

玫瑰茄花色苷纯化工艺优化研究

张赛男¹, 李林福¹, 陈毅勇², 宗俊²

(1. 赣南医学院药学院, 江西赣州 341000; 2. 漳州农业科技园区研发中心, 福建漳州 363000)

摘要:对玫瑰茄花色苷纯化工艺进行优化研究, 通过对 X-5、DA-201、HPD-100、D101、AB-8 五种大孔树脂进行筛选, 得出最适用于玫瑰茄花色苷纯化的树脂为 HPD-100 大孔树脂。通过单因素和正交实验对 HPD-100 大孔树脂纯化条件进行优化, 得出最佳吸附工艺条件是: 样液浓度为 1.5 mg/mL, 上样流速为 2 mL/min, pH 值为 3.0, 吸附率为 91.988%; 最佳解吸工艺条件是: 洗脱液浓度为 70%, 洗脱流速为 1.75 mL/min, 洗脱液用量 60 mL, 解吸率为 92.144%, 纯化后的玫瑰茄红色素色价为 38.5。通过纯化前后玫瑰茄红色素高效液相色谱图的比较可知: 玫瑰茄红色素主要含有 5 种成分, 纯化后的色素矢车菊花色苷的含量明显升高。

关键词:玫瑰茄; 花色苷; 纯化; 大孔树脂

中图分类号: TS 202.3 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2015)05-0055-06

Research on purification of roselle anthocyanins

ZHANG Sai-nan¹, LI Lin-fu¹, CHEN Yi-yong², ZONG Jun²

(1. College of Pharmacy, Gannan Medical University, Ganzhou Jiangxi 341000;

2. Zhangzhou Agricultural Sci-Tec Park, Zhangzhou Fujian 363000)

Abstract: The purification of roselle anthocyanins was studied. The most suitable resin for roselle anthocyanin purification was HPD-100 macroporous resin, which was obtained by screening five kinds of macroporous resins: X-5, DA-201, HPD-100, D101 and AB-8. The purification conditions for HPD-100 macroporous resin were optimized by single factor and orthogonal experiments, which were: the sample's concentration 1.5 mg/mL, flow rate 2 mL/min, pH 3. The adsorption rate can reach 91.988%. The optimal desorption process conditions were eluent concentration 70%, elution velocity 1.75 mL/min, dosage of eluent 60 mL. The desorption rate can reach 92.144%. After the purification, the color value of roselle anthocyanins was 38.5. Compared before and after the purification, the chromatograms by HPLC showed that roselle red pigment mainly contained five components. The cornflower anthocyanin content in the pigment increased significantly after being purified.

Keywords: roselle; anthocyanins; purification; macroporous resin

玫瑰茄属药食两用植物^[1], 其花萼具有重要的药用价值, 且含有丰富的花色苷, 可以用作天然食品着色剂, 因其色泽鲜亮、纯天然, 受到广大消费者的青睐^[2]。玫瑰茄红色素是从玫瑰茄花萼中提取的花色苷类色素, 包括矢车菊素-3-葡萄糖苷、飞燕草素-3-葡萄糖苷、矢车菊素-3-接骨木二糖苷和飞燕草素-3-接骨木二糖苷四种花色苷^[3], 花色苷具有不稳定性, 在食品贮藏与加工过程中易受温度、光照、pH、氧化剂、氧、酶、金属离子等因素影

响引起变色^[4]。玫瑰茄红色素含有大量杂质^[5], 色价偏低, 稳定性受到严重的影响, 易吸潮, 需要进一步的分离纯化^[6]。目前主要的分离纯化方法有纸层析法、膜分离法、高效液相技术和柱层析法^[7], 纸层析法纯化后的花色苷产品质量稳定性差、纯度不高^[8]; 膜分离法、高效液相纯化技术虽获得的产品透明度高、稳定性好, 但对设备要求高, 纯化成本高, 提取效率低^[9]; 柱层析法即采用大孔树脂分离, 利用大孔吸附树脂纯化是一种适合工业化生产的方法, 该方法工艺简单, 安全性强, 树脂再生容易, 重复利用率高, 可以有效地去除其中的糖类等杂质^[10]。

收稿日期: 2015-03-11

作者简介: 张赛男, 1986 年出生, 女, 浙江东阳人, 助理实验师。

通讯作者: 陈毅勇, 1984 年出生, 男, 福建漳州人, 硕士研究生。

本实验通过对大孔树脂的筛选,选出适合玫瑰茄色素纯化的最佳树脂,然后选取样液浓度、上样流速、pH 值这三个影响吸附率的因素进行单因素与正交实验,确定最佳吸附工艺参数;选取洗脱液用量、洗脱液浓度、洗脱流速这三个影响解吸率的因素进行单因素与正交实验,确定最佳的解吸工艺参数。

1 材料与方法

1.1 材料

玫瑰茄干花萼,经粉碎机处理后,过 70 目标准筛备用;大孔树脂:X-5、DA-201、HPD-100、D101、AB-8,购买自郑州勤实科技有限公司,具体指数详见表 1。

表 1 各种树脂具体指数

树脂型号	极性特征	孔径/nm	比表面/(m ² /g)
X-5	非极性	29~30	500~600
DA-201	极性	80~90	550~600
HPD-100	非极性	85~90	650~700
D101	非极性	90~100	500~550
AB-8	弱极性	130~140	480~520

1.2 仪器与设备

WFZ756PC 型紫外-可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;JA1003 电子分析天平,上海舜玉恒平科学仪器有限公司;pHS-3C 精度 pH 计,上海精密科学仪器有限公司;自动收集器,上海青浦沪西仪器厂;LGJ-12 立式真空冷冻干燥机,北京松源华兴科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 玫瑰茄粗色素制备

本研究的前期已开展超声-微波协同提取法提取玫瑰茄花色苷技术研究,通过单因素实验和响应面实验,得出了最佳工艺条件为:乙醇体积分数 40%,微波功率 164 W,料液比 1:25,提取时间 12 min。因此,本研究采用上述的超声-微波协同法的最佳工艺条件提取玫瑰茄花色苷,得到花色苷粗提取液,然后冷冻干燥得到红色素备用。

1.3.2 大孔树脂预处理

把脱水的以上五种树脂浸泡在蒸馏水中,反复淋洗并将小颗粒和破碎的树脂除去。用无水乙醇充分浸泡,约 12 h 后用蒸馏水冲洗树脂,去除其中的乙醇。为了除去树脂内的杂质,分别用 4% HCl 溶液和 40 mg/mL NaOH 溶液浸泡 5 h,之后用蒸馏水

冲洗至 pH=7。动态吸附实验中,采用湿法装柱,即将预处理好的树脂慢慢倒入已加入少量水的层析柱中,使其分布均匀,床层稳定。

1.3.3 树脂纯化指标计算方法

$$\text{静态吸附率} / \% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \tag{1}$$

$$\text{静态解吸率} / \% = \frac{A_2}{A_0 - A_1} \times 100 \tag{2}$$

$$\text{动态吸附率} / \% = \frac{A_0 V_0 - A_1 V_1}{A_0 V_0} \times 100 \tag{3}$$

$$\text{动态解吸率} / \% = \frac{A_2 V_2}{A_0 V_0 - A_1 V_1} \times 100 \tag{4}$$

式中: A₀,红色素原液吸光度; A₁,吸附后溶液的吸光度; A₂,解吸后溶液吸光度; V₀,原液体积; V₁,吸附后流出液的体积; V₂,解吸后溶液的体积。

1.3.4 不同大孔树脂的能力测定

(1) 吸附能力测定: X-5、DA-201、HPD-100、D101、AB-8 大孔树脂经预处理后,分别称取 2 g 于三角瓶中,并向三角瓶内各加入 20 mL 同浓度的色素溶液,在 25 ℃、100 r/min 下振荡 24 h,抽滤后在 520 nm 下测定吸光度,根据 1.3.3 中的公式计算出静态吸附率。

(2) 解吸能力测定: 称取吸附饱和的不同树脂各 1.0 g,分别加入 30 mL、70% 乙醇水溶液,在 25 ℃、100 r/min 下振荡 12 h,抽滤后在 520 nm 下测定吸光度,根据 1.3.3 中的公式计算出静态解吸率。

1.3.5 HPD-100 大孔树脂动态吸附单因素实验

称取活化后的 HPD-100 大孔树脂 10 g 装柱,对影响大孔树脂吸附的因素进行研究,取等体积的流出液测定吸光度,计算出吸附率,确定最佳吸附条件。

(1) 样液浓度的研究。配制 pH 为 3、浓度分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/mL 的样液,每组样液的色素总量相等,控制上样流速为 2 mL/min 进行纯化,记录每组样液吸附前后的吸光度,计算吸附率。

(2) 上样流速的研究。配制以上确定的最佳样液浓度、pH 为 3 的样液 15 mL,控制样液流速分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL/min 进行纯化,记录每组样液吸附前后的吸光度,计算吸附率。

(3) pH 值的研究。以以上确定的最佳样液浓度、上样流速,配制 4 组样液,每组 15 mL,设置 pH 值分别为 1、2、3、4,进行纯化,记录每组样液吸附前后的吸光度,计算吸附率。

(4) 正交实验。在单因素的基础上,选取样液浓度、上样流速、pH 值为影响因素进行正交实验。

1.3.6 HPD-100 树脂动态吸附透过曲线及吸附饱和量

称取活化后的 HPD-100 大孔树脂 10 g 装柱,配制浓度为 1.5 mg/mL、pH 为 3.0 的样液,控制上样流速为 2 mL/min,每收集 5 mL 流出液后测吸光度,绘制动态吸附透过曲线,计算树脂吸附饱和量。

1.3.7 HPD-100 大孔树脂动态解吸实验

乙醇可选择性地洗脱出色素,因此以乙醇作为洗脱液。称取活化后的 HPD-100 大孔树脂 10 g 装柱,对影响大孔树脂解吸的因素进行研究,取等体积的流出液测定吸光度,计算出解吸率,确定最佳解吸条件。

(1) 洗脱液乙醇用量的研究。根据以上确定的最佳上样条件吸附饱和后,控制洗脱流速为 1.75 mL/min,先用 50 mL 的蒸馏水冲洗,再用 70% 乙醇溶液进行洗脱,每 5 mL 收集一次测定吸光度,计算解吸率。

(2) 洗脱液乙醇浓度的研究。根据以上确定的最佳上样条件吸附饱和后,控制洗脱流速为 1.75 mL/min,先用 50 mL 的蒸馏水冲洗,再分别用 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇溶液进行洗脱,收集 60 mL 洗脱液测定吸光度,计算解吸率。

(3) 洗脱流速的研究。根据以上确定的最佳上样条件吸附饱和后,先用 50 mL 的蒸馏水冲洗,再分别以 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL/min 的流速用 60 mL、70% 的乙醇溶液进行洗脱,收集流出液,测定吸光度,计算解吸率。

(4) 正交实验。在单因素实验基础上,选取洗脱液用量、洗脱液浓度、洗脱流速为影响因素进行正交实验。

1.3.8 纯化后色价的测定

色素纯化参照曾哲灵等^[11]的方法,采用色价表示,称取玫瑰茄纯化后的色素 0.01 g,用 pH 3.0 的盐酸定容于 100 mL 的容量瓶中,以盐酸为空白对照,用 1 cm 比色皿,在 520 nm 下测得吸光度 A。

$E = A/m$, 式中: E 表示色价; A 表示色素吸光度; m 表示色素质量, g。

1.3.9 纯化前后玫瑰茄红色素的高效液相色谱图

参照葛芹^[12]的方法对玫瑰茄红色素进行高效液相色谱分析,液相色谱条件: lichrospher5-C18 色

谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温 35 °C, 流动相 A: 100% 的色谱乙腈, 流动相 B: 0.1% 磷酸水溶液, 检测波长为 520 nm, 流速为 1 mL/min, 进样量为 10 μL, 进行绘图。

2 实验结果

2.1 不同大孔树脂的能力测定

由表 2 可知, HPD-100 和 D101 型号的树脂具有很强的吸附与解吸能力, 吸附率分别为: 93.10%、87.61%, 解吸率分别为: 90.6%、91.4%。X-5、AB-8 型号的树脂吸附与解吸性能稍弱些, DA-201 型号的树脂吸附与解吸性能最弱, 因此选择具有最佳吸附与解吸性能的 HPD-100 型号的树脂对玫瑰茄红色素进行后续的纯化。

表 2 树脂的筛选结果

树脂型号	吸附率/%	解吸率/%
X-5	80.50	79.0
DA-201	75.42	71.4
HPD-100	93.10	90.6
D101	87.61	91.4
AB-8	81.32	90.3

2.2 HPD-100 大孔树脂动态吸附单因素实验

2.2.1 样液浓度的研究

由图 1 可知, 随着样液浓度的升高, 树脂吸附率先升高, 当浓度为 2 mg/mL 时, 吸附率达到最大值, 之后再增加样液的浓度, 吸附率反而下降。这是因为 HPD-100 大孔树脂与样液之间的吸附是以物理方式进行的, 当样液浓度达到 2 mg/mL 后, 继续提高其浓度使得平衡时间延长, 导致吸附率下降。另外, 样液浓度的增加, 相应的杂质也会增加, 阻碍了色素在树脂中的扩散, 也会导致吸附率的下降。因此选择浓度为 2 mg/mL 的样液进行纯化。

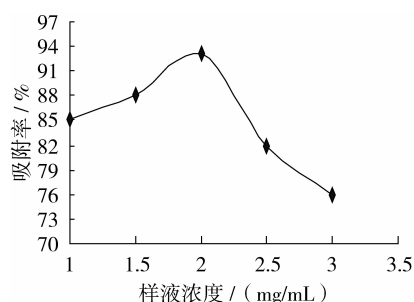


图 1 样液浓度对吸附率的影响

2.2.2 上样流速的研究

由图 2 可知,随着上样流速的加快,吸附率逐渐减小,这是因为,上样流速过快使得树脂未能及时吸附色素,导致色素流失。当上样流速达到 2 mL/min 时,树脂的吸附率达到最大值;当上样流速再减缓时,吸附率没有明显增加,反而延长了实验时间,因此选择上样流速为 2 mL/min。

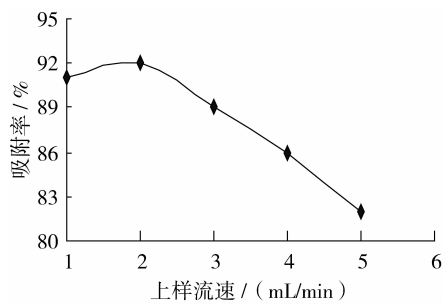


图 2 上样流速对吸附率的影响

2.2.3 pH 值的研究

由图 3 可知,吸附率随着 pH 值的升高先上升后下降,当 pH 值为 3 时吸附率达到最大值。这是因为酸性化合物在酸性溶液中最容易被吸附,当 pH 值为 3 时,样液的极性最接近树脂的极性,使得吸附率最高。因此选取最佳吸附 pH 值为 3。

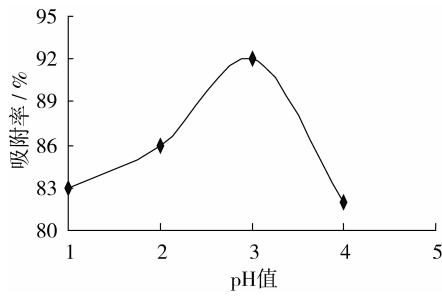


图 3 pH 值对吸附率的影响

2.2.4 正交实验

在单因素实验基础上,选取样液浓度、上样流速、pH 值为影响因素进行正交实验,实验设计见表 3 ~ 表 4。

表 3 L₉(3⁴) 正交实验因素与水平

水平	A	B	C
	样液浓度/(mg/mL)	上样流速/(mL/min)	pH 值
1	1.5	1.5	2.75
2	2	2	3.0
3	2.5	2.5	3.25

由表 4 ~ 表 5 可知,HPD - 100 大孔树脂最佳吸附条件是:A₁B₂C₂;由极差分析可知影响程度大小为:pH 值 > 上样流速 > 样液浓度。综上所述,最佳

吸附工艺条件是:样液浓度为 1.5 mg/mL,上样流速为 2 mL/min,pH 值为 3.0。

表 4 正交实验方案及结果

实验号	A	B	C	空列	吸附率/%
1	1	1	1	1	81.732
2	1	2	2	2	91.988
3	1	3	3	3	82.169
4	2	1	2	3	90.497
5	2	2	3	1	85.622
6	2	3	1	2	78.818
7	3	1	3	2	82.575
8	3	2	1	3	78.990
9	3	3	2	1	85.520
K ₁ /3	85.296	84.935	79.847	84.291	
K ₂ /3	84.979	85.533	89.335	84.460	
K ₃ /3	82.362	82.169	83.455	83.885	
R	2.934	3.364	9.488	0.575	

表 5 正交实验方差分析表

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	15.563	2	7.782	29.700	0.033
B	19.326	2	9.663	36.880	0.026
C	137.621	2	68.811	262.625	0.004
误差	0.524	2	0.262		
总变异	173.034	8			

2.3 HPD - 100 树脂动态吸附透过曲线及吸附饱和量

由图 4 可知,在动态吸附过程中,上样量为 30 mL 时透过液的吸光度开始较为明显地上升,上样量为 35 mL 时,透过液吸光度超过上样液吸光度的 10%,因此计算 HPD - 100 树脂的吸附饱和量为 3 mg/g。

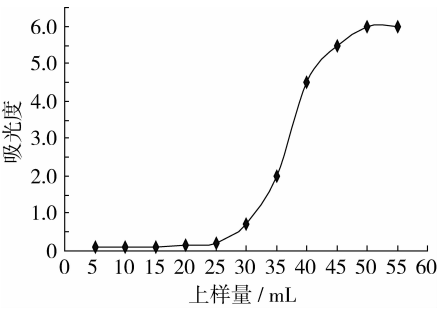


图 4 动态吸附曲线

2.4 HPD - 100 大孔树脂动态解吸研究结果

2.4.1 洗脱液用量的研究

由图 5 可知,解吸率随着洗脱液用量的增加而

增大,当洗脱液为 60 mL 时,解吸率达到 92.146%,洗脱液用量继续增加,解吸率增加不显著,表明:当洗脱液为 60 mL 时,色素基本被洗脱完全,因此树脂最佳洗脱液用量为 60 mL,并用于后续实验。

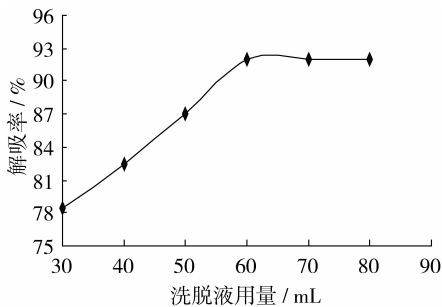


图 5 洗脱液用量对解吸率的影响

2.4.2 洗脱液浓度的研究

由图 6 可知,随着乙醇浓度的增加,解吸率先上升后下降,当乙醇浓度为 70% 时解吸率最大,这是因为当乙醇溶液与色素分子间作用力大于大孔树脂与色素分子间作用力时,树脂中的色素将转移到乙醇溶液中。因此确定洗脱液最佳洗脱浓度为 70%,并用于后续实验。

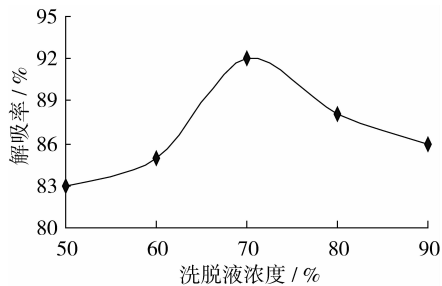


图 6 洗脱液浓度对解吸率的影响

2.4.3 洗脱流速的研究

由图 7 可知,当洗脱流速大于 2 mL/min 时,解吸率随着洗脱流速的增加而减小,变化比较明显;当洗脱流速为 2 mL/min 时,解吸率为 88.326%。通常来说,洗脱量与洗脱流速成反比,洗脱流速过大,

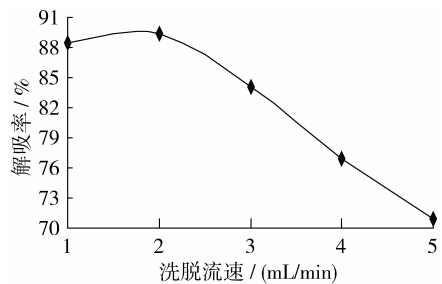


图 7 洗脱流速对解吸率的影响

洗脱量会减小,洗脱流速过小虽然会增加洗脱量,但是同时会带来洗脱时间延长的问题,生产效率下降。综上所述,确定最佳洗脱流速为 2 mL/min,并用于后续实验。

2.4.4 正交实验

在单因素实验基础上,选取洗脱液用量、洗脱液浓度、洗脱流速为影响因素进行正交实验,实验设计见表 6 ~ 表 7。

表 6 L₉(3⁴) 正交实验因素与水平

水平	A	B	C
	洗脱液浓度/%	洗脱流速/(mL/min)	洗脱液用量/mL
1	65	1.25	60
2	70	1.50	65
3	75	1.75	70

表 7 正交实验方案及结果

实验号	A	B	C	空列	解吸率/%
1	1	1	1	1	81.617
2	1	2	2	2	86.447
3	1	3	3	3	88.692
4	2	1	2	3	77.147
5	2	2	3	1	87.971
6	2	3	1	2	92.144
7	3	1	3	2	76.895
8	3	2	1	3	87.285
9	3	3	2	1	82.521
K ₁ /3	85.585	78.553	87.015	84.036	
K ₂ /3	85.754	87.234	82.038	85.162	
K ₃ /3	82.234	87.786	84.519	84.375	
R	3.52	9.233	4.977	1.126	

由表 7 ~ 表 8 可知,HPD-100 大孔树脂最佳解吸条件是:A₂B₃C₁;由极差分析可知影响程度大小为:洗脱流速 > 洗脱液用量 > 洗脱液浓度。综上所述,最佳解吸工艺条件是:洗脱液浓度为 70%,洗脱流速为 1.75 mL/min,洗脱液用量 60 mL。

表 8 正交实验方差分析表

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	23.655	2	11.827	11.819	0.078
B	160.912	2	80.456	80.396	0.012
C	37.156	2	18.578	18.564	0.051
误差	2.001	2	1.001		
总变异	223.724	8			

2.5 纯化前后玫瑰茄红色素色价的比较

由表 9 可知,由超声—微波协同提取最佳工艺

制得的玫瑰茄红色素液,经 HPD - 100 大孔树脂最佳纯化工艺纯化后,得到玫瑰茄红色素产品的色价为 38.5,是纯化前的 7 倍左右。

表 9 纯化前后玫瑰茄红色素的色价比较

项目	色价
未经纯化的色素	5.63
经 HPD - 100 纯化后的色素	38.5

2.6 纯化前后玫瑰茄红色素高效液相色谱图

由图 8 ~ 图 9 可知,玫瑰茄红色素含有 5 种成分,含量大小依次为 A > C > E > D > B。通过与标样矢车菊花色苷图谱比较,得知成分 D 为矢车菊花色苷,纯化后的玫瑰茄红色素矢车菊花色苷的含量明显升高。

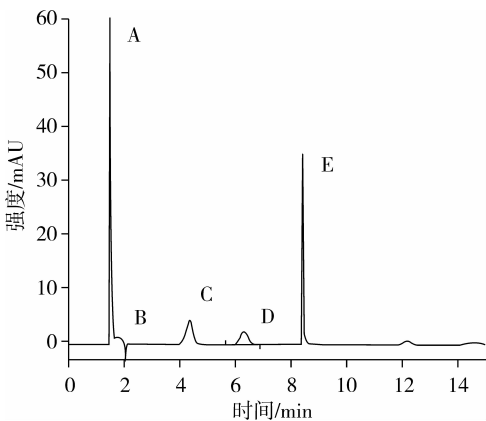


图 8 玫瑰茄红色素粗提物高效液相色谱图

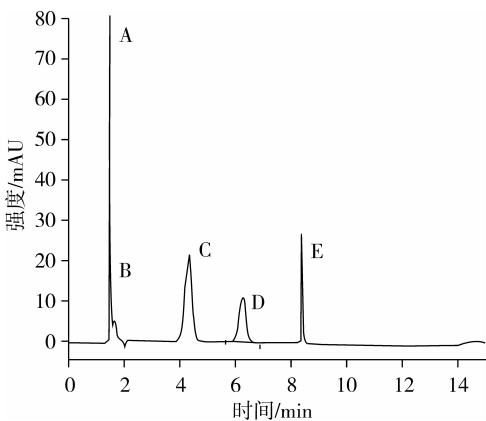


图 9 玫瑰茄红色素纯化后高效液相色谱图

3 结论

通过对 X - 5、DA - 201、HPD - 100、D101、AB - 8 五种大孔树脂进行筛选,得出最适用于玫瑰茄花

色苷纯化的树脂是 HPD - 100。利用单因素和正交实验,以 HPD - 100 大孔树脂的吸附率与解吸率为评价标准,确定了树脂的最佳吸附与解吸工艺。最佳吸附工艺条件是:样液浓度为 1.5 mg/mL,上样流速为 2 mL/min,pH 值为 3.0,吸附率为 91.988%;最佳解吸工艺条件是:洗脱液浓度为 70% 乙醇,洗脱流速为 1.75 mL/min,洗脱液用量 60 mL,解吸率为 92.144%。通过树脂吸附流出曲线得出,HPD - 100 大孔树脂的吸附饱和量为 3 mg/g。纯化后的玫瑰茄红色素色价为 38.5,是未纯化的 7 倍左右。以矢车菊花色苷为标样,通过纯化前后玫瑰红色素高效液相色谱图的比较可知:玫瑰茄红色素主要含有 5 种成分,纯化后的色素矢车菊花色苷的含量明显升高。使用 HPD - 100 大孔树脂对玫瑰茄花色苷进行纯化具有很好的效果。

参考文献:

[1] 吴琳琳. 摄入玫瑰茄提取物后花青素 - 3 - 糖苷的药动力学研究[J]. 国外医药·植物药分册,2006,21(1):35 - 36.

[2] 胡克章. 玫瑰茄标准提取物治疗高血压的临床试验[J]. 国外医药·植物药分册,2007,22(6):273 - 274.

[3] 师文添. 响应面法优化玫瑰茄中花青素的超声波提取工艺[J]. 安徽农业科学,2010,38(31):17433 - 1743.

[4] 倪勤学,霍艳荣,陆国权. 花色苷保健功能的研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(35):20025 - 20028.

[5] 徐玉娟,肖更生,刘学铭. 桑椹红色素稳定性的研究[J]. 蚕业科学,2002,28(3):265 - 269.

[6] 干雅平,申秀英,许晓路,等. 食用色素及其应用现状[J]. 生物学教学,2006,31(1):5 - 7.

[7] 魏一枝,邓洁红,王维茜. 花色苷纯化分离及鉴定研究进展[J]. 包装与食品机械,2014,32(1):50 - 54.

[8] 郝婧玮,赵玥琪,孙晓薇. 大孔树脂 AB - 8 纯化短梗五加果实中的花色苷[J]. 吉林农业,2014,22(6):32 - 33.

[9] 滕学峰,徐雅琴. 大孔树脂纯化黑大豆皮色素工艺的研究[J]. 食品工业科技,2007,28(6):62 - 69.

[10] 冯颖,张彬. 大孔树脂纯化无梗五加果花色苷工艺的研究[J]. 沈阳农业大学学报,2014,45(2):164 - 169.

[11] 曾哲灵,郝纯青,邹强. 玫瑰茄红色素的纯化及其结构鉴定[J]. 食品与发酵工业,2011,34(7):57 - 62.

[12] 葛芹. 食用玫瑰色素的提取、纯化及性质研究[D]. 无锡:江南大学,2013.