

玫瑰花色苷和花色苷元分离提取的初步研究

石江林, 荣永海, 荣 龙*

北京航空航天大学生物与医学工程学院, 北京 100191

摘要:通过比较溶剂浸提法、超声波法和闪式提取法提取玫瑰花色素,结果显示闪式提取法提取玫瑰花色素具有最高的效率。在单因素试验的基础上,以玫瑰花色素的提取率为参考指标,选取提取时间、液料比和闪提电压三个影响因子,进行正交试验。确定正交试验优选玫瑰花色素最佳闪提条件为:提取时间为 55s,料液比 1:60(g/mL),电压为 120 V。经过聚酰胺树脂和 XAD 大孔树脂的纯化,玫瑰花色素的收率达到 4.463%。经过滤纸过滤分离,得到玫瑰花色苷和花色苷元,收率分别为 2.331% 和 2.131%。本研究为高效、简便的提取玫瑰花色苷和花色苷元提供参考。

关键词:闪式提取法;正交试验;玫瑰花色苷;玫瑰色苷元

中图分类号:Q819

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.S.024

Flash Extraction of Rose Anthoyanins and Rose Anthocyanidins

SHI Jiang-lin, RONG Yong-hai, RONG Long*

School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China

Abstract: In this study, solvent extraction, ultrasonic extraction and flash extraction was used for the extraction of rose pigment, in which flash extraction showed the highest efficiency. Based on single factor experiments, the effects of extraction time, liquid to solid ratio and extraction voltage on the yield of rose pigment were investigated, and orthogonal experiments were applied to further optimize extraction conditions. The results showed that the optimal conditions of flash extraction were confirmed as follows: flash extraction for 55 seconds, solid to liquid ratio of 1:60 g/mL, and voltage of 120 V. The crude rose pigment was further separated by polyamide resin and XAD macroporous resin. The concentration of rose pigment in the purified extract was 4.463%. Through further separation, the concentration of anthocyanins was 2.331% and the anthocyanidins was 2.131%. These results provided the basis for the extraction of anthocyanins and anthocyanidins, efficiently and simply.

Key words: flash extraction; orthogonal test; rose anthoyanins; rose anthocyanidins

目前玫瑰花主要用来生产玫瑰精油,长期以来玫瑰精油生产过程残留的花渣都是作为废物处理,没有加以利用。实际上花渣富含类黄酮化合物,是一类值得开发的天然色素^[1]。Biolley JP 等利用紫外分光光度计和 HPLC 分析了 100 种玫瑰花色苷,研究表明花色苷的含量范围为 0.1% ~ 1.2%^[2]。

花色苷具有改善视力、预防心血管疾病、还具有抑菌、消炎等众多的生理活性及功效^[4,5],广泛应用于医药、保健品和化妆品行业。法国于 1995 年开发的成品药品 DIFRAEL100 就是以花色苷为有效成分,在欧洲作为眼病药剂或保健品,效果得到普遍承认^[6]。Hou 等研究 6 种不同的花色苷元表明在 B 环上

具有邻二羟苯基结构的花色苷元能够诱导癌细胞凋亡^[7]。

玫瑰花色素的主要提取方法是溶剂浸提法、微波萃取法、超声波提取法^[8],但是色素在长时间的热效应条件下会破坏其结构。利用闪式提取器迅速提取动植物组织中的有效成份,本实验室已经做了大量研究。刘灿^[9]等利用闪提法提取罗汉果甜苷的平均提取率达到 9.18%,高于传统的超声波法和微波法。本研究利用闪式提取法,对玫瑰花色素的分离效率进行研究,建立高效、简便的玫瑰花色苷和花色苷元的提取方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

JHBE-50S 闪式提取器;河南金鼎科技发展有限公司

公司;FW-200 高速万能粉碎机:北京中兴伟业仪器有限公司;TDL-5-A 高速离心机:上海安亭科学仪器厂;SP-756P 紫外可见分光光度计:上海光谱仪器有限公司;旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;真空干燥箱:上海博远实业有限公司;高效液相色谱仪:600E 双泵,2478 型紫外检测器,Empower 色谱工作站,美国 Waters 公司。

1.2 材料与试剂

玫瑰花市售,聚酰胺树脂,CO-XAD 大孔树脂;氯化钾、无水乙酸钠、醋酸、浓盐酸、乙醇等为国产分析纯;三氟乙酸,乙腈为色谱纯,实验用水为超纯水。

1.3 pH 示差法测定玫瑰花色苷含量

pH 示差法是在花色苷最大吸收波长处确定两个对花色苷吸光度差别最大但是对花色苷稳定的 pH 值^[10]。利用 pH 示差法不需要标准品,而且测得的含量与 HPLC 具有高的相关性。

1.3.1 计算玫瑰花色苷的含量

$$\text{色素含量}(\%, w/w) = (\Delta A / \epsilon L) \times MW \times DF \times V / W_t \times 100 \quad (1)$$

式中, ΔA —吸光度(值); ϵ —矢车菊花色苷元-3-*O*-葡萄糖苷的消光系数,26900; MW —矢车菊花色苷元-3-*O*-葡萄糖苷的分子量,449.2; V —最终体积, mL; W_t —产品重量, mg; L —光程, 1 cm; $\Delta A = (A_{\lambda_{\max}} \text{ pH } 1.0 - A_{700\text{nm}} \text{ pH } 1.0) - (A_{\lambda_{\max}} \text{ pH } 4.5 - A_{700\text{nm}} \text{ pH } 4.5)$ 。以蒸馏水作参比,用 $A_{700\text{nm}}$ 来消除样液混浊

表 1 提取条件的因素与水平表

Table 1 Extraction experimental factors and levels

水平 Level	因素 Factor		
	(A) 提取时间 Extraction duration (s)	(B) 料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)	(C) 提取电压 Voltage (V)
1	35	1:50	115
2	45	1:60	120
3	55	1:70	125

1.6 玫瑰花色苷和花色苷元的分离纯化

称取 15 g 玫瑰花瓣,粉碎机中粉碎成粉末,加入 60 倍体积二蒸水,以 120 V 电压闪提 30 s,间隔 2 min,再闪提 15 s。加 1% 盐酸搅拌 10 min,离心 30 min。取上清备用,沉淀加入 60 倍体积的二蒸水,以 120 V 电压闪提 30 s,间隔 2 min,再闪提 15 s。加 1% 盐酸搅拌 10 min,离心 30 min,取上清。抽滤上清,并合并两次得到的滤液,即得到玫瑰色素粗提液。

本实验采用聚酰胺树脂除去提取液中鞣酸等杂

的影响。

1.3.2 测定玫瑰花色苷的含量

准确称取 0.05 g 经纯化后的玫瑰花色苷,用 50 mL 容量瓶定容,配成 1 mg/mL 的玫瑰花色苷溶液。分别用 pH1.0 的 KCl-HCl 缓冲液、pH4.5 的 CH_3COONa -HCl 缓冲液稀释 1.5、2、2.5、3、3.5、8 倍,平衡 60 min 后,采用 pH 示差法测吸光度 $A_{\lambda_{\max}}$,按公式(1)计算花色苷含量,以花色苷的浓度(mg/L)为横坐标,吸光度为 ΔA 纵坐标,得线性回归方程。

1.4 提取玫瑰花色苷的方法

根据为文献报道及预备实验的结果,提取条件为:提取溶剂二蒸水(闪式提取器的接触探头是金属的,为了避免腐蚀,闪提完毕之后才加酸溶液搅拌),料液比为 1:40 g/mL,闪提时间为 30 s 的条件下。玫瑰色素提取液于 517 nm 处测吸光度,换算成提取率。

1.5 提取条件的优化

根据预实验结果,影响玫瑰花色苷提取的因素主要有料液比、闪提时间、闪提电压。先考察各单因素的适用范围,所有实验结果取三次实验的平均值。正交试验在单因素实验的基础上,为优选玫瑰花色苷分离提取工艺,选取闪提时间(A)、料液比(B)、闪提电压(C)作为影响提取率的主要因素,设计 3 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 正交试验,因素与水平见表 1。

质^[11],用 0.809% 盐酸洗脱,收集液过 CO-XAD 大孔树脂用 85% 乙醇(含 0.809% 盐酸)溶液纯化,除去色素溶液中的糖、蛋白质、无机盐等杂质^[12]。首先用 pH3 的酸性水溶解色素,过滤,真空干燥滤液,得到矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷;滤渣用 pH3 的乙醇溶液溶解,过滤,真空干燥滤液,即是矢车菊素花色苷元。

1.7 玫瑰花色苷与花色苷元的纯度实验

1.7.1 色谱条件^[14]

色谱柱为 Waters 的 SunFire C_{18} 柱(4.6 mm \times

150 mm × 5 μm);进样体积 20 μL;柱温室温;流速为 1 mL/min。流动相 A 为 0.4% 三氟乙酸(TFA)水溶液,流动相 B 为 0.4% TFA 乙腈;采用梯度洗脱,条件为:0 ~ 40 min,15% ~ 30% B,花色苷和花色苷元的检测波长分别为 517 nm 和 540 nm。

1.7.2 标准品溶液的配制

精确称取 2 mg 矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷(麦考林公司),溶于 2 mL 2% 的盐酸水溶液(5.4 mL 37% 浓盐酸 + 94.6 mL 二次蒸馏水),配成浓度为 1.0 mg/mL 的花色苷标准品溶液;准确称取 2 mg 矢车菊素(Sigma 公司),溶于 2 mL 6.29% 盐酸乙腈(17 mL 37% 浓盐酸 + 83 mL 乙腈)溶液,配成浓度为 1.0 mg/mL 的花色苷元标准品溶液。

1.7.3 供试品溶液的配制

精确称取 4.4 mg 制备的矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷样品,溶于 2 mL 2% 的盐酸水溶液,配制成浓度为 2.2 mg/mL;准确称取 10.4 mg 矢车菊素样品,溶于 4 mL 酸性乙腈水溶液(50 mL 乙腈 + 17 mL 37% 浓盐酸 + 33 mL 二次蒸馏水),配制成浓度为 2.6 mg/mL。

2 结果与讨论

2.1 玫瑰花色苷和花色苷元的吸收光谱特征

水溶性色素溶液经过紫外光谱扫描,在可见光区的 517 nm 处有一个特征吸收峰,此外在 275 nm 处有吸收峰,正是矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷的光谱特征^[13]。由于其他酮类物质,在 270 nm 附近也有吸收峰,所以实验中选择 517 nm 作为玫瑰花色苷的测定波长。醇溶性色素溶液紫外光谱扫描的最大吸收波长发生横移,在紫外区的 540 nm 附近,实验选择 540 nm 作为花色苷元的测定波长。

2.2 pH 示差法测定玫瑰花色苷的含量

pH 示差法测定玫瑰花色苷的含量,曲线呈现出良好的线性关系,曲线方程为: $y = 0.01796x + 0.04292$, R^2 为 0.9992。

2.3 闪式提取单因素实验结果与分析

2.3.1 闪提时间对玫瑰色素提取率的影响

闪提条件:料液比为 1:40 g/mL,温度 25 °C,电压 110 V(所有实验重复三次,取平均值)。由图 1 可知,在 15 ~ 45 s 时,玫瑰色素提取率随着提取时间的增加而增加,闪提具有快速提取的效果。在 45 s 以后,玫瑰色素的提取率基本保持不变,因此可以确定每次提取时间为 45 s。

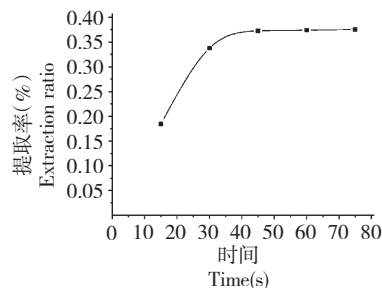


图 1 提取时间对玫瑰色素提取率的影响

Fig. 1 The effect of extraction duration of yield of rose pigment

2.3.2 提取次数对玫瑰色素提取率的影响

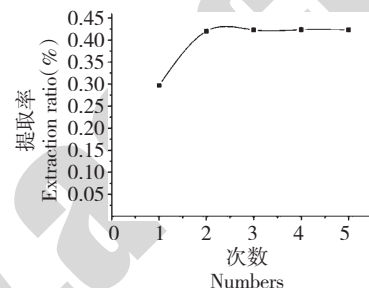


图 2 提取次数对玫瑰色素提取率的影响

Fig. 2 The effect of extraction times of extraction yield of rose pigment

闪提条件:料液比 1:40 g/mL,温度 25 °C,电压 110 V,每次提取的时间为 45 s。由图 2 可知,经过闪提两次后玫瑰花色素的提取率基本保持不变,因此可以确定闪提次数为两次。

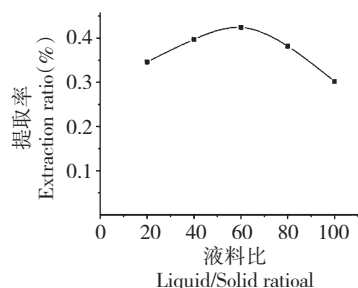


图 3 液料比对玫瑰花色素提取率的影响

Fig. 3 The effect of liquid-to-solid ratio on the extraction yield of rose pigment

2.3.3 液料比对玫瑰色素提取率的影响

闪提条件:温度 25 °C,电压 110 V,每次提取的时间为 45 s,提取两次。由图 3 可知,料液比由 1:20 ~ 1:60 g/mL,提取剂的增加,玫瑰花色素的提取率显著增加。之后,随着提取剂的倍数增加,玫瑰花色素的提取率反而下降。

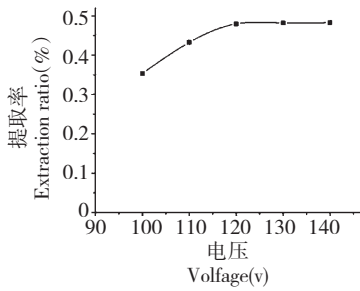


图4 闪提电压对玫瑰色素提取率的影响

Fig. 4 The effect of the flash voltage on the extraction yield of rose pigment

2.3.4 闪提电压对玫瑰色素提取率的影响

闪提条件:温度 25 °C, 料液比 1:60 g/mL 每次提取的时间为 45 s, 提取两次。由图 4 可知, 闪提电压由 100 V 增大到 120 V 的时候, 玫瑰花色素的提取率也随之增大。再增大闪提电压, 玫瑰花色

素的提取率基本保持不变, 为节约能源, 可以确定闪提电压 120 V 作为最佳闪提电压。

2.4 正交实验结果与分析

以玫瑰花色素提取率为考察指标, 选用 $L_9(3^4)$ 正交表安排实验, 结果见表 3。A 代表闪提时间、B 代表料液比、C 代表闪提电压、D 代表误差, 4 个因素列中出现的 1、2、3 代表各因素所选定的试验水平在水平 1、2、3 时, I、II、III 代表进行试验所得实验结果的平均值。

各因素不考虑交互作用, 进行方差分析, 结果见表 2。从直观分析可知, 影响玫瑰花色素闪式提取的各因素的主次顺序是 $B > A > C$, 即料液比的影响最大, 其次是提取时间, 影响最小的是提取电压。进一步的方差分析, 闪式提取的料液比对玫瑰花色素提取具有显著影响。正交设计优选的最佳条件为 $A_3B_2C_2$, 即闪式提取时间为 55 s, 料液比为 1:60 g/mL, 闪提电压为 120 V。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

序号 No.	因素 Factor				提取率 Extraction yield (%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.4369
2	1	2	2	2	0.4782
3	1	3	3	3	0.4434
4	2	1	2	3	0.463
5	2	2	3	1	0.4843
6	2	3	1	2	0.4414
7	3	1	3	2	0.4609
8	3	2	1	3	0.4851
9	3	3	2	1	0.4492
I	0.4528	0.4536	0.4545	0.4568	
II	0.4629	0.4825	0.4635	0.4602	
III	0.4654	0.4447	0.4629	0.4638	
极差 R	0.0126	0.0378	0.009	0.007	

表 3 方差分析结果

Table 3 Variance analysis of orthogonal test's result

方差来源 Sources of variance	离差平方和 Squares of Deviations	自由度 Degrees of freedom	方差 Variance	F 值 F value	P 值 P value
A	0	2	0	3.344	
B	0.002	2	0.01	31.662	<0.05
C	0	2	7.60E-05	2.046	
误差 Deviation	7.43E-05	2	3.71E-05		

注: $R^2 = 0.974$ (调整 $R^2 = 0.895$); $F_{0.05}(2, 2) = 1.0$ 。

2.5 验证实验结果

按上述最佳条件 $A_3B_2C_2$ 进行 3 次验证提取实验,玫瑰花色素提取率分别为 0.5015%、0.5276%、0.5039%,平均提取率为 0.5110%。

2.6 玫瑰花色苷与花色苷元的纯度测定

矢车菊-3-*O*-葡萄糖苷标准品 HPLC 图谱如图 5 (A) 所示,色谱峰保留时间为 6.388 min;图 5 (B) 为本研究精制的矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷,色谱峰保留时间为 6.532 min,与标准品的保留时间基本吻合。

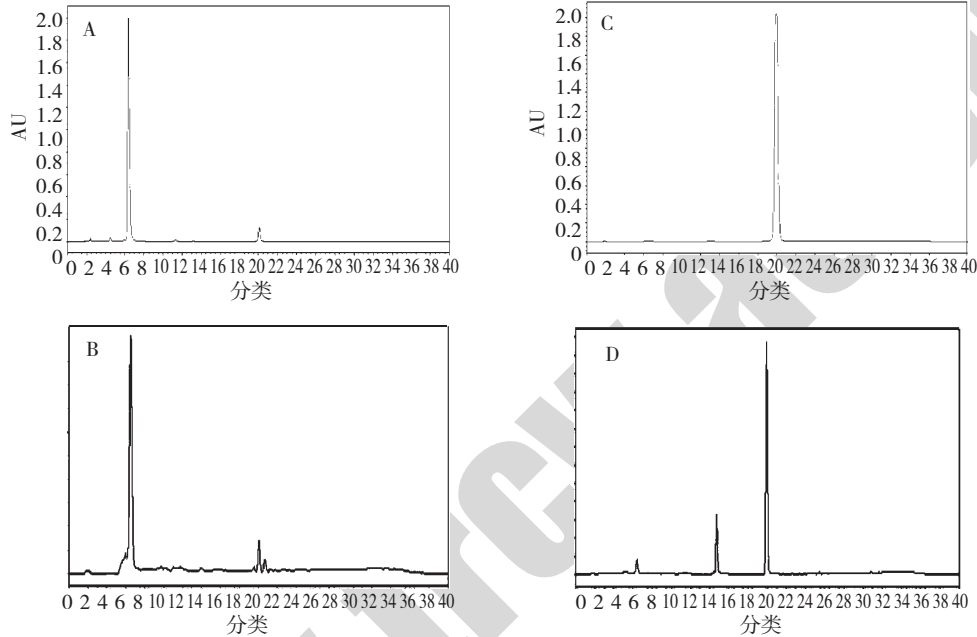


图 5 矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷标准品(A)、本研究精制的矢车菊-3-*O*-葡萄糖苷样品(B)、矢车菊素标准品(C)及本研究精制的矢车菊素样品(D)的 HPLC 色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of cyanidin-3-*O*-glucoside standard (A), purified cyanidin-3-*O*-glucoside (B)

3 结论

本研究将闪式提取法应用于玫瑰花色素的提取,通过正交试验得到最佳提取条件为提取时间为 55 s,料液比为 1:60 g/mL,提取电压为 120 v,经过纯化后色素总收率达到 4.463%,收率高于溶剂浸提法、微波提取法和超声波提取法,说明闪式提取法优于溶剂提取法,微波提取法和超声波提取法。

纯化后的色素,经过进一步的滤纸过滤分离纯化得到水溶性色素矢车菊素-3-*O*-葡萄糖花色苷和醇溶性色素矢车菊素花色苷,收率分别达到 2.331% 和 2.131%。本研究利用 HPLC 检测,得到矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷的纯度为 96.1%,矢车菊素的纯度为 79.8%。矢车菊素的纯度不高,可能是因

经面积百分归一法计算可知,本研究精制的矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷的纯度为 96.1%。矢车菊素标准品 HPLC 图谱如图 5 (C) 所示,色谱峰保留时间为 19.941 min;图 5 (D) 为本研究精制的矢车菊素,色谱峰保留时间为 19.921 min,与标准品的保留时间基本吻合,在 6.410 min 和 15.405 min 处的两个峰可能为其他酮类物质。经面积百分归一法计算可知,本研究精制的矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷的纯度 79.8%。

为醇溶性色素里还有其他酮类物质,需要进一步纯化。本研究利用闪式提取法,建立了高效、简便提取玫瑰花色苷和花色苷元的方法。

参考文献

- 1 Wang DN(王多宁). The comprehensive utilization and exploiting prospects of roses. *Heilongjiang Agric Sci*(黑龙江农业科学),2010,1:117-120.
- 2 Jean-PB, Maurice J, Marie-Rose V. Flavonoid diversity metabolism in 100 Rose X Hybrid cultivars. *Phytochemistry*, 1994,35:413-419.
- 3 Tsuda T. Anthocyanins as functional food factors-Chemistry, Nutrition and Health Promotion. *Food Sci Technol Res*,2012, 18:315-324.
- 4 Wang JT. Medicinal and edible value of ginkgo bilobol ex-

- tract. *Food Drug*, 2006, 8(11): 73-74.
- 5 Li YD(李亚东), Zhang ZD(张志东), Wu L(吴林). Blueberry fruit composition and health care function. *Food Nutr China*(中国食物与营养), 2002, 1: 27-28.
 - 6 Hou DX, Ose T, Lin S, et al. Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells; structure-activity relationship and mechanisms involved. *Int J Oncol*, 2003, 23: 705.
 - 7 Li ZJ(李子江). Study of the extraction process and properties of Anthocyanin from Pingyin Roses. Shandong: Shandong Normal University, MSc. 2010.
 - 8 Liu C(刘灿), Rong YH(荣永海), Wang ZB(王志彬), et al. Flash extraction of polyphenols from fruits of *Siraitia grosvenorii*. *Food Sci Technol*(食品科学), 2010, 31(22): 50-53.
 - 9 Jian Y(翦祎), Han SY(韩舜愈), Zhang B(张波), et al. Comparison of single pH method, pH-differential method and subtraction method for determining content of anthocyanins from red wine. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2012, 33: 323-325.
 - 10 Xue Y(薛扬), Wu W(吴唯). The development and application in purification by polyamide chromatography. *New Chem Mater*(化工新型材料), 2005, 33(4): 50-53.
 - 11 Zhao G(赵歌). Research and application of anthocyanidin extraction from flower of *Rhododendron Ripense* M. Suzhou: Suzhou University, MSc. 2012.
 - 12 Harborne JB. The chromatographic identification of *Capulin anthocyanins*. *J Chromatogr*, 1958, 1: 473-488.
 - 13 Zhang Z, Kou XL, Fugal K, et al. Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and anthocyanidins in Bilberry Extracts. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 688-691.
-
- (上接第 141 页)
- 4 Wu YHS, Chiu CH, Yang DJ, et al. Inhibitory effects of litchi (*Litchi chinensis*, Sonn.) flower-water extracts on lipase activity and diet-induced obesity. *J Funct Foods*, 2013, 5: 923-929.
 - 5 Liu TN(刘天罔), Xu MJ(徐梦佳), Hu B(胡冰), et al. Inhibitory activity of polyphenols from fuzhuan brick tea on pancreatic lipase. *Food Sci*(食品科学), 2015, 36(21): 46-49.
 - 6 Cai S, Wang O, Wang M, et al. In vitro inhibitory effect on pancreatic lipase activity of subfractions from ethanol extracts of fermented Oats (*Avena sativa* L.) and synergistic effect of three phenolic acids. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 7245-7251.
 - 7 Chen PD(陈培栋). The birth of *Nymphaea hybrid*. *Chin Flo Hortic*(中国花卉园艺), 2003, 24: 38.
 - 8 Liu YW(刘家文), Chen Y(陈燕), Li H(李晖), et al. The production process of *Nymphaea hybrid* tea. *Agric Res App*(农业研究与应用), 2014, 5: 30-31.
 - 9 Shen JF(沈建福), Che L(车璐), Wu XQ(吴晓琴), et al. Comparison of antioxidant activity from *Nymphaea Hybrid* of different color. *J Chin Inst Food Sci Tech*(中国食品学报), 2013, 13: 214-218.
 - 10 Ren HR(任红荣), Shan CY(单承菴), Jiang HF(姜洪芳), et al. Inhibition of the extract from *Nymphaea Hybrid* on the activity of tyrosinase. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2011, 23: 1122-1126.
 - 11 Che L(车璐), Wu XQ(吴晓琴), Zheng XX(郑茜茜), et al. Effect of *Nymphaea Hybrid* on prostatic hyperplasia in rats. *J Chin Inst Food Sci Tech*(中国食品学报), 2015, 15(2): 28-33.
 - 12 Zhang WM(张卫明), Jiang HF(姜洪芳), Xu H(徐辉), et al. Experimental study on reducing blood lipid of *Nymphaea Hybrid*. *Sci Tech Food Ind*(食品工业科技), 2009, 30: 111-116.
 - 13 Guo XL(郭夏丽), Luo LP(罗丽萍), Leng TT(冷婷婷), et al. Chemical compositions and antioxidant activities of seven honeys from different floral sources. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2010, 22: 665-670.
 - 14 Ji JY(纪建业). The determination of the activity of lipase. *J Tonghua Tch Coll*(通化师范学院学报), 2006, 26(6): 51-53.
 - 15 Zhang Z(张忠). The inhibition of tea polyphenol on pancreatic lipase. *Food Ind*(食品工业), 2013, 34: 168-170.
 - 16 Wu ZJ(吴子健), Wang H(王喆), Zheng JQ(郑俊清), et al. Effects of grape seeds extracts on pancreatic lipase activity. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2009, 30(9): 83-86.
 - 17 Yang LJ(杨龙佳). Inhibitory effect of black tea on pancreatic lipases. Guizhou: Guizhou Normal University(贵州师范大学), MSc. 2015.
 - 18 Ren XJ(任秀娟), Ma HL(马海乐). Study on inhibitory screening and mechanism of grape seed extract on pancreatic lipases. *Sci Tech Food Ind*(食品工业科技), 2009, 30: 181-186.
 - 19 Yuan QS(袁勤生). Modern Enzymology(现代酶学). East China University of Science and Technology Press, 2007. 25-50.