

葡萄皮花色苷的树脂纯化及稳定性研究

李 杨¹ 韩业慧¹ 李记明² 徐 岩¹

(1.江南大学工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122;2.烟台张裕葡萄酿酒股份有限公司,山东 烟台 264000)

摘 要:以烟73酿酒葡萄为花色苷提取材料,采用HPLC分析方法,对10种树脂的吸附/解析效果进行了比较。选用性能较优的XAD-7HP树脂进行纯化实验并对纯化后花色苷的稳定性进行了研究。结果表明,纯化处理使花色苷在干物质中的含量由处理前的48.16%提高到处理后的94.93%,色价由处理前的47.7提高到处理后的291.6,回收率为85.7%。花色苷的稳定性实验结果表明,随着光照强度、温度、pH值的升高,花色苷的不稳定性明显加剧。在避光、pH值为3.4℃下存放7d,花色苷的保留率在95%以上,适宜于花色苷的短期保存。

关键词:花色苷; 纯化方法; 稳定性; XAD-7HP; 葡萄皮

中图分类号:O657.7;TS261.7;TS261.2 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2012)01-0028-04

Purification of Anthocyanins from Grape Skin by Resin and Its Stabilities

LI Yang¹, HAN Yehui¹, LI Jiming² and XU Yan¹

(1. Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122; 2. Yantai Changyu Grape Wine Co.Ltd., Yantai, Shandong 264000, China)

Abstract: Anthocyanins was extracted from Yan73 grape and then purified by ten kinds of resins and the absorption effects were compared by use of HPLC. The selected XAD-7HP resin with better purifying performance was used for anthocyanins purification and the stability of the purified anthocyanins was studied. The results indicated that anthocyanins content in dry substances increased from 48.16 % to 94.93 % after purification treatment and its color scale increased from 47.7 to 291.6 with the recovery as 85.7 %. The stability experimental results of anthocyanins suggested that anthocyanins became more unstable evidently with the increase of light intensity, temperature, and pH values. As stored at pH 3, 4 °C and in dark in one week, the retention rate of anthocyanins was above 95 %. Accordingly, such conditions were suitable for short storage of anthocyanins.

Key words: anthocyanins; purification methods; stability; XAD-7HP; grape skin

天然色素花色苷是一种良好的食品着色剂,色彩亮丽,无毒无害并能影响食物的口感。花色苷还具有延缓衰老、增强抵抗力、促进血液循环的保健功效^[1-2]。在食品卫生方面,许多国家都颁布了禁止或限制合成色素使用的法律法规,这一举措推动了天然色素提取、纯化、稳定性等方面的研究。

大孔树脂吸附法是目前纯化花色苷类物质最常用的方法,具有效率高、成本低、操作简单的特点。在花色苷纯化方面应用效果较好的大孔树脂有XAD-7HP、X-5、AB-8、NKA-9等^[3-6]。天然花色苷的纯化一般以植物为原料,常见的有杨梅、越橘、火龙果、葡萄、红心萝卜等^[7]。烟73酿酒葡萄是我国自主研究成功的杂交染色品种,已被广泛用于葡萄酒的酿造。烟73酿酒葡萄是欧亚种酿酒葡萄,其花色苷特征具有欧亚种酿酒葡萄花色苷的典型性。

根据已报道的结果,花色苷类物质的纯化效果可用

色价来表示。2007年,孟宪军用AB-8大孔树脂从蓝莓中纯化出了花色苷类物质,色价为32.1^[8];2009年,李颖畅通过对AB-8纯化条件的进一步优化,将蓝莓花色苷的色价提高到54.10^[9];高虹于2005年采用X-5大孔树脂纯化得到的紫荆花色苷类物质的色价为264.3,是国内报道的提取花色苷纯化后的最高色价^[10]。

本实验的目的是纯化烟73酿酒葡萄花色苷并研究其稳定性。通过找到一种适合葡萄皮花色苷纯化实验的大孔树脂,提高花色苷色价,以期扩大天然花色苷的使用范围并提升其价值。稳定性研究主要包括对其在不同pH值、温度、光照强度下的稳定性。根据花色苷在不同条件下的稳定性差异寻找花色苷溶液的适宜保存条件。

1 材料与方法

1.1 实验材料及仪器

基金项目:“泰山学者”建设工程。

收稿日期:2011-11-01

作者简介:李杨(1985-),女,硕士研究生,研究方向为葡萄酒分析化学。

通讯作者:徐岩, yxu@jiangnan.edu.cn。

烟 73: 烟台张裕葡萄酒股份有限公司, -20 °C 贮存;

95 % 乙醇 (分析纯), 浓盐酸 (分析纯), 乙腈 (色谱纯), 甲酸 (色谱纯), 去离子水, 二甲花翠素葡萄糖苷标样 (购自法国 Extrasynthese 公司);

高效液相色谱 HPLC (Dienox P680, UVD170), Thermo Scientific 全波长酶标仪, LABCONCO 冷冻干燥机, BUCHI 旋转蒸发仪 R-210, UNIC UV-2802H 型紫外可见分光光度计, 纯水仪 (Millipore, simplicity UV)。

1.2 实验方法

1.2.1 酿酒葡萄皮中花色苷的提取

参考郭耀东的研究^[11], 提取条件确定为: 料液比 1:4 (g:mL), 温度 70 °C, 提取液乙醇浓度 60 %, pH 为 0.5, 浸提 30 min, 提取 3 次并合并提取液。浸提完成后, 先滤去皮渣, 再以 8000 r/min 离心 10 min 去沉淀。将提取液真空旋蒸至原体积的 2/5, 8000 r/min 离心 10 min 去沉淀。

1.2.2 花色苷的分析方法

1.2.2.1 花色苷的 HPLC 分析方法

采用 iChroCART C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm), 溶剂 A: 水 / 乙腈 / 甲酸 = 87/3/10 (v/v/v), 溶剂 B: 水 / 乙腈 / 甲酸 = 40/50/10 (v/v/v), 柱温 45 °C, 进样量 20 μL, 520 nm 检测, 梯度洗脱。梯度洗脱条件为: (1) 0~15 min, 6 % A~30 % A; (2) 15~30 min, 30 % A~50 % A; (3) 30~35 min, 50 % A~60 % A; (4) 35~40 min, 60 % A~6 % A; (5) 40~45 min, 6 % A。

1.2.2.2 烟 73 葡萄中花色苷的定性与定量

将烟 73 葡萄皮肉分离后分别提取, 采用高效液相-质谱联用 (HPLC-MS) 方法, 检测烟 73 葡萄皮及果肉中的花色苷含量。实验中对溶液中花色苷浓度的检测都采用二甲花翠素葡萄糖苷 (Malvidin-3-O-glucoside) 进行半定量。所有实验进行 3 次, 取平均值并计算误差。

1.2.3 树脂处理及花色苷纯化方法

表 1 中列出了在色素提取中应用较为普遍的各种树脂。其预处理方法如下: 先用乙醇浸泡, 每 12 h 换洗 1 次, 至洗出液无色透明为止。再用去离子水洗至无醇, 接着在 1 mol/L NaOH 中浸泡 12 h, 然后用去离子水洗至中性 pH 值, 换用 1 mol/L HCl 浸泡 12 h, 最后再用去离子水洗至中性 pH 值, 装柱备用。

表 1 树脂的类型

极性强度	树脂名称
极性	DA201、D201
中极性	HPD400、HPD750、HPD400
弱极性	AB-8、DS401、XAD-7HP
非极性	X-5、SQ-A21

XAD-HP 大孔树脂装柱后先用 0.1 % 的盐酸水溶液

平衡。提取液经 0.45 μm 滤膜过滤后, 通过蠕动泵加样。用 5 倍柱体积的 0.1 % 盐酸水溶液进行冲洗, 洗去糖、有机酸等杂质。然后换用 0.1 % 的盐酸乙醇溶液洗脱, 收集带有颜色的洗脱液。洗脱液经真空旋蒸至原体积的 1/10, 然后真空冷冻干燥。

1.2.4 检测纯化效果

1.2.4.1 色价

精确称取样品 50 mg, 用 pH 3 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液定容至 1000 mL, 用 1 cm 比色皿以缓冲溶液作空白, 在 520 nm 下测其吸光度^[12]。

$$\text{色价} = A \times 100 / m$$

式中: A——520 nm 下的吸光度;

m——样品质量。

1.2.4.2 纯化前后花色苷纯度及回收率的计算

花色苷回收率的计算方法:

$$\text{回收率}(\%) = (\text{实际回收花色苷质量} \div \text{理论回收花色苷质量}) \times 100 \%$$

1.2.4.3 光谱扫描

将样品在 200~700 nm 波长下进行光谱扫描, 步长为 5 nm, 比较纯化前后样品在不同波长下吸光度的差别。

1.2.5 花色苷稳定性研究

1.2.5.1 光稳定性实验

柱纯化后的花色苷粉末溶解到 pH 3 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中 (200 mg/L), 分 3 组分别装入透明的密闭小瓶中。在相同的室温条件下, 3 组分别置于白炽灯灯光、室内散射光、避光的环境中, 每隔 2 d 检测 1 次 3 组样品中的花色苷浓度。

1.2.5.2 热稳定性实验

用柱纯化后的花色苷粉末溶解到 pH 3 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中 (200 mg/L), 分 4 组分别装入棕色的密闭小瓶中。4 组试验样品分别置于 4 °C、30 °C、50 °C、70 °C 下, 每隔 8 h 检测 1 次花色苷浓度。

1.2.5.3 pH 值稳定性实验

柱纯化后的花色苷粉末溶解到 pH 值分别为 2、3、4、5、6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中 (200 mg/L), 装入棕色密闭小瓶于室温存放, 每隔 6 h 检测 1 次各组样品中的花色苷浓度。

2 结果与分析

2.1 葡萄皮与果肉中的花色苷

图 1 为葡萄皮中花色苷的色谱图, 图中色谱峰 1~7 号依次为花翠素葡萄糖苷、花青素葡萄糖苷、甲基花翠素葡萄糖苷、甲基花青素葡萄糖苷、二甲花翠素葡萄糖苷、二甲花翠素乙酰葡萄糖苷、二甲花翠素反式香豆酰葡萄糖苷。7 种花色苷是欧亚种酿酒葡萄中的主要花色苷, 能

够在一定程度上反映葡萄的品种特征。图1显示果皮中二甲花翠素葡萄糖苷的含量最高,占总量的32.5%,其次为甲基花青素葡萄糖苷,占15.3%;果肉中的甲基花青素葡萄糖苷含量最高,占51.3%,二甲花翠素葡萄糖苷次之,为23.9%。

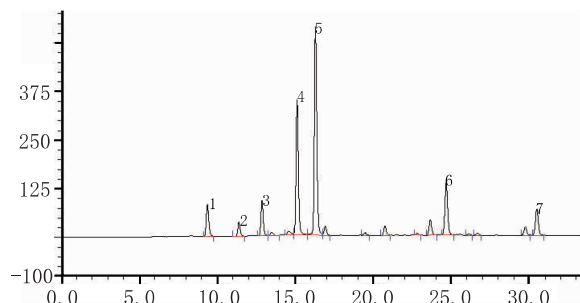


图1 果皮中花色苷色谱图

2.2 花色苷的提取

烟73葡萄中花色苷半定量的结果为658.7 mg/100 g果实,远高于刘洪海等在2009年采用pH值示差法所测得的烟73果实中花色苷310 mg/100 g的含量^[13]。葡萄皮中花色苷提取物中花色苷占到了干物质的48.16%,果肉提取物中花色苷仅占干物质的3.33%。烟73葡萄花色苷74%分布在果皮中,26%存在于果肉中。鉴于葡萄皮中花色苷含量高,提取物中杂质较少,所以选用葡萄皮作为提取材料。

2.3 树脂的静态试验

不同树脂的静态试验结果比较见表2。将表2的数据进行比较可以看出,对花色苷吸附性能较好的是XAD-7HP、XAD-761、DA201、HPD400 4种树脂,解析性能较好的是AB-8、SQ-A21、D4006、DS401、DM301、X-5、XAD-7HP。从综合吸附和解析效果来看,XAD-7HP是比较理想的树脂,其每10 mL的吸附量、解析量分别为3.112 mg、1.611 mg。

表2 不同树脂的静态试验结果比较

树脂	极性	吸附量 (mg)	吸附率 (%)	解析量 (mg)	解析率 (%)
DA201	极性	2.853	76.4	1.197	42.0
HPD400	中极性	2.844	76.2	0.977	34.3
HPD750	中极性	2.775	74.3	1.326	47.8
AB-8	弱极性	1.989	53.3	1.456	73.2
DS401	弱极性	2.438	65.3	1.482	60.8
XAD-7HP	弱极性	3.112	83.4	1.611	51.8
XAD-761	弱极性	3.094	82.9	0.977	31.6
X-5	非极性	2.654	71.1	1.585	59.7
D4006	非极性	2.395	64.2	1.469	61.3
SQ-A21	非极性	1.359	36.4	0.899	66.1

2.4 XAD-7HP的动态吸附/解析曲线

从动态曲线(图2)可以看出,XAD-7HP在30 min左右时达到了吸附/解析平衡。在吸附和解析过程的前

10 min里,溶液中花色苷浓度的变化最快,其后逐渐放缓直至达到动态平衡。XAD-7HP对花色苷的吸附/解析迅速,符合实验要求。

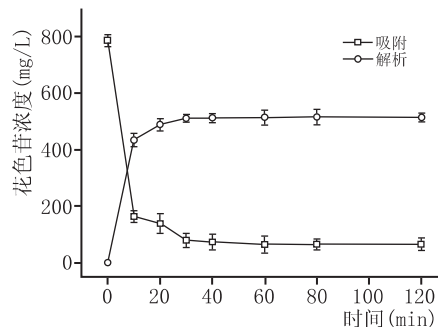


图2 树脂XAD-7HP的动态吸附/解析曲线

2.5 纯化效果

经XAD-7HP大孔树脂纯化后,花色苷的色价由纯化前的47.7提高到291.6,高于目前国内文献报道的最大值。花色苷在干物质中的含量也有明显增加,由之前的48.16%提高到了94.93%。

花色苷在520 nm左右的吸收作用最强,在紫外光区虽有吸收但相对较弱,以带苯环的杂质类物质的吸收为主。纯化前后的扫描光谱图见图3。

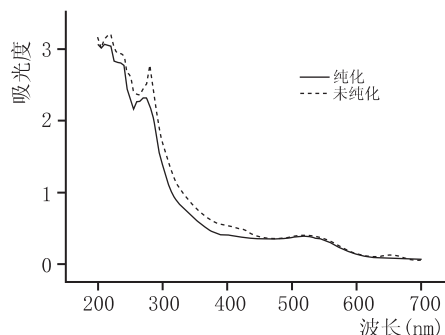


图3 纯化前后的扫描光谱图

从图3扫描结果来看,纯化后花色苷提取液中的杂质明显减少。在520 nm左右吸光度基本一致的情况下,纯化后的样品在200~450 nm和650 nm左右,纯化后溶液的吸光度明显低于纯化前。扫描光谱图进一步证明了XAD-7HP树脂对葡萄皮花色苷具有良好的纯化效果。

2.6 烟73葡萄花色苷的稳定性

花色苷对光的稳定性随着光照强度的增加而降低(图4A)。避光时花色苷的降解速度最慢,常温下7 d内保留率保持在90%以上。光照能明显加速花色苷的降解,白炽灯较室内自然光对花色苷的降解作用明显。花色苷在7 d之后降解速度有加快的趋势。

如图4B所示,花色苷在低温时稳定性较好,40 h内花色苷的降解不明显;温度上升到30℃时,40 h后降解率在10%以内;温度继续升高,降解速度进一步增大,50℃时40 h后的保留率仅为60%,而70℃下经30 h

后几乎全部降解。

花色苷在不同 pH 值下其稳定性不同,规律与光照、温度类似(图 4 C)。常温下,随着 pH 值增加,花色苷的稳定性下降。随着 pH 值由 2 上升到 6,保留率由 90 %逐步下降到 30 h 时的 75 %。

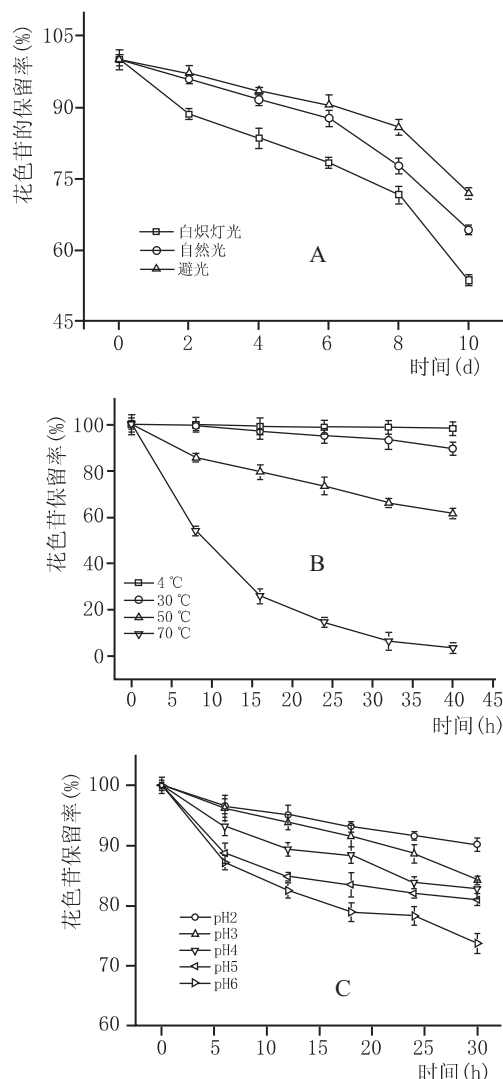


图 4 花色苷的光(A)、热(B)、pH(C)稳定性

根据稳定性实验,选取避光、4 °C、pH 3 共 3 种对稳定性有利的条件进行组合实验,结果见图 5。由图 5 可以看出,在此条件下花色苷在 7 d 内的保留率达 95 %以上,14 d 的保留率为 90 %以上,证明此条件组合适宜于花色苷溶液的短期保存。

3 结论

烟 73 酿酒葡萄中的花色苷含量较高,每 100 g 果实中含有 650 mg 以上的花色苷,是提取花色苷的良好材料。大孔树脂 XAD-7HP 对酿酒葡萄皮中的花色苷具有良好的吸附和解析性能,纯化效果非常理想。经大孔树脂纯化,花色苷的色价达到了 291.6。花色苷在干物质中的

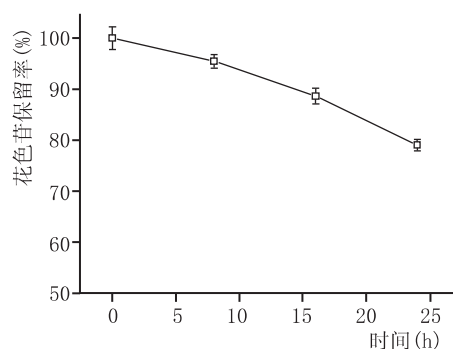


图 5 花色苷在避光、4 °C、pH 3 时的稳定性

含量增加明显,由之前的 48.16 %提高到了 94.93 %。稳定性实验表明光、热、pH 值均会影响花色苷的稳定性,并且呈现出相似的负相关的变化规律。避光、低温、低 pH 值有利于花色苷的稳定性。

参考文献:

- [1] Fournand D, Vicens A, Sidhoum L, et al. Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006,54(19): 7331-7338.
- [2] Nayak CA, Srinivas P, Rastogi NK. Characterisation of anthocyanins from *Garcinia indica* Choisy[J]. Food Chemistry, 2010,118(3): 719-724.
- [3] 曹少谦,潘思轶,姚晓琳,等.柱层析法分离纯化血橙花色苷[J]. 中国农业科学, 2009,42(5): 1728-1736.
- [4] 邹阳.AB-8 大孔吸附树脂对蓝莓色素吸附和分离的特性研究[J].中国食品添加剂,2007(1): 80-82.
- [5] 吴克伟,赵晓燕,李应彪,等.XAD-7HP 大孔树脂纯化紫玉米苞叶花色苷的研究[J].中国调味品,2009,43(6): 98-100.
- [6] 郑永丽.大孔树脂法分离原花色素的初步研究[J].天津化工, 2010,24(1): 39-40.
- [7] 王晓梅.红心萝卜花色苷稳定性的研究[J].食品科学,2008,29(7): 98-100.
- [8] 孟宪军,李颖畅,宣景宏,等.AB-8 大孔树脂对蓝莓花色苷的动态吸附与解吸特性研究[J].食品工业科技,2007,28(12): 94-99.
- [9] 李颖畅,郑凤娥,孟宪军.大孔树脂纯化蓝莓果中花色苷的研究[J].食品与生物技术学报, 2009,28(4): 496-500.
- [10] 高虹,张洁,黎碧娜,等.大孔吸附树脂分离紫荆花红色素[J].华西药杂志, 2005,20(4): 302-305.
- [11] 郭耀东.葡萄皮花色苷提取纯化技术及稳定性研究[D].西安: 西北农林科技大学,2008.
- [12] 中华人民共和国卫生部.GB25536—2010 食品添加剂-萝卜红[S].北京:中国标准出版社,2010.
- [13] 刘洪海,张晓丽,杜平.pH 示差法测定烟 73 葡萄中花青素含量[J].中国调味品, 2009,34(4): 110-111.
- [14] Matsumoto H, Hanamura S, Kawakami T, et al. Preparative-scale isolation of four anthocyanin components of black currant (*Ribes nigrum* L.) fruits[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001,49(3): 1541-1545.