

TÁCH CHIẾT VÀ PHÂN TÍCH HÀM LƯỢNG ANTHOCYANIN TỪ CÁC MẪU THỰC VẬT KHÁC NHAU

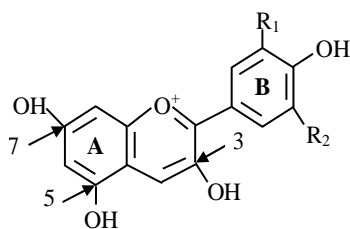
PHẠM THỊ THANH NHÀN

Trường đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên

NGUYỄN HỮU CƯỜNG, LÊ TRẦN BÌNH

Viện Công nghệ sinh học

Các loại sắc tố ở thực vật có vai trò rất quan trọng trong quá trình quang hợp. Chúng bao gồm: sắc tố lục (chlorophyll), sắc tố vàng (carotenoid), sắc tố của thực vật bậc thấp (phycobilin) và sắc tố dịch bào (anthocyanin). Trên cơ sở hàm lượng các dạng sắc tố trong lá, người ta có thể đánh giá khả năng quang hợp của thực vật và xếp thực vật thuộc nhóm ưa sáng hay ưa bóng, thực vật C3 hay C4. Anthocyanin được tìm thấy trong dịch không bào của tế bào biểu bì, mô mạch dẫn [1, 4, 8, 10]. Chúng xuất hiện trong rễ, trụ dưới lá mầm, bao lá mầm, thân, củ, lá và tạo màu cho cả bề mặt, viền sọc, hay các vết đốm. Anthocyanin là những glucosit, thuộc họ flavonoid, do gốc đường glucose, galactose... kết hợp với gốc aglucon có màu (anthocyanidin). Aglucon của chúng có cấu trúc cơ bản được mô tả trong hình 1. Các gốc đường thường được gắn vào vị trí 3 và 5, ít gắn vào vị trí 7. Các aglycon của anthocyanin khác nhau chính là do các nhóm gắn vào vị trí R1 và R2, thường là H, OH hoặc OCH₃ [2].



Hình 1. Cấu trúc cơ bản của aglycon của anthocyanin

Anthocyanin là chất màu thiên nhiên được sử dụng an toàn trong thực phẩm và dược phẩm với giá thành cao (khoảng 1000 USD/100mg). Chúng tồn tại trong hầu hết các thực vật bậc cao và có nhiều trong rau, hoa, quả, hạt có màu từ đỏ đến tím như: quả nho, quả dâu, lá tía tô, gạo

đỏ, hạt ngô đen.... Gần đây, chức năng của anthocyanin được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu [6, 7, 12, 14]. Các chức năng của anthocyanin bao gồm: bảo vệ lục lạp khỏi tác động bất lợi của ánh sáng, hạn chế bức xạ của tia UV-B, hoạt tính chống oxy hóa và chống viêm. Ngoài ra, chúng còn tạo điều kiện cho sự thụ phấn, phát tán hạt nhờ màu sắc sặc sỡ trên cánh hoa và quả. Sinh tổng hợp anthocyanin ở lá được tăng cường để đáp ứng với stress môi trường: hạn, ánh sáng mạnh, UV-B, nhiệt độ cao, thiếu nitơ và photpho, nhiễm nấm và vi khuẩn, tổn thương, côn trùng, ô nhiễm [9, 15]. Với khả năng chống oxy hóa cao, anthocyanin được sử dụng để chống lão hóa, hoặc chống oxy hóa các sản phẩm thực phẩm, hạn chế sự suy giảm sức đề kháng. Điều này mở ra một triển vọng về việc sản xuất được phẩm chức năng chữa bệnh có hiệu quả.

Ở Việt Nam, anthocyanin có thể được tách chiết từ các nguyên liệu thực vật sẵn có. Bài báo này trình bày một số dung môi tách chiết anthocyanin và kết quả xác định hàm lượng anthocyanin trong một số nguyên liệu tươi bằng phương pháp pH vi sai, làm cơ sở cho việc lựa chọn dung môi và nguyên liệu giàu anthocyanin để khai thác sử dụng.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Các loại rau, củ, quả được thu thập tại Hà Nội (tháng 12 năm 2009).

2. Hóa chất

Chúng tôi sử dụng các hóa chất như: ethanol, acetone, chloroform, methanol, KCl

(dung dịch đệm pH 1,0), K₂S₂O₅, CH₃COONa (dung dịch đệm pH 4,5) của hãng Fluka; HCl đặc của Trung Quốc.

3. Phương pháp

a. Tách chiết anthocyanin

Anthocyanin được tách chiết theo quy trình sau [5, 11]: Nguyên liệu tươi thu thập về được rửa sạch, để ráo hết nước ở nhiệt độ phòng, mỗi mẫu thí nghiệm cân lấy 10 g (mỗi loại nguyên liệu lấy 3 mẫu); nghiền nhỏ mẫu thành bột mịn trong niơ lỏng, bổ sung 20 ml dung môi có HCl, để mẫu ở 4°C trong 24 h; lọc chân không thu lấy dịch (lặp lại 3 lần), bổ sung chloroform (theo tỉ lệ 1v:1v) và thu dịch màu phía trên. Đo phổ hấp thụ và mật độ quang

b. Xác định hàm lượng anthocyanin theo phương pháp pH vi sai [3]

Dựa trên nguyên tắc: chất màu anthocyanin thay đổi theo pH. Tại pH 1,0 các anthocyanin tồn tại ở dạng oxonium hoặc flavium có độ hấp thụ cực đại, còn ở pH 4,5 thì chúng lại ở dạng carbinol không màu. Đo mật độ quang của mẫu tại pH 1,0 và pH 4,5 tại bước sóng hấp thụ cực đại, so với độ hấp thụ tại bước sóng 700 nm.

Dựa trên công thức của định luật Lambert-Beer:

$$\lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \times l \times C \quad (1)$$

Trong đó: $\lg \frac{I_0}{I}$. đặc trưng cho mức độ ánh sáng yếu dần khi đi qua dung dịch (mật độ quang, A); I. Cường độ ánh sáng sau khi đi qua dung dịch; I₀. Cường độ ánh sáng chiếu vào dung dịch; C. Nồng độ chất nghiên cứu, mol/l; l. Chiều dày của lớp dung dịch mà ánh sáng đi qua; ε. Hệ số hấp thụ phân tử, mol⁻¹ cm⁻¹.

Hàm lượng sắc tố anthocyanin đơn tử theo công thức:

$$a = \frac{A \times M \times HSPL \times V}{\varepsilon \times l} \quad (2)$$

Trong đó: A. Mật độ quang, A = (A_{λ_{max}, pH=1,0} - A_{700nm, pH=1,0}) - (A_{λ_{max}, pH=4,5} - A_{700nm, pH=4,5}); A_{λ_{max}, A_{700nm}}. Độ hấp thụ tại bước sóng cực đại và 700 nm ở pH 1,0 và pH 4,5; a. Lượng anthocyanin (mg/l); M. Khối lượng phân tử của anthocyanin (g/mol); HSPL. Hệ số pha loãng;

V. Thể tích dịch chiết (l); l. Chiều dày cuvet (cm); ε = 26900.

Từ đó tính được phần trăm hàm lượng anthocyanin toàn phần:

$$\% \text{anthocyanin} = \frac{a}{m \times (100 - w) \times 10^{-2}} \times 100\% \quad (3)$$

Trong đó: a. Lượng anthocyanin tính được theo công thức (2); m. Khối lượng nguyên liệu ban đầu (g); w. Độ ẩm nguyên liệu (%).

Dịch chiết anthocyanin được xử lý bằng nước cất thay cho các đệm pH ở trên, đem đo ở các bước sóng tương ứng và xác định mật độ sắc màu theo công thức [11]:

$$M = [(A_{420nm} - A_{700nm}) + (A_{\lambda_{max}} - A_{700nm})] \times HSPL \quad (4)$$

Dịch chiết anthocyanin còn lại được xử lý bằng dung dịch K₂S₂O₅ 20% thay cho đệm pH, đem đo ở các bước sóng tương ứng và tính tỉ lệ phần trăm màu đa tử theo công thức [11]:

$$D = [(A_{420nm} - A_{700nm}) + (A_{\lambda_{max}} - A_{700nm})] \times HSPL$$

$$\% \text{Màu đa tử} = \frac{D}{M} \times 100\% \quad (5)$$

c. Phương pháp tính toán số liệu

Sử dụng toán thống kê để xác định các trị số thống kê, mỗi mẫu nghiên cứu được nhắc lại ba lần. Các số liệu được xử lý trên máy vi tính bằng chương trình Excel theo Chu Hoàng Mậu (2008) [13].

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

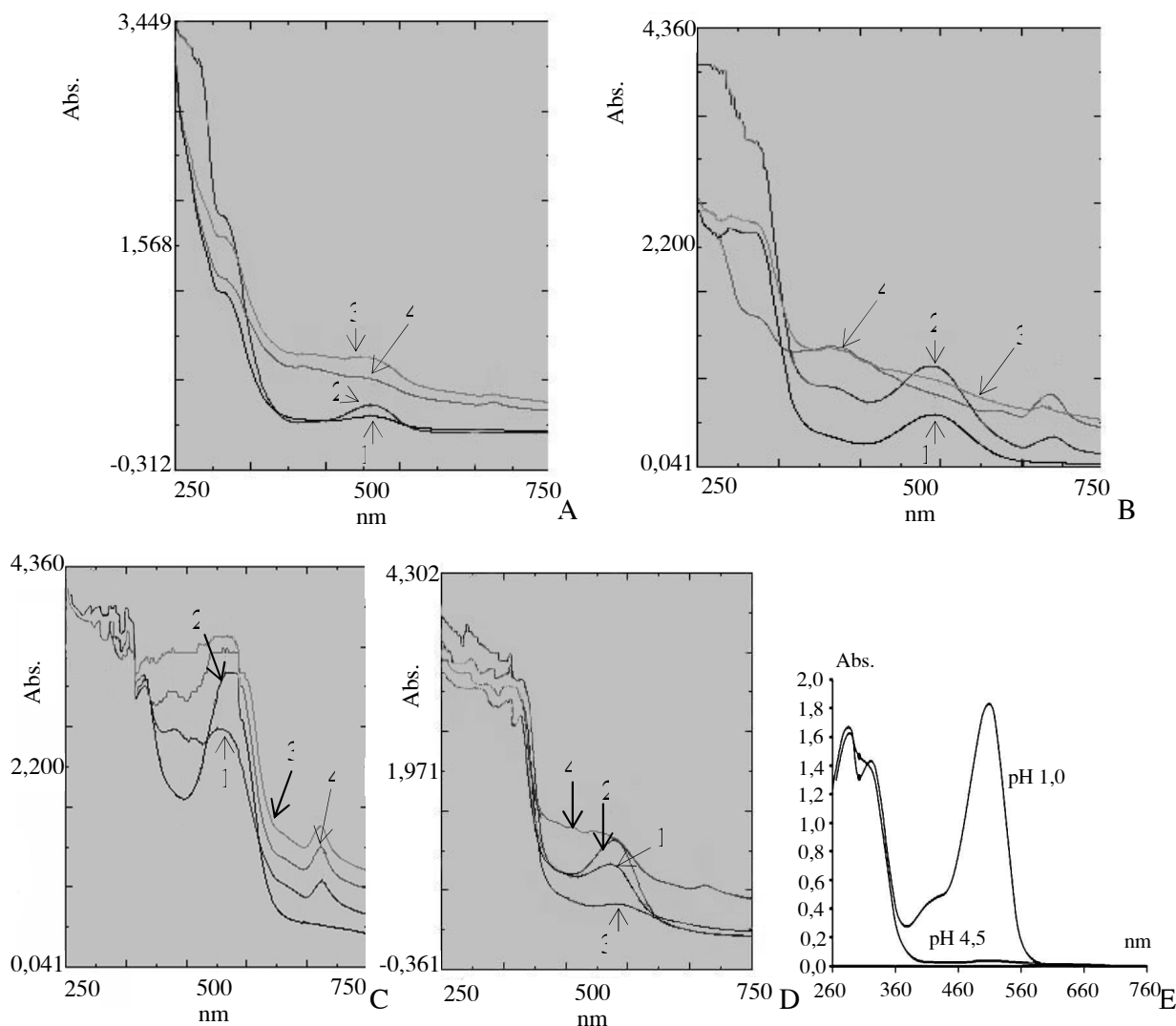
1. Phổ hấp thụ của anthocyanin ở một số rau, củ, quả

Nguyên liệu tươi thu thập về được xử lý theo quy trình ở mục 3.a và sử dụng 4 loại dung môi chiết anthocyanin khác nhau: ethanol: dung dịch HCl 1%= 1:1 (v/v), acetone có 0,01% HCl (v/v), methanol có 0,1% HCl (v/v), methanol có 0,01% HCl (v/v) [2, 5, 11]. Sau đó chúng tôi lấy 0,5 ml dịch chiết pha loãng với 2 ml dung dịch đệm pH 1,0, quét phổ hấp thụ bước sóng từ 250 nm đến 750 nm trên máy quang phổ. Kết quả được minh họa ở hình 2.

Kết quả trên cho thấy, phổ hấp thụ của dịch chiết từ các mẫu nghiên cứu nằm trong vùng phổ hấp thụ của các anthocyanin (510-540 nm), bước sóng hấp thụ cực đại của dịch chiết anthocyanin từ lá tía tô là khoảng 520 nm- 524

nm, quả dâu ta là 513-526 nm, vỏ quả nho là 519-523,5 nm. Trong khi kết quả công bố trước đây ở lá tía tô là 524 nm, quả dâu là 513,5

nm, vỏ nho là 523,5 nm [2]. Điều này đã chứng tỏ độ tin cậy của phương pháp thử nghiệm và dung môi tách chiết là khá cao.



Hình 2. Phổ hấp thụ của dịch chiết anthocyanin từ một số nguyên liệu tươi ở pH 1,0

A. thân ngô non; B. rau dền; C. lá tía tô; D. Lá mơ; E. Phổ anthocyanin chuẩn ở pH 1,0 và pH 4,5 (theo M. Mónica Giusti và Ronald E. Wrolstad, 2001); 1. dung môi ethanol: dung dịch HCl 1% (1v: 1v); 2. dung môi acetone có 0,01% HCl (v/v); 3. dung môi methanol có 0,1% HCl (v/v); 4. dung môi methanol có 0,01% HCl (v/v).

Bảng 1

Giá trị mật độ quang của các dịch chiết anthocyanin từ bốn dung môi nghiên cứu

S TT	Mẫu	λ_{\max} (nm)	Giá trị mật độ quang A (Abs.)			
			Ethanol HCl 1%	Acetone 0,01% HCl	Methanol 0,1% HCl	Methanol 0,01% HCl
1	Thân của loài ngô (<i>Zea mays</i> L.)	512	0,23	0,29	0,27	0,25
2	Lá chua, búp dấm	521	1,21	1,27	1,26	1,25

	<i>(Hibiscus sabdariffa L.)</i>					
3	Hoa của loài chuối tiêu <i>(Musa paradisiaca L.)</i>	516	0,10	0,12	0,10	0,10
4	Lá của loài hoa sói <i>(Chloranthus spicatus</i> <i>(Thunb.) Makino)</i>	522	1,08	1,18	1,16	1,06
5	Lá của loài huyết dụ <i>(Cordyline fruticosa (L.)</i> <i>Goepp.)</i>	519	1,57	1,65	1,59	1,50
6	Quả của loài dâu tằm <i>(Morus alba L.)</i>	513- 526	2,43	2,55	2,43	2,34
7	Lá của loài tía tô <i>(Perilla frutescens (L.)</i> <i>Britt.)</i>	520- 524	1,81	2,32	2,21	2,02
8	Củ của loài khoai lang tím <i>(Ipomoea batatas (L.) Poir.)</i>	520	2,08	2,12	2,02	2,02
9	Vỏ quả của loài nho <i>(Vitis vinifera L.)</i>	519- 523,5	2,06	2,10	2,04	2,02
10	Lá của loài mơ leo <i>(Paederia scandens (Lour.)</i> <i>Merr.)</i>	522	0,59	0,62	0,51	0,44
11	Củ của loài sâm đại hành <i>(Eleutherine bulbosa (Mill.)</i> <i>Urban)</i>	511	1,49	1,86	1,75	1,55
12	Lá của loài rau dền tía <i>(Amaranthus tricolor L.)</i>	540	1,04	1,06	1,02	1,00

So sánh phổ hấp thụ và giá trị mật độ quang của dịch chiết anthocyanin thu được từ bốn loại dung môi cho thấy, sử dụng dung môi acetone có 0,01% HCl (v/v) thu được lượng anthocyanin tối ưu hơn cả, và phổ hấp thụ giống với phổ chuẩn [11]. Kết quả này tương tự ở các đối tượng còn lại (bảng 1).

2. Hàm lượng anthocyanin ở một số rau, củ, quả

Độ hấp thụ của anthocyanin liên quan mật

thiết đến màu sắc, nồng độ của chúng và phụ thuộc vào pH của dung dịch (thường pH thuộc vùng acid mạnh có độ hấp thụ lớn). Sau khi tách chiết anthocyanin bằng dung môi acetone, chúng tôi tiến hành đo mật độ quang của các mẫu nghiên cứu tại bước sóng hấp thụ cực đại, 420 nm và 700 nm, ở pH 1,0 và pH 4,5, từ đó áp dụng công thức (2), (3), (4) và (5) tính được hàm lượng anthocyanin trong các loại nguyên liệu trên. Kết quả được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2

Hàm lượng anthocyanin trong các mẫu nghiên cứu

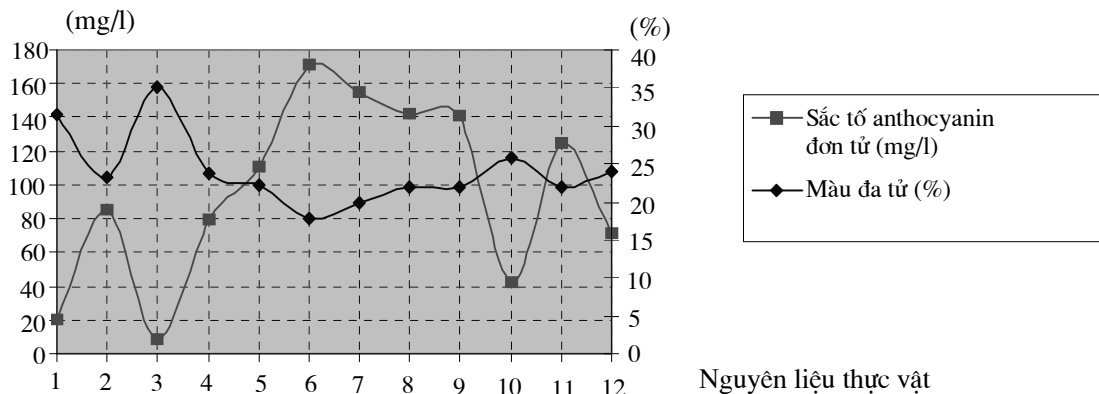
S TT	Mẫu	Hàm lượng toàn phần (%)	Sắc tố anthocyanin đơn tử (mg/l)	Màu đa tử (%)
1	Thân của loài ngô <i>(Zea mays L.)</i>	0,59	19,57	31,42
2	Lá chua, búp dấm <i>(Hibiscus sabdariffa L.)</i>	1,49	84,63	23,30
3	Hoa của loài chuối tiêu <i>(Musa paradisiaca L.)</i>	0,34	7,88	35,21

4	Lá của loài hoa sói (<i>Chloranthus spicatus</i> (Thunb.) Makino)	0,56	78,89	23,66
5	Lá của loài huyết dụ (<i>Cordyline fruticosa</i> (L.) Goep.)	1,28	110,28	22,12
6	Quả của loài dâu tằm (<i>Morus alba</i> L.)	1,75	170,26	17,73
7	Lá của loài tía tô (<i>Perilla frutescens</i> (L.) Britt.)	1,72	154,77	19,97
8	Củ của loài khoai lang tím (<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Poir.)	0,46	141,67	21,95
9	Vỏ quả của loài nho (<i>Vitis vinifera</i> L.)	1,27	140,20	22,06
10	Lá của loài mơ leo (<i>Paederia scandens</i> (Lour.) Merr.)	1,05	41,28	25,88
11	Củ của loài sâm đại hành (<i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urban)	2,04	124,37	21,87
12	Lá của loài rau dền tía (<i>Amaranthus tricolor</i> L.)	1,74	70,54	24,02

Kết quả bảng 2 cho thấy, hàm lượng anthocyanin toàn phần của các mẫu nghiên cứu dao động trong khoảng từ 0,34 % đến 2,04%. Đáng chú ý là hàm lượng anthocyanin của lá tía tô là 1,72%, quả dâu ta 1,75%, vỏ nho 1,27%, cao hơn kết quả của tác giả Huỳnh Thị Kim Cúc (2007) (0,397%, 1,188%, và 0,564%) [2]. Sự khác nhau này có thể do mẫu được lấy ở địa

điểm và thời gian khác nhau, nhưng khi so sánh hàm lượng anthocyanin tách được từ dung môi acetone vẫn cho kết quả cao hơn các dung môi khác, đặc biệt đối với thân cây ngô.

Khi phân tích số liệu về sắc tố anthocyanin đơn tử và màu đa tử cho thấy, giá trị của hai đại lượng này tỉ lệ nghịch với nhau. Kết quả được minh họa trong hình 3.



Hình 3. Đồ thị tương quan giữa lượng sắc tố anthocyanin đơn tử và tỉ lệ phần trăm màu đa tử

Ghi chú: 1. Thân của loài ngô; 2. Lá chua, búp dấm; 3. Hoa của loài chuối tiêu; 4. Lá của loài hoa sói; 5. Lá của loài huyết dụ; 6. Quả của loài dâu tằm; 7. Lá của loài tía tô; 8. Củ của loài khoai lang tím; 9. Vỏ quả của loài nho; 10. Lá của loài mơ leo; 11. Củ của loài sâm đại hành; 12. Lá của loài rau dền tía.

III. KẾT LUẬN

Dịch chiết anthocyanin được tách từ dung môi acetone có 0,01% HCl (v/v) có phổ hấp thụ

và hàm lượng tối ưu hơn so với 3 dung môi còn lại (ethanol: dung dịch HCl 1% (1v: 1v), methanol có 0,1% HCl (v/v), methanol có 0,01% HCl (v/v)).

Dịch anthocyanin từ các nguyên liệu khác nhau có phổ hấp thụ cực đại tại bước sóng từ 511-540 nm. Giá trị hấp thụ của sắc tố anthocyanin đơn tử và tỉ lệ phần trăm màu đa tử có mối tương quan nghịch.

Hàm lượng anthocyanin toàn phần ở thân cây ngô non là 0,59%, lá chua 1,49%, hoa chuối 0,34%, lá cây hoa sói 0,56%, lá huyết dụ 1,28%, quả dâu ta 1,75%, lá tía tô 1,72%, củ khoai lang tím 0,46%, vỏ quả nho 1,27%, lá mơ 1,05%, củ sâm đại hành 2,04%, lá rau dền tía 1,74%.

Lời cảm ơn: Công trình hoàn thành được sự hỗ trợ từ kinh phí đề tài nghiên cứu khoa học cấp bộ B2009- TN04- 25, phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen và phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Chalker Scott L.**, 1999: Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photobiol*, 70: 1-9.
2. **Huỳnh Thị Kim Cúc, Nguyễn Thị Lan, Châu Thế Liễu Trang**, 2005: Tối ưu hóa điều kiện chiết tách chất màu anthocyanin từ bắp cải tím trong môi trường trung tính. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, trường đại học Đà Nẵng, 4(12): 44-50.
3. **Huỳnh Thị Kim Cúc**, 2007: Nghiên cứu thu nhận và ứng dụng anthocyanin công nghệ thực phẩm. Luận án Tiến sĩ, trường đại học Đà Nẵng.
4. **David R., Kristen Bell, Gochenaur**, 2006: Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *Applied Physiology*, 00626(4): 1164-1170.
5. **Fuleki T., Francis F. J.**, 1968: Quantitative Methods for Anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanin and degradation Index for Cranberry Juice. *J. Food Science*, 33: 78-83.
6. **Gould K.**, 2004: Nature's Swiss army knife. The diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *J. Biomed Biotech*, 5: 314-320.
7. **Gould K. S., Lister C.**, 2006: Flavonoid functions in plants. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. CRC Press, Boca Raton: 397-441.
8. **Hooijmaijers C. A. M., Gould K. S.**, 2007: Photoprotective pigments in red and green gametophytes of two New Zealand liverworts. *J. Bot*, 45: 451-461.
9. **Kevin Gould, Kevin Davies, Chris Winefield**, 2009: *Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications*. Qc Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY 10013, USA.
10. **Lee D. W., Collins T. M.**, 2001: Phylogenetic and ontogenetic influences on the distribution of anthocyanins and betacyanins in leaves of tropical plants. *J. Plant Sci.*, 162: 1141-1153.
11. **Luis E., Rodriguez-Saona, Ronald E., Wrolstad**, 2001: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Copyright © 2001 by John Wiley & Sons, Inc.
12. **Manetas Y.**, 2006: Why some leaves are anthocyanic, and why most anthocyanic leaves are red. *Flora*, 201: 163-177.
13. **Chu Hoàng Mậu**, 2008: Phương pháp phân tích di truyền hiện đại trong chọn giống cây trồng. Nxb. Đại học Thái Nguyên.
14. **Stintzing F. C., Carle R.**, 2004: Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol*, 15(1): 19-38.
15. **Winkel-Shirley B.**, 2002: Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol.*, 5: 218-223.

EXTRACTING AND ANALYSING ANTHOCYANIN CONTENT FROM DIFFERENT PLANTS

PHAM THI THANH NHAN, NGUYEN HUU CUONG, LE TRAN BINH

SUMMARY

Anthocyanins are natural pigments used safely in foods and functional food. They play the important role in photoprotection, antioxidant activity, biological defense and also in symbiotic functions between microbes and plant cells. In addition, they are attractants for pollinating via flower color and dispersing seeds via brightly colored fruit. This article presents some anthocyanin extraction buffers and the result of determination of anthocyanin content in different plants by pH-differential method.

Using the buffer containing acetone and 0.01% HCl to extract anthocyanin from different materials was more effective than three other types of buffers (ethanol: distilled water with HCl 1% (1v: 1v), methanol with 0.1% HCl (v/v), methanol with 0.01% HCl (v/v)) and the absorption spectrum of anthocyanin diluted extract was similar to that of standard anthocyanin.

Maximum absorption spectrum of the different diluted extracts was ranged from 511nm to 540nm. In addition, the nonomeric anthocyanin pigment is in inverse proportion to the percent of polymeric color.

The content of anthocyanin was 0.59% in young stem of *Zea mays* L., 1.49% in leaf of *Hibiscus sabdariffa* L., 0.34% in flower of *Musa paradisiaca* L., 0.56% in leaf of *Chloranthus spicatus* (Thunb.) Makin, 1.28% in leaf of *Cordyline fruticosa* (L.) Goepp., 1.75% in fruits of *Morus alba* L., 1.72% in leaf of *Perilla frutescens* (L.) Britt., 0.46% in tuber of *Ipomoea batatas* (L.) Poir., 1.27% in fruit skin of *Vitis vinifera* L., 1.05% in leaf of *Paederia scandens* (Lour.) Merr., 2.04% in bulbus of *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urban and 1.74% in leaf of *Amaranthus tricolor* L..

Key word: Acetone, Anthocyanin, maize, absorption spectrum, pH-differential method.

Ngày nhận bài: 23-6-2011