商陆果实红色素的提取工艺研究

林海珠，王宁，郑一敏，胥秀英，乔源，傅善权
（重庆理工大学药学与生物工程学院，重庆 400054）

摘要：对 5 种大孔树脂提取商陆红色素进行比较；考察经 AB-8 大孔树脂提纯后，乙醇沉淀商陆红色素的最佳工艺条件。AB-8 大孔树脂吸附商陆红色素效果最好；乙醇沉淀纯化商陆红色素的最佳工艺为：洗脱液浓缩 50 倍，浓缩液：乙醇为 1:10（0.8 mL 浓缩液加到 8 mL 乙醇中），沉淀 3 次。经过 AB-8 大孔树脂提纯后，乙醇沉淀不仅能够除去大部分杂质，而且大大提高了商陆红色素的品质。

关键词：商陆；大孔树脂；色素；乙醇沉淀

文章篇号：1673-9078(2013)1-170-172

Study on Extraction and Isolation of Red Pigment from Fruits of *Phytolacca acinosa Roxb*

LIN Hai-zhu, WANG Ning, ZHENG Yi-min, XU Xiu-ying, QIAO Yuan, FU Shan-quan
(School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China)

Abstract: Considering overall adsorption and desorption capacity, AB-8 resin was selected out of 5 types of macroporous resins to purify the red pigment from fruits of *Phytolacca acinosa* Roxb. And the optimum process conditions for purifying the red pigment using ethanol precipitation were determined as follows: elution concentrated 50 time, concentrated solution:ethanol as 1:10 (0.8 mL concentrated solution added to 8ml ethanol) and precipitation 3 time. After AB-8 macroporous resin purification, ethanol precipitation was able to remove most of the impurities and greatly enhance the pigment quality.

Key words: *Phytolacca acinosa Roxb*; macroporous resin; pigment; ethanol precipitation

商陆（*Ptdacca acinosa* Roxb.）为商陆科多年生宿根草本植物，分布于全国各地，其中以垂序商陆[*Ph.americana* L (*Ph.decandra* L)]分布较广，资源丰富。商陆果实红色素属于甜菜素，包括甜菜红素与甜菜黄素，以甜菜苷为主，是水溶性含氮色素，溶于水显酸性[1]。商陆果实红色素能溶于水，不溶于甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯等有机溶剂。商陆果实红色素在偏酸性条件下，对光、热、食品添加剂等稳定，毒性实验表明安全可靠[2~5]。在国外商陆红色素曾用于红酒和食品着色剂[6]。商陆红色素具有抗氧化和清除自由基活性的药理作用[7~8]，能有效防止氧化过程,有助于预防人类的退行性疾病，并具有良好的生物利用度，可以提供保护某些氧化应激紊乱[9]。本文对商陆红色素的分离纯化进行研究，为商陆红色素的开发提供依据。

1 材料与方法

收稿日期：2012-08-13

作者简介：林海珠(1983-)，男，硕士研究生，主要从事天然药物物质基础与新药评价研究

通讯作者：郑一敏(1963-)，男，硕士，教授，主要从事天然药物研究

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

垂序商陆果实采自重庆理工大学校园。

1.1.2 试剂

乙醇，重庆川东化工有限公司，20120601；盐酸，重庆川东化工有限公司，20111008；大孔树脂 AB-8、NKA-9、N KA-Ⅱ、D101-B、D4020，南开大学化工厂；试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器

TU-1901 可见光分光光度计，北京普析通用仪器有限公司；KQ-50B 型超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；RE-5298 型旋转蒸发仪，上海亚荣生化仪器厂；KA-1000 台式离心机，上海安亭科学仪器厂；GL-21M 高速冷冻离心机，长沙湘仪离心机仪器有限公司；BCD-649WADV 型电冰箱，青岛海尔股份有限公司；HH-6 数显恒温水浴锅，国华电器有限公司；HZP-250 型全温振荡培养箱，上海精宏实验设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 工艺流程

成熟商陆果实→20 ℃冷冻 24 h→超声波萃取（物料比 1:20，20 min，三蒸水）→提取液→过滤离心→上大孔树脂→减压浓缩→浓缩液→乙醇沉淀→50℃水浴蒸干→紫红色粉末

1.2.2 树脂预处理

4%氢氧化钠水溶液浸泡大孔树脂过夜，洗涤至中性；然后，用 95%乙醇（3% HCl）浸泡大孔树脂过夜并洗涤，至洗涤液与 3 倍体积的水混合不产生浑浊，备用。

1.2.3 树脂吸附方法

大孔树脂预处理后装柱，上清液过大孔树脂吸附，待吸附完全后，用一定量的洗脱剂洗脱，收集洗脱液，减压浓缩成合适的倍数，进行乙醇沉淀，50 ℃水浴蒸干得到紫红色粉末。

1.2.4 分析方法

取上清液稀释适当倍数，在波长为 400~700 nm 范围内扫描最大吸收波长。用可见光光度计在最大波长下进行提取液或洗脱液吸光度的测定，根据吸光度及吸附率的大小确定其最优的工艺条件。

1.2.5 乙醇沉淀方法

取一定量浓缩倍数的浓缩液缓缓加入一定量的无水乙醇中，并用超声波清洗仪超声清洗。然后，3000 r/min 离心 10 min 并判断上清液的颜色进行 1~10 分评分[10]（5 个实验员评分，取平均值），上清液无色透明为最好 10 分，上清液红色为最差 1 分。

2 结果与讨论

2.1 最大吸收波长的确定

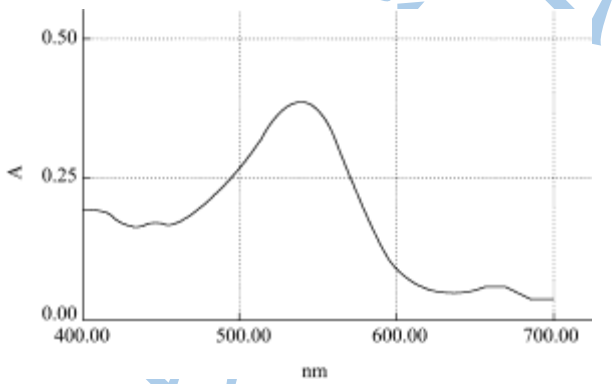


图 1 商陆果实红色素紫外吸收光谱图谱

Fig.1 Absorption spectrum of *Ph.americana L* red pigment

取 1 mL 超声波提取液稀释 10 倍，在波长为 400~700 nm 范围内扫描最大吸收波长，得到商陆红色素吸收光谱，如图 1 所示，其最大吸收波长为 538 nm。

2.2 大孔树脂纯化工艺的确定

2.2.1 大孔树脂的选择

分别称取已处理好的不同型号大孔树脂 10.0 g，放入 100 mL 三角烧瓶中，加入 50 mL 上清液，振荡 12 h 后过滤，在 538 nm 处测定吸附前后的吸光度 A 值，考察不同的大孔树脂对商陆红色素的吸附效果，并计算吸附率，吸附率=($A_{前}$-$A_{后}$)/$A_{前}$×100%。结果（见表 1）AB-8 大孔树脂吸附效果较好，吸附率达 90.128%，其中 NKA-9 的吸附效果最差，吸附率仅为 36.746%。因此，选择 AB-8 大孔树脂进行商陆红色素纯化工艺研究。

表 1 不同大孔树脂对商陆红色素的吸附

Table 1 Adsorption of different resins to red pigment of *P.americana L*

树脂名称	树脂性质	$A_{吸附前}$	$A_{吸附后}$	吸附率%
AB-8	弱极性	0.547	0.054	90.13±0.27
D101-B	弱极性	0.547	0.112	79.52±0.22
D-4020	非极性	0.547	0.189	65.45±0.21
NKA-9	极性	0.547	0.346	36.75±0.07
NKA-Ⅱ	极性	0.547	0.089	83.73±0.05

2.2.2 洗脱剂的选择

取 4 份吸附了商陆色素的 AB-8 大孔树脂 5 g 于 50 mL 三角烧瓶中，分别加入 10 mL 甲醇、75%乙醇、丙酮、乙酸乙酯振荡 1 h，过滤，滤液在 538 nm 处测定吸光度，考察不同洗脱剂对商陆红色素的洗脱效果。结果（见表 2）75%乙醇对商陆红色素的洗脱效果最好。

表 2 不同洗脱剂对商陆红色素的洗脱效果

Table 2 Elution results of different solutions to red pigment of *P.americana L*

洗脱剂	甲醇	75%乙醇	丙酮	乙酸乙酯
$A_{解吸附后}$	0.128	0.306	0.095	0.077
$A_{解吸附前}$	0.041			
吸附率/%	90.21±0.09			
解吸附率/%	67.97±0.16	86.60±0.14	56.84±0.55	46.75±0.27

2.2.3 乙醇浓度的确定

取 5 份已吸附商陆红色素的 AB-8 大孔树脂 5 g 于 50 mL 三角烧瓶中，分别加入 10 mL 不同浓度的乙醇溶液振荡 1 h，过滤，滤液在 538 nm 处测定吸光度，考察乙醇浓度对商陆红色素的洗脱效果。结果（见表 3）表明 15%乙醇对商陆红色素的洗脱效果较好。

2.2.4 AB-8 大孔树脂重复使用效果

称取 20.0 g AB-8 湿树脂装柱，15%乙醇溶液洗脱，再用蒸馏水冲洗至无醇味。测得商陆红色素溶液在 538 nm 处吸光度为 0.547，取 100 mL 该色素溶液进行吸附，流速为 2 BV/min，测定流出液体的吸光度。平行实验 25 次，考察 AB-8 大孔树脂重复使用的效果（见表 4）。由表 4 可得，AB-8 大孔树脂重复使用 25 次，吸光度变化较大，吸附率下降了 7.13%，原因主要是

洗脱剂的浓度过低，大孔树脂的吸附的杂质没有得到充分的洗脱而影响大孔树脂的吸附效果，95%乙醇（3% HCl）可以有效洗脱树脂吸附的杂质。不使用95%乙醇（3% HCl）清洗的情况下，AB-8 大孔树脂使用 15 次之内仍然可以重复使用。

表 3 不同浓度乙醇溶液的洗脱效果

Table 3 Elution results of different concentration ethanol to red pigment of *P.americana L*

乙醇浓度/%	5	15	25	35	45	55	65	75	85	95
$A_{解吸附后}$	0.246	0.376	0.266	0.260	0.231	0.277	0.288	0.306	0.198	0.124
$A_{解吸附前}$	0.041									
吸附率/%	90.21±0.09									
解吸附率/%	83.33±0.12	89.10±0.21	84.59±0.10	84.23±0.23	82.25±0.09	85.20±0.17	85.76±0.19	86.60±0.14	79.29±0.22	66.94±0.08

表 4 AB-8 大孔树脂重复使用次数与吸附率

Table 4 Reuse times of AB-8 resin and adsorption rate

次数	1	5	10	15	20	25
吸光度 A	0.022	0.029	0.036	0.044	0.050	0.061
吸附率/%	95.98±0.03	94.70±0.17	93.42±0.14	91.96±0.10	90.86±0.08	88.85±0.06

2.3 乙醇沉淀纯化工艺的确定

2.3.1 洗脱液浓缩倍数的确定

表 5 不同浓缩倍数的沉淀效果

Table 5 Precipitation results of different concentration factor to red pigment of *P.americana L*

浓缩倍数	100	75	50	25
上清液的颜色	黄色	淡黄色	微黄色	淡红色
得分	6.23±0.16	7.02±0.10	8.44±0.09	2.71±0.02

取 AB-8 大孔树脂洗脱液 100 mL，分别浓缩成 100、75、50 和 25 倍的浓缩液。分别取不同浓缩倍数的浓缩液 0.2 mL，缓缓滴加到 8 mL 无水乙醇中，并用超声波清洗仪清洗 1 min，3000 r/min 离心 10 min，判断上清液的颜色并评分（见表 5）。由表 5 可见，在 4 个浓缩倍数中，浓缩 50 倍的效果最好，而浓缩 100 倍比浓缩 50 倍的色素杂质较多，对结果的判定有一定的影响，但浓缩倍数越大浓缩难度和成本也就越大。因此，选择浓缩 50 倍为宜。

2.3.2 沉淀体积的确定

分别取 0.2、0.3、0.5、0.8、1.0 和 1.2 mL 浓缩 50 倍的浓缩液，缓缓滴加到 8 mL 乙醇中，并用超声波清洗仪清洗 1 min，3000 r/min 离心 10 min，判断上清液的颜色并评分（见表 6）。实验表明，向 8 mL 乙醇中加入 0.2 Ml 50 倍浓缩液的效果最好，得分最高；而 0.2 mL 体积过少，实验过程中乙醇消耗量过大，即使加入 0.8 mL 时得分不高，却能有效的纯化商陆红色素，减少实验时间和乙醇的消耗量提高效率，因此，选择向 8 mL 乙醇中加入 0.8 mL 50 倍浓缩液为宜。

表 6 不同体积对沉淀效果的影响

Table 6 Precipitation results of different concentration volume to red pigment of *P.americana L*

沉淀体积/mL	0.20	0.30	0.50	0.80	1.00	1.20
上清液的颜色	微黄色	微黄色	淡黄色	黄色	淡红色	红色
得分	8.32±0.05	7.12±0.07	6.24±0.06	5.49±0.04	1.20±0.17	1.00±0

2.3.3 沉淀次数的确定

表 7 不同沉淀次数的效果

Table 7 Precipitation results of different times to red pigment of *P.americana L*

沉淀次数	1	2	3
上清液的颜色	黄色	微黄色	透明无色
得分	6.02±0.05	7.53±0.09	9.46±0.06

取 3 支编有 1、2、3 的 10 mL 离心管，分别加入 8 mL 乙醇，各缓缓滴加 0.8 mL 50 倍数浓缩液，并用超声波清洗仪清洗 1 min，3000 r/min 离心 10 min；2、3 号离心管分别加入 0.8 mL 三蒸水，充分溶解后，缓缓滴加到另一预先装有 8 mL 乙醇的 4、5 号离心管中，超声波清洗 1 min，3000 r/min 离心 10 min；如此，5 号离心管重复 1 次；分别比较乙醇沉淀 1、2、3 次后上清液的颜色并进行评分（见表 7）。由表 7 可见，重复沉淀 3 次效果最佳。

3 结论

AB-8 大孔树脂能够有效除去商陆果实提取液的杂质，起到提纯浓缩的作用，而且能够反复使用。用 15%乙醇洗脱，可以除去大部分吸附杂质，纯度得到提高，质量较好，而且为后续浓缩提供了便利。乙醇沉淀能

够除去部分杂质，使干燥后的商陆红色素，显紫红色粉末，质量好，纯度高，易于保存与分装。乙醇沉淀纯化商陆红色素的最佳工艺条件为：洗脱液浓缩 50 倍，浓缩液：乙醇为 1:10（0.8 mL 浓缩液加到 8 mL 乙醇中），沉淀 3 次。此法，简单方便，易于操作，乙醇经浓缩后可以重复利用，无污染，适合用于分离提取商陆果实红色素的生产。

参考文献

[1] Dieter Strack, Thomas Vogt, Willibald, Schliemann. Recent advances in betalain research [J]. Phytochemistry, 2003, 69: 247-269

[2] 辛化,张秀荣,张玉娜,等.商陆果实色素性质研究[J].西北农业大学学报,1998,4:110-112

[3] 肖洪伟,李以宾,刘宁芳,等.天然商陆色素理化性质研究[J].江西化工,2002,,4:83-86

[4] 吕晓霞,李坤平,黄克瀛.商陆浆果色素的提取及理化性质的研究[J].河北化工,2004,2:23-26

[5] 彭玲西,梁华正,李威威,等.天然商陆红色素稳定性的研究[J].现代食品科技,2005,21(4):82-84

[6] Willibald Schliemann, Richard W Joy IV, Atsushi Komamine, et al. Betacyanins from plants and cellcultures of Phytolaccaamericana [J]. Phytochemisto, 1996, 42(6): 1039-1046

[7] Pedreno MA, Escribano J. Studying the oxidation and the antiradical activity of betalain from beetroot [J]. J. Biol. Educ., 2000, 35: 49-51

[8] Escribano J, Pedreno MA, Garcia-Carmona F, et al. Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots [J]. Phytochem. Anal, 1998, 9: 124-127

[9] Kanner J, Harel S, Granit R. Betalains-a new class of dietary cationized antioxidants [J]. J. Agric. Food Chem., 2001, 49: 5178-5185

[10] 汤卫东,朱海涛,王建军,等.苹果感官品质的模糊综合评价[J].现代食品科技,2005,21(3):61-63

现代食品科技