

花色苷提取、分离纯化及鉴定的研究进展*

于东¹, 陈桂星², 方忠祥¹, 叶兴乾¹, 许荷法²

1(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州, 310029) 2(台州市黄岩区农机总站, 浙江 台州, 318020)

摘要 花色苷是高等植物中最重要的水溶性色素。因其种类繁多、来源广泛、安全无毒并有一定的营养和保健功效而引起国内外的广泛关注, 具有十分重要的开发价值和广阔的应用前景。近年来, 有关花色苷的研究一直是国内外研究的热点。文中系统地介绍了国内外花色苷提取、分离纯化及鉴定的研究方法, 并对各种方法进行了分析评价。

关键词 花色苷, 提取, 纯化, 鉴定

花色苷是一类天然的水溶性色素, 广泛存在于植物的根、茎、叶、花、果实等器官的细胞液中, 从而使其呈现出红色、蓝色或紫色等颜色。花色苷是由花色苷配基(苷元)与糖通过糖苷键结合而成的一类多酚类化合物。天然花色苷配基(花青素)的基本结构为 3, 5, 7-三羟基-2-苯基苯并吡喃。目前已知的花色素有 20 多种, 但在植物中最常见的有 6 种, 即矢车菊色素、天竺葵色素、飞燕草色素、芍药色素、牵牛色素、锦葵色素。最有可能与花色素成苷的单糖依次是: 葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖。花色素分子上可以连接 1 个或几个糖基, 连接方式可以是单糖和低聚糖。通过改变花色苷分子中的羟基数目、羟基的甲基化程度、连接到花色苷分子上的糖的种类、数量及位置、连接到分子上的有机酸的数量和种类等, 可以形成大量的花色苷^[1~3]。

花色苷具有一定营养和药理作用, 在食品、化妆品、医药领域有着巨大应用潜力, 是替代合成色素的理想材料^[4~6]。本文对国内外有关花色苷提取、分离纯化及鉴定的研究方法进行了系统的总结, 阐明了各种方法的原理, 并对各种方法进行了分析评价。

1 花色苷提取

1.1 溶剂法提取

花色苷的基本骨架通常被 1 个或多个极性侧链如糖基糖苷化, 因而表现出较强的极性。因此传统方法中大都采用溶剂法提取。常用的溶剂主要分为 3 类: 水、亲水性有机溶剂(甲醇、乙醇和丙酮等)和亲脂

性有机溶剂(石油醚、苯、三氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯和二氯化烷等)。为防止花色苷的降解和提高花色苷的溶出率, 常在溶剂中加少量的无机酸(盐酸、硫酸、亚硫酸和碳酸等)或有机酸(甲酸、醋酸、柠檬酸和酒石酸等), 使提取液的 pH 控制在 3.5 以下。

李知敏^[7]研究了蓝莓花色苷的提取工艺, 研究表明: 体积分数 75% 的酸化乙醇提取, 料液比(质量浓度) 1: 10, 50℃ 下浸提 60 min 所得花色苷含量最高。霍琳琳^[8]在提取桑椹色素的研究中发现: 体积分数 30% 的酸化乙醇, 料液比 1: 10, 在温度 60℃ 下提取 60 min 花色苷得率最高。Revill 等^[9]对葡萄花色苷的提取的几种方法进行了比较, 结果表明体积分数 1% 的 HCl 甲醇溶液提取效果最好。但后来的研究表明与酸化甲醇相比, 丙酮的提取效果更好, 而且可以消除果胶的影响, 降低提取温度。此法受到浸提剂种类、浸提浓度、浸提时间、浸提温度及料液比等因素的影响, 但最适的提取溶剂组合与所提花色苷的种类及研究目的有关。

1.2 酶法提取

用于花色苷提取的酶主要有纤维素酶和果胶酶, 通过酶解使植物细胞壁软化、膨胀及崩溃, 从而促进了花色苷的溶出。王萍等人^[10]通过单因素和正交试验, 确定了黑加仑果渣花色苷酶法提取的最佳工艺为: 采用果胶酶酶解, 温度 50℃, 时间 120 min, 果渣与酶解液的比(质量浓度)为 1: 8, 酶用量为原料质量的 1.4%, pH 值 3.5, 黑加仑花色苷提取率的 91.09%, 并发现果胶酶的提取效果要优于纤维素酶。李颖畅等人^[11]用纤维素酶、果胶酶及两者复合对蓝莓花色苷进行了提取, 发现纤维素酶效果较好, 结果表明酶用量 5 mg/g, 料液比(质量浓度) 1: 8, pH 5.0, 提取时间 60 min, 酶解温度 45℃, 提取 2 次, 花

第一作者: 硕士研究生(叶兴乾为通讯作者)。

* 浙江省重大科技专项(2008CO2005-2), 浙江省科技计划面上重点项目(2008C22013)

收稿日期: 2008-11-12, 改回日期: 2009-02-12

色苷提取率最高。此法可以大大缩短花色苷提取时间,提高得率。

1.3 发酵法提取

目前,仅发现发酵法用于紫甘薯花色苷提取中的报道。其原理是:通过微生物的作用使紫甘薯中的淀粉转化为乙醇,将乙醇分离后,可得到紫甘薯花色苷,原料的利用率大大提高。日本三荣化学工业株式会社报道的提取方法是:将山川紫甘薯 500 kg(色价 2.1)洗净,蒸熟后冷却、粉碎,与用 100 kg 米调制的 1 次醪混合,发酵 8 d,调制 2 次醪。此发酵液(930 L,色价 1.1)的 pH 为 4.2,色素基本不分解,过滤 2 次醪,减压浓缩,得 22.0 kg 色价为 40.0 的浓缩色素液。用这种方法得到的色素液含淀粉成分非常少,其固形物 21.8%,是 1 种澄清的色素液。而常法制得的甘薯紫红色色素,其色数为 18.2,固形物 52.7%,且甘薯特有的风味大。国内,韩永斌^[12]利用发酵法对紫甘薯花色苷的提取进行了研究。研究结果表明,酵母接种量为 10%时,发酵温度 27℃,初始 pH 值为 3.0,经过 72 h,花色苷产量达到 66.6 μg/mL。与传统乙醇酸化提取法比,紫甘薯花色苷减少了 14.39%,但色价增加了 49,同时每 100 g 鲜薯得到 200 mL 体积分数为 6%的乙醇。发酵法大大弥补了传统提取方法花色苷提取率不高、纯化难度大、原料利用率不高等缺陷。其利用微生物破坏细胞壁和细胞膜,促进花色苷的溶出,提高提取率。通过发酵分解色素液中的糖、有机酸和其他杂质,大大降低了色素的纯化难度。此外,微生物还可以利用色素提取留下的残渣,发酵产生酒精等副产物,提高了原料的利用率,降低了工业化生产的成本。

1.4 超临界 CO₂ 提取

超临界 CO₂ 提取技术是食品工业中新兴的一项提取和分离技术,它利用超临界 CO₂ 作萃取剂,从液体或固体物料中萃取、分离有效成分。时海香等人^[13]研究了超临界 CO₂ 萃取常山胡柚天然色素的工艺。得到的最佳工艺条件为:萃取时间 2 h、萃取压力 25 MPa、原料与乙醇(体积分数 95%)比(质量浓度)1:3、萃取温度 35℃。色素提取率可达 96.87%。Vat-tai 等人^[14]用超临界 CO₂ 从接骨木果和葡萄渣提取花色苷,研究表明,利用超临界 CO₂ 提取法可以有效替代传统的有机酸溶剂提取花色苷的方法。同时 CO₂ 安全无毒、廉价易得,所得产品容易与溶剂分离,无溶剂残留问题。而且超临界 CO₂ 流体的萃取温度仅稍高于常温,有利于热敏性物质的萃取。

1.5 其他辅助提取方法

花色苷色素存在与植物的细胞液中,被细胞壁、细胞膜包裹,为提高色素得率,常采用超声波、微波、脉冲电场及高压水法等技术破坏细胞壁和细胞膜,提高组织细胞的渗透性,缩短提取时间。

1.5.1 超声波辅助提取

超声波是频率高于 20 kHz 的机械波,可以在媒质传播时产生空化现象。超声波的空化作用是:在超声波声场中,振动负压区由于周围的液体来不及补充,形成无数的微小真空泡,而当正压来到时,微小气泡在压力下突然闭合,液体间猛烈碰撞产生极大的冲击波,压力可高达 3 000 MPa,从而使植物细胞破裂,利于花色苷的溶出。目前,超声波提取的方法在生物活性物质的提取中得到广泛应用。Fang 等人^[15]在对红树梅中花色苷的提取中利用超声波辅助提取法。实验得出的最佳工艺参数为:超声功率 400 W、盐酸 1.5 mol/L、体积分数 95%乙醇、固液比 1:4、温度 40℃、处理 200 s 时提取率最高,可达 78.13%。李华等人^[16]研究了超声波辅助提取葡萄籽中总多酚的最佳条件,通过单因素实验和正交实验研究结果是:在 45℃下,频率 40 kHz,料液比为(质量浓度)1:12,提取 5 次,每次提取 55 min,得率最高。此法具有提取时间短,设备简单,操作方便等优点,并可有效防止热敏性成分的高温分解。

1.5.2 微波辅助提取

微波已广泛应用于植物化学领域,是 1 种快速穿透加热的方式。当微波加热时,细胞内极性物质尤其是水分子吸收微波能,产生大量的热量使细胞内温度迅速上升,液态水汽化产生的巨大压力将细胞膜和细胞壁冲破,形成微小的孔洞,使胞外溶剂容易进入细胞内,溶解并释放出胞内物质。许正虹等人^[17]以甘薯粉为原料,在微波条件下萃取其色素,并通过响应面法确定了最佳萃取工艺参数为:微波辐射功率 700 W、温度 70℃、辐射时间 6.37 min、固液比 1:15、HCl 体积分数为 0.3%。张文等人^[18]用微波法对山楂中总黄酮类化合物进行提取,其最佳的工艺条件为:体积分数 50%乙醇、微波功率 350 W、处理 24 min、料液比 1:15,提取率较热提法高 14.1%,较超声波法高 39.1%。与传统方法相比,微波法具有提取率高、时间短、能耗小等优点,因此微波用于天然色素的提取工艺具有广阔的应用前景。

1.5.3 液态静高压法辅助提取

液态静高压(HHP)是新兴的食品加工技术之

一,一般是指用 100 MPa 以上(100 MPa~1 000 MPa)的静水压力在常温下或较低温度下对食品物料进行处理,物料经过高压处理后其理化性质发生改变,使蛋白质、淀粉等大分子发生变性,使果蔬细胞的结构发生变形或破裂,细胞壁通透性增加,利于胞内物的溶出。Corrales 等人^[19]用液态静高压辅助提取的方法从葡萄皮中提取花色苷,研究所得的最优工艺参数是:100%乙醇,温度 50℃,压力 600 MPa。此法与未使用 HHP 法相比,产率提高 23%。HHP 具有提取温度低,时间短,不破坏色素结构等优点,但应用于花色苷等活性成分提取的报道还不多见。

1.5.4 高压脉冲电场辅助提取

高压脉冲电场(PEF)也是 1 种新型的食品加工技术,在食品工业中用于液态食品的杀菌灭酶。高压脉冲电场作用使生物细胞膜发生电穿孔或电渗透,细胞膜破裂,使生物细胞胞内物质向外的传质过程加速。张燕等人^[20]研究了高压脉冲电场处理对红梅花色苷提取过程的影响,结果表明,用 3.0 kV/cm PEF 处理 420 个脉冲后,用酸化甲醇提取 15 min,可使花色苷的提取率达到 54.24%。Corrales 等人^[21]在对葡萄副产品中花色苷提取方法的比较中发现,用 3.0 kV/cm PEF 处理 1 h,花色苷得率是未经辅助处理的提取方法的 4 倍,是液态高静压辅助提取的 1.3 倍,超声波辅助提取的 2 倍。高压脉冲电场辅助提取法是一种新型非热技术,它具有提取温度低、速率快、时间短、提取率高、产品品质好的特点。

2 花色苷纯化

经过提取的花色苷粗品中往往含有很多有机酸、糖等杂质,产品质量稳定性差、纯度不高。为了提高产品的色价和稳定性,需要对提取物进一步纯化。

2.1 柱层析法

柱层析法是应用最广泛的一类纯化技术。根据固定相的不同,柱层析分离的原理有所不同。早期的固定相主要是氧化铝和纤维素等,目前大多采用凝胶、聚酰胺、硅胶、离子交换树脂、大孔树脂等。

2.1.1 凝胶柱层析

凝胶层析也称排阻层析,工作原理是利用具有网状结构的凝胶的分子筛作用,根据被分离物质的分子大小不同来进行分离。层析柱的固定相多是交联的多聚糖(如葡聚糖或琼脂糖),小分子物质能进入其内部,洗脱下来的速度慢,而大分子物质却被排除在外部,洗脱下来的速度快,当混合溶液通过凝胶过滤层

析柱时,溶液中的物质就按不同分子量筛分开了。武彦文等人以葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 做柱层析,酸化甲醇水溶液洗提,成功得到了萝卜红色素的主要花色苷成分。Andersen 等人^[22]先用 Amberlite XAD-7 和 Sephadex LH-20 对草莓花色苷的粗提物层析分离后,再用 HPLC 进行鉴定,效果显著。凝胶柱层析的突出优点是层析所用的凝胶属于惰性载体,不带电荷,吸附力弱,操作条件比较温和,可在相当广的温度范围下进行,不需要有机溶剂,并且对分离成分理化性质的保持有独到之处。

2.1.2 聚酰胺层析

聚酰胺是一类纤维树脂,分子链上的重复结构单元是酰胺基的聚合物。其原理是根据“氢键吸附”,即当所分离化合物的结构与聚酰胺形成氢键的能力越强时,其吸附也就越强,也就越难洗脱。Strack 等人^[23]用聚酰胺柱层析的方法从粗的花色苷溶液中分离纯化花色苷。此法在花色苷中应用不多,主要用于黄酮类化合物的分离纯化。

2.1.3 硅胶层析

硅胶层析法的分离原理是根据物质在硅胶上的吸附力不同而得到分离,其中有微孔,对不同化合物的吸附能力不同,然后选用适当的洗脱剂进行洗脱从而达到分离。王霞等人^[24]在对黑甜玉米中黑色素提取及纯化工艺的研究中,采用硅胶层析,使提取后的色素纯度明显提高。徐忠等人^[25]对千日红花色苷酶法提取后,用硅胶进行分离纯化,并从径长比和层析柱温度两方面确定其较适宜的分离纯化条件。即径长比 1:30,层析温度 35℃。硅胶层析法由于试验操作简单,成本低,分离效果好,已在花色苷的纯化技术中得到广泛应用。

2.1.4 离子交换树脂层析

离子交换层析依据的原理是物质的酸碱性、极性,也就是所带阴阳离子的不同。电荷不同的物质,对管柱上的离子交换剂有不同的亲和力,改变冲洗液的离子强度和 pH 值,物质就能依次从层析柱中分离出来。胡隆基等人^[26]报道,葡萄果汁和葡萄皮色素用磺酸型阳离子交换树脂进行纯化,可除去浓缩液中的糖及有机酸,精制后的产品中色素的稳定性得到提高。钟瑞敏等人^[27]在葡萄花色苷优化提纯和纯化工艺的研究中,以弱酸性阳离子树脂 D152 作为纯化树脂。D152 的吸附率超过 95%,而且用体积分数 95%乙醇洗脱,其速度较快,洗脱率很高。离子交换树脂提取分离技术设备简单,操作方便,生产连续化程度

高,而且得到的产品往往纯度高,成本低,因此离子交换树脂在天然产物提取分离研究与生产中的应用必将日益广泛。

2.1.5 大孔树脂层析

大孔树脂是近代发展起来的一类有机高聚物吸附剂。其分离的原理是:不同类型大孔树脂从极稀水溶液中富集微量亲水性酚类衍生物,再经洗脱回收,除掉杂质,从而达到纯化精制的目的。王华等人^[28]用大孔吸附树脂对葡萄果皮花色苷的纯化进行了研究。通过单因素、正交试验,确定的最优工艺条件为:吸附时间 60 min,体积分数 5% 甲酸甲醇为解析剂,色素溶液浓度 1.2 mg/mL,吸附流速 1.5 V/h, pH 值 2.0,动态洗脱流速 1.5B V/h。该工艺所得产品的纯度为 90.05%。目前天然产物化学成分分离中最常用的树脂有 D101、DA201、AB-8、H103、LD-605、CDA-40、D1300 及 NKA 和 SIP 系列。大孔树脂具有吸附性强,解吸附性强,解吸附容易,机械强度高,可反复使用和流体阻力小等优点。因而在生产中可缩短生产周期,所需设备也简单,成本较低。

2.2 膜分离法

膜分离技术是使用具有选择透过性的膜为分离介质,当膜两侧存在某种推动力(如压力差、浓度差、电位差等)时,物料依据滤膜孔径的大小而通过或被截留,选择性地透过膜,达到分离、提纯的目的。花色苷提取中常用的膜分离技术有超滤(UF)、反渗透(RO)、电渗析(ED)等。Patil^[29]用酸化的乙醇提取红萝卜花色苷,随后用膜分离的方法有效的脱醇并浓缩了花色苷提取液,使花色苷含量从 372.6 mg/L 提高到 625.8 mg/L。之后用渗透膜联合蒸馏的方法将其进一步浓缩至 4 850 mg/L。Lin 等人^[30]用电渗析的方法从废弃的紫苏盐水溶液中除去了质量分数 90% 的 NaCl,并回收了质量分数 86% 的紫苏花色苷。膜分离纯化的花色苷色价和透明度高,稳定性好,容易实现连续化生产,生产过程劳动强度低,流程简单,但对设备要求高,纯化成本高,提取效率低。

2.3 重结晶法

向色素溶液中加入质量分数 5% 醋酸铅,使色素沉淀,过滤收集沉淀,再将沉淀用盐酸酸化的乙醇溶解形成氯化铅白色沉淀,过滤除去白色沉淀得到纯度较高的花色苷溶液。Zapsalis 等人^[31]曾用醋酸铅沉淀法和离子交换树脂法纯化花色苷。由于醋酸铅剧毒,故此法不适用于食用天然色素的生产。

2.4 分级醇沉法^[32]

分级醇沉法的原理是:多次反复调整乙醇浓度使大分子物质如多糖、淀粉和蛋白质等沉淀、过滤得到较纯的花色苷溶液。此法过程繁琐,消耗乙醇量大,并伴有吸附和包夹,致使色素有不同程度的损失。此法在花色苷纯化中报道较少。

3 花色苷鉴定

花色苷种类繁多,现已发现的就有 400 多种,而且每年不断有新的花色苷被发现。花色苷的鉴定对于人们认识其结构、理化性质和生理功能,进而进行新资源的开发及指导生产有十分重要的意义。

3.1 纸层析(PC)

纸层析法在 1940 年就被广泛使用,根据花色苷在不同溶剂中的迁移值(R_f)和颜色来判断花色苷的类别。鉴定时,即使没有标准品,通过同一样品在 3~4 种不同展开剂的 R_f 值,对照数据库的 R_f 值,就可以粗略估计出样品所含花色苷的种类。常用的展开剂有 BAW[V(正丁醇):V(乙酸):V(水)=4:1:5],BH[V(2 mol/L 正丁醇):(HCl)=1:1]体积分数 1% HCl,AHW[V(乙酸):V(浓 HCl):V(水)=15:3:82]。叶兴乾等人^[33]采用此法与光谱鉴定相结合的方法鉴定了荸荠种杨梅的花色苷组分。王川^[34]通过盐酸乙醇提取橙皮花色苷,经纸层析分析其主要成分为矢车菊。纸层析是实验室常规分析方法,具有快速,设备简单等优点。但是对于成分复杂、结构和极性相似的混合物难以分辨。

3.2 薄层层析(TLC)

薄层层析原理与纸层析相同,也可采用与纸层析法相同的展开剂。Harbon^[35]以硅胶为层析支持剂,以乙酸乙酯-甲酸-2 mol/L HCl(体积比为 85:6:9)为展开剂分离花色苷。蔡正宗^[36]在分析红凤菜花色苷时,就采用纤维素薄层层析,采用 BAW,AHW,体积分数 1% HCl 上行法推测花色苷结构。

3.3 光谱分析法

3.3.1 紫外-可见光谱法

紫外-可见光谱法很早就被人们应用于花色苷的结构鉴定。色素的紫外吸收光谱是色素的重要特征。吸收光谱是鉴定和测量混合物中主要色素的最简单方法。其主要原理是依据花色苷的不同基团的在不同的波长下有不同的吸收峰,进而推断出其结构。李进等人^[37]用紫外-可见光吸收光谱结合金属离子定性反应对鸡冠花红色素作了初步鉴定。与其他的检测方法类似,此法也必须精确控制测量条件,因为色

素所处的环境(如:溶剂,温度,与蛋白质的结合程度等)会强烈影响最大吸收峰的位置和吸收光谱的形状。

3.3.2 红外吸收光谱法

红外光谱目前在花色苷的结构鉴定中的报道较少。花色苷的红外光谱主要有苯环、含氧杂环、糖和羟基和甲氧基四部分。吴信子等人^[38]曾用红外吸收光谱对蓝靛果花色苷进行研究。

3.4 HPLC、MS、HPLC-MS

高效液相色谱法(HPLC)以经典的色谱法为基础,引入了气相色谱法的理论和实验方法,流动相改为高压输送,采用高效固定相及在线检测手段发展而成的一种高效快速分离分析技术。Nørbk 等人^[39]采用 HPLC 从 *Lilium* 的花中提取了 2 种花色苷。Maurizio^[40]也利用 HPLC 法从草莓中分离鉴定了 3 种花色苷。HPLC 可以在 30min 一个流程内分离 15 种不同的花色苷,其分辨能力远远超过纸层析和薄层层析。但是,由于缺乏花色苷的标准对照品,使得仅靠 HPLC 方法对花色苷进行定性和定量分析还不够充分。

质谱分析法(MS)是通过对被测样品离子的质荷比的测定来进行分析的 1 种方法。被分析的样品首先要离子化,然后利用不同离子在电场或磁场的运动行为的不同,把离子按质荷比(m/z)分开而得到质谱,通过样品的质谱和相关信息,可以得到样品的定性定量结果。Taïeb 等人^[41]用 ESI-MS 得到了葡萄汁中 1 种次要花色苷的结构。质谱法可以给出化合物的分子量、分子式,而且可以提供有关化合物的结构类型等重要信息。质谱仪具有很高的分辨能力,在测定天然产物结构时,灵敏、准确,已被广泛应用于植物粗提物的快速筛选分析。

HPLC-MS 在目前花色苷鉴定中应用最为广泛。Ordaz-Galindo 等人^[42]用 HPLC-MS 联用技术鉴定了柳叶野黑樱中的花色苷。Zhang 等人^[43]利用 HPLC-MS 联用的方法鉴定了荔枝皮中的花色苷。此法克服了 HPLC 法缺少标准品的缺陷,大大提高了花色苷鉴定的准确性。

3.5 核磁共振法(NMR)

核磁共振法是有机结构鉴定的重要手段之一。广泛应用于分子生物学、药物化学、植物化学等诸多领域。Rentzsch^[44]等人用 NMR 并结合 MS 分离鉴定了樱桃饮料中的花色苷。虽然 NMR 分析可以获得色素分子结构的很多信息,但是应用此法鉴定时需

要相对大量的纯化样品(mg 级),而且数据的获得需要较长时间。

3.6 毛细管区带电泳法(CZE)

毛细管区带电泳法是采用熔合二氧化硅毛细管,将分离溶剂调到一定 pH 值(酸化或碱化),花色苷在 CZE 中的迁移时间顺序取决于分子电荷和分子大小的比率,以及缓冲液复杂化合物的形式。因此,不同的花色苷就在覆盖有线性聚丙烯酰胺的毛细管壁上分离。Sáenz-López 等人^[45]曾用 CZA 分析了酒龄在 1~14 年的红葡萄酒。与 HPLC 相比,CZE 可以很容易的分离葡萄酒中的聚合色素,具有比 HPLC 更短的保留时间和更少的溶剂消耗量,更高的分离效率、更短的分析时间和更低的成本。但 CZE 的灵敏度不及 HPLC,而且达不到 HPLC 分离复杂化合物的范围,因而限制了 CZE 在花色苷鉴定中的应用。

3.7 花色苷水解分析法

花色苷水解分析法通过将花色苷在特定的条件下水解,分离出苷元和糖,再对它们分别进行分析鉴定的 1 种花色苷鉴定方法。苏金为等人^[46]将提取的黑米色素水解后,结合层析和紫外-可见光吸收光谱对黑米花色苷进行了鉴定。Longo 等人^[47]将纯化后的花色苷溶液水解,结合 HPLC-MS 鉴定出了 3 种野生浆果中的花色苷。此法对于结构较为复杂的花色苷鉴定,有一定参考价值。

4 小结

有关花色苷的提取方法已日臻成熟,在实验和生产过程中仍主要以酶法和溶剂法为主,花色苷提取率低,提取后纯化难度大。超临界 CO₂ 技术,超声波技术,微波技术,液态静高压技术及高压脉冲电场技术等高新技术的应用大大提高了花色苷提取的质量、产率和效率。此外,发酵法作为花色苷提取的新方法,在原料利用率,花色苷提取率及提取后花色苷纯化效率方面显示出了传统方法所不能比拟的优势。目前有关发酵法提取花色苷的报道甚少,需加强研究。花色苷的纯化技术也逐渐由传统的层析技术(包括柱层析,聚酰胺层析,硅胶层析,离子交换树脂层析,大孔树脂层析)向膜分离等高新技术转变,采用膜分离技术不仅使纯化的花色苷色价和透明度高,提高了稳定性,而且容易实现连续化生产,使生产过程劳动强度低,流程简单。但对设备要求高,纯化成本高,提取效率低。花色苷鉴定技术也由传统的纸层析,薄层层析等技术向高新技术转变。光谱技术, HPLC-MS,

NMR 等技术的应用已使花色苷的鉴定变得更加快速准确。但由于其设备要求高,较高的实验成本大大限制了其在普通实验条件下的应用。因此,设备简单,低成本,高效率,简便可行的新型花色苷提取、分离纯化及鉴定技术的仍有待开发。另外,采用多种方法联合使用也为花色苷的提取、分离纯化及鉴定提供了一个新的思路。

随着人们对食品安全问题关注度的提高,合成色素的使用越来越受到限制,天然色素的优越性日趋明显。近年来,天然色素的开发和应用发展很快,不少天然色素可以从一些食品加工的副产物中获得,如从葡萄皮、杨梅渣中提取分离花色苷,从而提高综合利用率。花色苷作为一类天然的食用色素,安全无毒、资源丰富而且具有一定的营养和保健功效,在食品、药品和化妆品中有广阔的应用前景^[48,49]。因此,花色苷研究一直受到国内外专家学者的关注,目前,有关花色苷的提取、分离纯化及鉴定的研究方法很多。本文对国内外的各种方法进行归纳总结,阐明了各种方法的原理,并对各种方法进行了分析评价。可以为从事花色苷的提取、分离、纯化及鉴定研究提供参考。

参 考 文 献

- Kong JM, Chia LS, Goh NK, et al. Analysis and biological activities of anthocyanins[J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(5): 923~933
- Brouillard R, Chassaing S, Fougereousse A, et al. Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it red wine color lasts so long[J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(7): 1 179~1 186
- 赵云荣, 王世雷. 植物花青素研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(8): 3 095~3 097
- 高彦祥, 许正虹. 紫甘薯色素研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2005, (1): 1~6
- 郑永藏. 花色素苷药理功效的研究进展[J]. *山西医药杂志*, 2008, 37(3): 254~257
- Fan GJ, Han YB, Gu ZX, et al. Composition and colour stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato culture[J]. *Food Science and Technology*, 2008, 41(8): 1 412~1 416
- 李知敏. 蓝莓花色苷的分离纯化及其初步药效学实验研究[D]. 重庆:重庆大学硕士学位论文, 2006
- 霍琳琳. 桑椹红色素的提取纯化及结构初步鉴定[D]. 杭州:浙江大学硕士学位论文, 2006
- Revilla E, Ryan JM. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [J], 1998, 46(11): 4 592~4 597
- 王萍, 苗雨, 王颖. 黑加仑果渣花色苷溶剂提取的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(8): 163~168
- 李颖畅, 孟宪军. 酶法提取蓝莓果中花色苷的研究[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(4): 215~217
- 韩永斌. 紫甘薯花色苷提取工艺与组分分析及其稳定性和抗氧化性研究[D]. 南京:南京农业大学博士学位论文, 2007
- 时海香, 仲山民, 吴峰华. 超临界 CO₂ 萃取常山胡柚天然色素工艺[J]. *林业科技开发*, 2008, 22(1): 20~23
- Vatai T, Skerget M, Knez Z. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide[J]. *Journal of Food Engineering*, 2009, 90(2): 246~254
- Chen F, Sun YZ, Zhao GH. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography - mass spectrometry [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2007, 14(6): 767~778
- 李华, 沈洁. 超声波法从葡萄籽中提取多酚的研究[J]. *酿酒科技*, 2005, 5: 89~91
- 许正虹, 高彦祥, 石素兰, 等. 微波辅助萃取紫甘薯色素的研究[J]. *食品科学*, 2005, 26(9): 234~238
- 张文, 霍丹群. 微波法提取山楂总黄酮的初步工艺研究[J]. *中成药*, 2006, 28(11): 1 667~1 669
- Corrales M, Garcia AF, Butz P, et al. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure[J]. *Journal of Food Engineering*, 2000, 90(4): 415~421
- 张燕, 李玉街, 胡小松. 高压脉冲电场 (PEF) 处理对红梅花色苷提取过程的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2006, 32(6): 129~132
- Corrales M, Toepfl S, Butz P, et al. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields; A comparison[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2008, 9(1): 85~91
- Andersen Ø M, Fossen T, Torskangerpoll K. Anthocyanin from strawberry (*Fragaria ananassa*) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelargonidin [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(4): 405~410
- Strack D, Mansell RL. Polyamide column chromatography for resolution of complex mixtures of anthocyanins [J]. *Journal of Chromatography*, 1975, 109(2): 325~331
- 王霞, 高云. 黑甜玉米中黑色素提取及纯化工艺研究[J]. *食品科学*, 2004, 25(11): 198~200
- 徐忠, 薄凯. 千日红色苷的酶法提取及纯化研究[J]. *食品与发酵工业*, 2006, 32(8): 139~141

- 26 胡隆基. 食用色素花色苷类的研究与应用动态[J]. 全国食品添加剂通讯, 1990, (1): 23~29
- 27 钟瑞敏. 葡萄花色苷优化提取和纯化工艺研究[J]. 韶关大学学报, 1995, 12(8): 113~120
- 28 王华, 菅蓁. 大孔吸附树脂纯化葡萄果皮花色苷的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 86~90
- 29 Patil G, Madhusudhan MC, Babu BR, et al. Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish[J]. Chemical Engineering and Processing, 2009, 48(1): 364~369
- 30 Lin S, Chiang BH, Hwang LS. Recovery of perilla anthocyanins from spent brine by diafiltration and electrodialysis[J]. Journal of Food Engineering, 1989, 9(1): 21~23
- 31 Zapsalis C, Francis FJ. Cranberry anthocyanins[J]. Journal of Food Science, 1965, 30: 396~399
- 32 李金林. 紫甘薯花色苷提取、膜分离及加工稳定性研究[D]. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 2007
- 33 叶兴乾, 陈健初, 苏平. 荸荠种杨梅的花色苷组分鉴定[J]. 浙江农业大学学报, 1994, 20(2): 188~190
- 34 王川. 橙皮花色苷的分离鉴定及稳定性研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(8): 38~40
- 35 Harborne J B. Spectral methods for characterizing anthocyanins[J]. Biochemical Journal, 1957, 70: 22~28
- 36 蔡正宗. 红凤菜所含两种主要花色苷之研究[J]. 食品科学(台湾), 1995, 22(2): 149~160
- 37 李进, 彭宇, 彭子模. 鸡冠花红色素理化性质及其稳定性研究[J]. 生物技术, 2004, 14(1): 21~24
- 38 吴信子, 朴京一, 张小勇. 蓝靛果花青素的分离鉴定[J]. 延边大学学报, 2001, 22(3): 191~194
- 39 Nørnbæk R., Kondo T. Anthocyanins from flowers of *Lilium* (Liliaceae) [J]. Phytochemistry, 1999, 50(7): 1181~1184
- 40 Maurizio F. Preparative high-performance liquid chromatography for the purification of natural anthocyanins [J]. Journal of Chromatography A, 1995(692): 213~219
- 41 Taieb A, Giannetti A, Thestrup-Pedersen K, et al. Proceedings of the 4th georg rajka international symposium on atopic dermatitis, arcachon, france, september 15—17, 2005[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2006, 117(2): 378~390
- 42 Ordaz-Galindo A, Wesche-Ebeling P, Wrolstad R E, et al. Purification and identification of Capulin (*Prunus serotina* Ehrh) anthocyanins[J]. Food Chemistry, 1999, 65(2): 201~206
- 43 Zhang ZQ, Pang XQ, Yang C, et al. Purification and structural analysis of anthocyanins from litchi pericarp [J]. Food Chemistry, 2004, 84(4): 601~604
- 44 Rentzsch M, Quast P, Hillebrand S, et al. Isolation and identification of 5-carboxy-pyranoanthocyanins in beverages from cherry (*Prunus cerasus* L.) [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2007, 8(3): 333~338
- 45 Sáenz-López R, Fernández-Zurbano P, Tena TM. Analysis of aged red wine pigments by capillary zone electrophoresis[J]. Journal of Chromatography, 2004, 1052(1~2): 191~197
- 46 苏金为. 黑米色素的提取和组分分析[J]. 福建农业大学学报, 1999, 28(2): 233~237
- 47 Longo L, Scardino A, Vasapollo G. Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregri-na* L.[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2007, 8(3): 360~364
- 48 王峰, 邓洁红, 谭兴和, 等. 花色苷及其共色作用研究进展[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 472~476
- 49 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, 2004, 35(2): 315~320

Advances on Extraction, Isolation, Purification and Identification of Anthocyanins

Yu Dong¹, Chen Guixing², Fang Zhongxiang¹, Ye Xingqian¹, Xu Hefa²

¹(School of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

²(Huangyan Agricultural Machinery Management Station of Taizhou City, Taizhou 318020, China)

ABSTRACT Anthocyanin is a kind of natural water soluble pigment, which used world-wildly because of their safety, nutrition and potential functionalities. Researches on anthocyanins have increased rapidly in recent years. The major research fields are focused on the extraction, isolation, purification and identification from plant resources. This paper reviewed and evaluated the principles and technologies of these methods.

Key words anthocyanin, extraction, purification, identification