

超滤膜精制胭脂虫红色素的研究

卢艳民¹, 周梅村¹, 郑华², 张弘^{2,*}

(1. 昆明理工大学化学工程学院, 云南 昆明 650224;

2. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224)

摘要: 用膜分离技术处理胭脂虫色素提取液, 研究不同孔径的超滤膜对胭脂虫色素精制结果的影响, 确定胭脂虫色素膜精制的方法。调节色素粗提液的 pH 值在 4 附近, 静置 24h 后滤去沉淀, 所得液体用截留分子量为 5kD 的螺旋卷式再生纤维素超滤膜进行精制, 可以截留 73% 虫体蛋白, 提高胭脂虫红色素的纯度, 胭脂虫红酸含量可达 54%。

关键词: 胭脂虫红色素; 超滤膜; 精制

Study on Refinement of Cochineal Dye by Ultrafiltration Membrane

LU Yan-min¹, HOU Mei-cun¹, ZHENG Hua², ZHANG Hong^{2,*}

(1. College of Chemical Engineering Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China

2. Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, China)

Abstract: Cochineal extract was filtrated by ultrafiltration membrane with different apertures, and the effects of different ultrafiltration processes were studied. The optimum ultrafiltration process was determined as follows: after adjusting crude extracting solution of cochineal dye at pH 4, standing for 24 h, and then filtrating the supernatant by the spiral-renewable cellulose membrane with molecular weight cut-off of 5000. By this process 73% cochineal protein can be removed out of the cochineal extract, the purity of cochineal dye is increased, and the content of carminic acid reaches 54%.

Key words: cochineal dye; ultrafiltration membrane; refinement

中图分类号: O658.64

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)09-0196-03

胭脂虫红色素是美国食品药品监督管理局允许既可用于食品又可用于药品和化妆品的天然色素^[1]。由于胭脂虫红色素是水溶性的蒽醌类色素, 从胭脂虫中直接提取出的胭脂虫红色素, 除会残留有少量溶剂外, 还会含有重金属离子(如砷、铅)和虫体蛋白, 这些物质的存在会影响胭脂虫红色素的品质, 降低其质量, 使其具有明显异味, 限制其应用范围; 而且还有可能影响人体健康^[2-4], 因此对胭脂虫色素进行精制是必须的。超滤膜分离技术可在原生物体系环境下实现物质分离, 具有无相变、无溶剂污染、不破坏生物活性等优点^[5], 天然色素工业中可选用适当孔径的超滤膜, 实现色素的纯化, 把膜分离应用于胭脂虫色素精制方面的研究国内未见报道。为此, 本实验应用不同孔径的超滤膜分离纯化胭脂虫红色素, 去除色素中的虫体蛋白及类似物, 以提高色素的纯度。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

胭脂虫干体 秘鲁; 胭脂红酸标样(100%) 日本三荣原株式会社; 柠檬酸(AR) 天津市化学试剂三厂; 牛血清白蛋白、考马斯亮蓝 G250 上海伯奥生物科技有限公司; 乙醇(AR, 95%) 天津化学试剂厂; 浓磷酸(AR) 成都化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

DU 800 SPECTROPHOTOMETER 美国 BECKMAN COULTER 公司; PHS-3C 精密 pH 计 上海雷磁仪器厂; 冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司; 纯水机 美国 BARNSTEAD 公司; 减压蒸馏装置 日本 EYELA 公司; HR83-P 型水分测定仪 美国 METTLER TOLEDO 公司; Prep/scale 超滤系统、超滤膜(螺旋卷式再生纤维素膜, 截留分子量为 5kD; 螺旋卷式聚醚砜膜, 截留分子量分别为 10kD、30kD。膜分离的有效面积为 0.54m²) 美国 Millipore 公司。

收稿日期: 2008-06-29

基金项目: 国家林业局科技成果推广项目(2005[72])

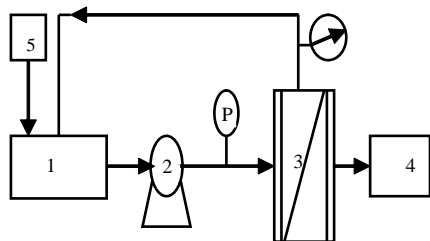
作者简介: 卢艳民(1985-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物化工。E-mail: abcluyan@163.com

* 通讯作者: 张弘(1963-), 男, 研究员, 研究方向为林产生物资源化学开发利用。E-mail: kmzhong@163.com

1.3 方法

1.3.1 超滤膜分离装置

实验采用 Millipore 公司生产的 Prep/scale 超滤系统, 其装置图见图 1。操作方法为样品液经输液泵输入卷式膜分离组件, 以切相流的方式通过超滤膜, 分为透过液和截留液, 在压力驱动下分别从膜分离柱外腔的透过口和循环口流出, 如此反复循环, 一直达到分离要求, 超滤过程中压力可以通过改变泵的转速与调节循环口端的开闭度实现。



1. 原料罐; 2. 输液泵; 3. 超滤组件; 4. 透过液接收罐; 5. 补料。

图1 Prep/scale 超滤系统
Fig.1 UF process of Prep/scale

1.3.2 胭脂虫色素提取液的制备

取一定量的胭脂虫干体, 先用 4 倍量的石油醚煮沸回流 6h, 再用 4 倍量的乙醇煮沸回流 6h, 最后用 4 倍量的纯水提取 8 次, 4h 每次, 用纱布过滤两次, 合并 8 次滤液, 减压浓缩至合并液体体积的 1/3, 即得胭脂虫红色素粗提液。

1.3.3 胭脂虫色素提取液的预处理

胭脂虫色素提取液中会含有大分子虫体蛋白和类似污染物^[6], 常形成凝胶层堵塞膜孔影响超滤效果, 因此超滤前的浸提液需进行预处理以除去部分有机胶体、机械颗粒等杂质。改变色素粗提液的 pH 值, 对其进行酸解, 得到胭脂虫色素粗提液的预处理条件为: 室温, pH4, 静置 24h 后减压抽虑。

1.3.3.1 超滤膜的预处理

Prep/scale 超滤系统使用前应先用蒸馏水洗涤 3~5 次, 每次 3000ml, 再用 0.1mol/L NaOH 溶液连续洗涤或浸泡过夜, 排尽 NaOH 溶液后用蒸馏水洗至中性, 即可将样品用泵打入超滤系统内进行超滤。

1.3.3.2 超滤膜精制色素

将预处理后的色素液等分为 3 份, 在室温和压力 5psi 时, 用截留相对分子量 5、10、30kD 的膜进行超滤, 分别得截留液 I、II、III 和透过液 I、II、III, 将三种透过液减压浓缩、冷冻干燥, 得到不同的胭脂虫红色素干品。

1.3.4 蛋白含量测定方法

采用考马斯亮蓝结合法^[8]测定粗提液、预处理液及各级透过液中蛋白质的含量。

1.3.5 溶液中色素含量的测定

按文献[7]用纯胭脂红酸样绘制标准曲线, 以吸光度为横坐标, 胭脂红酸浓度(mg/ml)为纵坐标, 求得回归方程为 $y=0.0843x-0.0147$, R^2 为 0.9992 ($0.300 < X < 2.000$), 根据朗伯-比尔定律计算溶液中色素含量。

1.3.6 胭脂虫色素中胭脂红酸含量测定方法

称取一定量(W, mg)的胭脂虫色素干品, 按标准方法^[7]测定其于最大吸收波长(494nm)处的吸光度。

1.3.7 计算公式

$$\text{蛋白质去除率 } R(\%) = \left(1 - \frac{\text{透过液中蛋白质含量}}{\text{原料液中蛋白质含量}}\right) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{胭脂虫红色素损失率 } L(\%) = \left(1 - \frac{\text{透过液中蛋白质含量}}{\text{原料液中蛋白质含量}}\right) \times 100 \quad (2)$$

$$\text{胭脂虫红酸含量 } P = \frac{100 \times A \times 100}{1.39W} \quad (3)$$

式中, 1.39 是浓度为 100mg/1000ml 的胭脂红酸溶液的吸光度; A 为最大吸收波长(494nm)处的吸光度; W 胭脂虫色素干品(mg)。

2 结果与分析

2.1 pH 值对预处理效果影响

用柠檬酸改变色素粗提液的 pH 值, 充分静置, 会发现溶液底部出现沉淀物, 这是由于胭脂虫色素粗提液中含有虫体蛋白及多糖等有机胶体, 随着 pH 值的改变会部分沉淀出来, 滤去这些沉淀物, 测滤液在最大吸收波长(494nm)处的吸光度, 结果如表 1 所示。

表 1 pH 值对预处理效果影响

Table 1 Effects of pH values on preprocessing efficiency

pH	2.5	3	3.5	4	4.5
吸光度	0.3872	0.5499	0.6527	0.7427	0.7324
色素损失率(%)	50.1	29.13	15.88	4.28	5.61

随着酸性的增强, 吸光度先升高再降低。柠檬酸电离的 H^+ 会抑制胭脂红酸分子中羟基和羧基的电离, 随着酸性的增强色素的溶解度降低, pH 2.5 时色素的损失率高达 50%, 因而溶液的吸光度下降; 在 pH 为 4 时的吸光度略高于 4.5 时, 可能是因为色素粗提液中虫体蛋白的等电点多在 4 附近的原因。综合考虑选用 pH 4 作为色素粗提液的预处理条件。

2.2 色素溶液的光谱性质

对粗提液、膜截留液和透过液在 350~650nm 范围处进行扫描, 结果如图 2~4 所示(不同截流分子量的膜的截留液和透过液的图形大致相同)。图 2 和图 3 比较, 发现胭脂虫红色素的粗提液在此范围内除了有一个特征吸收峰外, 还有两个小峰出现, 而经过超滤膜的透过液在其间只有一个特征峰, 杂质峰消失; 两者的特征峰

相同,而且经过超滤膜处理的色素液的吸光度明显升高,说明经过超滤膜处理后色素的纯度有了明显改善。截留液的吸收谱图在此范围内并无最大吸收波长存在,

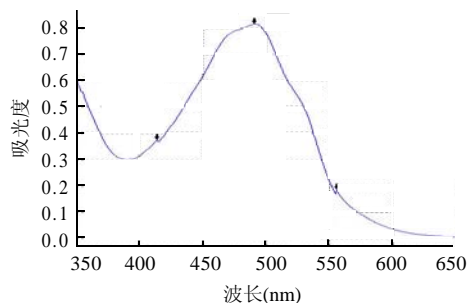


图2 粗提液的吸收谱图

Fig.2 Absorption spectrogram of crude extracting solution

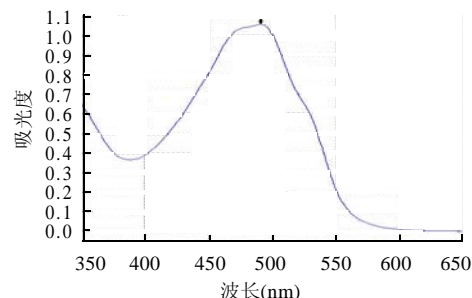


图3 透过液的吸收谱图

Fig.3 Absorption spectrogram of permeating solution

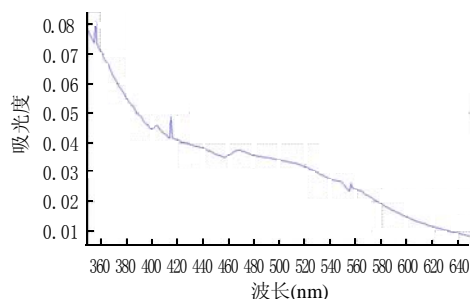


图4 截流液的吸收谱图

Fig.4 Absorption spectrogram of retentate solution

说明胭脂虫红色素分子基本全部透过膜。

2.3 膜分离除蛋白

表2 各种膜对色素液中主要组分截留效果影响

Table 2 Effects of different membranes on the intercept efficiency for the main constituents of pigment solution

膜	5kD	10kD	30kD
色素损失率(%)	22.92	15.15	2.27
蛋白截留率(%)	73.76	50.36	35.73

测定各级透过液中色素的损失率及蛋白的截留率,结果见表2。通过截留分子量为5kD的再生纤维素膜可以截留大部分的虫体蛋白,但是色素的损失率较大;而通过30kD的超滤膜色素损失率虽低,但是截留虫体蛋白的效果不好。这是因为在溶液中色素与虫体蛋白及糖

类^[9]、色素与色素之间会以某种方式产生结合,膜的截留分子量小时,在截留大分子虫体蛋白时会同时截留一部分的色素,使得色素的损失率增加。

2.4 膜分离精制结果

表3 各级透过液中胭脂红酸含量

Table 3 Content of carminic acid at different permeating solution

	粗提液	5kD膜	10kD膜	30kD膜
色素吸光度	0.4452	0.7105	0.6534	0.6375
胭脂红酸含量(%)	32.02	54.62	50.55	49.32

测定各种膜精制处理后胭脂虫色素中胭脂红酸含量,结果如表3所示。通过超滤膜精制后胭脂虫红色素中胭脂红酸的含量明显增加,即色素的纯度提高。由于截留分子量小的超滤膜对虫体蛋白和类似物的截留效果好,精制后色素的纯度较高,因此选用截留分子量为5kD的螺旋卷式再生纤维素膜精制色素。

3 结 论

本实验对超滤膜精制胭脂虫红色素的方法进行初步探讨,确定精制方法为:调节色素粗提液的pH值在4附近,静置24h后滤去沉淀,所得液体用截留分子量为5kD的螺旋卷式再生纤维素超滤膜进行精制,可以截留大部分虫体蛋白,提高胭脂虫红色素的纯度,胭脂虫红酸含量可达54%。

本研究探索的精制方法,为工业化生产杂质含量低、符合国际市场要求的胭脂虫红色素提供了参考。整个精制过程中无有机溶剂的引入,消耗成本低,分离后没有达到要求的色素溶液可以回收再精制,不会造成大的浪费。还可以进一步的探讨,比如采用合适的蛋白酶促进蛋白质的水解,以断开色素与虫体蛋白及其类似物的结合,从而降低色素损失率。

参考文献:

- [1] MENDEZ A, GONZALEZ J, LOBO M, et al. Color Quality of Pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa) [J]. Agric Food Chem, 2004, 52: 5.
- [2] LIZASO M T, MONEO I, GARCIA B E, et al. Identification of Allergens involved in occupational asthma due to carmine dye[J]. Allergy Asthma Immunol, 2000, 84(5): 549-552.
- [3] CHUNG K, BAKER J R, BALDWIN J L, et al. Identification of carmine allergens among three carmine allergy patients [J]. Allergy, 2001, 56(1): 73-77.
- [4] TABAR-PURROY A I, ALVAREZ-PUEBLA M J, ACERO-SAIN S, et al. Carmine(E-120)-Induced occupational asthma revisited[J]. Allergy Clin Immunol, 2003, 111(2): 415-419.
- [5] 严希康. 生化分离技术[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 1996, 49-54.
- [6] ICHI T, KODA T, YUKAWA C, et al. Purified Cochineal and Method for its Production: US, 0199019[P]. 2003-10-23.
- [7] 凌关庭. 食品添加剂手册[M]. 2版. 北京: 化学工业出版社, 1997.
- [8] 陈钧辉. 生物化学实验[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2003.
- [9] 郑华, 张弘, 张忠和. 天然动植物色素的特性及其提取技术概况[J]. 林业科学研究, 2003, 16(5): 628-635.