

# XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG ANTHOCYANIN TRONG MỘT SỐ NGUYÊN LIỆU RAU QUẢ BẰNG PHƯƠNG PHÁP pH VI SAI

## DETERMINATION OF ANTHOCYANIN CONTENT IN FRUITS AND VEGETABLES BY pH-DIFFERENTIAL SPECTROPHOTOMETRY

HUỶNH THỊ KIM CÚC – PHẠM CHÂU HUỶNH  
*Trường Cao đẳng Lương thực Thực phẩm Đà Nẵng*  
NGUYỄN THỊ LAN – TRẦN KHÔI UYÊN  
*Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng*

### TÓM TẮT

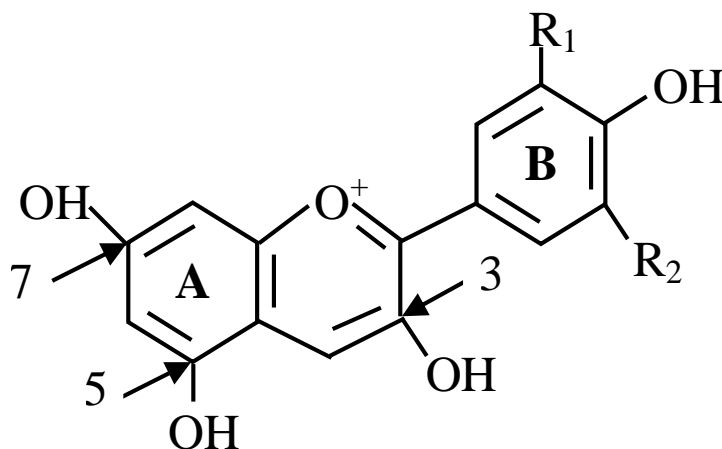
Bài báo này trình bày phương pháp xác định hàm lượng anthocyanin trong một số nguyên liệu rau quả (quả dâu, bắp cải tím, lá tía tô, trà đỏ, vỏ quả nho, vỏ quả cà tím) bằng phương pháp pH vi sai. Kết quả cho thấy độ hấp thụ cực đại của dịch chiết từ quả dâu tại bước sóng  $\lambda_{\max}$  = 513,5nm; bắp cải tím 523nm; lá tía tô 524nm; trà đỏ (đài hoa hibicus) 519,5nm; vỏ quả nho 523,5nm; vỏ cà tím 523,5nm. Hàm lượng anthocyanin trong quả dâu là 1,188%; bắp cải tím: 0,909%; lá tía tô: 0,397%; trà đỏ: 0,335%; vỏ quả nho: 0,564%; vỏ cà tím: 0,441%

### ABSTRACT

In this article we present the determination results of anthocyanin content in fruits and vegetables (mulberry, violet cabbage, perilla leaves, red tea, grapes skin, eggplant skin) by pH-differential spectrophotometry. The results obtained were as follows: Maximum absorption spectrum of diluted extract of mulberry was 513,5nm; violet cabbage, 523nm; perilla leaves, 524nm; red tea (hibicus flower cup), 519,5nm; grapes skin, 523,5nm; eggplant skin, 523,5nm. The total anthocyanin content in mulberry was 1,188%; violet cabbage, 0,909%; perilla leaves, 0,397%; red tea, 0,335%; grapes skin, 0,564%; eggplant skin, 0,441%.

### 1. Mở đầu

Anthocyanin là những glucozit 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 có thể được gắn vào vị trí 3,5,7; thường được gắn vào vị trí 3 và 5 còn vị trí 7 rất ít. Phân tử anthocyanin gắn đường vào vị trí 3 gọi là monoglycozit, ở vị trí 3 và 5 gọi là diglycozit.



Hình 1: Cấu trúc cơ bản của aglucon của anthocyanin

Các aglucon của anthocyanin khác nhau chính là do các nhóm gắn vào vị trí R<sub>1</sub> và R<sub>2</sub>, thường là H, OH hoặc OCH<sub>3</sub> [5]

Anthocyanin tinh khiết ở dạng tinh thể hoặc vô định hình là hợp chất khá phân cực nên tan tốt trong dung môi phân cực. Màu sắc của anthocyanin luôn thay đổi phụ thuộc vào pH, các chất màu có mặt và nhiều yếu tố khác, tuy nhiên màu sắc của anthocyanin thay đổi mạnh nhất phụ thuộc vào pH môi trường. Thông thường khi pH < 7 các anthocyanin có màu đỏ, khi pH > 7 thì có màu xanh. Ở pH = 1 các anthocyanin thường ở dạng muối oxonium màu cam đến đỏ, ở pH = 4 ÷ 5 chúng có thể chuyển về dạng bazơ cacbinol hay bazơ chalcon không màu, ở pH = 7 ÷ 8 lại về dạng bazơ quinoideal anhydro màu xanh [1].

Anthocyanin có bước sóng hấp thụ trong miền nhìn thấy, khả năng hấp thụ cực đại tại bước sóng 510÷540nm. Độ hấp thụ là yếu tố liên quan mật thiết đến màu sắc của các anthocyanin chúng phụ thuộc vào pH của dung dịch, nồng độ anthocyanin: thường pH thuộc vùng acid mạnh có độ hấp thụ lớn, nồng độ anthocyanin càng lớn độ hấp thụ càng mạnh.

Ngoài tác dụng là chất màu thiên nhiên được sử dụng khá an toàn trong thực phẩm, tạo ra nhiều màu sắc hấp dẫn cho mỗi sản phẩm, anthocyanin còn là hợp chất có nhiều hoạt tính sinh học quý như: khả năng chống oxy hóa cao nên được sử dụng để chống lão hóa, hoặc chống oxy hóa các sản phẩm thực phẩm, hạn chế sự suy giảm sức đề kháng; có tác dụng làm bền thành mạch, chống viêm, hạn chế sự phát triển của các tế bào ung thư; tác dụng chống các tia phóng xạ.

Những đặc tính quý báu của anthocyanin mà các chất màu hóa học, các chất màu khác hình thành trong quá trình gia công kỹ thuật không có được đã mở ra một hướng nghiên cứu ứng dụng hợp chất màu anthocyanin lấy từ thiên nhiên vào trong đời sống hàng ngày, đặc biệt trong công nghệ chế biến thực phẩm. Điều đó hoàn toàn phù hợp với xu hướng hiện nay của các nước trên thế giới là nghiên cứu khai thác chất màu từ thiên nhiên sử dụng trong thực phẩm, bởi vì chúng có tính an toàn cao cho người sử dụng.

Trong các chất màu thực phẩm có nguồn gốc tự nhiên thì anthocyanin là họ màu phổ biến nhất tồn tại trong hầu hết các thực vật bậc cao và tìm thấy được trong một số loại rau, hoa, quả, hạt có màu từ đỏ đến tím như: quả nho, quả dâu, bắp cải tím, lá tía tô, hoa hibiscus, đậu đen, quả cà tím, gạo nếp than, gạo đỏ...

Bài báo này trình bày phương pháp chiết tách đơn giản, xác định hàm lượng anthocyanin trong một số nguyên liệu rau quả, bằng phương pháp pH vi sai, làm cơ sở cho việc lựa chọn nguyên liệu giàu anthocyanin để nghiên cứu khai thác sử dụng trong công nghiệp thực phẩm.

## **2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu**

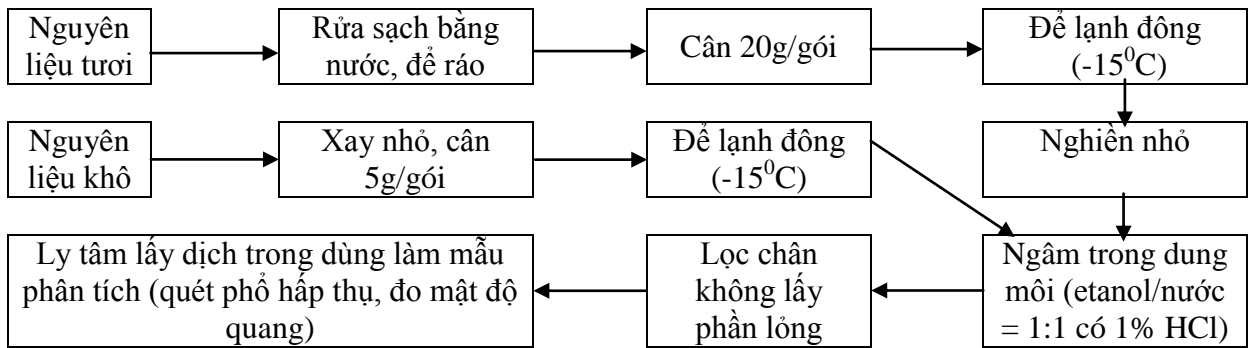
### **2.1. Nguyên liệu**

Lá tía tô, bắp cải tím, quả dâu tằm, nho, cà tím, trà đỏ (đài hoa cây thảo dược hibiscus): mua tại Đà Nẵng.

Nguyên liệu nghiên cứu được chuẩn bị theo sơ đồ ở phần 2.2.1.

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

### 2.2.1. Sơ đồ nghiên cứu



### 2.2.2. Phương pháp xác định độ ẩm của nguyên liệu

Cho lượng mẫu (từ 3 – 5 g) vào máy xác định độ ẩm tự động, ở nhiệt độ 85°C, đặt chế độ thời gian tự động, cho đến khi máy báo hiệu ẩm đã tách hết, đọc kết quả độ ẩm của mẫu.

### 2.2.3 Phương pháp chiết tách anthocyanin

Nguyên liệu đã được chuẩn bị và xử lý như sơ đồ phần 2.2.1, ngâm trong 200 ml dung môi, thời gian 60 phút, sau đó đem lọc chân không thu phần lỏng, ly tâm tốc độ 5000 vòng/phút, trong 10 phút, tách lấy dịch trong, đem phân tích

### 2.2.4. Phương pháp pH vi sai [4] [6]

Dựa trên nguyên tắc: chất màu anthocyanin thay đổi theo pH. Tại pH = 1 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 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

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

Trong đó:  $\lg \frac{I_0}{I}$ : Đặc trưng cho mức độ ánh sáng yếu dần khi đi qua dung dịch hay còn gọi là mật độ quang, ký hiệu là A

I: Cường độ ánh sáng sau khi đi qua dung dịch;  $I_0$ : 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;  $\varepsilon$ : Hệ số hấp thụ phân tử,  $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$

Xác định lượng anthocyanin theo công thức

$$a = \frac{A.M.K.V}{\varepsilon.l}; g \quad (2)$$

Trong đó:  $A = (A_{\lambda_{\text{max}} \cdot \text{pH}=1} - A_{700\text{nm} \cdot \text{pH}=1}) - (A_{\lambda_{\text{max}} \cdot \text{pH}=4,5} - A_{700\text{nm} \cdot \text{pH}=4,5})$

Với  $A_{\lambda_{\text{max}}}$ ,  $A_{700\text{nm}}$ : Độ hấp thụ tại bước sóng cực đại và 700nm, ở pH = 1 và pH = 4,5.

a: Lượng anthocyanin, g; M: Khối lượng phân tử của anthocyanin, g/mol; l: Chiều dày cuvet, cm; K: Độ pha loãng; V: Thể tích dịch chiết, l.

Từ đó tính được hàm lượng anthocyanin theo phần trăm:

$$\% \text{ Anthocyanin toàn phần} = \frac{a}{m(100 - w) \cdot 10^{-2}} 100\% \quad (3)$$

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

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Kết quả xác định độ ẩm và chiết tách anthocyanin thô

Xác định độ ẩm của các mẫu nghiên cứu trên máy đo độ ẩm tự động, và chiết tách dịch chiết giàu anthocyanin như phần 2.2.2, kết quả được thể hiện trong bảng 1

*Bảng 1: Độ ẩm và thể tích dịch chiết giàu anthocyanin của các mẫu nghiên cứu*

Mẫu	Độ ẩm (%)	Thể tích dịch chiết thu được (lit)
Quả dâu ta	89,36	0,208
Bắp cải tím	87,47	0,204
Lá tía tô	80,03	0,198
Trà đỏ	11,03	0,187
Vỏ nho	82,07	0,206
Vỏ cà tím	86,12	0,203

Từ kết quả trên ta thấy độ ẩm của các nguyên liệu tươi nằm trong khoảng 80-90% là hoàn toàn phù hợp với độ ẩm của các nguyên liệu rau quả tươi, dâu là loại quả mọng nên độ ẩm cao hơn. Độ ẩm của quả dâu và bắp cải tím cao vì vậy thể tích dịch chiết thu được cũng cao, do nước trong nguyên liệu được tách ra một phần, đối với trà đỏ do độ ẩm thấp nên khi chiết tách một phần dung môi bị bã hút lại vì vậy thể tích dịch chiết thu được thấp.

Với tỷ lệ nguyên liệu và dung môi như trên sau khi chiết tách phần bã vẫn còn có màu đỏ, chứng tỏ rằng phương pháp này chưa tách triệt để các chất màu có trong nguyên liệu, vì vậy chúng tôi thấy rằng có thể nghiên cứu tìm phương pháp chiết tách có hiệu quả hơn để thu nhận chất màu đạt hiệu suất cao.

#### 3.2. Xác định bước sóng hấp thụ cực đại

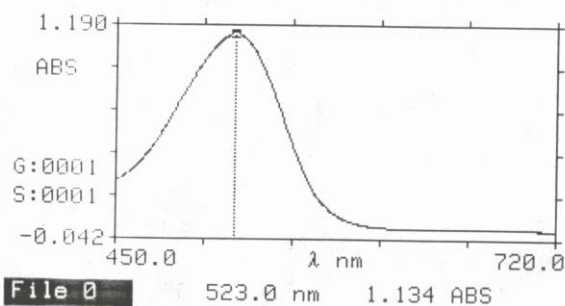
Lấy 5 ml dịch chiết pha loãng với dung dịch đệm pH = 1,0 trong bình định mức 25 ml, quét phổ hấp thụ trong vùng khả kiến ( $\lambda = 450 - 720 \text{ nm}$ ) trên máy quang phổ UV - Vis, kết quả được thể hiện ở bảng 2.

*Bảng 2: Bước sóng hấp thụ cực đại và độ hấp thụ tại bước sóng cực đại của các mẫu nghiên cứu*

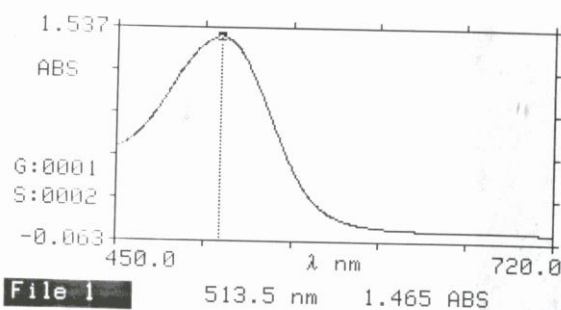
Mẫu	Quả dâu ta	Bắp cải tím	Lá tía tô	Trà đỏ	Vỏ nho	Vỏ cà tím
$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	513,5	523	524	519,5	523,5	523,5
$A_{\lambda_{\text{max}}}$	1,465	1,134	0,973	1,170	1,231	0,698

Phổ hấp thụ của một số mẫu nghiên cứu được thể hiện trên các hình 1.

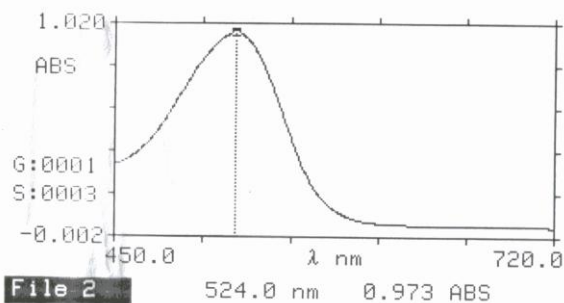
DR/4000U S/N: 0312U0005325 2.40  
09-APR-04 14:28:48 SCAN  
450-720 nm Step 0.5 nm



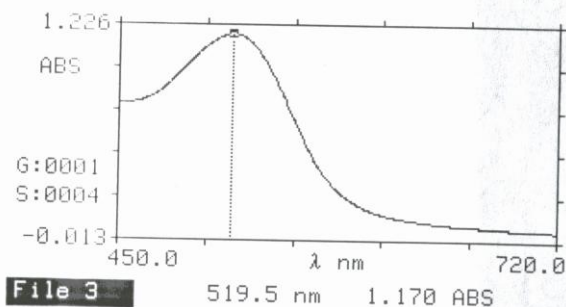
DR/4000U S/N: 0312U0005325 2.40  
09-APR-04 14:46:13 SCAN  
450-720 nm Step 0.5 nm



DR/4000U S/N: 0312U0005325 2.40  
09-APR-04 14:55:36 SCAN  
450-720 nm Step 0.5 nm



DR/4000U S/N: 0312U0005325 2.40  
09-APR-04 15:03:29 SCAN  
450-720 nm Step 0.5 nm



Hình 1: Phổ hấp thụ của dịch chiết giàu anthocyanin từ các nguyên liệu:  
file0: Bắp cải tím; file1: quả dâu; file2: lá tía tô; file3: trà đỏ

Từ kết quả trên chúng tôi thấy phổ hấp thụ của dịch chiết từ các mẫu nghiên cứu nằm trong vùng phổ hấp thụ của các anthocyanin (510 – 540 nm), vì vậy có thể thấy rằng các dịch chiết của các mẫu này rất giàu anthocyanin, nếu được làm sạch tốt thì có thể thu được lượng anthocyanin tương đối cao. Đối với dịch chiết từ quả dâu có bước sóng hấp thụ cực đại 513,5 nm, còn dịch chiết của bắp cải tím, lá tía tô, trà đỏ, vỏ quả nho, vỏ quả cà tím có bước sóng hấp thụ nằm trong khoảng 520-525nm nên có khả năng nhóm anthocyanin trong quả dâu sẽ khác so với các loại nguyên liệu còn lại. Theo khảo sát của chúng tôi, độ hấp thụ cực đại của dịch chiết lá tía tô là 524nm, trong khi kết quả công bố trong tài liệu [2] độ hấp thụ cực đại của anthocyanin tinh khiết trong lá tía tô là 525nm đã chứng tỏ độ tin cậy của phương pháp thử nghiệm là khá cao.

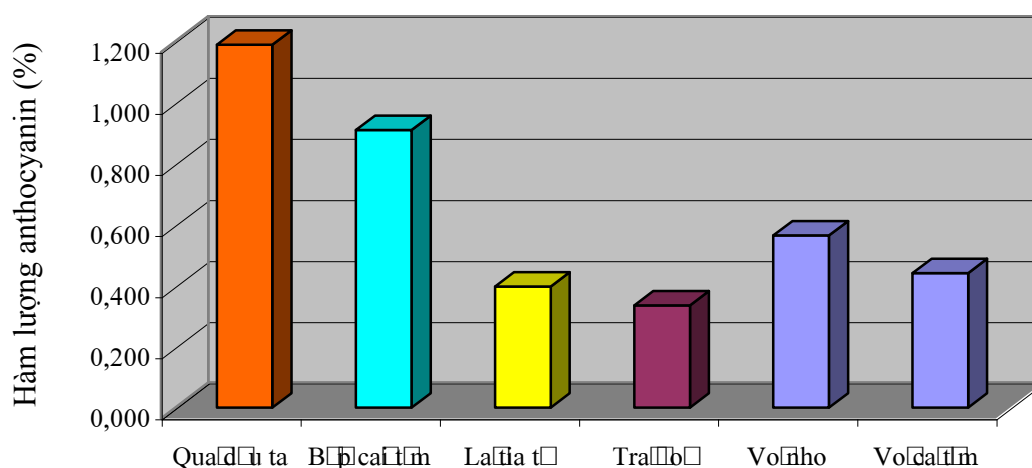
### 3.3. Kết quả hàm lượng anthocyanin

+ Đo mật độ quang của các mẫu nghiên cứu tại bước sóng hấp thụ cực đại và 700nm, ở pH = 1,0 và pH = 4,5, từ đó áp dụng công thức (2) và (3), ta tính được hàm lượng anthocyanin trong các loại nguyên liệu trên, kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3: Mật độ quang tại bước sóng hấp thụ cực đại và 700nm trong các dung dịch đệm pH=1,0 và pH=4,5 và hàm lượng anthocyanin của các mẫu

Mẫu	pH = 1,0		pH = 4,5		Hàm lượng anthocyanin (%)
	$\lambda_{\max}$	$\lambda = 700 \text{ nm}$	$\lambda_{\max}$	$\lambda = 700 \text{ nm}$	
Quả dâu ta	1,465	0,012	0,224	0,028	1,188
Bắp cải tím	1,134	0,015	0,172	0,025	0,909
Lá tía tô	0,973	0,047	0,143	0,046	0,397
Trà đỏ	1,170	0,050	0,353	0,057	0,335
Vỏ nho	1,231	0,025	0,217	0,027	0,564
Vỏ cà tím	0,698	0,002	0,085	0,013	0,441

+ Hàm lượng anthocyanin có trong các mẫu nguyên liệu nghiên cứu, được biểu diễn dưới dạng biểu đồ trong hình 2



Hình 2: Biểu đồ biểu diễn hàm lượng anthocyanin có trong các nguyên liệu: quả dâu ta; bắp cải tím; lá tía tô; trà đỏ; vỏ nho; vỏ cà tím

Kết quả trên cho thấy hàm lượng anthocyanin trong các nguyên liệu đều tương đối cao, trong đó quả dâu tằm cao nhất chiếm 1,188%, bắp cải tím và các nguyên liệu khác cũng rất giàu anthocyanin.

#### 4. Kết luận

Bằng phương pháp pH vi sai chúng tôi đã xác định được hàm lượng anthocyanin trong một số nguyên liệu rau quả thuộc khu vực miền Trung Việt Nam. Kết quả cho thấy một số nguyên liệu có hàm lượng anthocyanin tương đối cao như: quả dâu ta 1,188 %; bắp cải tím 0,909%; lá tía tô 0,397%; trà đỏ 0,335%, vỏ nho 0,564%, vỏ cà tím 0,441%.

Từ kết quả này chúng tôi đã lựa chọn được các nguyên liệu để nghiên cứu sâu hơn về chiết tách, làm sạch hợp chất màu anthocyanin, và ứng dụng chúng trong chế biến các sản phẩm thực phẩm.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Lê Ngọc Tú, *Hoá học thực phẩm*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 1994.
- [2] Akio Tsukui, Atsuko Suzuki, Sumi Nagayama and Norihiko Terahara, *Stability of anthocyanin pigments from purple leaves of perilla ocimoides L. var. crispa*, Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi, Vol. 43, No.4, 113 – 119 (Article), 1996.
- [3] Gui, M. M., Rodriguez-Saona, Wroslated Pelargonidin-Based Anthocyanins, *J.Agric. and Food Chemistry*, Vol. 47, No.11, 1999.
- [4] Fuleki, T., Francis, F.J., Quantitative Methods for Anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanin and degradation Index for Cranberry Juice, *J. Food Science*, Vil.33, 1968.
- [5] Jon Wright and David Wickard, Biochemistry 321, *The National Science Foundation*, 1998.
- [6] Wrolstad, R.E., Color and Pigment Analyses in Fruit products, *Agricultural Experiment Atation*, Oregon State University, Station Bulletin 624, 1993.