

# 紫马铃薯花色苷的提取纯化与鉴定

王仁雷<sup>1</sup>, 周峰<sup>2</sup>, 周泉澄<sup>2</sup>, 王小平<sup>2</sup>, 华春<sup>2,\*</sup>, 李建玲<sup>3</sup>, 赵梦丹<sup>3</sup>

(1.江苏教育学院生命科学与化学学院, 江苏南京 210013; 2.南京晓庄学院生物化工与环境工程学院, 江苏南京 211171; 3.南京师范大学生命科学院, 江苏南京 210046)

**摘要:**对超声波辅助提取紫马铃薯花色苷工艺条件进行优化,并用NKA-9大孔吸附树脂进行纯化,液相色谱结合紫外-可见光谱扫描分离和鉴定花色苷组成。结果表明:花色苷最佳提取条件为料液比1:50(2.5g/100mL柠檬酸溶液)、超声功率400W、提取温度45℃、提取时间10min,以干质量计算紫马铃薯种花色苷含量为1.362mg/g;用NKA-9大孔吸附树脂纯化,8倍柱床体积洗脱出占总量98.35%的花色苷,花色苷纯度达到90.23%;高效液相色谱鉴定出紫马铃薯含有5种组分,其中3种分别是矢车菊素-3-葡萄糖苷、矢车菊素-3-芸香糖苷和芍药-3-葡萄糖苷,其含量分别为0.27、0.057mg/g和0.46mg/g,三者总和占马铃薯中总花色苷含量的57.78%。马铃薯中含量最高的花色苷成分出峰保留时间为12.224min,其结构未知。

**关键词:**紫马铃薯;花色苷;超声波;树脂;高效液相色谱

## Extraction, Purification and Identification of Anthocyanins from Purple Potato

WANG Ren-lei<sup>1</sup>, ZHOU Feng<sup>2</sup>, ZHOU Quan-cheng<sup>2</sup>, WANG Xiao-ping<sup>2</sup>,  
HUA Chun<sup>2,\*</sup>, LI Jian-ling<sup>3</sup>, ZHAO Meng-dan<sup>3</sup>

(1. College of Life Science and Chemistry, Jiangsu Institute of Education, Jiangsu 210013, China ;  
2. School of Biochemical and Environmental Engineering, Nanjing Xiaozhuang College, Nanjing 211171, China ;  
3. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

**Abstract :** The main goals of the current study were to optimize the ultrasonic-assisted extraction process for anthocyanins from purple potato, purify extracts using NKA-9 macroporous adsorption resin, and separate and identify anthocyanin constituents. The optimal conditions for anthocyanin extraction were found as follows: 2.5% citric acid aqueous solution as extraction solvent at a material-to-liquid ratio of 1:50 and 400 W ultrasonic power for an extraction duration of 10 min at 45℃. Under these conditions, the extraction yield of anthocyanins from purple potato was 1.362 mg/g (dry weight). Further, anthocyanins with 98.35% recovery and 90.23% purity were obtained after purification using NKA-9 macroporous adsorption resin as a result of elution with 8 bed volumes of pH 2.5, 55% ethanol aqueous solution containing citric acid. Using HPLC, 5 anthocyanin fractions were identified, including cy-3-glu, cy-3-rut and pn-3-glu with respective contents of 0.27, 0.057 and 0.46 mg/g sweet potato (dry weight), altogether accounting for 57.78% of total anthocyanins. The retention time of the most predominant anthocyanin was 12.224 min, while the structure was unknown.

**Key words :** purple potato ; anthocyanin ; ultrasonic ; resin ; HPLC

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)22-0055-05

花色苷具有抗氧化<sup>[1-2]</sup>、增强人体免疫力、延缓衰老<sup>[3-4]</sup>、抑制肥胖、增强视力<sup>[5-6]</sup>等生物功效。紫马铃薯富含牵牛花色苷、芍药苷等及其咖啡酰化衍生物为主的色素,另富含VC、胡萝卜素等,兼具药食用功能。

本研究以资源丰富和低成本的紫马铃薯为原料,采用超声波辅助提取其中的花色苷,采用大孔吸附树脂分离纯化、液相色谱分离鉴定,以期对紫马铃薯中天然色素的深度开发提供参考。

收稿日期: 2011-06-29

基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目(KJD180118); 江苏省植物生理学精品课程建设项目(2010);

江苏省现代教育技术研究重点课题(2010); 南京市环境科学重点学科建设项目(2011)

作者简介: 王仁雷(1963—), 男, 教授, 博士, 主要从事植物光合与逆境生理研究。E-mail: WRL3501988@163.com

\*通信作者: 华春(1963—), 女, 教授, 学士, 主要从事盐生植物资源开发与利用研究。E-mail: hc3501988@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

紫马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)产于山东莱阳市。

矢车菊素-3-葡萄糖苷、矢车菊素-3-芸香糖苷、芍药-3-葡萄糖苷 挪威 Polyphenols Laboratories AS 公司; NKA-9 大孔吸附树脂 南京化工大学; 其他试剂均为色谱纯或分析纯。

### 1.2 仪器与设备

TU-1901 紫外分光光度计 北京普析通用有限公司; LGJ-18C 压盖型冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂有限公司; KQ2200B 型超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; Zorbax SB C<sub>18</sub> 柱(250mm × 4.6mm, 5 μm) 美国 Agilent 公司; RE52 型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; BSZ-160F 自动分部收集器 上海精密仪器有限公司; DZF-6090 真空干燥箱 上海和呈仪器设备有限公司; JYL-D010 粉碎机 九阳股份有限公司; GL-20G 冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; 树脂动态吸附柱(40cm × 0.5cm) 上海沪西分析仪器厂有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 紫马铃薯花色苷的提取<sup>[7]</sup>

工艺流程: 紫马铃薯 清洗、去皮、切片 真空干燥 粉碎过筛 紫马铃薯粉 加入柠檬酸溶液, 超声波辅助提取 离心分离 紫马铃薯花色苷溶液。

紫马铃薯清洗干净、去皮后切片, 厚度约 1 cm, 50 ~ 55 °C 真空干燥, 粉碎后过 100 目筛, 得到紫马铃薯粉。用称量皿精确称取 10.0000 g 紫马铃薯粉于锥形瓶中, 加入合适体积的 2.5 g/100 mL 柠檬酸溶液, 设定超声波功率, 超声波每提取 30 s 后间隔 30 s, 一定温度下恒温水浴避光提取一定时间, 10000 r/min 冷冻离心 10 min 后, 取上清液, 得到紫马铃薯花色苷溶液, 4 °C 冰箱冷藏备用。

#### 1.3.2 紫马铃薯花色苷最大吸收波长的测定

紫马铃薯花色苷溶液在波长 200 ~ 800 nm 范围内扫描, 得到紫马铃薯花色苷在可见光区的最大吸收波长, 从而确定样品测定的吸光度。

#### 1.3.3 紫马铃薯花色苷含量的测定<sup>[8-9]</sup>

参照文献<sup>[8]</sup>的 pH 示差法测定。取待测液 1 mL, 分别用 pH1.0 和 pH4.5 的缓冲液定容至 10 mL。两种溶液分别测定在 700 nm 和 535 nm 波长处的吸光度( $A$ )。每个样品平行 3 次, 取平均值。按下式得到花色苷含量, 以干质量计, 下同。

花色苷含量/(mg/g) =  $[A(\lambda \times L)] \times M_w \times DF \times V/W_1$ <sup>[9]</sup>

式中:  $A = (A_{535\text{nm}, \text{pH}1.0} - A_{700\text{nm}, \text{pH}1.0}) - (A_{535\text{nm}, \text{pH}4.5} - A_{700\text{nm}, \text{pH}4.5})$ ;  $M_w$  为矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔消光系数

(26900 L/(mol · cm));  $M_w$  为矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔质量(449.2 g/mol);  $DF$  为稀释倍数;  $V$  为最后定容的体积/mL;  $W_1$  为样品质量/mg;  $L$  为比色皿的宽度(1 cm)。

#### 1.3.4 紫马铃薯花色苷大孔吸附树脂初步纯化<sup>[10]</sup>

称取一定量的 NKA-9, 清洗去杂, 将树脂先用 2 倍体积的 2 mol/L NaOH 溶液洗涤, 用蒸馏水洗至中性后, 再用 2 倍体积的 2 mol/L HCl 溶液洗涤, 最后用蒸馏水洗至中性。湿法装柱(40 cm × 0.5 cm), 树脂高度为 30 cm, 用 pH 值为 3.0 的磷酸-柠檬酸缓冲液稀释紫马铃薯花色苷溶液至上样质量浓度为 0.35 mg/mL, 上样量 300 mL, 吸附流速 3 mL/min, 室温下用相同的流速以蒸馏水洗下树脂中的水溶性杂质, 待水洗流出液为无色后, 用 8 倍柱床体积的 55% 乙醇溶液(pH 值用柠檬酸溶液调至 2.5)洗脱, 洗脱流速 2 mL/min, 收集合并洗脱液, 40 °C 旋转蒸发去除乙醇, 置于冰箱冷藏备用。洗脱结束后, 依据洗脱曲线, 分别收集并合并洗脱液, 按照下式计算洗脱率。

$$\text{洗脱率}/\% = \frac{A_1 \times V_1}{A_2 \times V_2}$$

式中:  $A = (A_{535\text{nm}, \text{pH}1.0} - A_{700\text{nm}, \text{pH}1.0}) - (A_{535\text{nm}, \text{pH}4.5} - A_{700\text{nm}, \text{pH}4.5})$ ;  $A_1$  为洗脱液吸光度;  $A_2$  为上柱液吸光度;  $V_1$  为洗脱液体积;  $V_2$  为原液体积。

#### 1.3.5 液相色谱分离鉴定<sup>[11-14]</sup>

液相色谱条件: 色谱柱<sup>[11-13]</sup>: Agilent Zorbax SB C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 进样体积 20 μL; 流动相: A 相为 0.2% (V/V) 乙腈溶液, B 相为甲酸溶液; 梯度: 0 ~ 5 min, 10% A; 5 ~ 20 min, 10% ~ 30% A; 25 ~ 30 min, 10% A; 流速 1 mL/min; DAD 扫描波长范围 225 ~ 600 nm, 检测波长 535 nm, 对分离的花色苷色谱峰进行紫外-可见光谱分析。将标准对照品配成 0、5、10、20、50、100、200 mg/L 的梯度溶液<sup>[14]</sup>, 混合标准品色谱分析条件同上, 得到标准品峰面积-质量浓度标准曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫马铃薯花色苷的提取工艺条件优化

#### 2.1.1 紫马铃薯花色苷的提取工艺条件单因素试验

按照 1.3.1 节工艺方法, 选择超声波功率 200 W、提取温度 25 °C、提取时间 5 min, 料液比分别为 1:30、1:40、1:50、1:60、1:70 (g/mL), 测定花色苷含量, 结果如图 1 所示。从图 1 可以看出, 料液比为 1:40 ~ 1:60 时, 花色苷含量变化缓慢。料液比过高不利于原料与溶剂的充分接触和提取物的溶出, 从而导致目标物得率

下降,但料液比过低会导致提取物被稀释,降低了提取效率,同时不仅造成浪费,也给后续的溶剂回收增加困难。因此,选择最佳料液比为 1:40 ~ 1:60。

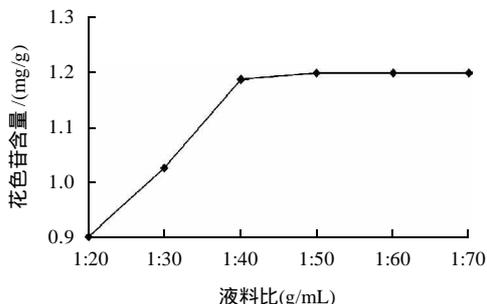


图1 料液比对花色苷含量的影响  
Fig.1 Effect of material/solvent ratio on anthocyanin extraction

按照 1.3.1 节工艺方法,选择料液比 1:50(g/mL)、提取温度 25、提取时间 5min,超声波功率分别为 100、200、300、400、500、600W,测定花色苷含量,结果如图 2 所示。从图 2 可以看出,超声波功率为 300 ~ 500W 时,花色苷含量变化缓慢且有所降低。这可能是由于随着超声功率的增强,细胞内物质不断被释放,同时一些能使花色苷分解的酶也被充分释放出来。因此,选择最佳超声功率为 300 ~ 500W。

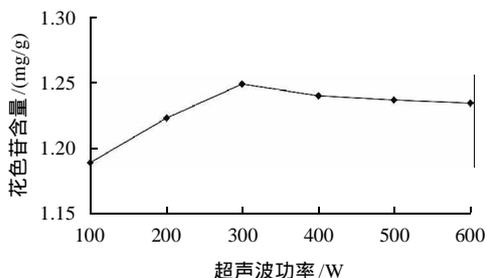


图2 超声波功率对花色苷含量的影响  
Fig.2 Effect of ultrasonic power on anthocyanin extraction

按照 1.3.1 节工艺方法,选择料液比 1:50(g/mL)、超声波功率 300W、提取时间 5min,提取温度分别为 15、25、35、45、55、65,测定花色苷含量,结果如图 3 所示。从图 3 可以看出,提取温度达到 35 以上后,花色苷含量变化缓慢。较高的提取温度有利于破坏组织结构、加速分子运动、促进扩散而加速目标物的溶出,但紫马铃薯中含有的淀粉在高温下的糊化作用可能会阻止提取剂对色素的溶解,超过一定温度后,有利作用和不利作用可能相抵消,导致花色苷含量变化缓慢。因此,选择最佳提取温度为 35。

按照 1.3.1 节工艺方法,选择料液比 1:50(g/mL)、超

声波功率 300W、提取温度 35,提取时间分别为 5、10、15、20、25min,测定花色苷含量,结果如图 4 所示。从图 4 可以看出,提取温度在 5 ~ 15min 范围内,花色苷含量变化缓慢,超过 15min 后,花色苷含量开始下降,延长提取时间有利于两者充分接触而溶出更多的活性物质,但是长时间的处理可能会导致对活性花色苷的破坏而造成目标物得率下降。因此,选择最佳提取时间为 5 ~ 15min。

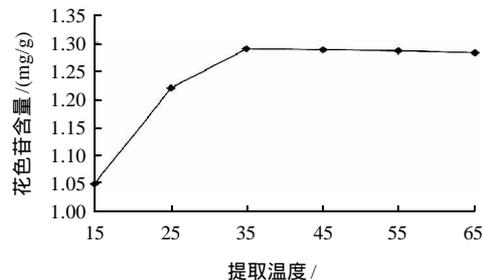


图3 提取温度对花色苷含量的影响  
Fig.3 Effect of temperature on anthocyanin extraction

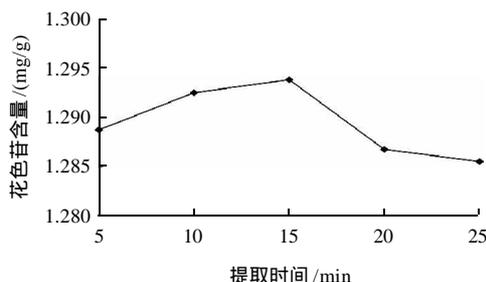


图4 提取时间对花色苷含量的影响  
Fig.4 Effect of extraction time on anthocyanin extraction

### 2.1.2 紫马铃薯花色苷的提取工艺条件正交试验

在单因素试验的基础上确定了影响紫马铃薯花色苷提取的 4 个主要因素,以花色苷得率为指标,设置正交试验因素水平表如表 1 所示,结果如表 2 所示。

表 1 紫马铃薯花色苷提取工艺优化正交试验因素水平表  
Table 1 Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters involved in orthogonal array design

水平	因素			
	A 料液比(g/mL)	B 超声波功率/W	C 提取温度/	D 提取时间/min
1	1:40	300	25	5
2	1:50	400	35	10
3	1:60	500	45	15

从表 2 可以看出,影响紫马铃薯花色苷超声波辅助提取工艺因素的主次顺序为 A > D > B > C。料液比影响最为显著,料液比过大,影响超声效果,提取率下

降；料液比过小，则容易导致提取过程花色苷的损失；提取时间影响程度次之，提取时间不足，提取时间过长，提取率会下降，原因可能是花色苷在提取过程中发生降解而损失；超声波功率和提取温度对马铃薯花色苷提取工艺的影响相对较小。优化实验最佳工艺条件为  $A_2B_3C_3D_2$ ，考虑到 400W 和 500W 超声功率对实验结果影响不大，因此花色苷提取实验选择最佳超声功率为 400W。综上所述，花色苷提取实验最佳工艺参数为料液比 1:50、超声功率 400W、提取温度 45℃、提取时间 10min。在最优条件下的验证实验结果为花色苷含量 1.362mg/g。

表 2 紫马铃薯花色苷提取工艺优化正交试验设计及结果

Table 2 Orthogonal arrays and experimental results

试验号	A	B	C	D	花色苷含量/(mg/g)
1	1	1	1	1	1.1928
2	1	2	2	2	1.2864
3	1	3	3	3	1.2606
4	2	1	2	3	1.2638
5	2	2	3	1	1.3224
6	2	3	1	2	1.3452
7	3	1	3	2	1.2226
8	3	2	1	3	1.1804
9	3	3	2	1	1.1886
$k_1$	3.7398	3.6792	3.7184	3.7038	
$k_2$	3.9314	3.7892	3.7388	3.8542	
$k_3$	3.5916	3.7944	3.8056	3.7048	
R	0.1133	0.0384	0.0291	0.0501	

## 2.2 紫马铃薯花色苷的纯化

### 2.2.1 紫马铃薯花色苷最大吸收波长的确定

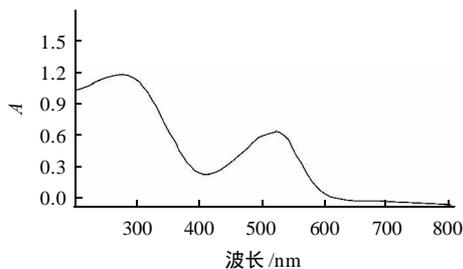


图 5 紫马铃薯花色苷的吸收波长扫描光谱图

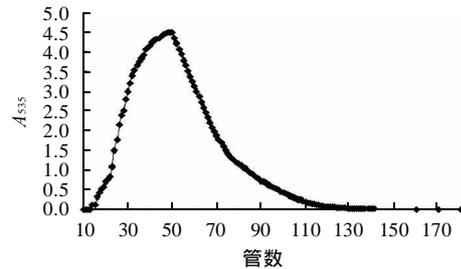
Fig.5 UV-Vis spectra of anthocyanins extracted from purple potato

由图 5 得出，在波长 500~540nm 区域内，紫马铃薯花色苷的最大吸收波长为 535nm，因此，以 535nm 作为紫马铃薯花色苷的测定波长。

### 2.2.2 紫马铃薯花色苷大孔吸附树脂纯化

从图 6 可以看出，4 倍柱床体积左右时，解析达到

顶峰，洗脱出占总量 61.24% 的花色苷，6 倍柱床体积时，洗脱出占总量 90.12% 的花色苷，8 倍柱床体积时，洗脱出占总量 98.35% 的花色苷，所得花色苷经一定程度浓缩至 300mL，花色苷纯度达到 90.23%。

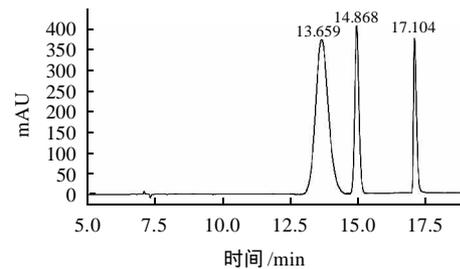


每管收集 6mL，柱床体积约为 90mL。

图 6 紫马铃薯花色苷在 NKA-9 大孔树脂的洗脱曲线

Fig.6 Elution curve of anthocyanins extracted from purple potato on NKA-9 macroporous resin

## 2.3 紫马铃薯花色苷液相色谱分离鉴定



按照出峰时间先后分别是矢车菊素-3-葡萄糖苷、矢车菊素-3-芸香糖苷、芍药-3-葡萄糖苷；上样质量浓度 200mg/L。

图 7 标准品在高效液相色谱上的洗脱曲线

Fig.7 HPLC chromatogram of anthocyanin standards

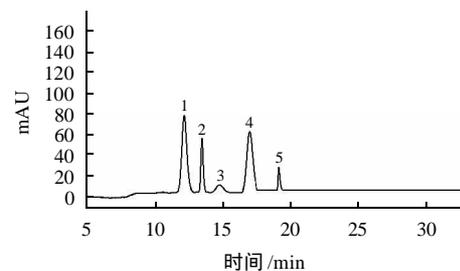


图 8 紫马铃薯花色苷高效液相色谱图

Fig.8 HPLC chromatogram of purified anthocyanins

从图 7、8 根据保留时间判断峰 2 可能是矢车菊素-3-葡萄糖苷，峰 3 可能是矢车菊素-3-芸香糖苷，峰 4 可能是芍药-3-葡萄糖苷。由于缺少峰 1 和峰 5 的标准品，因此无法对峰 1 和峰 5 组分进行定性分析。

3 种花色苷的标准品质量浓度  $X$ /(mg/L) 与峰面积  $Y$  的

相互关系回归方程及紫马铃薯峰 2、峰 3、峰 4 中花色苷含量测定结果如表 3 所示。由表 3 可以看出,紫马铃薯中矢车菊素-3-葡萄糖苷和芍药-3-葡萄糖苷两种花色苷含量相对较高,两者总和占紫马铃薯花色苷总含量的 53.60%。紫马铃薯中矢车菊素-3-芸香糖苷的含量相对较少。三者总和占马铃薯中总花色苷含量的 57.78%。

表 3 花色苷标准品标准曲线及紫马铃薯各花色苷含量  
Table 3 Standard curves of three anthocyanin standards and their contents in purple potato

标准品	标准曲线	相关系数	花色苷质量浓度/(mg/L)	紫马铃薯各花色苷含量/(mg/g)
矢车菊素-3-葡萄糖苷	$Y = 5.1726X + 9.2743$	0.9992	8.84	0.27
矢车菊素-3-芸香糖苷	$Y = 1.9688X + 6.2396$	0.9994	1.91	0.057
芍药-3-葡萄糖苷	$Y = 1.4045X + 39.101$	0.9992	14.88	0.46

花色苷的紫外-可见吸收光谱可提供花色苷元、糖基取代模式的信息。由图 9 可以看出,含量较高的峰 2 和峰 4 的花色苷在 440nm 处紫外吸光度和最大吸收波长处紫外吸光度的比值  $A_{440}/A_{max}$  分别为 31.11% 和 29.63%, 均在 29% ~ 33% 内, 根据参考文献[15]可以判断峰 2 和峰 4 为  $C_3$  位被糖基取代的花色苷, 这与高效液相色谱实验结果一致。

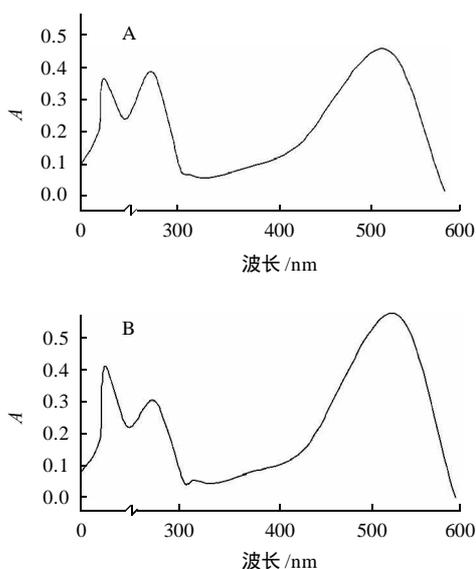


图 9 峰 2(A)和峰 4(B)紫外-可见扫描光谱  
Fig.9 UV-Vis spectra of peaks 2 and 4 shown in Fig. 8

### 3 结论

3.1 紫马铃薯超声波辅助提取实验最佳工艺参数为料液比 1:50、超声功率 400W、提取温度 45℃、提取时间 10min。

在最优条件下的验证实验结果为花色苷含量 1.362mg/g。

3.2 采用 NKA-9 大孔吸附树脂纯化紫马铃薯提取液, 8 倍柱床体积时, 洗脱出占总量 98.35% 的花色苷, 花色苷纯度达到 90.23%。

3.3 高效液相色谱分离出紫马铃薯中的花色苷包括 5 种成分, 其中 3 种成分可能分别是矢车菊素-3-葡萄糖苷、矢车菊素-3-芸香糖苷和芍药-3-葡萄糖苷, 其含量分别为 0.27、0.057、0.46mg/g, 三者总和占马铃薯中总花色苷含量的 57.78%。马铃薯中含量最高的花色苷成分在保留时间 12.224min 处出峰, 其结构未知, 可能是矢车菊素-3-葡萄糖苷酰化异构体。液相色谱分离出紫马铃薯中的花色苷经紫外-可见扫描光谱验证为  $C_3$  位被糖基取代的花色苷。

### 参考文献:

- [1] KAHKONEN M P, HEINONEN M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(4): 628-633.
- [2] BELLIDO G G, BETA T. Anthocyanin composition and oxygen radical scavenging capacity (ORAC) of milled and pearled purple, black, and common barley[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(3): 1022-1028.
- [3] TSUDA T. Regulation of adipocyte function by anthocyanins: possibility of preventing the metabolic syndrome[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(3): 642-646.
- [4] GHOSH D, KONISHI T. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function[J]. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 2007, 16(2): 200-208.
- [5] 吕春茂, 王新现, 董文轩, 等. 响应面法优化越橘花色苷微波辅助提取工艺参数[J]. 食品科学, 2011, 32(6): 71-75.
- [6] 彭强, 高彦祥, 袁芳. 紫甘薯及其花色苷的研究与开发进展[J]. 食品科学, 2011, 32(23): 401-405.
- [7] PATIL G, MADHUSUDHAN M C, BABU B R, et al. Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish[J]. Chemical Engineering and Processing, 2009, 48(1): 364-369.
- [8] RONALD E W, TERRY E A, ERIC A D, et al. Handbook of food analytical chemistry. Pigments, colorants, flavors, texture and bioactive food components[M]. New York: Wiley, 2005: 19-24.
- [9] RAPISARDA F, FANELLA F, MACCARONE E. Reliability of analytical methods for determining anthocyanins in blood orange juices[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(6): 2249-2252.
- [10] 邓洁红, 谭兴和, 王锋, 等. HP-20 树脂对刺葡萄皮色素纯化特性研究[J]. 食品工业科技, 2008(2): 145-148.
- [11] KATRIN S, M ARKUS P, REINHOLD C, et al. Characterization and quantification of anthocyanins in selected artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars by HPLC-DAD-ESIMS[J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 384(5): 1511-1517.
- [12] 于东, 业兴隆, 方忠祥. 采用 HPLC-DAD-ESIMS 技术鉴定紫山药中的花色苷成分[J]. 中国粮油学报, 2010(10): 213-217.
- [13] HARBORNE J B. Spectral methods for characterizing anthocyanins[J]. Biochemical Journal, 1957, 70(1): 22-28.
- [14] 侯召, 霍虎渠, 万建民, 等. 黑米花色苷的提取及纯化[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 53-59.
- [15] HONG V, W ROLSTAD R E. Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry 1990, 38(3): 708-715.