

花青素分离纯化及其组分鉴定研究进展

王秋霜, 凌彩金, 刘淑媚, 赵超艺, 李家贤

(广东省农业科学院茶叶研究所, 广东省茶树资源创新利用重点实验室, 广东广州 510640)

摘要:花青素是广泛存在于植物中的一种水溶性色素,使植物呈现出红、紫类色彩。花青素稳定性好,且具有较多生理活性,如抗氧化、抗癌、抵御由氧化引起的慢性病等,可以作为食品、医药、化妆品等领域重要的功能性添加成分。文章就国内外花青素分离纯化及其鉴定方面的研究进展进行了综述,以期为该类物质的分离纯化奠定基础。

关键词:茶叶,花青素,分离纯化,进展

Research progress in separation purification and component identification of anthocyanins

WANG Qiu-shuang, LING Cai-jin, LIU Shu-mei, ZHAO Chao-yi, LI Jia-xian

(Tea Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Key Laboratory of Tea Plant Resources Innovation & Utilization, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Anthocyanin is a kind of water soluble pigments existed in plant broadly which makes plant express red or purple color. Anthocyanin has good stability and many biological effects, such as antioxidant, anticancer, counteracting oxidative stress-associated chronic diseases. And it can be used as important functional adding component in food, medicine and cosmetic field. The article summarized progress of anthocyanins separation purification and component identification in order to provide research base for this kind of matter.

Key words: tea; anthocyanin; separation purification; progress

中图分类号: TS201

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)03-0358-04

花青素 (anthocyanidin) 又叫花色素, 是一类广泛存在于植物中的水溶性色素, 属类黄酮化合物, 是构成花瓣和果实颜色的主要色素之一。花青素不仅使花卉、水果和蔬菜呈现美丽的颜色, 还赋予更高的功能性。花青素具有延缓衰老、抗氧化^[1-4]、抗突变^[5]、抑制肿瘤细胞发生^[6]、预防心脑血管疾病、保护肝脏、降低 DNA 氧化损害^[7]、降血糖^[8]等多种生理功能。天然色素与合成色素相比安全性高, 且具有一定的营养和药理作用^[9]。因此, 开发利用天然色素资源日益受到人们的重视。提取、分离、纯化是功能性物质研究的第一步, 因此本文将对该领域的研究进展进行综述。

1 花青素的基本概况

花青素存在于很多植物中, 如红葡萄、草莓、蓝莓、茄子、紫薯等等。花青素大部分都是水溶性色素, 是果实、植株、花呈现出红、橙、紫、蓝等颜色的主要原因^[10]。花青素属类黄酮化合物, 基本结构单元为 α -苯基苯并吡喃型阳离子 (图 1), 因 3' 及 5' 位置的取代基不同 (羟基或甲氧基), 形成了各种各样的

花青素^[11]。现已知的花青素有 20 多种, 主要存在于植物中的有 6 种: 天竺葵素 (pelargonidin)、矢车菊素或芙蓉花色素 (cyanidin)、翠雀素或飞燕草色素 (delphinidin)、芍药素 (peonidin)、锦葵色素 (Malvidin) 及牵牛花色素 (Petunidin) 等^[12]。有研究认为, 在发酵和未发酵茶叶中已经鉴定的花青素主要是前五种, 其中最主要的是锦葵色素^[10]。杨贤强等^[13]发现, 茶叶中花青素主要有四种, 除了上述的前 3 种外还包括翘摇紫苷元 (三策啉)。

此外, 茶叶中还存在原花色素 (proanthocyanidins), 由花白素和儿茶素聚合而成, 酸性条件下两类物质可部分转化为花青素^[11]。自然条件下, 游离的花青素主要以糖苷形式存在, 花青素与葡萄糖鼠李糖、半乳糖、阿拉伯糖等通过糖苷键形成花色苷, 已知天然的花色苷有 250 多种^[11]。

花青素可以随着细胞液的酸碱度而改变颜色: 细胞液呈酸性则偏红, 细胞液呈碱性则偏蓝。因为茶叶细胞显酸性, 因此叶片显现红色。花青素在普通的绿色芽叶中仅含 0.1%, 红紫色芽叶中含量高达 1% 以上^[14]。低温时, 有些植物的茎叶会变成紫红色, 这是因为叶片里的碳水化合物转变成花青素的缘故, 秋天的红叶也是叶片的花青素引起的。光可增加花青素含量, 高温会使花青素降解。

2 花青素分离纯化方法研究进展

从植物中分离、纯化得到花青素类物质并应用于食品、医药等领域已经成为花青素研究的新热点。

收稿日期: 2012-08-27

作者简介: 王秋霜 (1978-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 茶叶品质与深加工。

基金项目: 国家茶叶产业技术体系项目 (CARS-23); 广东省科技计划项目 (2011B020309001); 国家星火计划项目 (2011GA780012)。

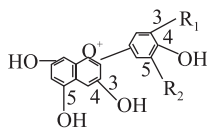


图1 花青素基本结构

Fig.1 Basic structure of anthocyanidin

由于花青素分子具有酸性与碱性基团,因此较易溶于水、酸碱及有机醇溶剂中^[11]。因此,花青素一般可以用极性溶剂来提取。传统的提取方法是在低沸点的醇类中添加盐酸,如使用酸性乙醇^[15-19];也有不加酸,仅仅用乙醇来提取^[20-21]。但是,有学者研究认为添加盐酸可能引起花青素的分解^[22]。因此,现在有学者提倡使用丙酮添加弱有机酸,但丙酮有一定的毒性,因此应用并不广泛^[23]。花青素在较强的酸性条件下相对稳定,在提取液中有必要添加酸来维持其稳定性。但是,添加酸的种类不同对花青素本身会产生影响,强酸可能引起糖苷键的断裂,影响结果的准确性^[24]。

提取的方法主要包括超声波辅助萃取^[25]、微波萃取^[16,18,20]、水浴加热萃取等。提取条件的研究较多,包括酸的浓度(pH)、醇浓度、浸提时间、浸提温度、料液比、提取次数等;在单因素实验基础上通过正交或者二次旋转回归方法对提取因素进行优化。

Kerio^[10]等研究人员采用甲醇-盐酸提取茶叶中的花青素。茶树中有一类特殊的资源,即新生的芽叶呈现出红紫色,主要是内含花青素的原因。常温下提取4h,然后浓缩、冻干,通过SPE固相萃取柱进行纯化,然后进入液相色谱仪分析。国内有学者用乙醇水溶液粗提得到茶叶花青素的水溶液,用石油醚脱脂后用三氯乙烷萃取,得到氯仿层溶液和水层;水层用乙酸乙酯萃取得到花青素水溶液,浓缩后干燥得到粗提物。接着采用硅胶柱层析分离,用不同的溶剂进行梯度洗脱,将斑点相似或相同的洗脱液合并,浓缩干燥,采用紫外-可见光谱扫描并进行初步鉴定,在465~550nm有吸收峰,可以确定含有花青素。罗正飞等^[26]采用乙醇溶剂提取紫鹃茶中的花青素物质,研究了最佳提取工艺:70%乙醇溶剂、回流30min、回流温度80℃,料液比1:10^[12],本文采用文献^[27]的方法测定了花青素含量。

黑布林是花青素提取的一种材料来源。有学者采用正交实验对黑布林皮中的花青素提取工艺进行优化,确定了适宜的提取工艺条件为75%乙醇溶液、pH为2.5、浸提温度50℃、浸提时间60min、料液比1:5可得花青素最大提取率为0.539%。此外,还发现黑布林皮花青素可与常用的食品基质配伍,对热、酸及常见的金属离子都有较好的稳定性。花青素总量采用pH示差法测定^[15]。

对蓝莓类材料中花青素提取的研究较多。有学者^[19]采用乙醇浸提法提取蓝莓果中的花青素。研究认为最佳提取条件为pH3.5、浸提温度50℃、浸提60min、乙醇浓度50%,提取1次的提取率最高。还有研究人员比较了四种提取液对草莓和蓝莓花青素提取的效果,发现甲醇-水-乙酸提取量最好,建议

采用HPLC法对花青素进行定量^[24]。Dai^[28]采用0.01% HCl/乙醇超声处理黑莓汤,冻干后得到花青素提取物。筛选了不同酸性乙醇的浓度,分别为100%、90%、75%、50%、25%、10%。发现浓度为50%时的总提取含量最多。花青素的总量测定采用pH示差法;单体测定采用HPLC方法、在524nm下检测主要花青素种类。

粮食作物中紫甘薯和紫玉米研究的较多。姚钰蓉^[29]的研究表明,通过单因素和正交实验得到紫甘薯花青素最佳提取条件:甲酸浓度5%,提取温度60℃,提取时间1h,料液比1:10,提取3次。对紫玉米花青素提取的研究发现,以蒸馏水、酸性水溶液(pH3)和酸性醇为提取剂时,酸性醇的提取率明显高于其他方法^[30]。

还有对一些紫红色花中花青素提取的研究,如李升锋^[31]运用四因素二次回归正交旋转组合设计实验方案,研究了温度、时间、液料比、乙醇浓度对玫瑰茄干花萼花青素提取率的影响,确定了花青素提取的较好条件。国外的Ben Amor^[32]利用热化学快速降压(DIC)使洛神葵组织破碎,研究了各种操作参数,认为DIC处理可以改善洛神葵花萼花青素的动力学和提取的产率。

3 花青素分析及组成鉴定方法

花青素的测定方法包括用单一pH法和pH示差法;组成及组分含量鉴定采用色谱法。

单一pH法:采用水溶液浸提茶汤,用酸性乙醇显色,在535nm测定花色苷含量,一般用平均比消光度(101.83)来测定花色苷总量^[27]。

pH示差法:在两个不同的pH下,花青素溶液的吸光值的差值与花青素的含量成比例。即在520和700nm下测定pH1.0和pH4.5处理液吸光度值的差异。国内外很多研究采用这种方法测定,认为该法能很好地消除溶液中杂质对测定结果的影响^[10]。

陈琼等^[33]采用上述两种方法比较测定了茶树芽叶花色苷含量,结果表明:单一pH法测定值高于pH示差法,两者线性关系良好;pH示差法能较好地消除干扰物质对测定结果的影响,为茶叶的花色苷定量分析提供了依据。

色谱法是样品组分分离鉴定的重要分离手段,并在多种物质的鉴定方面已经大规模应用。Kerio等^[10]采用SPE方法纯化kenya茶花青素后,利用HPLC-UV-Vis在520nm测定了花青素组分,在发酵和未发酵茶叶中鉴定出天竺葵素、矢车菊素、飞燕草色素、芍药素和锦葵色素。其中最主要的是锦葵色素。

Nafiz Oncu Can^[34]等采用梯度洗脱利用HPLC-DAD在18min内对28种水果和蔬菜中的花青素进行了分离和鉴定,鉴定了6种食物中最多的花青素物质,如三种葡萄糖苷的天竺葵色素、花青素、芍药素、花翠素、牵牛花色素、锦葵色素苷元。

反向逆流色谱(CCC)已经成功地应用到分离和纯化花青素物质,CCC分离所用的溶剂是极性的,因为含有n-丁醇,所以在浓缩和挥发时比较难把握。

通常会使用三氟乙酸(TFA)防止花青素平衡向阳离子方向转化,也会改善分离效果^[35]。紫露草叶、紫棉、接骨木果汁、红酒、黑莓中花青素也开展了CCC高速逆流色谱的分析,HPLC-ESI-MS得到了纯的花青素^[36]。Cato Frøyto^[37]利用Toyopearl HW-40F gel和反相液相色谱法可以分离黑醋栗的花青素,而不需要使飞燕草素-3-O-葡萄糖苷和花青素-3-O-芸香糖苷及小的芍药素和锦葵色素-3-O-芸香糖条带重叠。

国内学者利用高效液相色谱-电喷雾离子化串联质谱联用技术(HPLC-ESI-MS/MS)对蓝莓提取物中的花青素和黄酮醇进行了分析,结构上的不同导致花青素和黄酮醇在紫外-可见光谱吸收、离子化以及裂解方式上都存在差异^[38]。花青素在530nm附近有特征吸收,负离子模式下黄酮醇可以生成负离子和自由基负离子,而正离子型的花青素则几乎不产生质谱信号,这一显著差异可以区别花青素和黄酮醇。研究中鉴定了飞燕草定-3-O-葡萄糖苷,锦葵定-3-O-葡萄糖苷和槲皮素^[38]。

4 结论和展望

4.1 花青素物质的分离一般采用酸性醇溶液,利用超声波辅助萃取、微波萃取、加热萃取等方法进行。提取条件包括酸的浓度(pH)、醇浓度、浸提时间、浸提温度、料液比、提取次数等;在单因素实验基础上通过正交或者二次旋转回归方法对提取因素进行优化。总量测定方法为单一pH法和pH示差法;组分测定采用HPLC方法。

4.2 花青素使花瓣和果实呈现出亮丽的颜色,还具有延缓衰老、抗肿瘤细胞发生、预防心脑血管疾病、降血糖等多种生理功能。开发天然色素具有较高的使用安全性和功能性,因此相信随着社会的不断进步、科技的日益创新,在天然色素的开发领域花青素资源具有更加广泛的发展空间和前景。

参考文献

- [1] Paweł Pasko, Henryk Bartoń, Paweł Zagrodzki. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth[J]. Food Chemistry, 2009, 115: 994-998.
- [2] Awika JM, Rooney LW, Waniska RD. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties[J]. Food Chemistry, 2004, 90: 293-301.
- [3] Kuresh A, Youdim, Antonio M, et al. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2000, 29(1): 51-60.
- [4] Idolo Tedesco, Gian Luigi Russo, Filomena Nazzaro, et al. Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase - inactive human erythrocytes[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2001, 12: 505-511.
- [5] Kazimierz G, Katarzyna S, Barbara B, et al. Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from Aronia melanocarpa fruits[J]. Cancer Letters, 1997, 119: 37-46.
- [6] Neto CC, Amoroso JW, Liberty AM. Anticancer activities of

- cranberry phytochemicals: an update[J]. Mol Nutr Food Chem, 2008, 52: S18-S27.
- [7] Møller P, Lofta S, Alfthan G, et al. Oxidative DNA damage in circulating mononuclear blood cells after ingestion of blackcurrant juice or anthocyanin-rich drink[J]. Mutation Research, 2004, 551: 119-126.
- [8] Grace MH, Ribnicky DM, Kuhn P, et al. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry[J]. Vaccinium Angustifolium Aiton Phytomedicine, 2009, 16: 406-415.
- [9] 黎钱, 黄小凤, 李中林. 利用苦瓜子衣废料制备食用色素的研究[J]. 林产化工通讯, 2003, 37(2): 3-7.
- [10] Kerio LC, Wachira FN, Wanyoko JK, et al. Characterization of anthocyanins in Kenyan teas: extraction and identification[J]. Food Chemistry, 2012, 131: 31-38.
- [11] 王日为, 张丽霞, 高吉刚. 茶叶中花青素类物质研究展望[J]. 茶叶科学技术, 2002, 4: 4-8.
- [12] 李双伶, 郭俊凌, 杜晓. 茶树紫色芽叶中花青素的提取-层析分离及初步鉴定[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(28): 13799-13802, 13809.
- [13] 杨贤强, 王岳飞, 陈留纪, 等. 茶多酚化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 10-85.
- [14] 刘富知, 黄建安, 付冬和, 等. 茶树上红紫色芽叶部分生化特性研究[J]. 湖南农业大学学报, 2000, 26(1): 55-57.
- [15] 张玲, 邱松山, 麦建华, 等. 黑布林皮中花青素的提取工艺优化及稳定性研究[J]. 粮食与食品工业, 2009, 16(6): 36-40.
- [16] 孙千鸿, 黄聿明, 梁卉, 等. 微波法提取铜锤草花青素的研究[J]. 化工时刊, 2010, 24(6): 29-32.
- [17] 谭永平, 王桂跃, 陆国权. 紫玉米花青素的浸提技术研究[J]. 食品科技, 2007, 10: 182-184.
- [18] 贾士芳, 董洪霞, 董树亭. 微波辅助法提取紫玉米植株花青素工艺条件优化研究[J]. 中国食物与营养, 2011, 17(2): 56-60.
- [19] 王兆雨, 徐美玲, 朱蓓薇. 蓝莓花青素的提取工艺条件[J]. 大连轻工业学院学报, 2007, 26(3): 196-198.
- [20] 黄琼, 陈婵, 彭宏, 等. 微波法萃取紫色甘薯皮原花青素工艺的研究[J]. 食品科技, 2010, 35(4): 199-203.
- [21] 张鑫, 张志军, 李会珍, 等. 紫苏叶花青素的提取及测定[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(9): 187-190.
- [22] García-Viguera C, Zafrilla P, Tomas-Barberan FA. The use of acetone as extraction solvent for strawberry fruit anthocyanins[J]. Phytochemical Analysis, 1998, 9(6): 274-277.
- [23] Zheng YH, Wang CY, Wang SY, et al. Effect of high-oxygen atmospheres on blueberry phenolics anthocyanins, and antioxidant capacity[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2003, 51(24): 7162-7169.
- [24] 刘仁道, 张猛, 李新贤. 草莓和蓝莓果实花青素提取及定量方法的比较[J]. 园艺学报, 2008, 35(5): 655-660.
- [25] 赵尔丰, 高畅, 高欣, 等. 酶-超声波辅助提取蓝莓果渣中花青素的工艺研究[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(4): 98-102.

(下转第364页)

- [20] 章衡,池建伟,王文生.沙枣果实开发利用的研究[J].山西农业大学学报,1991,11(4):304-307.
- [21] 江发寿,谢建新,刘金荣,等.沙枣的营养成分分析及沙枣油的理化常数测定[J].石河子大学学报:自然科学版,2002,6(1):20-22.
- [22] 王雅,赵萍,王玉丽,等.野生小沙枣营养成分研究[J].甘肃农业大学学报,2006,41(6):130-132.
- [23] 张应年.沙枣中维生素C的测定[J].化学世界,1995,36(7):379-382.
- [24] 姬华,李应彪.沙枣食品的开发与利用[J].果菜,2006,(4):45-46.
- [25] 丁玉松,马儒林,牛强,等.沙枣多糖的抗氧化实验研究[J].农垦医学,2009,31(6):511-513.
- [26] Cansev A, Sahan Y, Celik G. Chemical properties and antioxidant capacity of *Elaeagnus angustifolia* L. fruits [J]. Asian Journal of Chemistry, 2011, 23(6):2661-2665.
- [27] 廉宜军,李炳奇,肖芙蓉,等.沙枣多糖对小鼠免疫功能影响的研究[J].时珍国医医药,2009,20(5):1126-1127.
- [28] 孙建新,朱虎虎,肖辉,等.4种新疆植物提取物对人肝癌细胞生长抑制作用的研究[J].新疆医科大学学报,2008,31(7):828-830.
- [29] Ahmadiani, J, Hosseiny, S, Semnanian. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of *Elaeagnus angustifolia* fruit extract [J]. Journal of Ethno Pharmacology, 2000, 72:287-292.
- [30] Karimi G, Hosseinzadeh H, Rassoulzadeh M. Antinociceptive Effect of *Elaeagnus angustifolia* Fruits on Sciatic Nerve Ligated Mice [J]. Iranian Journal of Basic Medical Science, 2010, 13(3):97-101.
- [31] 买尔旦·马合木提,阿孜古力·吾司曼,古丽仙·胡加.沙枣水提取物抗炎、镇痛、解热及抗菌作用研究[J].西北药学杂志,2011,26(1):43-46.
- [32] 陶大勇,李树伟,应璐,等.沙枣化学成分的提取分离及药敏实验[J].中兽医医药杂志,2005(3):10-13.
- [33] 麦合苏木·艾克木,买尔旦·马合木提.新疆沙枣提取物对实验性小鼠腹泻以及小肠推进功能的影响[J].新疆医学,2007,37(3):1-3.
- [34] 多里坤·木扎帕尔,吐尔逊娜依·玉山,古丽娜尔·乌拉孜别克.沙枣治疗婴幼儿急性腹泻病的临床研究[J].儿科院学杂志,2007,13(1):18-20.
- [35] 丁玉松,王忠,马儒林,等.沙枣多糖抗疲劳作用及其机制的研究[J].食品科学,2010,31(11):255-257.
- [36] Hossein H, Mohammad R, Nazanin N. Muscle relaxant activity of *Elaeagnus angustifolia* L. fruit seeds in mice [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2003, 84:275-278.
- [37] Bucur L, Negreanu - P T, Giurginca M, et al. Some new *Elaeagnus angustifolia* L. extracts and the pharmaceutical products antioxidant activities determined by the chemiluminescence method [J]. Revue roumaine de chimie, 2008, 53(10):961-961.

(上接第360页)

- [26] 罗正飞,梁明志,夏丽飞,等.“紫鹃”茶花青素提取工艺研究[J].福建茶业,2011,3:22-24.
- [27] 黄易欢.茶学实验技术[M].北京:中国农业出版社,1995:125-126.
- [28] Dai J, Gupte A, Gates L, et al. A comprehensive study of anthocyanin - containing extracts from selected blackberry cultivars; Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms [J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47:837-847.
- [29] 姚钰蓉.紫甘薯花青素的提取纯化、稳定性及抗氧化活性研究[D].保定:河北农业大学,2006:19-21.
- [30] 肖丽霞,汪芬,张超,等.提取剂对紫玉米花青素提取量的影响[J].农产品加工·创新版,2009,6:38-44.
- [31] 李升锋,徐玉娟,张友胜,等.玫瑰茄花青素提取条件优化研究[J].广东农业科学,2006,11:83-86.
- [32] Ben Amor B, Allaf K. Impact of texturing using instant pressure drop treatment prior to solvent extraction of anthocyanins from Malaysian Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) [J]. Food Chemistry, 2009, 115:820-825.
- [33] 陈琼,陆瑞琼.茶树芽叶花色苷含量测定方法的研究[J].北京工商大学学报:自然科学版,2011,29(2):41-44.
- [34] Nafiz Oncu Can, Goksel Arli, Zeki Atkosar. Rapid determination of free anthocyanins in foodstuffs using high performance liquid chromatography [J]. Food Chemistry, in press.
- [35] Josep Valls, Silvia Millán, M Pilar Martí, et al. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216:7143-7172.
- [36] Michael Schwarz, Silke Hillebrand, Saskia Habben. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins [J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 14:179-189.
- [37] Cato Frøytlog, Rune Slimestad, Øyvind M Andersen, et al. Combination of chromatographic techniques for the preparative isolation of anthocyanins-applied on blackcurrant (*Ribes nigrum*) fruits [J]. Journal of Chromatography A, 1998, 825:89-95.
- [38] 袁帅,姚胜军,耿昱,等.HPLC-ESI-MS/MS 识别蓝莓提取物中的花青素和黄酮醇 [J]. 化学学报, 2009, 67(4):318-322.

全国中文核心期刊

轻工行业优秀期刊