文章编号: 1673-5072(2006)03-0300-04

植物花色苷定性定量研究方法

张秀丽[1],李劲涛[1],杨 军[1,2]
(1. 西华师范大学生命科学学院,四川 南充 637002; 2. 西华师范大学珍稀动植物研究所,四川 南充 637002)

摘 要:植物组织中是否有花色苷及其类型,可通过植物组织的颜色、抽提液的颜色、抽提液在 pH梯度中的颜色等作大致的推断,但对植物组织中的花色苷进行较精确的定性还需做进一步分离、纯化和鉴定. 定量分析要依据材料不同而选择不同的方法,本文对花色普定性定量研究方法进行了综述.

关键词:花色苷;提取;纯化;定性分析;定量分析
中图分类号: S718 - 43 **文献标识码**: A

花色苷是一种黄酮类色素,存在于大部分的花和果实中,一些植物的茎和叶中也存在花色苷. 花色苷作为一种天然食用色素,安全、无毒、且具有一定的营养和药理作用,在一些功能性食品和化妆品中已有应用,因此越来越受到人们的重视[1,2]. 花色苷是由花色素和糖结合形成的配糖体,常见的花色素主要有 6种,分别是天葵色素 (花葵素)、矢车菊素、飞燕草色素 (翠雀素)、芍药色素、牵牛花色素和锦葵色素 (二甲花翠素)[3]. 花色苷的种类决定于花色素的种类、糖基的种类以及花色素与糖基的结合部位. 本文对花色苷定性定量的方法进行了概述,以方便对植物的花色苷进行较为广泛和深入的研究,从而为进一步研究花色苷的性质奠定基础.

1 花色苷的简单定性

可根据植物体的颜色判断. 当植物组织呈现有蓝色或紫色时,其肯定含有花色素;呈红色时,则可能含有花色素也可能含有类胡萝卜素,这时可根据水溶性来区别,花色素类较易溶于水而类胡萝卜素不易溶于水[2]. 若将含有花色素的植物体的切片暴露于醋酸蒸汽中会变成红色,而暴露于氨蒸汽中时,会依紫—蓝—绿的顺序发生颜色变化[2]. 花色苷的颜色会随溶液 pH的变化而变化,花色苷在强酸性溶液中呈稳定的红色,弱酸性至中性溶液中呈红紫色,碱性溶液中呈蓝色. 主要含有天竺葵色素、矢车菊素的糖苷提取物会呈现橙到红色,含有甲基花青素糖苷的为深红,含有飞燕草素、矮牵牛苷配基和锦葵色素糖苷的则会显出红色,而糖苷基团的酰化可能会有一种蓝化效果[3]. 花色苷的酰基化会影响花色苷的稳定性. 非酰化和单酰化的花色苷在 pH值很低时,其溶液呈现最强的红色. 随着 pH值的增大,花色苷的颜色将褪至无色,最后在高 pH值时变成紫色或蓝色. 但是具有两个或两个以上酰基的花色苷在整个 pH值范围内都表现出相当好的颜色稳定性[4]. 将植物组织用石油醚提取,若无色则说明提取物不含类胡萝卜素和叶绿素;向提取物中加入 10% HCl若呈现各种红色且加入 25%氨溶液后呈现各种黄绿 (花色苷的蓝色与类黄酮的黄色产生)则说明含有花色苷和类黄酮 (除去橙酮)[5,6].

2 花色苷的提取

花色苷提取方法的选择取决于提取的目的和花色苷的种类. 多用盐酸甲醇溶液或蚁酸甲醇液提取[7]. 定量提取需在低温下保持一夜,若浑浊还需过滤或离心分离;若只用于层析的样品,则提取 10 - 15 min即可[8]. 当提取的花色苷要用于食品着色时,考虑到甲醇的毒性,应选择盐酸乙醇溶液[1].

收稿日期: 2006 - 07 - 10
基金项目:四川省科技厅应用基础研究项目 (JY029 - 055 - 2);四川省重点学科建设资助项目 (SZD0420).
作者简介:张秀丽 (1980 -),女,山西忻州人,西华师范大学生命科学学院遗传专业硕士研究生,主要从事植物分子生理及遗传学方面的研究.

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

提取花色苷时用盐酸酸化可以保持低 pH值,阻止无酰基的花色苷的降解,但随着盐酸甲醇液或蚁酸甲醇液的蒸发盐酸被浓缩其结果会导致花色苷的降解. Revilla等对红葡萄中色素进行提取的研究表明提取液中盐酸的浓度大于 0.12 mol/L就会引起含酰基的花色苷的部分水解[9]. 因此为了获得更接近于天然状态的花色苷,可采用中性溶剂或弱有机酸做初步提取. 如果既要考虑色素的产量,又要尽量保持色素的原始状态,可以选择有机酸和甲醇提取花色苷,其中,柠檬酸是最好的,其次是酒石酸、甲酸、乙酸和丙酸. 一些学者采用丙酮作提取剂,其效果比酸化的甲醇液要好,且操作可在相对较低的温度下进行[7]. 初步提取的花色苷提取物通常很稀,一般用旋转蒸发器浓缩. 因花色素类不耐高温,所以浓缩时温度不要超过 40℃,时间也不宜太久.

3　花色苷的分离纯化

3.1　纸层析

是分离天然色素的一种较为传统的方法,具有快速、设备简便等优点,但此法分离到的花色苷的量很有限. 常用新华 NO. 3或 WhatmanNO. 3层析纸,多以 BAW (正丁醇 - 醋酸 - 水 = 4∶1∶2 v/v)、MAW (正丁醇 - 醋酸 - 水 = 4∶1∶5v/v)为展液. 大规模分离 (1 - 100mg)时常用 BH (正丁醇 - 2mol/L盐酸 = 1∶1上层 v/v)和 15%的乙酸为展液. 展开后,用酸性甲醇或乙醇洗涤,乙醚反复沉淀、浓缩,即可得到样品[2,8].

3.2　薄层层析

可用硅胶作吸附剂, Harbon的研究表明以乙酸乙酯 - 甲酸 - 2mol/L盐酸 (86∶5∶9)为展液尤适用于分离用纸层析很难分离的锦葵色素和芍药色素[8,10]. 也可用纤维素作吸附剂. 具有速度快、分辨力好的优点,但同纸层析法一样,此法分离到的花色苷的量也很有限.

3.3　柱层析

是目前普遍采用的纯化花色苷的方法,对于不挥发的花色苷的分离是理想的;多以吸附树脂、凝胶为吸附剂. 在游离花色素的情况下,洗脱速度取决于游离酚羟基对氢键的利用程度,依次为:锦葵素 >芍药素 >天竺葵素 >碧冬茄素 >矢车菊素 >飞燕草素[8,10].

3.4　HPLC (高效液相色谱)

可用制备型 HPLC (preparative HPLC)来纯化花色苷. Fiorini用 Sphefisorb ODS - 2柱对草莓、接骨木、茄子、萝卜等的花色苷进行了提取,结果表明 HPLC是分离单糖基或酰化的二糖基和三糖基花色苷的一种有效的方法[11]. 近来,科学工作者多用高效快速、样品用量极少、溶剂消耗极少的毛细管电泳 (CE), 1997年 Bridle用毛细管区带电泳 (CZE)使得混有草莓和接骨木浆果花色苷获得了分离. 1998年 Watanabe用胶束电动毛细管色谱法 (MEKC/MECC)分析了糖果、果汁、果冻等食品中的接骨木色素,不到 10 min所有的花色苷都得到分离[12].

4　花色苷的定性分析

4.1　纸层析与薄层层析

常用的展开剂有 BAW (正丁醇 - 乙酸 - 水 = 4∶1∶5v/v/v)、BH (正丁醇 - 2mol/L盐酸 = 1∶1)、1%盐酸 (浓盐酸 - 水 = 3∶97)等. 可通过各种花色苷在纸层析与薄层层析中的 Rf值来推断花色苷的种类. 各种花色苷的 Rf值可参考文献[2,6,13]等得到. 纸层析与薄层层析用于花色苷的定性分析很有限且缺乏精确性.

4.2　紫外 - 可见光谱法

通常用 0.01%的盐酸甲醇液作为溶剂测定其紫外吸收值 (也可用 0.01%的盐酸乙醇). 花色苷及其色素元在可见光 465 - 550 nm,紫外光 275 nm处有吸收峰,不过通常提取物要在 200 - 700 nm范围扫描,与酰基化有关[3]. 在 0.01%的盐酸乙醇测定的 λmax要比在 0.01%的盐酸甲醇中的 λmax长 10 nm,在 0.01%的盐酸甲醇中的 λmax比在水中的 λmax长 15 nm.

用紫外 - 可见光谱法测定花色苷其要点如下:

①B环有邻位羟基的确定　将花色苷及其色素元在 200 - 700 nm波长范围内进行扫描. 再加入 $AlCl_3$,若出现红移说明 B环有邻位羟基,则可区分矢车菊素、牵牛色素、飞燕草素 (有邻位羟基)与天竺葵素、芍药色素、锦葵色素 (无邻位羟基)[1 - 3,10].

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

②糖基位置的确定　糖基化会导致可见光区紫移, 3 - 羟基位的糖基化会导致最大紫移 (约 10 - 15 nm), 5 - 糖基化会紫移约 7 nm. 3, 5 - 糖基化的花色苷与只 3 - 羟基位糖基化的同花色素的花色苷不易区分,但 5 - 羟基的糖基化与酰基化会在 400 - 570 nm处产生不同的吸收值. 5 - 羟基的没有糖基化,只是 3 - 羟基位的糖基化有一个肩峰, 5 - 羟基的糖基化会在这个区域产生一个平台. 糖基位置最好的确定方法就是测定 E440 nm / Emax[13].

③酰基是否存在的确定　测定在 300 - 330 nm范围内有无吸收峰,若有则说明有酰基. pH > 0. 4时,复合酰化的花色苷在 560 - 600 nm或 600 - 640 nm还显示一个额外的吸收最大峰[3].

④甲基化与羟基化　花色苷 3 和 5 位置的羟基的甲基化会导致微量的紫移,但 7 - 羟基的甲基化会导致 8—10 nm的紫移 (伴随颜色变红). 分子内羟基数目增多会导致红移 (颜色变紫).

⑤其它　添加甲醇钠 (NaOMe)若可见光区的最大吸收波长红移,且吸光度值不随时间下降,则说明花色苷 4 位有羟基,且 3位羟基上形成糖苷[10]. 若花色苷在紫外光下有荧光则说明 5位有取代基[10]. 当黄烊阳离子在 4位上有苯基或甲氧基时,通入二氧化硫后不会褪色[10].

4. 3　HPLC (高效液相色谱)

HPLC可用于花色苷的定性和定量测定,但由于商业上可提供的花色苷标准物有限,所以限制了 HPLC在花色苷定性方面的应用[11]. 再加上高效液相色谱仪本身存在的缺点,所以通常采用高效液相色谱仪与质谱、核磁共振仪等连用的方法.

4. 4　花色苷的水解

将花色苷水解后,分别测定它的色素元、糖基和酰基再结合花色苷测定的结果,同样可推测花色苷的种类. 常用的方法为:在色素的甲醇溶液中按 1 ∶1加入加入 2mol/L 盐酸,水浴回流,再用戊醇提取色素元,以 N - 甲基双辛胺的氯仿溶液除去酸,浓缩干燥可得酰化剂样品;除去色素元和酰化剂的溶液以氯仿除去多余的胺,浓缩经过微孔过滤器,可用于分析[10].

5　花色苷的定量测定

5. 1　应用朗伯—比尔定律测定花色苷

应用朗伯—比尔定律得出的公式:

$$C = \frac{100EVM}{\varepsilon_0} \left(\frac{\mathrm{mg}}{\mathrm{mL}}\right).$$

C为色素的浓度; E为所测得的消光值; V为稀释倍数; M为标准色素的相对分子量; ε_0为标准色素的分子消光系数[2].

该方法测定花色苷总量需要在一个恒定的 pH介质中进行. 首先要在定性的基础上确定花色苷的种类,然后测定单个花色苷的最大吸收波长下的摩尔消光系数 ε或比消光度 E. 但单个花色苷的差别很小,而且单个花色苷组成的比率未知,所以一般用平均比消光度 av E来测定花色苷总量,误差小于 0. 2%. 单个花色苷的比消光度 E是很难得到的,可以利用参考文献提供的数据. Fuleki和 Francis利用该方法对红莓子中花色苷总量进行了测定[1]. 陈炳华、陈前火等用改进的 Fuleki法测定了果实中花色苷的含量[15].

5. 2　经过加工或储藏的材料中花色苷总量测定的两种方法

经过加工或储藏的材料会产生褐色降解物,这些降解物和花色苷具有相同的能量吸收范围. 这类花色苷总量的测定,通常有两种方法.

5. 2. 1　pH示差法

依据花色苷发色团的结构随 pH而转换,而超干扰作用的褐色降解物的特性不随 pH而变化,通过实验确定两个对花色苷吸光度差别最大,但对花色苷稳定的 pH值,根据 Fuleki的公式可以计算出花色苷总量[1].

5. 2. 2　差减法

先测定样品在可见光区最大吸光度,经二氧化硫或亚硫酸盐漂白或过氧化氢氧化后,再测定一次吸光度,二者的差值就是花色苷的吸光度. 参考用标准花色苷绘制的工作曲线,将吸光度换算成浓度. 差减法使用漂白剂因而能降低某些干扰组分的吸光度而使总花色苷浓度偏高[1].

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

5.3 单个花色苷的定量分析

对于单个花色苷的定量分析,其分离纯化是关键.早期单个花色苷纯化的方法有乙酸铅法、聚酰胺法、聚乙烯吡咯烷酮法和离子交换树脂法等,其中以离子交换树脂法最佳. Amberlite CG - 50离子交换树脂比较常用.目前,HPLC方法广泛地应用于总花色苷和单个花色苷的定量分析.

6 结束语

近年来,随着人们对人工合成色素毒性及花色苷抗氧化性和生理功能的认识,对天然色素的需求量将会越来越大,因此找到一种花色苷含量较多且其稳定性较好的植物、进一步改进花色苷分离提纯的方法使其应用于生产实践将是花色苷研究的重要方向.

参考文献:

[1] 卢　钰,董现义.花色苷研究进展[J].山东农业大学学报,2004,35(2):315 - 320.

[2] 孙中武.植物化学[M].哈尔滨:东北林业大学出版社,2000.

[3] 唐传核.植物生物活性物质[M].北京:化学工业出版社.

[4] 任玉林,李　华,邴贵德,等.天然食用色素花色苷[J].食品科学,1995,16(7):22 - 27.

[5] 赵昶灵,郭维明,陈俊愉.梅花"粉皮宫粉"花色色素的花青苷实质和花色的动态变化[J].西北植物学报,2004,24(12):2237 - 2242.

[6] 赵昶灵,郭维明,陈俊愉.梅花"南京红"花色色素花色苷的分子结构[J].云南植物研究,2004,26(5):549 - 557.

[7] KONG J M, CHIA L S, GOH N K, et al. Analysis and Biological Activities of Anthocyanins[J]. Phytochmistry, 2003, 64: 923 - 933.

[8] 宋长铣.花色素类色素的分析方法[J].化工时刊,1999,13(1):20 - 24.

[9] REVILLA E, RYAN J M, MARTIN-ORTEGA G. Comparison of Several Procedures Used for the Extraction of Anthocyanins from Redgrapes[J]. J. Agric. Food Chem., 1998, 46: 4592 - 4597.

[10] 姜平平,吕晓玲,朱惠丽.花色苷类物质分离鉴定方法[J].中国食品添加剂,2003,(4):108 - 111.

[11] FIDRIN M. Preparative High-performance Liquid Chromatography for the Purification of Natural Anthocyanins[J]. J. Chnmatogr A, 1995, 692: 213 - 219.

[12] 杨秀娟,赵晓燕,马　越,等.花青素研究进展[J].中国食品添加剂,2005,4:40 - 42,17.

[13] HARBORNE J B. The Chromatographic Identification of Anthocyanin Pigments[J]. J. Chromatory, 1958, 1: 473 - 488.

[14] CHANDRA A, RANA J, LI Y Q. Separation, Identification, Quantification, and Method Validation of Anthocyanins in Botanical Supplement Raw Materials by HPLC and MS-HPLC[J]. J. Agric. Food Chem., 2001, 49: 3515 - 3521.

[15] 陈炳华,陈前火,刘剑秋,等.吕宋荚迷果红色素的提取、纯化及其性质分析[J].福建师范大学学报,2004,20(4):85 - 89.

Methods for Isolation and Identification of Anthocyanins from Plants

ZHANG Xiu-li[1], LI Jin-tao[1], YANG Jun[1,2]

(College of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong 637002, China;
Institute of Rare Animals and Plants, China West Normal University, Nanchong 637002, China)

Abstract: The presence and the types of anthocyanin in plant tissue can be deduced via obervation on color in plant tissue, in extracts from plant or the extract in low pH solutions. But the precise characterization of anthocyanin needs further work such as seperation, purification, and identification of anthocyanin from plant materials. Different methods of quantification should be adapted according to the plant tissue used for experiment.

Key words: anthocyanin; extraction; purification; characterization; quantification

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net