

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA PH ĐẾN MÀU ANTHOCYANIN TỪ BẮP CẢI TÍM ỨNG DỤNG LÀM CHẤT CHỈ THỊ AN TOÀN TRONG PHÂN TÍCH THỰC PHẨM VÀ HÓA HỌC

STUDYING THE EFFECT OF PH ON ANTHOCYANIN PIGMENT EXTRACTED FROM PURPLE CABBAGE, AND APPLYING THIS PIGMENT TO MAKE SAFE PH INDICATOR USED IN FOOD AND ANALYTICAL CHEMISTRY

NGUYỄN THỊ PHƯƠNG ANH – NGUYỄN THỊ LAN
Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng

TÓM TẮT

Chất màu anthocyanin (antho) có trong bắp cải tím được chiết tách bằng hệ dung môi phân cực. Trong hệ dung môi ethanol-nước chất màu antho nhận được có màu tím. Với chất màu thu được chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến màu antho. Kết quả cho thấy rằng khi pH thay đổi từ môi trường acid sang môi trường base, màu của antho thay đổi từ đỏ sang xanh và hấp thụ cực đại tại bước sóng $\lambda_{\max} = 520 \div 617$ nm ứng với mỗi pH. Từ đó chúng tôi nghiên cứu khả năng ứng dụng chất màu antho làm chất chỉ thị acid-base (có khoảng pH đổi màu từ 5,5 ÷ 7,5) trong phân tích hóa học và thực phẩm.

ABSTRACT

Anthocyanin pigment was extracted from purple cabbage by using polarity solvent: ethanol-water. In this solvent, it was purple. From the result of studying the effect of pH on Anthocyanin pigment, we realized that the colour of this pigment changed from red to blue ($\lambda_{\max} = 520 \div 617$ nm) when the solvent medium changed from acid to base medium. The changing colour interval of this anthocyanin pigment was between pH 5.5 and pH 7.5. From the results obtained, we suggest that Anthocyanin pigment extracted from purple cabbage could be used as safe acid-base indicator in food chemistry and analytical chemistry.

1. MỞ ĐẦU

Bắp cải tím (*Brassica oleracea var capitata rubra*) xuất xứ từ Địa Trung Hải, hiện nay được trồng rộng rãi khắp thế giới, thích hợp với khí hậu ôn đới. Tại Việt Nam bắp cải tím được trồng nhiều ở Đà Lạt. Bằng phương pháp tối ưu hoá thực nghiệm trong quá trình chiết tách [1], đã xác định được hàm lượng antho trong bắp cải tím Đà Lạt chiếm khoảng 1,110%. Sắc tố chính được chiết xuất từ bắp cải tím đó là cyanidin 3,5-diglucoside của hệ màu antho [6] và có màu sắc thay đổi rõ rệt theo pH môi trường. Trong môi trường acid nó có màu đỏ bền và khi môi trường chuyển sang base màu của nó chuyển sang xanh và ổn định trong thời gian dài. Đây là đặc tính rất khác so với các antho của một số nguyên liệu khác (màu thay đổi liên tục tại pH base) như lá tía tô, quả dâu,...

Ngoài việc tạo màu sắc đẹp, antho còn giúp cơ thể chống một số bệnh như: chống ung thư, chống viêm, chống oxy hóa. Antho là một hợp chất hữu cơ thiên nhiên phân cực, tan tốt trong hệ dung môi phân cực. Do có nhiều ưu điểm, nên antho đang được nhiều người trong và ngoài nước quan tâm. Nhưng việc nghiên cứu, ứng dụng nó làm chất chỉ thị an toàn, "thông minh" trong hóa học phân tích và phân tích thực phẩm chưa được đề cập một cách đầy đủ. Do vậy, nghiên cứu sử dụng antho làm chất chỉ thị là việc làm cần thiết, có ý nghĩa nhằm khai

thác, phát triển hơn nữa các hợp chất hữu cơ có nguồn gốc thiên nhiên; đó cũng là hướng nghiên cứu của chúng tôi.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- Bắp cải tím Đà Lạt được mua tại chợ Hàn Đà Nẵng, rửa sạch làm nguyên liệu nghiên cứu.



2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chiết tách antho thô từ bắp cải tím

- Antho được chiết trong điều kiện tối ưu với tỷ lệ dung môi ethanol-nước là 28:72 % v/v, ở nhiệt độ 29 °C và thời gian chiết là 54 phút [1]

- Dịch chiết được làm sạch bằng phương pháp kết tủa phân đoạn. Sản phẩm thu được sau khi tinh sạch ở dạng keo và được bảo quản ở 0 °C cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2.2. Xác định nồng độ antho trong dịch chiết bằng phương pháp pH vi sai

- Nguyên tắc dựa trên sự đổi màu của antho theo pH. Tại pH=1 antho tồn tại ở dạng flavium có độ hấp thụ cực đại, còn ở pH=4,5 chúng lại ở dạng carbinol không màu.

- Để xác định nồng độ của antho trong dịch chiết chúng tôi pha loãng dịch chiết trong đệm (KCl-HCl) có pH=1 và đệm (CH₃COONa-HCl) có pH=4,5 [2] sau đó lần lượt đo độ hấp thụ của antho tại bước sóng 520 nm và 700 nm.

- Nồng độ antho được tính theo công thức sau:

$$C = \frac{A \times M \times K \times V \times 10^3}{\epsilon \times l} \text{ (mg/l)} \quad (2.1)$$

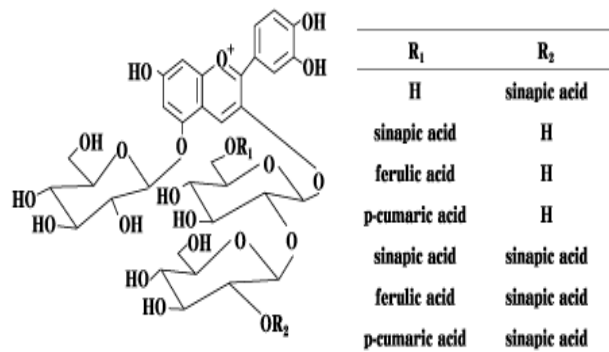
$$A = (A_{\lambda_{\max}, \text{pH}=1} - A_{\lambda_{700\text{nm}}, \text{pH}=1}) - (A_{\lambda_{\max}, \text{pH}=4,5} - A_{\lambda_{700\text{nm}}, \text{pH}=4,5})$$

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

C: Nồng độ antho, g; M: phân tử lượng của antho, g/mol; l: chiều dày cuvet, cm; K: hệ số pha loãng, ϵ : hệ số hấp thụ mol, mol⁻¹ cm⁻¹; V: thể tích dịch chiết, l [5]

2.2.3. Phương pháp xác định λ_{\max} của mỗi dung dịch pH.

Để khảo sát ảnh hưởng của pH đến màu antho cũng như sự thay đổi cấu trúc phân tử của nó, chúng tôi xác định λ_{\max} của mỗi dung dịch:



Hình 1.1. Công thức cấu tạo của Cyanidin 3,5-diglucoside

- Chuẩn bị dung dịch đệm citrat- phosphat [2] có pH thay đổi từ 1-9 (pH=1 được điều chỉnh bằng dung dịch HCl 0,5N).

- Pha loãng dịch chiết trong hệ đệm sao cho nồng độ antho trong mỗi dung dịch pH là 50 mg/l (ở nồng độ này dễ quan sát sự thay đổi màu bằng mắt).

- Quét phổ hấp thụ ứng với bước sóng từ 400-700 nm trên máy so màu UV-VIS. Ứng với mỗi pH khác nhau chúng tôi xác định được λ_{max} khác nhau đặc trưng cho khả năng hấp thụ của mỗi dạng cấu trúc antho trong dung dịch pH.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chiết antho trong môi trường trung tính và xác định nồng độ của dịch chiết

Theo phương pháp đã chọn ở mục 2.2. và bằng phương pháp pH vi sai, thu được dịch chiết cô đặc ở dạng keo và xác định được nồng độ của antho trong dịch chiết cô đặc là $C = 79\ 950\ \text{mg/l}$.

Dung dịch trên được sử dụng làm dung dịch gốc cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến màu antho

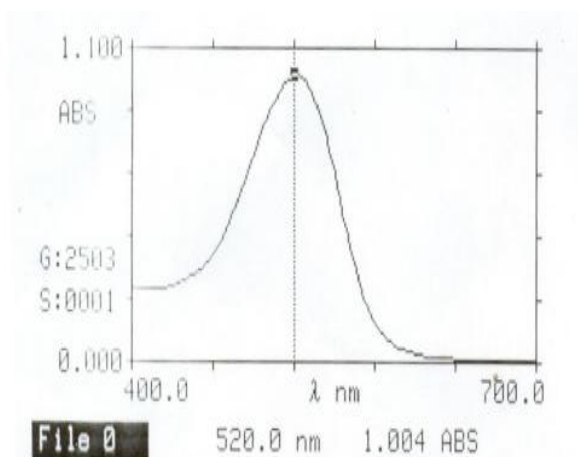
Kết quả khảo sát sự thay đổi màu và giá trị λ_{max} của dung dịch tại 9 pH khác nhau được biểu diễn ở bảng 3.1 và hình 3.1, hình 3.2.

Bảng 3.1: Màu của antho trong các pH khác nhau

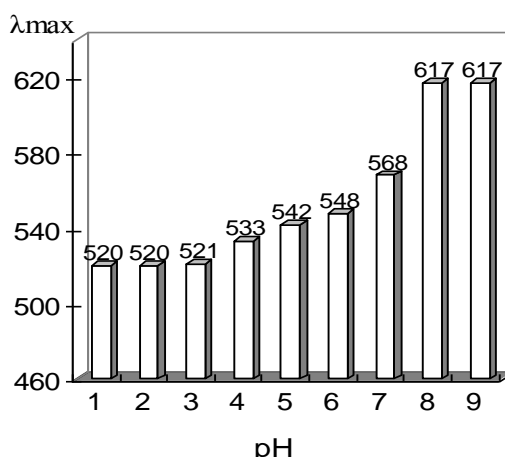
pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Màu	đỏ	đỏ	đỏ	đỏ nhạt	đỏ nhạt	tím nhạt	tím	xanh	xanh

Từ kết quả trên bảng 3.1, hình 3.1, 3.2 cho thấy: màu của antho thay đổi theo pH môi trường. Ở vùng acid mạnh (pH=1), antho có màu đỏ và hấp thụ cực đại tại $\lambda_{max} = 520\ \text{nm}$ (hình 3.1).

Còn trên hình 3.2 cho thấy: khi pH tăng từ 1-9, màu đỏ giảm dần và giá trị λ_{max} thay đổi và có xu hướng tăng lên. Tại pH = 8; 9 giá trị λ_{max} đạt được là 617 nm



Hình 3.1. Bước sóng hấp thụ cực đại của antho tại pH=1



Hình 3.2. Ảnh hưởng của pH đến bước sóng hấp thụ cực đại λ_{max}

Như vậy màu của antho hoàn toàn thay đổi khi pH môi trường chuyển từ acid sang base và giống như các chất chỉ thị acid-base (Phenolphthalein, metyl đỏ và metyl da cam).

Điều này được giải thích như sau: Trong dung dịch acid, antho tồn tại dạng ở cation flavylium có màu đỏ. Khi pH tăng dần, có sự tấn công của nước vào vòng pyran C (hình 3.4), antho chuyển dần sang dạng base carbinol và chalcone không màu. Đây chính là quá trình hydrat hóa, yếu tố chính tạo nên sự bạc màu của dung dịch màu- nước. Trong dung dịch base, có sự dịch chuyển của H^+ từ OH^- trên vòng B, antho chuyển sang dạng anion có màu xanh. Khi pH môi trường càng cao, ion H^+ trong nhóm OH^- còn lại bị phân huỷ và khi áy điện tử không còn, màu xanh trở nên xanh hơn bởi vì ánh sáng hấp thụ trở thành đỏ hơn. Trong môi trường trung tính, cả hai dạng cùng tồn tại nên dung dịch cho màu tím.

3.3. Nghiên cứu ứng dụng antho làm chất chỉ thị acid- base trong phân tích hóa học

Qua kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến màu antho chúng tôi nhận thấy rằng: sự thay đổi màu của antho rất rõ rệt (từ đỏ sang xanh) khi chuyển từ môi trường acid sang môi trường base. Để đánh giá khả năng ứng dụng làm chất chỉ thị acid-base của chất màu antho, chúng tôi đã tiến hành xác định khoảng đổi màu của antho, độ chính xác của phép đo và ứng dụng chế tạo giấy chỉ thị phát hiện nhanh pH môi trường. Mục đích cuối cùng của nghiên cứu này là chúng tôi muốn đưa ra thị trường loại giấy chỉ thị an toàn, phát hiện nhanh môi trường của các sản phẩm thực phẩm và dùng antho làm chất chỉ thị áp dụng cho các trường phổ thông, là chất chỉ thị an toàn và phù hợp với lứa tuổi của các em nhỏ.

3.3.1. So sánh độ chính xác của chất màu antho với các chất chỉ thị phenolphthalein, metyl da cam, metyl đỏ

Chúng tôi tiến hành xác định nồng độ NaOH bằng dung dịch chuẩn HCl 0,1N bằng phương pháp chuẩn độ acid - base [3].

Bảng 3.2: Kết quả xác định nồng độ NaOH bằng HCl 0,1N

Chỉ thị	Phenolphthalein		Metyl da cam		Metyl đỏ		Antho	
	V_{HCl} (ml)	C_{NaOH} (N)	V_{HCl} (ml)	C_{NaOH} (N)	V_{HCl} (ml)	C_{NaOH} (N)	V_{HCl} (ml)	C_{NaOH} (N)
Kết quả	8,3	0,083	8,9	0,089	8,9	0,089	9,0	0,090

Kết quả trên bảng 3.2 cho thấy: chất chỉ thị antho cho kết quả định phân chính xác tương đương với chất chỉ thị metyl da cam và metyl đỏ. Qua quan sát quá trình định phân, chúng tôi nhận thấy màu của dung dịch thay đổi rất rõ từ đỏ sang xanh.

3.3.2. Xác định khoảng đổi màu của chất chỉ thị antho.

Để đưa chất màu antho vào danh mục chất chỉ thị sử dụng theo tiêu chuẩn Việt Nam, chúng tôi tiến hành định phân xác định nồng độ NaOH như trên. Dùng antho để kết thúc quá trình định phân và tiến hành đo pH tại thời điểm khi dung dịch bắt đầu chuyển từ đỏ sang màu tím xanh, để xác định khoảng pH đổi màu. Kết quả thể hiện ở bảng 3.3.

Bảng 3.3: Khoảng đổi màu của chất chỉ thị antho

Chất chỉ thị	pH đổi màu	Khoảng đổi màu
Antho	5,5- 7,5	Từ đỏ sang tím xanh

Để khẳng định lại khoảng đổi màu của antho, chúng tôi tiến hành xác định khoảng đổi màu bằng phương pháp so màu: Pha dãy dung dịch đệm có pH: 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 trong các

ống nghiệm. Nhỏ một giọt antho 0,1% lần lượt vào mỗi dung dịch đệm. Kết quả thể hiện ở bảng 3.4.

Bảng 3.4. Kết quả so màu

pH	5,0	5,5	6	6,5	7,0	7,5
Kết quả	Đỏ nhạt	Đỏ nhạt	Đỏ ánh tím	Tím nhạt	Tím	Tím xanh

Từ kết quả nghiên cứu đã xác định được khoảng đổi màu của chất chỉ thị antho nằm trong khoảng pH= 5,5 ÷ 7,5. Như vậy khoảng đổi màu của chất màu antho khá hẹp và quá trình thay đổi màu rất rõ đây cũng là một trong những yêu cầu cần thiết cho một chất chỉ thị.

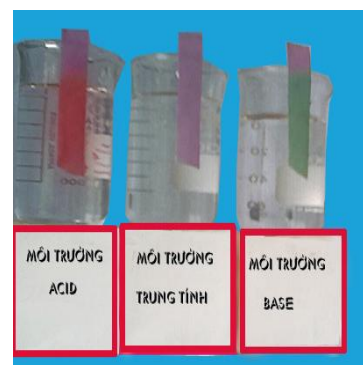
Từ kết quả định phân, xác định khoảng pH đổi màu cũng như những thông tin nhận được theo [5] (INA Method 116 000) đã cho thấy chất màu antho có đủ tiêu chuẩn để làm chất chỉ thị acid–base, dần dần thay cho chất chỉ thị màu metyl da cam, metyl đỏ, phenolphetalein,... Đây là những chất chỉ thị tổng hợp phải nhập ngoại và không an toàn cho người sử dụng.

3.3.3. Ứng dụng làm giấy chỉ thị để xác định nhanh pH môi trường

Giấy lọc được rửa bằng axit HCl 0,1N, sau đó rửa bằng nước và bằng dung dịch amoniac 5%, rửa lại bằng nước cất và sấy khô. Ngâm tẩm giấy lọc trong dung dịch antho đã pha loãng trong ethanol. Sau đó sấy khô đến khối lượng không đổi và bảo quản ở nơi mát, tránh tiếp xúc với oxy, ánh sáng.

Giấy lọc được rửa bằng axit HCl 0,1N, sau đó rửa bằng nước và bằng dung dịch amoniac 5%, rửa lại bằng nước cất và sấy khô. Ngâm tẩm giấy lọc trong dung dịch antho đã pha loãng trong ethanol. Sau đó sấy khô đến khối lượng không đổi và bảo quản ở nơi mát, tránh tiếp xúc với oxy, ánh sáng.

Sản phẩm thu được có màu tím (môi trường trung tính). Khi nhúng giấy chỉ thị antho vào các môi trường acid, base, màu tím của giấy sẽ nhanh chóng chuyển sang màu đỏ hoặc màu xanh (Hình 3.3). Nhờ vào sự đổi màu nhanh trong các môi trường trung tính, acid, base, giấy chỉ thị antho sẽ sử dụng để phát hiện nhanh pH môi trường đặc biệt là môi trường của các sản phẩm thực phẩm.



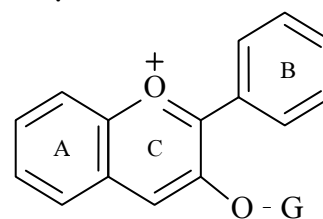
Hình 3.3. Giấy chỉ thị antho trong môi trường acid, trung tính và base

4. KẾT LUẬN

Sau một thời gian nghiên cứu chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

* Đã chiết được chất màu antho từ búp cải tím trong môi trường trung tính và bằng phương pháp pH vi sai xác định được nồng độ dịch chiết cô đặc là 79 950 mg/l làm dung dịch gốc.

* Màu của antho thay đổi theo pH môi trường, khi pH thay đổi từ môi trường acid sang base, màu của antho đổi từ đỏ sang xanh, tương ứng với bước sóng hấp thụ cực đại $\lambda_{\max} = 520 \div 617 \text{ nm}$.



Hình 3.4: Cyanidin 3 - glucoside

* Ứng dụng antho làm chất chỉ thị màu an toàn trong phân tích hóa học có khoảng pH đổi màu là $5,5 \div 7,5$.

* Ứng dụng làm giấy chỉ thị màu để xác định nhanh pH môi trường đặc biệt là môi trường của các sản phẩm thực phẩm.

5. KIẾN NGHỊ

* Nghiên cứu phản ứng đặc trưng giữa antho và borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) để làm giấy phát hiện nhanh hàn the trong các sản phẩm thực phẩm.

* Xin đăng ký chất màu antho làm chất chỉ thị acid - base theo tiêu chuẩn Việt Nam với các thông số kỹ thuật sau:

1. Công thức phân tử chung (hình 3.4).
2. Khối lượng phân tử 444,9.
3. Khoảng pH đổi màu $5,5 \div 7,5$.
4. Ở môi trường pH mạnh hấp thụ cực đại tại $\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$.
5. Ở môi trường bazơ hấp thụ cực đại tại $\lambda_{\text{max}} = 617 \text{ nm}$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Huỳnh Thị Kim Cúc, Nguyễn Thị Lan, Châu Thê Liễu Trang, *Tối ưu hóa điều kiện chiết tách chất màu anthocyanin từ bắp cải tím trong môi trường trung tính*, Tạp chí Khoa học & Công nghệ, Đại học Đà Nẵng, số 4(12).2005, tr. 44-50.
- [2] Phạm Luận, *Sổ tay pha dung dịch*, Đại học Tổng hợp Hà Nội, 1987.
- [3] Lê Thị Mùi, *Thí nghiệm phân tích định lượng*, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng, 2004.
- [4] Nguyễn Đình Triệu, *Bài tập và thực tập các phương pháp phổ*, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội, 2001.
- [5] *Anthocyanin content in purple cabbage by pH-Diferential-Spectrophotometry*, INA Method 116 000.
- [6] [Http://www.jagumma.net/tsumagoi/kyabetul.htm](http://www.jagumma.net/tsumagoi/kyabetul.htm)