~1000 个脱水半乳糖醛酸残基, 平均相对分子质量为 20 000~400 000, 水解后得到 D-半乳糖及阿拉伯糖。研究^[36]显示, 果胶和花青素分子之间能够通过羧基、羟基和疏水相互作用形成复合物 (图 7)。Fernandes 等^[37]首次使用饱和转移差异核磁共振 (saturation transfer difference nuclear magnetic resonance, STD-NMR) 和分子模拟清晰地展示了飞燕草色素-3-O-葡萄糖苷与矢车菊色素-3-O-葡萄糖苷在弱酸条件下其形成的黄鎗阳离子、半缩酮形式和果胶作用机制。发现具有大平面结构 (A-C 和 B 环) 及糖环的黄鎗阳离子有助于和果胶的羟基和游离的羧酸基团之间通过氢键形成相互作用, 因此其结合能力最

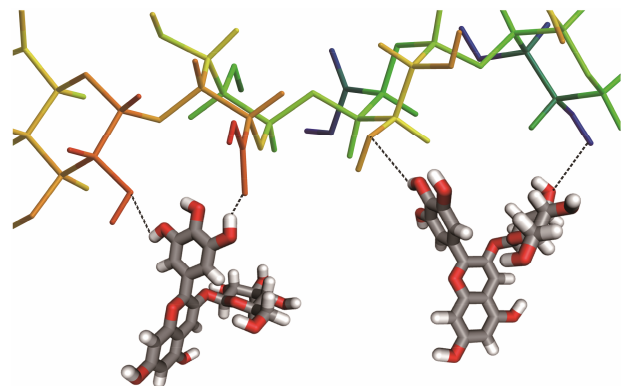


Figure 7 Schematic diagram of anthocyanins and pectin complex

强。飞燕草色素 B 环有更多的羟基而具有更强的结合能力, 显示花青素的 B 环在和果胶结合过程中起到重要作用, 但同时还发现花青素自聚现象的发生抑制了其与果胶大面积结合。

Fernandes 等^[38]为探明色素与其他物质在食品工业中相互作用的问题, 使用紫外可见光谱、H-NMR 和分子动力学模拟研究了锦葵色素-3-O-葡萄糖苷和细胞壁果胶多糖与辅色剂儿茶素之间的相互作用。结果显示儿茶素分子和果胶多糖分子紧密结合花色苷, 具有协同辅色作用。但当果胶含量大于 1.5 g·L⁻¹ 时, 儿茶素和花色苷结合常数下降, 可能和儿茶素与果胶之间的竞争行为有关。Buchweitz 等^[39]选用低酯化酰胺化柑橘果胶、低甲氧基化苹果果胶和高甲氧基化的甜菜果胶加入纯化的花青素提取物及含有花青素和非花色苷多酚提取物中, 研究不同果胶对 pH 3.0 模型溶液中黑醋栗花青素的稳定性影响。为此, 通过 HPLC 测定在避光、20 °C 条件下 18 周内的花青素含量, 计算半衰期和破坏值。与空白相比, 所有加入果胶的溶液花青素稳定性均有明显改善, 但在同样程度酯化和酰胺化的果胶中, 柑橘果胶稳定性最强, 甜菜果胶最弱。当对总酚进行评估时, 果胶来源对其稳定性的影响比果胶类型的效果更显著。

值得注意的是, 果胶不溶于醇, 在水中溶解后带负电荷形成黏稠的胶体溶液, 且果胶易在强酸或强碱条件下解聚而在弱酸下稳定。因此, 乙醇含量、金属粒子和 pH 值对果胶的稳定性有较大影响, 应注意成分之间配伍和加入后可能造成液体的黏稠度和澄明度改变。

2.4.2 阿拉伯胶

阿拉伯胶 (gum arabic, GA) 为豆科金合欢属植物阿拉伯树树干自然渗出物, 主要成分包括阿拉伯半乳糖 (80%~90%)、糖蛋白 (2%~4%) 和阿拉伯半乳糖-蛋白 (10%~20%), 相对分子质量约为 22~30 万, 在溶液中带负电荷^[40]。目前主要应用在食品和药品领域, 作为乳化剂、稳定剂、黏合剂及囊材等。Guan 等^[41]研究了 GA 改善花青素的热稳定性能力。实验中添加了 10 mg·mL⁻¹ GA 的花青素溶液分别在 80 °C 和 126 °C、pH 值为 5.0 条件下加热 80 min, 发现加入 GA 后花青素热降解半衰期分别增加了 2.0 和 1.8 倍; 加热 30 min 后花青素残余量分别为空白的 1.02 和 1.35 倍, 抗氧化能力明显高于未添加 GA 的溶液; 荧光光谱数据表明花青素和 GA 之间通过氢键和疏水相互作用形成复合物。Chung 等^[42]发现含 L-抗坏血酸的模型饮料中紫色胡萝卜花青素在 40 °C 条件下光照 5 天, 储存期间以一级反应速率降解;

GA 在 0.05%~5.0% 浓度范围内显著增强花青素稳定性, 并在含量为 1.5% 时达最佳, 这是由于继续增加浓度会导致阿拉伯树胶分子构象改变而阻碍它们接触花青素; 荧光淬灭测量表明花青素可能与其糖蛋白部分通过氢键结合相互作用。

阿拉伯胶在重金属、硼砂和乙醇 (>35%) 等条件下会发生沉淀, 且阿拉伯胶蛋白质部分含过氧化酶, 能引起愈创木酚、香草醛、鞣酸和阿托品等变色; 同时, 阿拉伯胶溶于水后溶液呈酸性, 具有胶体和高分子电解质的性质, 使用前应除去酶并注意药辅配伍。

2.5 β -环糊精

β -环糊精 (β -cyclodextrin, β -CD) 是一种由淀粉经过酶解后得到的 7 个葡萄糖残基以 β -1,4-糖苷键结合构成的非还原性环状低聚化合物。 β -CD 的立体结构为中空圆筒形 (图 8), 由于其空腔内外壁存在不同的葡萄糖分子基团而表现为筒内具有氧原子呈疏水性而筒外具有羟基呈亲水性, 这使得 β -CD 可包含多种化合物分子, 增加包合物对光、热和氧的稳定性, 改变被包合物的理化性质^[43]。

近年来, Fernandes 等^[44]通过分子动力学模拟和 NMR 技术研究了 β -CD 与花色苷结合机制。NMR 显示 β -CD 空腔包含半缩酮式和顺式查耳酮式的花青素, 没有包含黄酮阳离子和反式查耳酮。复合物分子动力学模拟发现其中 A、C 环完全被包含在 β -CD 空腔中, 起主要结合作用; B 环位于较宽底面边缘, 但葡萄糖残基扰乱了花色苷在 β -CD 中的包合并使其部分暴露于溶剂。其中花青素的 H4、H2'、H5' 和 H6' 原子与 β -CD 的 Glc3、Glc5 和 Glc7 单元内 H3 和 H5 原子紧密结合, 这些结果也通过 NMR 证实。值得注意的是, 通过溶剂可及表面积 (solvent-accessible surface area, SASA) 值表征原子暴露溶剂程度发现花色苷 A 环 H6 原子 SASA 值最高, 说明始终暴露在溶剂中; 而花色苷 H4、H8、H2'、H5' 和 H6' 的 SASA 值较低, 表明受到 β -CD 保护。

Howard 等^[45]研究了 3 个 pH 水平 (2.8、3.2 和

3.6) 和 4 个 β -CD 浓度 (0%、0.5%、1% 和 3%) 单独和组合条件下对巴氏杀菌前后, 置于 4 °C 和 25 °C 下储存 8 个月野樱莓花色苷的稳定性。结果发现, 在无 β -CD 情况下 pH 降低有利于保存花色苷; 而在 pH 3.6 下添加 3% β -CD, 并在 4 °C 和 25 °C 下储存 8 个月后果花色苷分别保留 81% 和 95%, 具有优异的保护效果。随着 β -CD 浓度和 pH 降低, 稳定效果降低, 说明不同 pH 下花色苷结构对 β -CD 稳定效果起重要作用。Aguilera 等^[46]使用来自 Idaho 和 Otomi 黑豆花青素提取物加入运动饮料中, 在添加 β -CD 和空白条件下储存于光照和黑暗存放 10 天使其包合, 并于 4 °C 和 25 °C 储存 6 周。结果发现, 在不同储存条件下, 所有大豆花色苷与 β -CD 组合在 4 °C 储存期间, 半衰期最多延长到 13 个月, 且具有更小的比色 (亮度、色度和色调角) 差异。

3 结语与展望

口服液类液体制剂的颜色和澄明度对其货架寿命和应用具有直接影响, 传统的花青素稳定技术如避光、低温储存和去氧等技术已较为成熟, 但仍然难以阻止其存放期间褪色和沉淀等不稳定因素。通过添加稳定剂来处理花青素可以发现, 氢键、疏水相互作用和范德华力等是分子间形成复合物的主要驱动力, 其中 A、C 环易和疏水键作用而氢键多在 B 环及糖基形成, 并且发现辅色素类能通过以上作用有效降低花青素褪色等物理不稳定性; 而蛋白质、 β -CD、甜味剂及果胶等能抑制其降解、聚合等, 与传统技术相比, 更能稳定花青素而不影响其抗氧化等生物活性。但与此同时, 稳定剂也有一定的适用范围, 如 pH 为 2.8 虽有利于花青素稳定, 但此时蛋白质、果胶和 β -CD 已失效, 同时其适口性也会变差。由于中药口服液成分复杂且存在一定相互作用, 某些条件下稳定剂在包括中药口服液在内的液体制剂中使用前应进行更详细考察, 这使得中药口服液花青素稳定剂相对于食品领域稳定剂的应用面临更多的挑战。例如某些中药金属离子、鞣质、酶、杂质及其所特有的某些化合

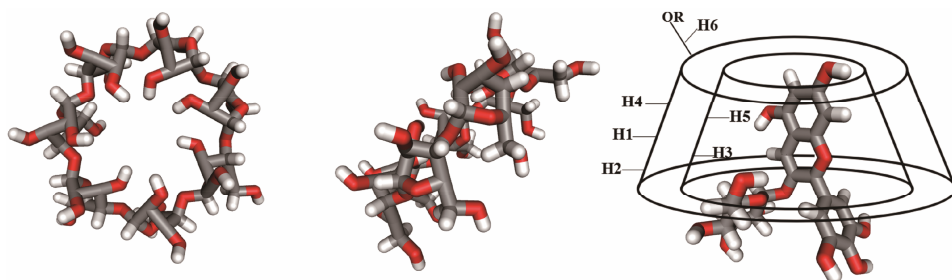


Figure 8 3D structure of beta-cyclodextrin and inclusion complex

物等, 能与稳定剂产生吸附结合甚至化学反应, 破坏稳定剂本身的稳定性, 直接导致稳定效果的降低, 这要求对加入稳定剂的口服液进行长期的稳定性及其他适用性考察, 而且还应考虑某些稳定剂的应用对工艺路线的变更和稳定剂本身所带来的研发及制造成本的提升等问题。因此, 在选择稳定剂时, 应在充分了解稳定剂理化性质和药液物质基础的前提下结合其实际情况来设计合理的花青素稳定工艺及技术。本文通过梳理总结花青素稳定剂的原理与方法, 为提高中药与天然药物口服液花青素稳定性提供理论基础和技术方案, 推动口服液品质和效果的提升。

References

- [1] Gonnet JF. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited—1. A colorimetric definition using the CIELAB scale [J]. *Food Chem*, 1998, 63: 409–415.
- [2] Pitz HS, Trevisan ACD, Cardoso FR, et al. Assessment of *in vitro* biological activities of anthocyanins-rich plant species based on *Plinia cauliflora* study model [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1391: 65–80.
- [3] Li BY, Gong Q, Zhang XF, et al. Analysis of clarity of TCM oral liquid [J]. *Chin Tradit Patent Med (中成药)*, 2014, 36: 2384–2387.
- [4] Escribano-Bailón MT, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. Anthocyanins in cereals [J]. *J Chromatography A*, 2004, 1054: 129–141.
- [5] Patras A, Brunton NP, O'Donnell C, et al. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2010, 21: 3–11.
- [6] Castaneda-Ovando A, de Lourdes Pacheco-Hernández M, Páez-Hernández ME, et al. Chemical studies of anthocyanins: a review [J]. *Food Chem*, 2009, 113: 859–871.
- [7] Furtado P, Figueiredo P, das Neves HC, et al. Photo chemical and thermal degradation of anthocyanidins [J]. *J Photochem Photobiol A*, 1993, 75: 113–118.
- [8] Shi B. *Plant Polyphenol (植物多酚)* [M]. Beijing: Science Press, 2000: 14–18.
- [9] Rein MJ. Copigmentation Reactions and Color Stability of Berry Anthocyanins [D]. Finland: University of Helsinki, 2005: 87.
- [10] Sun J, Cao X, Liao X, et al. Comparative analyses of copigmentation of cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-sophoroside from red raspberry fruits [J]. *Food Chem*, 2010, 120: 1131–1137.
- [11] Bordenave N, Hamaker BR, Ferruzzi MG. Nature and consequences of non-covalent interactions between flavonoids and macronutrients in foods [J]. *Food Funct*, 2014, 5: 18–34.
- [12] Bakowska A, Kucharska AZ, Oszmiański J. The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex [J]. *Food Chem*, 2003, 81: 349–355.
- [13] Colon M, Nerin C. Synergistic, antagonistic and additive interactions of green tea polyphenols [J]. *Eur Food Res Technol*, 2016, 242: 211–220.
- [14] Chung C, Rojanasasithara T, Mutilangi W, et al. Stabilization of natural colors and nutraceuticals: inhibition of anthocyanin degradation in model beverages using polyphenols [J]. *Food Chem*, 2016, 212: 596–603.
- [15] Gras CC, Bogner H, Carle R, et al. Effect of genuine non-anthocyanin phenolics and chlorogenic acid on color and stability of black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) anthocyanins [J]. *Food Res Int*, 2016, 85: 291–300.
- [16] Bimpilas A, Panagopoulou M, Tsimogiannis D, et al. Anthocyanin copigmentation and color of wine: the effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors [J]. *Food Chem*, 2016, 197: 39–46.
- [17] Pacheco-Palencia LA, Talcott ST. Chemical stability of açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) anthocyanins as influenced by naturally occurring and externally added polyphenolic cofactors in model systems [J]. *Food Chem*, 2010, 118: 17–25.
- [18] Pan YZ, Guan Y, Wei ZF, et al. Flavonoid C-glycosides from pigeon pea leaves as color and anthocyanin stabilizing agent in blueberry juice [J]. *Ind Crops Prod*, 2014, 58: 142–147.
- [19] Hernández-Herrero JA, Frutos MJ. Influence of rutin and ascorbic acid in colour, plum anthocyanins and antioxidant capacity stability in model juices [J]. *Food Chem*, 2015, 173: 495–500.
- [20] Xu H, Liu X, Yan Q, et al. A novel copigment of quercetagenin for stabilization of grape skin anthocyanins [J]. *Food Chem*, 2015, 166: 50–55.
- [21] Eidenberger T. Stabilized anthocyanin compositions: US 8623429B2 [P]. 2014-1-7.
- [22] Chung C, Rojanasasithara T, Mutilangi W, et al. Stability improvement of natural food colors: impact of amino acid and peptide addition on anthocyanin stability in model beverages [J]. *Food Chem*, 2017, 218: 277–284.
- [23] Zuo H, Tang L, Li S, et al. Combined multispectroscopic and molecular docking investigation on the interaction between delphinidin-3-*O*-glucoside and bovine serum albumin [J].

- Luminescence, 2015, 30: 110–117.
- [24] Tang L, Zhang D, Xu S, et al. Different spectroscopic and molecular modeling studies on the interaction between cyanidin-3-*O*-glucoside and bovine serum albumin [J]. Luminescence, 2014, 29: 168–175.
- [25] Tang L, Zuo H, Shu L. Comparison of the interaction between three anthocyanins and human serum albumins by spectroscopy [J]. J Lumin, 2014, 153: 54–63.
- [26] Tang L, Li S, Bi H, et al. Interaction of cyanidin-3-*O*-glucoside with three proteins [J]. Food Chem, 2016, 196: 550–559.
- [27] Arroyo-Maya IJ, Campos-Terán J, Hernández-Arana A, et al. Characterization of flavonoid-protein interactions using fluorescence spectroscopy: binding of pelargonidin to dairy proteins [J]. Food Chem, 2016, 213: 431–439.
- [28] Chung C, Rojanasasithara T, Mutilangi W, et al. Enhanced stability of anthocyanin-based color in model beverage systems through whey protein isolate complexation [J]. Food Res Int, 2015, 76: 761–768.
- [29] He Z, Zhu H, Xu M, et al. Complexation of bovine β -lactoglobulin with malvidin-3-*O*-glucoside and its effect on the stability of grape skin anthocyanin extracts [J]. Food Chem, 2016, 209: 234–240.
- [30] He Z, Xu M, Zeng M, et al. Interactions of milk α - and β -casein with malvidin-3-*O*-glucoside and their effects on the stability of grape skin anthocyanin extracts [J]. Food Chem, 2016, 199: 314–322.
- [31] Wu J, Guan Y, Zhong Q. Yeast mannoproteins improve thermal stability of anthocyanins at pH 7.0 [J]. Food Chem, 2015, 172: 121–128.
- [32] Kopjar M, Jakšić K, Piližota V. Influence of sugars and chlorogenic acid addition on anthocyanin content, antioxidant activity and color of blackberry juice during storage [J]. J Food Process Preserv, 2012, 36: 545–552.
- [33] Pérez-Ramírez IF, Castaño-Tostado E, Ramírez-de León JA, et al. Effect of stevia and citric acid on the stability of phenolic compounds and *in vitro* antioxidant and antidiabetic capacity of a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage [J]. Food Chem, 2015, 172: 885–892.
- [34] Nowicka P, Wojdyło A. Stability of phenolic compounds, antioxidant activity and colour through natural sweeteners addition during storage of sour cherry puree [J]. Food Chem, 2016, 196: 925–934.
- [35] Dhaouadi K, Belkhir M, Raboudi F, et al. Pomegranate and mint syrup addition to green tea beverage stabilized its polyphenolic content and biofunctional potentials during refrigerated storage [J]. J Food Sci Technol, 2016, 53: 1164–1177.
- [36] Kopjar M, Piližota V, Tiban NN, et al. Strawberry jams: influence of different pectins on colour and textural properties [J]. Czech J Food Sci, 2009, 27: 20–28.
- [37] Fernandes A, Brás NF, Mateus N, et al. Understanding the molecular mechanism of anthocyanin binding to pectin [J]. Langmuir, 2014, 30: 8516–8527.
- [38] Fernandes A, Brás NF, Oliveira J, et al. Impact of a pectic polysaccharide on oenin copigmentation mechanism [J]. Food Chem, 2016, 209: 17–26.
- [39] Buchweitz M, Speth M, Kammerer DR, et al. Impact of pectin type on the storage stability of black currant (*Ribes nigrum* L.) anthocyanins in pectic model solutions [J]. Food Chem, 2013, 139: 1168–1178.
- [40] Hosseini A, Jafari SM, Mirzaei H, et al. Application of image processing to assess emulsion stability and emulsification properties of Arabic gum [J]. Carbohydr Polym, 2015, 126: 1–8.
- [41] Guan Y, Zhong Q. The improved thermal stability of anthocyanins at pH 5.0 by gum Arabic [J]. LWT-Food Sci Technol, 2015, 64: 706–712.
- [42] Chung C, Rojanasasithara T, Mutilangi W, et al. Enhancement of colour stability of anthocyanins in model beverages by gum Arabic addition [J]. Food Chem, 2016, 201: 14–22.
- [43] Gu WX, Li QL, Lu H, et al. Construction of stable polymeric vesicles based on azobenzene and beta-cyclodextrin grafted poly(glycerol methacrylate)s for potential applications in colon-specific drug delivery [J]. Chem Commun, 2015, 51: 4715–4718.
- [44] Fernandes A, Ivanova G, Brás NF, et al. Structural characterization of inclusion complexes between cyanidin-3-*O*-glucoside and β -cyclodextrin [J]. Carbohydr Polym, 2014, 102: 269–277.
- [45] Howard LR, Brownmiller C, Prior RL, et al. Improved stability of chokeberry juice anthocyanins by β -cyclodextrin addition and refrigeration [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61: 693–699.
- [46] Aguilera Y, Mojica L, Rebollo-Hernanz M, et al. Black bean coats: new source of anthocyanins stabilized by β -cyclodextrin copigmentation in a sport beverage [J]. Food Chem, 2016, 212: 561–570.