

超声波法制备紫葡萄皮花色苷

章谷成¹,袁海娜²,肖功年²

(1. 浙江省食品工业协会,杭州 310006;2. 浙江科技学院 生物与化学工程学院,杭州 310023)

摘要:以新鲜紫葡萄皮为原料,采用超声波辅助萃取法,制备了紫葡萄皮花色苷(APGS)。实验考察了 APGS 的色泽变化与光谱学性质,通过纸色谱和薄层色谱对 APGS 进行了分析。实验结果判定 APGS 是由 2 种以上花色苷类化合物组成。通过 pH 值示差法测得 100 g 新鲜葡萄皮中 APGS 得率为 145 mg。

关键词:花色苷;超声波萃取;pH 示差法

中图分类号: TS264.4

文献标志码: A

文章编号: 1671-8798(2011)04-0289-04

Preparation of anthocyanins from purple grape skins by ultrasonic technology

ZHANG Gu-cheng¹, YUAN Hai-na², XIAO Gong-nian²

(1. Zhejiang Association of Food Industries, Hangzhou 310006, China; 2. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China)

Abstract: Using the fresh purple grape skins as the raw material, we apply the technology of ultrasonic assistant extraction to prepare anthocyanins from purple grape skins (APGS). Its color and optical spectroscopy properties are studied. The filter paper chromatography and thin layer chromatography are simultaneously used to identification APGS. The results show that APGS is composed of over two kinds of anthocyanins compounds. The concentration is determined by pH differential method and the extraction ratio of APGS is 145 mg/100g fresh grape skins.

Key words: anthocyanins; ultrasonic assistant extraction; pH differential method

花色苷(Anthocyanin)是一类水溶性色素,由花色苷配基(即花色素)和糖基以糖苷键结合形成。其中花色素是类黄酮化合物^[1-3],属于多酚类物质。食品中常见的花色苷主要有:花翠素(飞燕草色素)、花青素(矢车菊素)、3'-甲花翠素(牵牛花色素)、甲基花青素(芍药色素)、二甲花翠素(锦葵色素)、天竺葵色素等种类^[4-9]。据报道,花色苷具有降低肝脏及血清中脂肪含量、抗氧化、抗肿瘤、延缓血小板凝集等保健和药

收稿日期: 2011-03-07

基金项目: 浙江省重大科技专项重点农业项目(2009C12032)

作者简介: 章谷成(1961—),男,浙江省绍兴人,工程师,主要从事食品新产品开发。

理作用^[10],在食品、化妆品、医药领域有着巨大的应用潜力。

葡萄花色苷是一种天然食用色素,主要分布于葡萄的果皮、果肉、葡萄籽、芽鳞片等部位,果皮含量最高^[3-4]。本实验采用超声波辅助萃取技术制备了紫葡萄皮花色苷(anthocyanin from purple grape skin, APGS),研究了 APGS 的色泽变化、光谱学性质和定量测定方法,并采用纸层析和薄层层析方法对 APGS 进行了初步组分检测,为 APGS 的应用开发提供了重要的实验和理论依据。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

1.1.1 主要仪器

UV-2102PC 紫外可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司),CF15R HITACH 冷冻离心机(天肯(上海)贸易有限公司),DHG-9023 型全自动电脑干燥箱(杭州蓝天化验仪器厂),RE-52AA 旋转蒸发仪器(上海亚容生化仪器厂),KQ3200B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),AB 204-N 电子天平(上海世义精密仪器有限公司)。

1.1.2 材料与试剂

原料:新鲜杭州产“巨峰”紫葡萄,购于杭州市留下菜市场,去除果肉,取葡萄皮。

主要试剂:无水乙醇、浓盐酸、醋酸、甲醇、蒸馏水、正丁醇、冰醋酸、盐酸、异丁醇、无水乙酸钠等,以上均为分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 APGS 的制备

选取新鲜紫皮葡萄,去除果肉,准确称取鲜葡萄皮 100 g,以预冷的 70%乙醇匀浆,按固液比 1:7 加入体积分数为 70%的乙醇,并以 1%盐酸调节料液 pH 值为 3.5,采用超声波浸提 30 min(超声波频率 40 kHz,功率 150 W),浸提液于 4℃离心,取上清液于(35±3)℃真空旋转蒸发,得 APGS 浸膏,冷藏备用。

1.2.2 APGS 吸收光谱及最大吸收波长的确定

取一定量的 APGS 浸膏,经适当稀释,以 70%乙醇为空白,检测其 200~700 nm 波长下的吸收图谱,并确定 APGS 在可见光区的最大吸收波长,记 λ_{\max} 。

1.2.3 APGS 定量测定方法

采用 pH 示差法测定 APGS 的含量。取适量 APGS 浸膏,并以 70%乙醇溶解,分别加入 pH 4.5 NaAc-HCl 和 pH 1.0 KCl-HCl 的缓冲溶液,混匀。静置 2 h 后,分别测定不同 pH 值下 APGS 溶液在 λ_{\max} 和 700 nm 处的吸光值变化。

根据 Fuleki^[11]的研究,APGS 的得率 ω (mg/100g)和 APGS 的质量浓度 C (mg/L)的计算方法如下:

$$\omega = \frac{\Delta A \cdot V \cdot F \cdot 100}{avE_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot m}$$

$$C = \frac{\Delta A \cdot F}{avE_{1\text{cm}}^{1\%}}$$

式中: $\Delta A = (A_{\lambda_{\max}} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{\lambda_{\max}} - A_{700})_{\text{pH}4.5}$; V 为花色苷溶液体积, mL; F 为稀释倍数; $avE_{1\text{cm}}^{1\%}$ 为平均消光系数, 98.2^[12]; m 为鲜葡萄皮质量, g。

1.2.4 APGS 的分离

分别采用纸层析(PC)(层析滤纸为新华 3 号滤纸)和硅胶薄层层析(TLC)分离 APGS。展开剂为 $m_{\text{正丁醇}} : m_{\text{冰醋酸}} : m_{\text{水}} = 4 : 1 : 5$,观察层析斑点颜色变化,计算其 Rf 值。

2 结果与讨论

2.1 APGS 的呈色反应

检测发现,APGS 的色泽受 pH 值和一些化学物质的干扰和影响,结果见表 1 和表 2。

表 1 不同 pH 值对 APGS 的色泽影响

Table 1 Effects of pH values on color of APGS

pH 值	颜色	pH 值	颜色
1.0	橙红色	7.0	浅黄
3.0	淡红	9.0	浅蓝
4.5	红黄	11.0	暗蓝

由表 1 可见,随着 pH 值由小变大时,APGS 颜色从橙色、红色、黄色到蓝色逐渐变化,此种颜色变化与文献报道的花色素变化规律相一致^[13],初步说明 APGS 为花色苷类色素。同时,APGS 色泽的呈现受 pH 值的影响较大,在一般食品 pH 值范围内多呈现黄色。而且食品中的某些化学物质或元素也影响花色苷的呈色状况,见表 2。因此在添加了膨松剂(如小苏打、碳酸氢铵等)及强化镁、铁等元素的食品中,APGS 的应用应考虑对其色泽变化的影响^[14]。

2.2 APGS 吸收光谱及最大吸收波长的检测

将适当质量浓度的 APGS 溶液进行紫外-可见吸收光谱检测,测定结果见图 1。

从图 1 可知,APGS 在紫外区存在 238 nm 和 281 nm 处的 2 个最大吸收波长,同时可见区也存在 539 nm 处的最大吸收波长。本实验所得 APGS 的紫外-可见区的光谱吸收情况与文献报道基本一致^[13],说明 APGS 中含有花色苷类色素。

2.3 APGS 的层析检测

为了进一步除去 APGS 浸膏中的极性杂质,向其中加入 3~5 倍体积的石油醚,反复沉淀后,以乙酸乙酯溶剂萃取 3 次,收集水相,并除去水相中残留的乙酸乙酯,得 APGS 水剂产品,冷藏备用。

APGS 纸层析结果(图 2)发现,层析纸上自上而下依次出现紫红色、桃红色和黄绿色斑点,且紫红色、红色斑点体积均大于黄绿色斑点体积,表明 APGS 中红色色素含量较大,而且由 2 种以上色素组成。将滤纸条移至紫外灯下观察,发现显红色的斑点无明显变化,而呈黄绿色的斑点呈现黄绿色荧光;将滤纸条再移至氨气瓶口观察,红色斑点呈现为黄色,而黄绿色斑点无明显变化。APGS 水剂产品经纸层析后,自上而下依次出现紫红色和桃红色斑点,未出现黄绿色斑点。据文献^[15]可推断,显红色斑点的色素属于花色苷类色素,黄色、黄绿色斑点则是类黄酮类色素,在 APGS 除杂质的过程中被除去。APGS 水剂产品经过薄层层析分离后,硅胶薄层色谱板上出现了粉红色和紫红色斑点(图 3),计算其 R_f 值分别为 0.64 和 0.85。

表 2 不同化学物质与 APGS 的呈色反应

Table 2 Color reactions of APGS with different chemical materials

试剂	呈色反应	试剂	呈色反应
氨水	蓝色	镁与盐	淡红色
浓硫酸	橙黄色	酸混合	
碳酸钠	浅蓝色	三氯化铁	暗蓝色

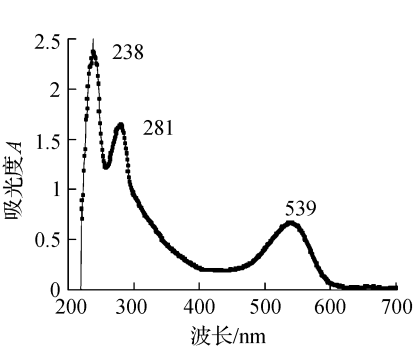


图 1 APGS 紫外-可见吸收图谱

Fig. 1 UV-Vis absorbance spectrum of APGS

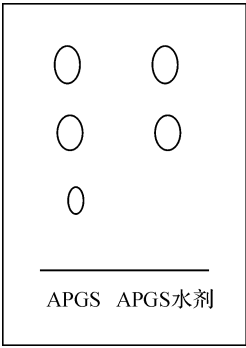


图 2 APGS 纸层析图谱

Fig. 2 Paper chromatography spectrum of APGS extracts

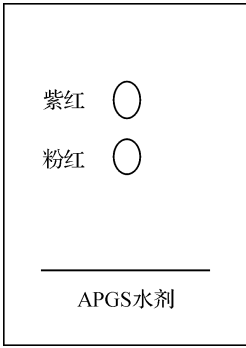


图 3 APGS 薄层层析层析图谱

Fig. 3 Thin layer chromatography spectrum of APGS extracts

纸层析和薄层层析结果均说明:以紫葡萄皮为原料,采用超声波提取技术所制得 APGS 中含有花色苷色素。但其品种不是单一的,进一步采用层析分离技术与质谱、核磁等分析手段,明确 APGS 中花色苷色素的组成,这是笔者今后对花色苷开发研究的方向之一。

2.4 APGS 的定量测定

APGS 在 pH 值 1.0 和 pH 值 4.5 时的吸光值结果见表 3。

由 1.2.3 中公式计算得 $\Delta A=0.04$,按照 Fuleki^[11] 的 pH 值示差法测定 APGS 的得率和质量浓度分别为:

$$\omega = \frac{\Delta A \cdot V \cdot F \cdot 100}{avE_1^1\% \cdot m} = \frac{0.04 \times 250 \times 100 \times 100}{98.2 \times 7} = 145(\text{mg}/100\text{g})$$
$$C = \frac{\Delta A \cdot F}{avE_1^1\%} = \frac{0.04 \times 100 \times 1000}{98.2} = 40.73(\text{mg}/\text{L})$$

3 结 语

中国具有丰富的葡萄资源,而且葡萄饮料和酿酒工业中存在的大量葡萄皮残渣,均可制备花色苷色素。因此,葡萄花色苷具有良好的综合开发前景。考虑到紫葡萄的品种、产地、气候等因素所引起的花色苷分布的差异性,本实验中均采用了分布广泛的杭州产“巨峰”紫葡萄为原料,采用超声波辅助萃取制备了 APGS。通过光谱学、纸层析和薄层层析分析,在 APGS 浸膏中初步发现了 2 种以上的呈红色花色苷色素。pH 值示差法测得 APGS 中花色苷含量为 145 mg/100 g。实验结果说明了超声波萃取技术应用于花色苷类色素制备的可行性。

参考文献:

[1] 高锦明. 植物化学[M]. 北京:科学出版社,2003:156-164.

[2] 刘邻渭. 食品化学[M]. 北京:中国农业大学出版社,2002:156-164.

[3] 丁锐. 国外花色苷的研究现状与进展[J]. 汉中师范学院学报:自然科学版, 2004(6):73-79.

[4] 任雁, 张惟广. 花色苷的研究进展[J]. 中国食品添加剂,2006(4):71-77.

[5] 庞志申. 花色苷研究概况[J]. 北京农业科学,2000,18(5):37-42.

[6] 卢钰,董现义,杜景平,等. 花色苷研究进展[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2004,35(2):315-320.

[7] MANN J. Secondary Metabolism [M]. London:Oxford University Press, 1987:275-285.

[8] BELL E A. Secondary Plant Products [M]. New York:Springer,1980:340-349.

[9] 邓洁红,谭兴和,潘小红,等. 葡萄花色苷研究进展[J]. 包装与食品机械,2006,24(6):22-28.

[10] 方忠祥,倪元颖. 花青素生理功能研究进展[J]. 广州食品工业科技,2001,17(3):60-62.

[11] FULEKI T, RICARDO DA SILVA J M. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in ontario [J]. J Agric Food Chem, 1997, 45(4):1156 - 1160.

[12] 徐金瑞,张名位,刘兴华,等. 黑大豆种质抗氧化能力及其与总酚和花色苷含量的关系[J]. 中国农业科学,2006,39(8):1545-1552.

[13] HARBORNE J B. 黄酮类化合物[M]. 戴伦凯,等,译. 北京:科学技术出版社,1983.

[14] 古丽伯斯坦. 紫葡萄皮色素的理化性质研究[J]. 新疆师范大学学报,2001,20(3):53-57.

[15] SHI Z, Balsa I A, GABRIEL S L, et al. Procyanldins pigment of sweet potatoes-Ipomoea batatas [J]. J Food Sci, 1992, 57(3):755-757.

表 3 不同 pH 值下 APGS 的吸光值
Table 3 Absorbance of APGS with different pH values

pH 值	A _{539 nm}	A _{700 nm}	ΔA
1.0	0.053	0.005	0.04
4.5	0.015	0.007	