

不同溶剂和保存条件对尾叶悬钩子 花色素苷提取及稳定性的影响

陈炳华, 刘剑秋

(福建师范大学生物工程学院, 福建 福州 350007)

摘要: 对尾叶悬钩子 (*Rubus caudifolius* Wuzhi) 鲜果中花色素苷的提取条件、主要化学组分及 pH 值、温度、没食子酸和 Al^{3+} 对其颜色及稳定性的影响进行了分析探讨。结果表明, 尾叶悬钩子花色素苷的主要组分可能为矢车菊素-3-葡萄糖苷; pH 值和温度影响该花色素苷的色泽及其稳定性, 随着 pH 值和温度的增加, 其分解加剧, 且花色素苷的分解均遵循动力学一级反应规律; 添加不同浓度的 Al^{3+} , 色素溶液的吸光值有所升高, 显示出有一定的增色效应, 但 Al^{3+} 和没食子酸对贮藏期间花色素苷的稳定性及色泽均无明显效果。

关键词: 尾叶悬钩子; 花色素苷; 提取; 稳定性; 贮存条件

中图分类号: Q946.836; S663.201 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2003)04-0011-05

Influence of different solvents and storage conditions on extraction and stability of anthocyanin from *Rubus caudifolius* Wuzhi fruit CHEN Bing-hua, LIU Jian-qiu (College of Bioengineering, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2003, 12(4): 11-15

Abstract: The extraction conditions and main components of anthocyanin from *Rubus caudifolius* Wuzhi fruit, as well as the effects of pH value, temperature, gallic acid and Al^{3+} ion on the color and stability of anthocyanin were analyzed. The results showed that the main component of this anthocyanin was probably similar to cyanidin-3-glucoside by means of paper chromatograph, thin layer chromatograph, UV and IR spectra. The pH value and temperature effected the color and stability of the anthocyanin, with the pH and temperature increase, the degradation of anthocyanin were faster, and followed the firstorder reaction of chemical kinetics. When Al^{3+} ion was added with different concentration, the absorbance of anthocyanin at 510 nm increased. It showed Al^{3+} ion had some certain effects of color improving, but no significant effect of Al^{3+} and gallic acid on the color and stability of anthocyanin during storage.

Key words: *Rubus caudifolius* Wuzhi; anthocyanin; stability; storage conditions

尾叶悬钩子 (*Rubus caudifolius* Wuzhi) 系蔷薇科悬钩子属 (*Rubus* L.) 蔓生性灌木, 自然分布于福建、浙江、广西和云南等省区, 多见于海拔 500 m 左右的山坡灌丛或林缘^[1]。其果实成熟时为紫黑色, 柔软多汁, 富含天然红色素, 该类色素属水溶性花色素苷类, 光、热、pH 值、氧化还原介质 (如 H_2O_2 、 Na_2SO_3)、维生素 C 及金属离子 (如 Fe^{3+} 、 Zn^{2+}) 等都会影响其稳定性, 而食品添加剂如蔗糖、葡萄糖、柠檬酸及苯甲酸钠等对其稳定性则无不良影响, 且有不同程度的护色效果^[2]。

在体外 (*in vitro*) 花色素苷颜色受 pH 值的影响较大^[3]。另外, 花色素苷能与某些共色素 (copigment) 或金属离子结合而呈现出增色效应, 从而延缓分解。现已知, 无色的类黄酮和多酚类是高

等植物中最常见的共色素, 金属离子中的 Al^{3+} 、 Mg^{2+} 和 Fe^{3+} 等也会与某些花色素苷结合, 形成高度着色且稳定的金属络合物^[4]。鉴于尾叶悬钩子鲜果直接可鲜食, 宜作为天然食用红色素加以开发利用。为此, 在前文^[2]研究的基础上, 本试验着重从提取溶剂的选择、花色素苷的分离及初步鉴定, 及 pH 值和温度对花色素苷的分解规律等加以探讨, 并就没食子酸和 Al^{3+} 能否作为其共色素做了尝试, 以期为提高尾叶悬钩子花色素苷的稳定性和选择合适的提取条件提供理论依据。

收稿日期: 2003-04-17

作者简介: 陈炳华 (1970-), 男, 福建长汀人, 硕士, 讲师, 主要从事植物资源化学的科研及植物学教学工作。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

尾叶悬钩子成熟果实采自福建省永泰县葛岭, 采摘后洗净沥干, 置于 -25°C 冰箱中保存, 备用。试剂均为分析纯。仪器: 752 型紫外光栅分光光度计、PHS-25 型酸度计(上海雷磁仪器厂)、UV-2201 型紫外可见分光光度计(日本岛津)、RE-52AAA 旋转蒸发器(上海嘉鹏)、360-FT 型红光分光光度计(美国尼高力公司)。

1.2 提取剂的选择

为了选择合适提取剂, 各称取 1.00 g 尾叶悬钩子果实, 匀浆, 分别以 1.5 mol/L HCl-95% EtOH (pH 3.0)、0.2% HCl-MeOH (pH 3.0)、0.2% HCl-95% EtOH、0.2% HCl、0.2% 柠檬酸、0.2% 草酸、柠檬酸-磷酸盐缓冲液 (pH 3.0) 及蒸馏水各 50 mL, 浸提 12~18 h, 过滤, 再用相应的提取剂定容至 50 mL, 分别于最大吸收峰处测定各自的吸光度。比较不同色素提取液的 $A(\lambda_{\max})$ 值, 筛选出合适的提取剂。

1.3 花色苷的提取及初步鉴定

1.3.1 提取 尾叶悬钩子鲜果捣碎, 用 1.5 mol/L HCl-95% EtOH (pH 3.0) 浸提, 抽滤得红色素液, 减压浓缩得粗制色素浸膏, 再用 60%~75% EtOH 除果胶, 浓缩至少量后, 上微晶纤维素柱, 用酸性乙醇洗脱, 洗脱液减压浓缩得暗红色色素浸膏。

1.3.2 光谱特征 紫外可见光光谱: 分别配制一定浓度的 1.5 mol/L HCl-95% EtOH (pH 3.0) 和 0.2% HCl-MeOH 的色素溶液, 用岛津 UV-2201 型紫外可见光分光光度计扫描(波长 200~700 nm), 记录吸收光谱图及最大吸收峰 (λ_{\max})。

红外光谱: 暗红色粉末, 经 KBr 压片后, 进行红外扫描, 光谱测量范围为 $3500\sim 600\text{ cm}^{-1}$ 。

1.3.3 纸上色谱与薄层层析 纸上色谱: 使用新华 3* 层析纸, 展开剂为 ① BAW: V(正丁醇): V(醋酸): V(水) = 4:1:5; ② 1% HCl: V(水): V(浓盐酸) = 43:3; ③ HOAc-HCl: V(醋酸): V(浓盐酸): V(水) = 15:3:82; ④ BuHCl: V(正丁醇): V(2 mol/L HCl) = 1:1。

薄层层析: 自制 CMC-Na 硅胶 G 薄板, 展开剂为 V(乙酸乙酯): V(丁酮): V(甲酸): V(水) = 5:3:3:1。

1.4 花色苷的稳定性

1.4.1 不同 pH 值的影响 用 0.2 mol/L KCl-HCl 和 0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液配制成色素量 0.1%、pH 值为 1~7 的系列溶液, 用岛津 UV-2201 型紫外可见光分光光度计测定不同 pH 处理的花色素苷在 400~600 nm 的吸光度值, 并于室温下放置 35 d, 定期取样, 测定不同 pH 值溶液的吸光度 (510 nm) 值及目测色素液颜色的变化。

1.4.2 不同温度的影响 取 pH 3.0 的 1.5 mol/L HCl-95% EtOH 及 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液色素液, 分别置于 60°C 、 80°C 及 100°C 的恒温水浴中处理, 每隔一定时间取样, 待冷却后, 分别于 510 nm 或 535 nm 处测其吸光度, 并观察色素液颜色变化。

1.4.3 Al^{3+} 和没食子酸的影响 用 AlCl_3 配制含 Al^{3+} 离子 50、100、200 和 300 mg/L 的色素溶液 (pH 3.0), 用没食子酸配制含没食子酸 100、200、400 和 600 mg/L 的色素溶液 (pH 3.0), 再分别以不含 Al^{3+} 离子或没食子酸的等体积的 pH 3.0 的磷酸盐缓冲液色素溶液作为空白对照。将上述各溶液于室温下放置一定时间, 定期取样, 测定各自的吸光度 (510 nm) 值。

2 结果与讨论

2.1 不同溶剂提取红色素的比较

用不同溶剂提取尾叶悬钩子红色素的比较结果见表 1。尾叶悬钩子果实色素在酸性溶液中呈现出亮丽的红色, 且随 pH 值的降低, 红色逐渐加深; 醇溶液的浸提效果优于水溶液, 其中 1.5 mol/L HCl-95% EtOH、0.2% HCl-95% EtOH 和 0.2% HCl-MeOH 等 3 种溶剂提取效果较为接近。从降低提取剂的毒性等因素考虑, 选取 1.5 mol/L HCl-95% EtOH (pH 3.0) 为最适提取剂。

2.2 花色苷的光谱特征

不同 pH 条件下尾叶悬钩子花色苷的可见光吸收光谱见图 1。结果表明, $\text{pH} \leq 4.0$, 花色苷在波长 510 nm 处有最大吸收, 呈现出其特征性吸收峰, 这与矢车菊素-3-葡萄糖苷在缓冲液中测定的可见光谱结果一致^[3]。随着 pH 的增加, 在 510 nm 处的吸光值减小, 当 pH 6.0 时特征吸收峰几乎消失, 而色素溶液也在该 pH 值下褪色; 当 pH 值增至 7.0 后, 色素溶液变为浅褐色, 无吸收峰。

表1 尾叶悬钩子果实红色素不同提取剂的比较

Table 1 Comparison of different solvents for extraction of the red pigment from *Rubus caudifolius* Wuzhi fruit

编号 Number	提取剂 Extraction solvents	pH值 pH value	稀释倍数 Diluted multiple	溶液色泽 Color	λ_{\max}	$A_{\lambda_{\max}}$
1	0.2% HCl	1.7	2.5	红色 Red	510	0.886
2	0.2% Citric acid	2.7	2.5	红色 Red	510	0.307
3	0.2% Oxalic acid	2.1	2.5	红色 Red	510	0.980
4	Citric acid-phosphate buffer solution	3.0	8.0	红色 Red	510	0.646
5	1.5 mol/L HCl-95% EtOH	3.0	25.0	紫红色 Purplish red	535	0.773
6	0.2% HCl-95% EtOH	3.0	20.0	紫红色 Purplish red	535	0.818
7	0.2% HCl-MeOH	3.0	20.0	紫红色 Purplish red	530	1.130
8	Distilled water	6.8	2.5	浅咖啡色 Light coffee	-	-

花色苷醇溶液的紫外可见分光光度计扫描结果表明,该花色苷在 1.5 mol/L HCl-95% EtOH 溶液中有 3 个吸收峰,分别位于 220、282 和 535 nm 处;在 0.2% HCl-MeOH 溶液也有 3 个吸收峰,分别位于 232、280 和 530 nm 处,表明尾叶悬钩子花色苷在紫外光区有 2 个强烈的吸收峰,即在 240 nm 以下和在 280 nm 左右;可见光区 510~540 nm 范围内也有 1 个大的吸收峰,且可见光区内甲醇液比乙醇液向紫外移 5 nm;此外,在 310~335 nm 之间无吸收峰,表明花色苷与糖的联结中无肉桂酸式结构,而是直接联结成苷。与有关文献和图谱比较^[5,6],显示出该花色苷是矢车菊素-3-葡萄糖苷。

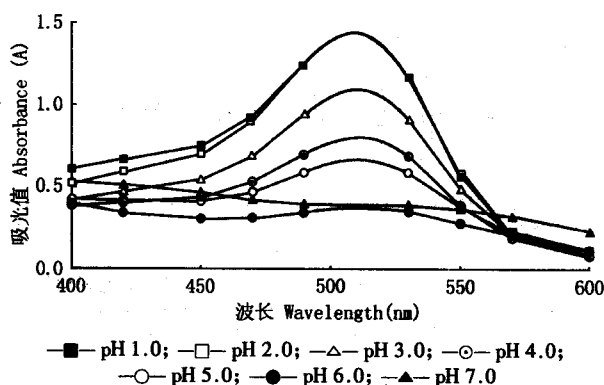


图1 不同 pH 条件下尾叶悬钩子花色苷的可见光吸收光谱
Fig. 1 Spectra of the anthocyanin from *Rubus caudifolius* Wuzhi fruit at different pH value

红外光谱表明,有几种基团的特定吸收:3300 cm^{-1} ,表明有 -OH 存在;2980、1680、1460 和 1380 cm^{-1} 表明有矢车菊素;2890、1380、1050 和 1090 cm^{-1} 显示葡萄糖结构的吸收峰^[5]。

2.3 花色苷的层析检识

用 4 种展开剂进行纸上色谱。结果表明,不同展开剂下尾叶悬钩子花色苷均显示出 1 个大且明

显的斑点,呈蓝红色,其 R_f 值具体如下:BAW 展层 R_f 值为 0.41, BuHCl 展层 R_f 值为 0.28, 1% HCl 展层 R_f 值为 0.16, HOAc-HCl 展层 R_f 值为 0.36。这些结果显示该花色苷主要由 1 种花色苷类组成,且与文献^[6]报道的矢车菊素-3-葡萄糖苷的纸上色谱结果相近;薄层层析结果也仅显示 1 个斑点($R_f = 0.73$)。

2.4 pH 值对花色苷稳定性的影响

在不同 pH 缓冲液中室温下放置 35 d 后,尾叶悬钩子果实花色苷呈现不同的颜色变化,在 pH 1.0 和 pH 2.0 时由鲜红变为橙红;pH 3.0 时由橙红变为浅棕红;pH 4.0、pH 5.0 时由浅红变为微红,略带紫色;pH 6.0、pH 7.0 时由浅紫、浅褐色变为褐色及黄褐色。可见,尾叶悬钩子果实花色苷的色泽依赖于 pH 值,提高 pH 将导致花色苷的褪色和变色。

从图 2 可知,花色苷在 pH 1.0 和 pH 2.0 缓冲液中分解速度最慢,且色泽上能长时间保持红色,这主要以带正电的花苷形式存在^[4],呈较稳定的红色;随着 pH 值提高,花色苷分解加快,如 pH 3.0 色素液中吸光度值为 0.963,是 pH 1.0 的 77.29%;pH 6.0 为 0.291,是 pH 1.0 的 23.35%;贮藏期间,花色苷在 pH 7.0 时迅速分解,15 d 后含量降为 0,而 pH 3.0 保存率为 95.33%。以色素液保存率的对数 $\lg A_0/A_t$ (A_0 为起始时的吸光度值, A_t 为贮藏期间定期取样时测定的吸光度值)为纵坐标,放置天数为横坐标作图(见图 3),表明在不同 pH 值下花色苷分解的动力曲线均呈直线,显示花色苷的分解为一级反应,可以推断花色苷的分解方式为裂解反应^[7]。

2.5 温度对花色苷稳定性的影响

不同温度对尾叶悬钩子花色苷保存率的影响见图 4。从图 4 可知,温度对花色苷稳定性也具有显著影响,随着温度的升高,分解速度迅速加快,且在相同温度条件下,在 HCl-EtOH 液中比在磷酸盐缓

冲液中分解更快。在 100℃ 时, 240 min 内分解至很低水平, 颜色也由红色变为浅褐色; 而在 5℃ 下贮藏, 无论是磷酸盐缓冲液还是 HCl-EtOH 液, 经 60~90 d 后仍没有明显的颜色变化。在不同温度下花色苷的分解也遵循一级动力学反应规律^[5](图 5)。可见, 低温对于保持尾叶悬钩子花色苷稳定性有利。

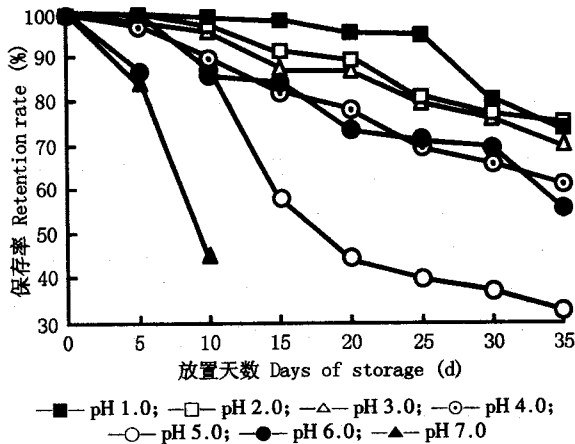


图 2 不同 pH 值对尾叶悬钩子花色苷保存率的影响
Fig. 2 Effects of different pH values on retention rate of anthocyanin from *Rubus caudifolius* Wuzhi fruit

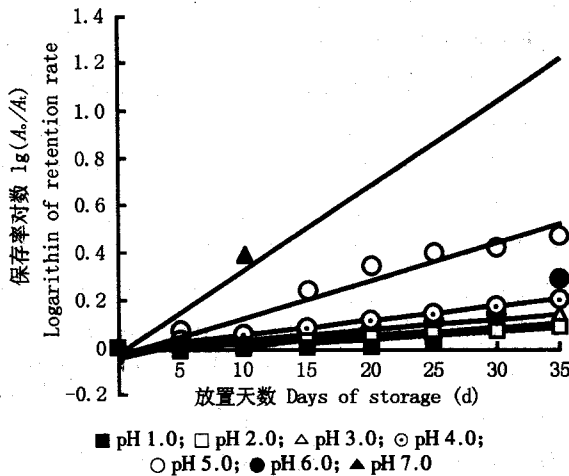


图 3 不同 pH 值中尾叶悬钩子花色苷降解的动力学曲线
Fig. 3 Kinetics of degradation of anthocyanin from *Rubus caudifolius* Wuzhi fruit at different pH values

2.6 Al³⁺ 对花色苷稳定性的影响

不同浓度 Al³⁺ 对尾叶悬钩子花色苷保存率的影响见表 2。结果表明, 随着 Al³⁺ 浓度的增加, 花色苷溶液的吸光度值有所上升, 当 Al³⁺ 浓度达 300 mg/L 时, 吸光度值由 0.687 增至 0.741, 是对照的

107.9%, 表明 Al³⁺ 有一定的增色效应。在室温下贮藏 18 d 内, 含 4 种不同 Al³⁺ 浓度的花色苷溶液, 其保存率及降幅与对照相近, 溶液色泽变化也与对照相似。可见, 贮藏期间 Al³⁺ 对花色苷的稳定性无明显影响。

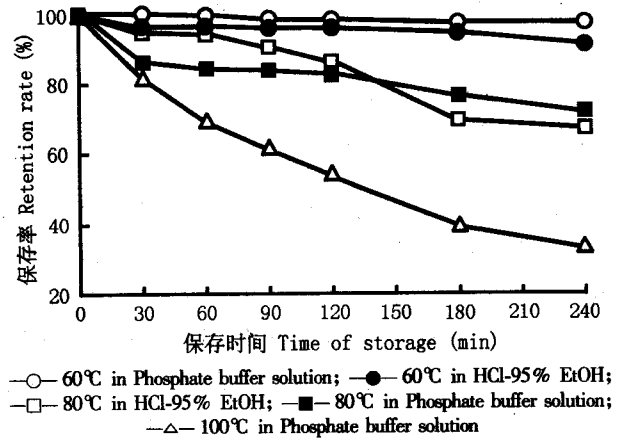


图 4 温度对尾叶悬钩子花色苷保存率的影响
Fig. 4 Effects of temperature on retention rate of anthocyanin from *Rubus caudifolius* Wuzhi fruit

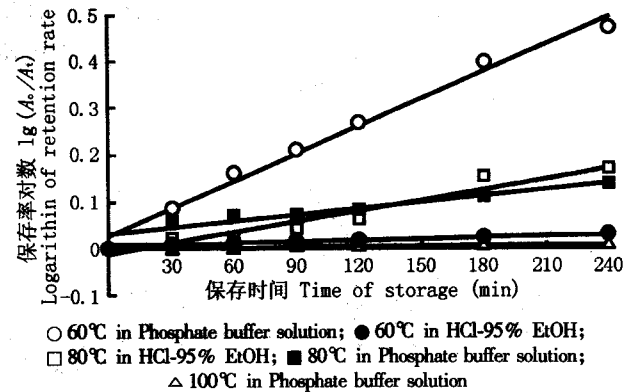


图 5 不同温度下尾叶悬钩子花色苷降解的动力学曲线
Fig. 5 Kinetics of degradation of anthocyanin from *Rubus caudifolius* Wuzhi fruit at different temperature

2.7 没食子酸对花色苷稳定性的影响

不同浓度没食子酸对尾叶悬钩子花色苷稳定性的影响见表 3。从表 3 可知, 尾叶悬钩子花色苷的分解速度不随没食子酸浓度的增加而发生变化, 且与对照(CK)接近, 说明没食子酸对花色苷的稳定性无明显效果; 从颜色的变化看, 贮藏 35 d 内, 也未见明显的增色效应, 因此, 作为多酚类前体物质的没食子酸不能作为该花色苷的共色素。

表2 不同浓度 Al^{3+} 对尾叶悬钩子花色苷稳定性的影响¹⁾Table 2 Effects of different Al^{3+} concentration on the stability of anthocyanin from *Rubus caudifolius* Wuzhi fruit¹⁾

时间 Time (d)	不同 Al^{3+} 浓度下的吸光度值 Absorbance in different Al^{3+} concentration				
	0(CK)	50 mg/L	100 mg/L	200 mg/L	300 mg/L
0	0.687(100.0)	0.714(100.0)	0.718(100.0)	0.719(100.0)	0.741(100.0)
2	0.675(98.25)	0.693(97.06)	0.698(97.21)	0.704(97.91)	0.726(97.98)
4	0.645(93.89)	0.661(92.58)	0.665(92.62)	0.659(91.66)	0.684(92.31)
6	0.604(87.92)	0.639(89.50)	0.641(89.28)	0.640(89.01)	0.663(89.47)
8	0.590(85.88)	0.632(88.52)	0.637(88.72)	0.631(87.76)	0.652(87.99)
10	0.582(84.72)	0.610(85.43)	0.612(85.24)	0.612(85.12)	0.635(85.70)
14	0.545(79.13)	0.594(83.19)	0.600(83.57)	0.600(83.45)	0.620(83.67)
18	0.509(74.09)	0.530(74.23)	0.533(74.23)	0.529(73.57)	0.544(73.41)

¹⁾括号中的数值表示花色苷保存率 The values in brackets indicate retention rate of anthocyanin (%).

表3 不同浓度没食子酸对尾叶悬钩子花色苷稳定性的影响¹⁾Table 3 Effects of different gallic acid concentration on the stability of anthocyanin from *Rubus caudifolius* Wuzhi fruit¹⁾

时间 Time (d)	不同没食子酸浓度下的吸光度值 Absorbance in different gallic acid concentration				
	0(CK)	100 mg/L	200 mg/L	400 mg/L	600 mg/L
0	0.762(100.0)	0.779(100.0)	0.735(100.0)	0.760(100.0)	0.763(100.0)
5	0.690(90.55)	0.700(89.86)	0.660(89.80)	0.679(89.34)	0.685(89.78)
10	0.577(75.72)	0.587(75.35)	0.563(76.60)	0.574(75.53)	0.579(75.88)
15	0.556(72.97)	0.571(73.30)	0.549(74.69)	0.563(74.08)	0.569(74.57)
25	0.523(68.64)	0.541(69.54)	0.522(71.02)	0.528(69.47)	0.534(69.87)
35	0.504(66.14)	0.524(67.27)	0.502(68.30)	0.503(66.18)	0.508(66.58)

¹⁾括号中的数值表示花色苷保存率 The values in brackets indicate retention rate of anthocyanin (%).

3 结 论

1) 经纸上色谱、薄层层析、紫外光谱及红外光谱等分析,结合相关文献比较,初步确定尾叶悬钩子果实花色苷的主要组分为矢车菊素-3-葡萄糖苷,但这一结果还须进一步的实验,如对水解分离的苷元和配糖基进行分析,并与标准品对照加以确认。

2) pH值和温度影响尾叶悬钩子花色苷的色泽及其稳定性,在低pH值和低温条件下(60℃以下)该色素较稳定,随着pH值和温度的上升,其分解加剧,且这种分解反应为一级动力学反应。因此,该花色苷的分解属于裂解反应^[7],即花色苷被分解为花色苷元及糖苷配基2部分。

3) 据报道^[4],花色苷-共色素复合物的形成可显著提高花色苷的稳定性,使色素液增色。没食子酸对提高尾叶悬钩子花色苷稳定性无明显效果,不能作为该花色苷的共色素,但因共色素的种

类丰富,仍然可进一步研究以选择其他共色素。色素液中添加一定浓度 Al^{3+} ,能使吸光度值提高,表明 Al^{3+} 对该色素有一定的增色效应,但对贮藏期间该花色苷的稳定性则无明显效果,若加工成果汁,使用铝罐包装,对果汁质量不会产生不利影响。

参考文献:

- [1] 林来官,张永田.福建植物志(第二卷)[M].福州:福建科学技术出版社,1985.293-310.
- [2] 陈炳华,刘剑秋,石冬梅.尾叶悬钩子红色素的性质及其稳定性[J].应用与环境生物学报,2001,7(4):355-359.
- [3] 庞学群,张昭其,段学武,等.pH值和温度对荔枝果皮花色苷稳定性的影响[J].园艺学报,2001,28(1):25-30.
- [4] 于晓南,张启翔.观赏植物的花色苷与花色[J].林业科学,2002,38(3):147-153.
- [5] 马自超,庞业珍.天然食用色素化学及生产工艺学[M].北京:中国林业出版社,1994.30-80.
- [6] 宋长铨.花色苷类色素的分析方法[J].化工时刊,1999,13(1):20-24.
- [7] 陈健初,苏平,叶兴乾.杨梅花色苷及色泽稳定性研究[J].浙江农业大学学报,1994,20(2):178-182.