

紫甘蓝色素的提取纯化及性质分析

* 吕楚滢 刘军民*

(中山大学材料科学与工程学院 广东 510275)

摘要: 紫甘蓝色素, 具有广泛的开发应用前景。而色素对酸、碱及化学物质的稳定性直接关系到色素的应用范畴。本综合实验采用微波萃取和柱层析法分离提纯紫甘蓝色素, 再通过加入不同pH值或不同金属离子的溶液, 用紫外可见光谱法测试两者对紫甘蓝色素稳定性的影响。让学生了解紫甘蓝提取工艺和提纯方法, 明白微波萃取法和色谱法分离提纯有机物的原理, 掌握微波萃取和柱层析操作技术, 学会分析不同酸度、金属离子对紫甘蓝天然色素的影响。

关键词: 紫甘蓝色素; 花色苷; 微波辅助提取; 柱层析法; 色素稳定性

中图分类号: 069 **文献标识码:** A

Extraction, Purification and Analysis of Pigment from Purple Cabbage

Lv Chuying, Liu Junmin*

(School of Materials Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangdong, 510275)

Abstract: The cabbage red pigment extracted from purple cabbage has a wide application prospect. The stability of pigment for acid, alkali and chemical substances is directly related to the pigment application. In this comprehensive experiment, anthocyanin is separated from purple cabbage pigment by the microwave extraction and then purified by column chromatography. The influence of pH values and metal ions on the pigment stability is investigated by UV-visible absorption spectrometer. This experiment enables students to understand extraction technology and purification method of purple cabbage pigment, understand the principle of microwave extraction and chromatography separation and purification, master the microwave extraction and column chromatography operation technology, learn to analyze the effect of different acidity and metal ions on purple cabbage pigment.

Key words: violet cabbage pigment; anthocyanin; microwave assisted extraction; column chromatography; pigment stability

1. 背景

色素通常分为天然色素和合成色素, 其中花青素是最为人所知的一类色素, 而紫甘蓝色素是花青素中的一员。紫甘蓝为十字花科芸薹属, 原产于欧洲地中海沿岸至北海沿岸地区, 现如今在我国已广泛种植。紫甘蓝色素通常是指以花青素与糖苷结合的形式存在的花色苷结构^[1]。紫甘蓝色素具有天然无毒, 色彩鲜艳以及抗氧化的优点, 可应用于衣物染色^[2]、食品添加剂^[3]和肿瘤治疗^[4]等方面。

(1) 天然色素

天然色素是指从天然原料(一般为植物)中提取出来的色素, 可分为三类。第一类是类黄酮类色素, 基本结构为2-苯基苯并吡喃酮, 具有清除氧自由基的功能, 所以常用于药物。本实验研究的花色苷就是一种类黄酮类色素。第二类是醌类色素, 具有很强的螯合性, 故要避免和金属离子接触。第三类是类胡萝卜素类色素, 通常为共轭烯烃结构, 是一种脂溶性色素, 对光、热和金属过氧化物敏感。

(2) 花色苷结构

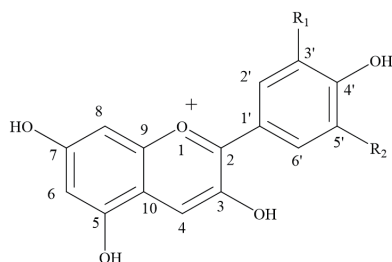


图1 花色苷的结构

花色苷(Anthocyanin)是指花色素与糖分子通过糖苷键结合而成的化合物(图1), 花色素的结构为2-苯基苯并

吡喃型阳离子, 其基本骨架为C6-C3-C6。2-苯基苯并吡喃型阳离子结构通常被称为母核, 母核上的羟基和甲氧基的数量不同造就了花青素种类的不同, 常见的有六种: 矢车菊色素、芍药色素、天竺葵色素、飞燕草色素、牵牛花色素以及锦葵色素(表1)^[5]。

表1 种类繁多的花色苷^[5]

名称	英文	缩写	取代基							颜色
			3	5	6	7	3'	4'	5'	
天竺葵色素	Pelargonidin	Pg	-OH	-OH	H	-OH	H	-OH	H	橙色
矢车菊色素	Cyanidin	Cy	-OH	-OH	H	-OH	-OH	-OH	H	橙红色
芍药色素	Peonidin	Pn	-OH	-OH	H	-OH	OMe	-OH	H	红色
飞燕草色素	Delphinidin	Dp	-OH	-OH	H	-OH	-OH	-OH	-OH	青红色
牵牛花色素	Petunidin	Pt	-OH	-OH	H	-OH	OMe	-OH	-OH	青红色
锦葵色素	Malvidin	Mv	-OH	-OH	H	-OH	OMe	OMe	-OH	青红色

(3) 花色苷的提取

花色苷类的色素主要存在于植物体中的花、叶和果实等部位, 其中含有的酚类化合物是具有抗氧化作用的活性物质, 可以入药, 提取的目的是要提出其中的多酚类物质。花色苷在pH值较小的条件下稳定存在, 因此大多数花色苷提取的方法都在酸性溶液中进行。

①溶剂提取法。花色苷结构中含有若干个羟基和甲氧基, 是一种极性化合物。根据溶液的相似相溶原理, 花色苷常用极性溶液溶解。常规的溶剂是水和甲醇、乙醇或者丙酮

等极性溶剂的混合物。用于食物时，出于安全考虑，也用柠檬酸、酒石酸等酸性温和的酸作提取液。因为样品中常常含有多种抗氧化物质，所以没有一种溶剂可以同时将所有有机物质都提取出来，一般都需要多种溶剂混用。

②超声波辅助提取法。超声波是指频率高于 2×10^4 Hz的声波，具有能量集中的特点。它可以使花青素溶液中产生气泡，在持续的声波作用下气泡会爆炸性破裂，产生局部压力，使植物细胞破裂。

③微波提取法。微波是指频率在300MHz-300GHz的电磁波。微波的加热方式是体加热，不同于常规加热。常规的加热方式是通过热辐射由表及里进行传导式加热，能量利用效率低且温度分布不匀。而微波加热是将吸收的电磁能转变成热能，升温快并且里外温度相差不大。在2011年，Liazid等人^[6]在100℃和磁力搅拌下，25mL的40%的甲醇水溶剂中，选择500W的功率，实现了在5min内从葡萄皮中提取了花色苷，且重复性良好。由于微波提取具有能量效率高、可重复性和选择性优越的特点，本实验采用微波提取的方法。

(4) 花色苷的纯化

经过初步提取的色素水溶液中除了有我们所需要的多酚类物质，还有许多的糖、酸等大分子杂质，需要对粗提取液进一步纯化。

①膜分离法。膜分离法是利用各种天然或人工制造的具有选择透过性的膜，如超滤膜、渗透膜和反渗透膜等，对粗提取液进行过滤，具有节能、分离效率高和产品质量高的优点。但由于该方法对设备要求较高，成本昂贵，不适用于工业应用。②重结晶法。使用醋酸铅使色素沉淀，过滤，酸洗，再过滤，得到纯度较高的花色苷溶液。但由于醋酸铅有毒，该法不适用于食用色素的提纯。③柱层析法。柱层析法通常选择氧化铝和硅胶作吸附剂。吸附剂将混合物中的各组分从溶液中吸附到其表面上，然后再用溶剂洗脱。由于各组分被吸附的程度不同，吸附强的组分移动慢，后洗出，吸附弱的组分移动快，先洗出，从而达到分离的目的。出于成本和可操作性的考虑，本实验采用的是最常用的柱层析法。

本文选取紫甘蓝为研究对象，通过微波萃取和柱层析法提取和纯化天然的紫甘蓝色素，并探究不同酸度和金属离子对其稳定性的影响，为花色苷的工业生产提供依据。

2. 实验部分

(1) 实验试剂

浓盐酸 (Hydrochloric Acid, HCl)，丙酮 (Acetone)，正丁醇 (n-butanol)，硫酸铝 (Aluminium Sulphate)，氯化钾 (Potassium Chloride)，氯化镁 (Magnesium Chloride)，氯化镍 (II) 六水 (Nickel (II) Chloride Hexahydrate)，醋酸铅 (Lead Acetate)，乙酸铜 (Cupric Acetate Monohydrate)，硅胶 (Silica Gel)，均为分析纯，购于广州化学试剂厂，使用时根据需要进行干燥纯化操作或直接使用。

(2) 实验仪器

MCR-3微波化学反应器：采用非脉冲微波连续加热，设定功率档位为7档，辐射温度60℃和辐射时间为180s；旋转蒸发仪：采用Heidolph Hei-VAP Value Digital型号；上海元析牌紫外可见光度计：采用扫描型UV-6000PC型号；真空干燥箱、酸度计。以上试剂与仪器均由中山大学东校区实验

教学中心提供。

(3) 紫甘蓝色素的提取和纯化

①洗净晾干切碎紫甘蓝并准确称取10g（实际为10.1825g），置于1个锥形瓶中。加入50mL的0.35mol/L盐酸，微波辐射3min，趁热过滤，得到色素粗提取液。色素粗提取液旋蒸至约5mL时取出，用于柱层析中的湿法上样。②用硅胶作为吸附剂，湿法装柱，湿法上样，柱层析进行纯化，流动相为正丁醇:丙酮:水:盐酸=6:1:1:2。收集红色洗脱液，经过旋转蒸发仪蒸发旋干，并真空干燥得到红色粉末，称重为0.4126g，提纯率为4.05%。③取适量色素胶质，在50mL容量瓶中配为色素水溶液，利用紫外可见分光光度计进行吸收光谱扫描，控制其吸光度范围在0.1-1.0之间。

(4) 探究不同酸度对紫甘蓝天然色素的影响

①在50mL容量瓶中，配置0.1mol/L盐酸溶液和0.1mol/L氢氧化钠水溶液。②用0.1mol/L盐酸溶液，0.1mol/L氢氧化钠水溶液，以及蒸馏水，按不同体积比配制pH为3, 5, 7, 9, 11的溶液，分别取3mL不同酸度的溶液，放置于5个干净的试管中。③在以上试管中，分别逐滴加入2mL的色素溶液，放置10min，发现不同样品呈现出不同程度的粉色，然后测吸光度。

(5) 探究金属离子对紫甘蓝天然色素的影响

①在6个干净试管中分别加入配好的4mL色素水溶液。②在6个含4mL色素水溶液的试管中，分别逐滴加入1mL配好的0.1mol/L的 K^+ 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ni^{2+} 及 Pb^{2+} 离子溶液。③放置10min，发现不同样品呈现不同的颜色，然后测吸光度。

3. 结果与分析

(1) 不同酸度对色素性质的影响

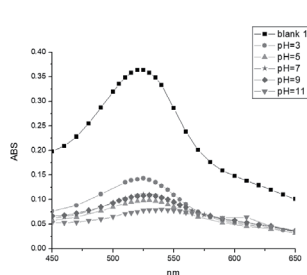


图2 不同酸度的色素溶液的紫外可见光谱曲线

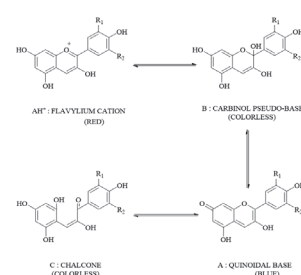


图3 不同pH值下花色苷结构的变化^[5]

表2 不同酸度的紫甘蓝色素溶液的吸光度

pH	空白	3	5	7	9	11
颜色	紫	粉红 (+++)	粉红 (+)	粉红 (++)	粉红 (++)	粉红 (+)
λ_{max} (nm)	525	525	525	525	530	540
Abs	0.145	0.143	0.099	0.110	0.109	0.080

注：“+”越多代表颜色越深；空白值是经朗伯-比尔定律计算后的校正值

因为空白组用的是5mL的原色素溶液，其最大的Abs值为0.363（见图2中的黑色线），而实验组均为2mL原色素溶液和3mL不同pH值的水溶液的混合液，所以经朗伯-比尔定律 $A=KcL$ 公式（其中K为摩尔吸光系数，c为吸光物质的浓度，L为吸收介质的厚度）校正得，2mL的原色素溶液稀释成5mL溶

液后,其最大的Abs值应为0.145。

随pH增大,溶液的颜色从粉红变成淡粉,颜色逐渐变浅。在pH值为3-5的范围内,色素溶液的最大吸收波长几乎不变,但吸光度逐渐减小;当pH值提高到7时,吸光度有一个小幅度的提高;而pH为9-11时,吸收波长红移,吸光度继续减小(图2和表2)。

这是因为花色苷具有一种受酸碱条件影响较大的结构。在不同的pH条件下,花色苷有四种不同的结构形式(图3):浅紫色的醌型碱(Quinoidal Base, A)、红色的黄烺盐离子(Flavylium, AH⁺)、无色的甲醇假碱(Carbinol Pseudo-base, B)、无色的查耳酮(Chalcone, C)。当溶液的pH值较小时,花青素以红色的黄烺盐阳离子(AH⁺)的形式存在,当pH值增大时,水分子亲核攻击AH⁺的2位,破坏其双键,生成的无色甲醇假碱B,吸光度下降。当pH值继续增大到7-9范围时,B会脱去质子形成蓝色的醌型碱,吸光度增大。当pH值大于9后,随pH值增大,醌型碱会开环变成查耳酮C,吸光度会降低。

(2) 不同金属离子对色素性质的影响

空白组用的是5mL的原色素溶液,其最大的Abs值为0.363(见图4中的黑色线),而实验组均为4mL原色素溶液和1mL不同金属离子的水溶液的混合液,所以经朗伯-比尔定律校正得,4mL的原色素溶液稀释成5mL溶液后,其最大的Abs值应为0.290。

随着K⁺、Mg²⁺水溶液的加入,溶液的最大吸收波长几乎没变,都保持在525nm左右,颜色为粉红色。随着Ni²⁺的溶液的加入,溶液的最大吸收波仍在525nm左右,但是吸光度有所下降,为浅粉色。加入Al³⁺离子溶液之后溶液颜色变成了深紫色,最大吸收波长红移至565nm,吸光度急剧增大。加入Pb²⁺离子溶液后,颜色为绿色,最大吸收波长红移至600nm,吸光度上升。而加入Cu²⁺后溶液颜色变成浅绿,吸收波长也红移至600nm,吸光度降低(图5和表3)。

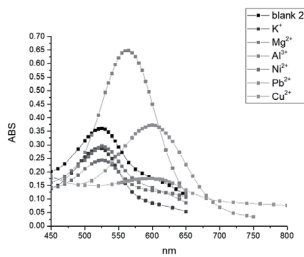


图4 加入不同金属离子溶液的水色素溶液的紫外光谱曲线

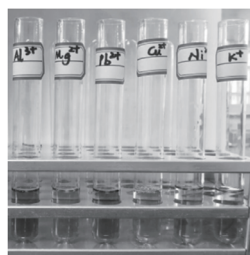


图5 加入不同金属离子溶液后的色素水溶液

表3 加入不同金属离子溶液的色素溶液的吸光度

金属离子	空白	K ⁺	Mg ²⁺	Ni ²⁺	Al ³⁺	Pb ²⁺	Cu ²⁺
颜色	紫	粉红	粉红	浅粉	深紫	绿	浅绿
λ_{max} (nm)	525	525	525	525	565	600	600
Abs	0.290	0.288	0.296	0.243	0.648	0.373	0.176

注:空白值是朗伯-比尔定律计算后的校正值

分析原因可知,花色苷分子含酚羟基和 γ -吡喃酮环,容易与金属离子发生络合反应,形成紫甘蓝-金属离子络合物,可吸收紫外或可见光区的某一部分波长而发生电荷转移

跃迁,电子从酚羟基配体的 π 轨道跃迁到金属离子的某一轨道,使紫甘蓝在紫外-可见区域吸收发生改变。K⁺和Mg²⁺可能没有与花色苷发生络合反应,查阅文献可知,Mg²⁺对花色苷有稳定作用,在植物体中大量存在^[7]。而Ni²⁺和Cu²⁺离子,其价电子层结构分别为3d⁸和3d⁹, (n-1) d轨道未填满,可与花色苷配位,形成内轨配合物,发生配位电荷转移,表现为颜色变浅。因Cu²⁺离子溶液本身是蓝色,加入色素溶液后变成浅绿色。Al³⁺和Pb²⁺离子最外层的s、p和d轨道都是空轨道,可与花色苷配位得到外轨配合物,电子由花色苷跃迁至金属离子的空轨道时,波长红移,吸光度增加,溶液颜色变深,其中以Al³⁺的增色效应最明显。

4. 结语

本实验提取并纯化了紫甘蓝色素以及测试了不同酸度和金属离子对紫甘蓝色素的影响,结果表明,在不同酸度的溶液中,花色苷分子有四种不同的形态,分别对应不同的颜色。在金属离子溶液中,由于花色苷分子含酚羟基和 γ -吡喃酮环,所以易与Ni²⁺、Cu²⁺、Al³⁺和Pb²⁺离子发生络合反应,生成不同颜色的复合物。

实验设计需要使用微波萃取仪、柱层析分离装置、旋转蒸发仪和紫外可见吸收光谱仪等仪器,可以使材料化学专业的同学熟悉完整的由物质制备纯化到物质性质研究的整个流程,了解常用的分离提纯装置和测试表征仪器,提高他们的动手能力,综合运用课堂所学的基础知识,深化对材料的结构和性质的了解,拓宽知识面,为后续学习和未来的科研道路奠定坚实的基础。

【参考文献】

- [1]王芳,兰素娟.紫甘蓝色素的超声波辅助提取及其稳定性研究[J].广东农业科学,2012,39(22):112-116.
- [2]李珂,张慧,肖子逸,李星光,曹振朋.紫甘蓝色素的提取及对羊毛纤维的染色性能[J].印染,2019,45(15):22-27.
- [3]BRIDLE P, TIMBERLAKE C F. Anthocyanins as natural food colours—selected aspects[J]. Food Chemistry, 1997, 58(1): 103-109.
- [4]徐颖倩,曾雪,唐倩.紫甘蓝提取液对人乳腺癌细胞生长和迁移的抑制作用[J].世界中医药,2017,12(11):2779-2782.
- [5]FRANCIS F J, MARKAKIS P C. Food colorants: Anthocyanins[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1989, 28(4): 273-314.
- [6]A. Liazid, R. F. Guerrero, E. Cantos, M. Palma, C. G. Barrero. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins[J]. Food Chemistry, 2010, 124(3).
- [7]HONDO T, YOSHIDA K, NAKAGAWA A, et al. Structural basis of blue-colour development in flower petals from Commelina communis[J]. Nature, 1992, 358(6386): 515-518.

【作者简介】

吕楚滢(1998-),女,广东深圳人,硕士研究生,中山大学材料科学与工程学院;研究方向:材料与化工。

【通讯作者】

刘军民(1976-),女,江西南康人,教授,中山大学材料科学与工程学院;研究方向:材料化学。