

郑蔚然,胡 莉,袁玉伟,等. 蓝莓中花青素提取及检测技术的研究进展[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):233-235.

蓝莓中花青素提取及检测技术的研究进展

郑蔚然¹,胡 莉²,袁玉伟¹,孙彩霞¹,张志恒¹

(1. 浙江省农业科学院农产品质量标准研究所/农业部农产品及转基因产品质量安全监督检验测试中心(杭州),浙江杭州 310021;

2. 四川省农业科学院分析测试中心,四川成都 610066)

摘要:蓝莓花青素性能优良,有着巨大的应用潜力。为了进一步开发利用蓝莓花青素,研究蓝莓中花青素的提取及检测技术具有十分重要的意义。本文综述了国内外相关的蓝莓花青素提取及检测技术研究进展。

关键词:蓝莓;花青素;提取;检测

中图分类号: TS202.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0233-03

花青素是一类广泛存在于植物中的水溶性天然色素^[1],属酚类化合物中的类黄酮类物质,是 2-苯基苯并吡喃盐的多羟基衍生物,其主体为 2-苯基苯并阳离子;R1 和 R2 为 H、羟基或甲氧基,R3 为糖基或 H,R4 为羟基或糖基,其分子式主体结构如图 1 所示^[2]。花青素作为一种天然着色剂,在食品、美容、医药等方面有着巨大的应用潜力;由于具有很强的抗氧化能力,花青素能有效地清除人体内的自由基,延缓衰老,提高人体免疫力,具有防癌抗癌功效^[2-3];同时花青素能保护血管,增强血管抵抗力,降低心血管疾病的发病率;花青

素还能降低糖尿病的发病危险及并发症的产生;此外花青素也可以通过血脑屏障,改善退行性老年痴呆^[4]。

蓝莓是植物中花青素含量较高的一类品种,其花青素最高含量可达 4 200 mg/kg^[5],蓝莓中所含花青素是目前所有植物花青素中性能最优良、副作用最低的花青素品种之一^[6]。为了进一步开发和有效利用蓝莓花青素,蓝莓中花青素提取及检测技术的研究具有十分重要的意义,本文综述了国内外相关技术的研究进展。

1 蓝莓中花青素的提取技术

1.1 有机溶剂萃取法

蓝莓中花青素的提取方法主要是有机溶剂萃取法,目前的研究较多地集中于不同萃取剂的提取效果及新型萃取纯化方法的应用。刘仁道等研究了不同有机提取溶液提取蓝莓中花青素的效果,5 种提取溶液的配制比例为(1)丙酮:水:甲酸=80 mL:20 mL:0.12 mL,(2)乙腈:乙酸=96 mL:4 mL,(3)乙醇:水:乙酸=80 mL:20 mL:1 mL,(4)甲醇:水:乙酸=85 mL:15 mL:0.5 mL,(5)含 0.1% 盐酸的甲醇;其步骤为:取 100 g 左右蓝莓材料并置于家用打浆机中粉碎 2 min,再用高速匀浆机于 15 000 r/min 条件处理 2 min 以破碎细胞结构;称取 1 g 破碎物于离心管中,加入 14 mL 提取液,振荡 20 min 后离心(20 000 g,10 min),上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后用于花青素的测定;其中甲醇:水:乙酸=85 mL:15 mL:0.15 mL 溶液的提取效果最佳^[7]。

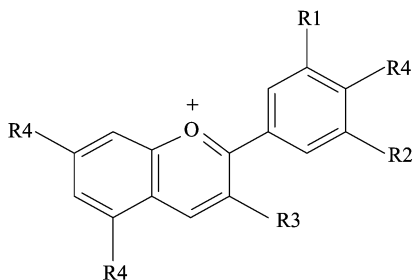


图1 花青素的主体结构分子式

收稿日期:2012-11-07

基金项目:2011 年农业行业标准制定项目(编号:农财发[2011]53);

2010 年农业行业标准制定项目(编号:农财发[2010]49)。

作者简介:郑蔚然(1983—),女,浙江乐清人,硕士研究生,助理研究员,主要从事农产品质量安全、风险评估、标准及法规研究。Tel:(0571)86419068;E-mail:rancki@163.com。

波协同法提取黄精多糖的最佳工艺条件为超声功率 50 W、超声频率 40 kHz、料液比 1 g:32 mL、微波功率 300 W、提取时间 80 s;按该工艺条件进行验证,黄精多糖提取率实际值为 11.19%。超声-微波协同法提取黄精多糖能充分利用超声波及微波的热效应、空穴作用、机械作用、高能作用等,提取方法简单、效率高,具有一定的实用价值。

参考文献:

- [1]陈克克,史 丽,李 莺,等. 黄精总黄酮和总酚的含量测定[J]. 陕西农业科学,2012(1):58-60.
- [2]石 林,蒙义文,李 伟. 黄精及黄精多糖的药理研究[J]. 天然产物研究与开发,1999,11(3):67-71.

- [3]杨胜坤. 黄精多糖对糖尿病大鼠血糖水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011(16):297.
- [4]王玉勤,吴晓岚,张广新,等. 黄精多糖对大鼠抗氧化作用的实验研究[J]. 中国现代医生,2011,49(5):6,11.
- [5]晏为力,蒲 蕾,蒙义文. 两种黄精多糖衍生物的制备及其抗病毒活性比较研究[J]. 天然产物研究与开发,2000,12(5):60-65.
- [6]安卫征,王飞,赵晓华. 超声波法提取普洱茶多糖的工艺[J]. 食品研究与开发,2008,29(4):119-122.
- [7]许丽璇,李伟斌,蔡建秀. 川芎总黄酮提取优化及小鼠体外抗氧化作用[J]. 中国医院药学杂志,2010,30(18):1524-1528.
- [8]蒋永红,唐仕荣. 银杏渣中多糖的超声波-微波协同萃取及抗氧化性研究[J]. 食品工业科技,2009(7):244-246.

王兆雨等利用乙醇浸提法提取蓝莓中的花青素,其流程为:乙醇浸提后过滤、离心,得到花青素提取液,经 AB-8 树脂吸附后用 60% 乙醇洗脱,再经石油醚萃取并干燥称重。研究确定最优浸提条件为 pH 值 3.5,浸提温度 50 ℃,浸提时间 60 min,浸提剂乙醇体积分数 50%,提取次数 1 次,在此条件下的提取率为 5.8%^[8]。

赵尔丰等利用纤维素酶、果胶酶及中性蛋白酶在不同的超声波功率、温度条件、酶用量和培养提取时间下,进行了蓝莓中花青素的提取试验,正交优化试验表明:纤维素酶辅助提取花青素的效果最好,其最佳工艺条件为:温度 50 ℃,酶用量 5 mg/g,按料液比 1 g:10 mL 加入水进行培养提取 20 min,然后补充加入乙醇,使得体系中乙醇浓度为 40%,强化提取 10 min,所得蓝莓果渣中花青素的提取率为 4.12%。在使用酶-超声波辅助培养提取的过程中,花青素的提取率并不随超声波功率的增加而提高,功率过高反而会造成提取率的下降^[9]。

陈健等报道的提取工艺为:蓝莓鲜果经破碎后,用甲醇溶液浸提、过滤、离心得花青素提取液,用聚酰胺树脂吸附后再用 60% 乙醇溶液洗脱,旋蒸后经石油醚萃取得产物并作显色分析。通过单因素试验,在正交试验的基础上得出:甲醇浓度 80%,料液比 1 g:10 mL,提取温度 80 ℃,提取时间 30 min, pH 值 3.5,在此条件下可达到最佳的提取效果,采用聚酰胺树脂进行纯化,花青素的得率可达 4.29%,样品纯度为 85.75%^[10]。

袁帅等报道的蓝莓中花青素提取条件为:用含 0.1% 盐酸的 70% 乙醇水溶液浸渍蓝莓鲜果,抽提液经抽滤后,所得滤渣经再次浸泡、抽滤后合并滤液并低温减压浓缩,用 D101 大孔树脂柱处理浓缩物,先以大量蒸馏水洗至洗脱液无色透明,去除糖、氨基酸、蛋白质和矿物质等杂质,然后用适量 70% 乙醇水溶液洗脱;收集的洗脱液于 60 ℃ 下减压蒸干溶剂,得到紫红色固体并冷冻保存^[11]。

刘翠等报道的提取方法为:取蓝莓果 100 g,加入 400 mL 超纯水,用高速匀浆机破碎后将匀浆在 10 000 r/min 条件下离心 15 min,取上清液用氯仿:石油=1 mL:4 mL 的氯醚萃取 3 次,除去蛋白、脂肪等杂质,将得到的溶液上大孔树脂柱,收集洗脱液,冻干得到精制花青素样品,其得率为 0.72%^[12]。

Lohachoompol 等报道的提取方法为:将蓝莓果实在 5 ℃ 下打浆 1 min,取 10 g 果浆用 75 mL 甲醇:水:乙酸=25 mL:24 mL:1 mL 的溶液进行萃取,在 15 ℃、12 000 r/min 条件下离心 20 min;按同样步骤萃取 3 次后将萃取液真空蒸发,蒸发后将产物溶解于 5 mL 3% 甲酸溶液中,溶液用 C₁₈ 反向预柱处理,处理液经真空蒸发后溶于 1 mL 溶液中,其中甲醇:5% 甲酸=15 mL:85 mL(5% 为甲酸质量体积比)^[13]。

1.2 固相萃取提取法

Denev 等报道了固相萃取提取方法,固相萃取材料为 Amberlite XAD7,用重蒸水浸泡后装填充柱,填充后用重蒸水冲洗萃取柱,固相吸附萃取粗提物,杂质用重蒸水洗脱,直到有不溶物洗出,同时收集洗脱液;再用 96% 的甲醇溶液洗脱,得花青素富集液^[14]。

1.3 超临界 CO₂ 萃取法

Laroze 等报道了花青素的自动化超临界 CO₂ 萃取设备,此设备配备了 1 个 285 mL 的不锈钢提取器、20 mm 的多孔板和 75 mL 的分离容器。萃取温度为 60 ℃,压力 8 000 ~ 13 000 kPa,乙醇作为改性剂由进气口中加入。分离器的操作条件为 30 ℃,固定压力(为萃取压力的 60%)^[15]。与传统的萃取方法相比,超临界 CO₂ 萃取法具有得率高、提取物活力高的优点。

1.4 离子交换反相萃取法

He 等报道了采用一种新型的离子交换反相萃取(cation-exchange/reversed-phase)结合固相萃取(SPE)技术,并优化使用水/有机缓冲流动相分离花青素^[16]。与常用的固相萃取技术(C₁₈, HLB, LH-20)相比,新技术取得了较高的花青素纯度,分离出的 8 种花青素纯度大于 99% (基于紫外可见光谱),此种分离技术保证了花青素提取物的纯度和提取效率,同时保持了良好的回收率和低成本。

2 蓝莓中花青素的检测分析技术

蓝莓中花青素检测的传统方法为分光光度法,目前研究较多的为高效液相色谱检测及质谱分析法。

2.1 高效液相色谱法

刘仁道等报道了 2 种花青素检测方法,一种为分光光度法:取制备的样品 1 mL,加入 4 mL pH 值 4.5 的 0.14 mol/L 乙酸钠缓冲液或 pH 值 1.0 的 0.125 mol/L 氯化钾缓冲液,摇匀后转入光路长 1 cm 的比色皿中后,用岛津 UV-mini 1240 紫外-可见分光光度计分别在 520、700 nm 波长处测定其吸光度。另一种为高效液相色谱法:将提取液制备的样品用液相色谱仪分离定量花青素,进样量 200 μL,色谱柱为 Inertsil ODS23(416 mm×250 mm, GL Science),流动相流速为 1 mL/min,温度恒定在 35 ℃;A、B 泵的梯度为:B 泵在 0 min 时为 0,在 55 min 时升至 55%,在 59 min 时升至 75% 并保持 4 min,到 65 min 时降至 0 并保持 5 min;二极管阵列检测器的波长设定在 250 ~ 600 nm 之间(最终计算结果为使使用 520 nm 的图谱图)^[7]。

宋阳成等以蓝莓汁饮料和蓝莓果酒为原料,建立了蓝莓饮料中飞燕草定-3-O-葡萄糖苷、锦葵定-3-O-葡萄糖苷 2 种花青素类成分的高效液相色谱快速检测方法,方法使用安捷伦 ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm×75 mm, 3.5 μm) 色谱柱,以 3% 磷酸溶液和甲醇为流动相,二极管阵列检测器在波长 525 nm 处进行检测。结果表明,该方法对飞燕草定-3-O-葡萄糖苷、锦葵定-3-O-葡萄糖苷的最低检出限分别为 0.4、2.5 ng,标准曲线线性良好,相关系数大于 0.998 4,回收率在 90.2% ~ 98.3% 之间,相对标准偏差不大于 1.79%^[17]。该方法简洁、快速且灵敏度高,适合于蓝莓类饮料中花青素的快速检测。

Sun 等采用高效液相色谱法检测花青素,方法为采用高效液相色谱岛津 LC-2010C 系统, ZORBAX Stablebond SB-C₁₈ 柱(4.6×250 mm, 5 μm)^[18]。用于色谱分离的 A(3% 水溶液磷酸)和 B(乙腈)梯度洗脱,流速为 1 mL/min,检测波长为 520 nm。使用的渐变程序如下:5% B, 0 ~ 5 min;5% ~ 10% B, 5 ~ 15 min;10% B, 15 ~ 25 min;10% ~ 12% B, 25 ~ 35 min;

12% ~ 15% B, 35 ~ 50 min; 15% ~ 18% B, 50 ~ 60 min; 18% ~ 25% B, 60 ~ 80 min; 25% ~ 30% B, 80 ~ 90 min。在此色谱条件下, 大部分峰可以实现最佳分辨率。

2.2 色谱质谱联用法

袁帅等利用高效液相色谱-电喷雾离子化串联质谱联用技术(HPLC-ESI-MS/MS)对蓝莓提取物中的黄酮类物质进行了分析,并快速地鉴定其主要成分为花青素^[11]。高效液相色谱检测条件为:Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),同规格 12.5 mm 预柱;柱温 35 °C;DAD 扫描波长 200 ~ 600 nm;流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液;流速 1 mL/min;洗脱梯度为 0 ~ 7 min = 5% B, 8 min = 6% B, 32 min = 20% B, 38 min = 30% B, 42 min = 40% B, 43 ~ 48 min = 95% B, 柱平衡 8 min;进样体积视样品溶液浓度而定;色谱流出液经过分流,以 0.3 mL/min 的流速进入质谱离子源。质谱检测条件为:ESI 源;全扫描质谱分别使用正、负离子模式,二级串联质谱采用正离子模式,选取各组分苷元为母离子;干燥气温度 350 °C;干燥气流速 10 L/min;雾化气压 310.3 kPa;毛细管电压 ± 4 000 V;源内裂解电压 220 V;碰撞能量 30 Unit;质量扫描范围:全扫描为 100 ~ 800 u;二级串联质谱为 100 ~ 400 u。

刘翠等采用反相高效液相色谱法和电喷雾质谱法对我国野生笃斯越橘中花青素组分进行了分析^[12]。反相高效液相色谱检测条件为采用 Alltima C₁₈ 反相色谱柱(250 mm × 416 mm, 5 μm),柱温为 25 °C,流动相为 2% 甲酸水溶液、2% 甲酸-甲醇溶液,经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后分 2 个梯度进行洗脱:1 ~ 5 min 时梯度保持在 95 : 5, 5 ~ 50 min 时从 95 : 5 到 0 : 100,流速 1 mL/min;检测波长 278 nm;进样量 20 μL。质谱条件为:用注射器以 1 μL/min 的速度持续进样,离子检测方式为单反应离子检测;离子极性为正离子;离子化方式为电喷雾离子化;毛细管电压为 210 kV;离子源温度为 200 °C;扫描范围 m/z 75 ~ 2 000;碰撞能量 35.0 V。

Lohachoopol 等采用液质联用分析蓝莓中花青素^[13]。高效液相色谱的分析条件为:Xterra™ MS C₁₈柱(2.1 mm × 150 mm);检测波长 520 nm,流动相 A 为甲醇,流动相 B 为 3% 的甲酸溶液;流速 0.2 mL/min;洗脱梯度:0 ~ 5 min 为 15% A, 5 min 为 20% A, 25 min 为 25% A, 柱平衡 5 min, 46 min 为 70% A, 柱平衡 6 min, 55 min 为 15% A。质谱检测条件为:ESI 源;扫描范围 m/z 250 ~ 700;离子源温度 150 °C;脱溶剂气温度 400 °C;毛细管电压 4 500 V;锥孔电压 31 V;氮气流速 500 L/h。

Laroze 等采用气质联用法分析蓝莓中花青素,采用 Hewlett-Packard 5890-II 气相色谱,60 m × 0.25 mm × 0.25 μm HP-Innowax 毛细管柱,He 作载气^[15]。温度 45 °C 并保持 30 min,以 3 °C/min 递升至 230 °C,在 230 °C 时保持 10 min。质谱条件为在 EI 模式(电子能量 70 eV;源温度 250 °C),数据采集在扫描模式从 30 到 300 amu/s,1.9 spectra/s。

3 意见与建议

目前,我国的蓝莓种植业已有较大规模,蓝莓果实的深加工也已起步,其中蓝莓花青素的提取和分析研究将有利于蓝莓在食品和保健品行业的加工利用。目前对于蓝莓花青素的

提取技术,国内的研究均处于实验室水平,未有大规模的工业提取、纯化技术,相关技术的深入研究将有十分广阔的应用前景和重要的经济意义。

参考文献:

- [1] You Q, Wang B, Chen F, et al. Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars[J]. Food Chemistry, 2011, 125(1): 201-208.
- [2] Kong J M, Chia L S, Goh N K, et al. Analysis and biological activities of anthocyanins[J]. Phytochemistry, 2003, 64: 923-933.
- [3] Motohashi N, Sakagami H. Anthocyanins as functional food colors[J]. Top Heterocycl Chem, 2009, 16: 1-40.
- [4] 胡雅馨, 李京, 惠伯棣. 蓝莓果实中主要营养及花青素成分的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 600-603.
- [5] Mateus N, de Freitas V. Anthocyanins as food colorants[J]. Anthocyanins, 2009: 284-304.
- [6] Prior R L, Cao G, Martin A, et al. Antioxidant capacity as influenced by total phenolics and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(7): 2686-2693.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 陈健, 孙爱东, 高雪娟, 等. 蓝莓花青素的提取及抗氧化性的研究[J]. 北京林业大学学报, 2011, 33(2): 126-129.
- [11] 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.
- [12] 刘翠, 陈素华, 陈少云, 等. 中国野生笃斯越橘花青素的初步分离和分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(1): 57-64.
- [13] Lohachoopol V, Mulholland M, Szrednicki G, et al. Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries[J]. Food Chemistry, 2008, 111(1): 249-254.
- [14] Denev P, Ciz M, Ambrozova G, et al. Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties[J]. Food Chemistry, 2010, 123(4): 1055-1061.
- [15] Laroze L E, Díaz-Reinoso B, Moure A, et al. Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents[J]. European Food Research and Technology, 2010, 231(5): 669-677.
- [16] He J, Giusti M M. High-purity isolation of anthocyanins mixtures from fruits and vegetables - A novel solid-phase extraction method using mixed mode cation-exchange chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(44): 7914-7922.
- [17] 宋阳成, 陈玉娟, 李皓, 等. 蓝莓类饮料中花青素的快速检测方法[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 334-336.
- [18] Sun L Q, Ding X P, Qi J, et al. Antioxidant anthocyanins screening through spectrum-effect relationships and DPPH-HPLC-DAD analysis on nine cultivars of introduced rabbiteye blueberry in China[J]. Food Chemistry, 2012, 132(2): 759-765.