

大孔树脂分离纯化隆子黑青稞花青素研究

张唐伟¹, 李京城², 张国强^{3 *}, 邱 城¹

(1. 西藏自治区农牧科学院农业质量标准与检测研究所, 西藏 拉萨 850000; 2. 西藏农牧学院食品学院, 西藏 林芝 860000; 3. 安徽工程大学, 安徽 芜湖 241000)

摘 要:为明确影响大孔树脂对隆子黑青稞花青素吸附的因素, 本文选取了 5 种不同极性的大孔树脂, 通过静态吸附与解吸平衡试验筛选出适合分离纯化黑青稞花青素的大孔树脂, 并对静态吸附与解吸试验和动态吸附与解吸试验进行了研究。对 5 种大孔树脂的静态吸附和解吸试验, 筛选出吸附率和解吸率效果都较好的 AB-8 大孔树脂对青稞花青素进行分离纯化。通过静态吸附和解吸平衡试验确定了吸附平衡时间为 13 h, 解吸平衡时间为 6 h。静态吸附试验中花青素浓度 2 mg/mL、pH 为 1 最佳, 静态解吸试验中洗脱剂体积分数 70 % 最佳, 动态吸附和解吸试验中最佳上样流速和洗脱流速为 1 mL/min。由此可得, AB-8 大孔树脂对青稞花青素有较好的吸附与解吸效果, 可以用于隆子黑青稞花青素的分离纯化。

关键词:隆子黑青稞; 大孔树脂; 花青素; 吸附; 解吸

中图分类号: S512.3

文献标识码: A

Purification of Anthocyan from Longzi Black Highland Barley by Macroporous Resin

ZHANG Tang-wei¹, LI Jing-cheng², ZHANG Guo-qiang^{3 *}, QIU Cheng¹

(1. Institute of Agricultural Product Quality Standard and Testing Research, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Tibet Lhasa 850000, China; 2. Academy of Food Sciences, Agricultural and Animal Husbandry College of Tibet University, Tibet Linzhi 860000, China; 3. Anhui Polytechnic University, Anhui Wuhu 241000, China)

Abstract: The present paper aimed to clarify the factors influencing adsorption of macroporous resin on longzi black highland barley anthocyan. Five different polarity of macroporous resins were selected, and the macroporous resins suitable for the separation and purification of black highland barley anthocyanin were screened out through static adsorption and desorption balance test, and the static adsorption and desorption test and dynamic adsorption and desorption test were studied. Through static adsorption and desorption tests of five macroporous resins, AB-8 macroporous resin with good adsorption and desorption rates was screened out to separate and purify the highland barley anthocyanin. By static adsorption and desorption equilibrium tests, the adsorption equilibrium time is 13 hours and desorption equilibrium time is 6 hours. In the static adsorption test, the concentration of anthocyanin is 2 mg/mL, the pH is 1, the volume fraction of eluent is 70 %, and the best flow rate and elution flow rate are 1 mL/min in the dynamic adsorption and desorption test. It is concluded that AB-8 macroporous resin has good adsorption and desorption effect on barley anthocyanin, which can be used for separation and purification of Longzi black barley anthocyanin.

Key words: Longzi black highland barley; Macroporous resin; Anthocyanin; Adsorption; Desorption

隆子黑青稞是西藏山南隆子县的特产。“隆子黑青稞”传说于公元 712 年左右金成公主经过隆子河谷文“内嘎沃”地段不慎从邦点(指藏式围裙)中

掉落在当地, 经过千年的种植而形成独特的当地品种。是历代隆子宗主要食物之一, 也是聂德主持历代和喇嘛的供品(聂德主持是聂雄六大寺庙的母寺之一), 该寺庙至今仍然食用水磨磨制的黑青稞糌粑。其做成的糌粑不仅深受藏区消费者欢迎, 而且也备受很多内地消费者的青睐, 在市场上供不应求。黑青稞通过最佳工艺提取的花青素粗提液经减压浓缩, 冷冻干燥后得到的是紫黑色片状物, 具有很大的粘性。这是因为溶剂提取法提取的花青素粗提液中

收稿日期: 2020-06-11

基金项目: 西藏自然科学基金项目(XZ2017ZRG-48)大麦青稞产业技术体系(CARS-05-02-06)

作者简介: 张唐伟(1987-), 男, 助理研究员, 研究方向为特色农产品营养品质评价, E-mail: zhangtangwei04@163.com; * 为通讯作者: 张国强(1982-), 男, 副教授, 研究方向为资源活性物质分离纯化, E-mail: guoqiang2008@163.com。

含有大量的糖、蛋白质、有机酸和淀粉等杂质,不利于花青素的保存、定性分析和其他生理活性的研究,因此需要对花青素提取液进行分离纯化。

Schwarz 等^[1]使用高速逆流色谱法从黑接骨木汁中分离得到矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和矢车菊素-3,5-葡萄糖苷,Patil 等^[2]使用膜分离法分离纯化红萝卜花色,这些方法都存在成本高、回收率低且不适合大规模工业化生产等问题。大孔树脂具有稳定性强、选择性好、可回收利用、成本低等特点,可以作为花青素的吸附剂来分离纯化花青素。冯颖^[3]等采用大孔树脂分离纯化无梗五加果多酚化合物,任萍^[4]等考察了同大孔树脂对紫甘蓝花青素的吸附解吸性能。

本文在参考相关文献的基础上,选取了5种不同极性的大孔树脂,通过静态吸附与解吸平衡试验筛选出适合分离纯化黑青稞花青素的大孔树脂,对静态吸附与解吸试验和动态吸附与解吸试验进行了研究,考察了黑青稞分离纯化工艺条件,并对纯化前后色价进行了比较。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料为从隆子黑青稞提取冷冻干燥后的花青素粗提物,5种大孔树脂型号见表1。

1.2 主要仪器

紫外可见分光光度计(TU-1901,北京普析通用仪器有限公司)、电热恒温水浴锅(HWS-26,上海齐欣科学仪器有限公司)、台式pH计(pH400,安莱立思仪器科技有限公司)、电子天平(B5A2245-CW,赛多利斯科学仪器有限公司)、摇床(西安科仪仪器有限公司)、旋转蒸发仪(R210,瑞典布奇公司)、玻璃层析柱(5 cm×100 cm,上海青浦沪西仪器厂)。

1.3 试验方法

1.3.1 黑青稞花青素分离纯化工艺路线 冷冻干燥黑青稞花青素固体→复溶→过滤→花青素粗提液→树

脂预处理→花青素粗提液吸附→洗脱→收集洗脱液。

1.3.2 树脂预处理 新的大孔树脂都含有一定的杂质或破碎的树脂,会影响到纯化效果,因此需要先将树脂预处理。将五种大孔树脂先分别用95%的乙醇溶液浸泡24 h,用蒸馏水洗至中性且无醇味;再用5%氢氧化钠溶液浸泡12 h,蒸馏水洗至中性且无醇味;最后用5%的盐酸浸泡12 h,蒸馏水洗至中性,备用^[5]。

1.3.3 大孔树脂的筛选 称取1.0 g不同型号大孔树脂于锥形瓶中,加入25 mL相同浓度的花青素粗提液,在531 nm下测其吸光度 A_0 ,30℃温度下振荡吸附24 h,过滤,测定滤液吸光度 A_1 ,依据下述公式计算吸附率;向吸附饱和的树脂中分别加入25 mL pH=1的70%乙醇溶液,30℃温度下振荡解吸24 h,过滤,测定滤液吸光度 A_2 ,依下述公式计算解吸率。以大孔树脂的饱和吸附率 α 和解吸率 β 为指标综合筛选出效果最佳的大孔树脂^[5]。

$$\alpha = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

$$\beta = \frac{A_2}{A_0 - A_1} \times 100\%$$

式中: A_0 为花青素粗提液在最大波长处的吸光值, A_1 为吸附饱和后吸附剂中的吸光值, A_2 为达到解吸平衡后解吸液的吸光值。

1.3.4 静态吸附和解吸平衡时间的确定 准确称取经过预处理的大孔树脂1 g若干份,将其放入150 mL锥形瓶中,加入浓度2 mg/mL pH为1的花青素提取液25 mL,放入恒温摇床30℃、100 r/min振荡,每隔0.5 h测定1次吸光值,直至黑青稞花青素溶液吸光值不再下降达到吸附平衡为止,记录达到吸附平衡的时间;取已经吸附饱和的树脂1 g若干份,每份加入25 mL pH为1的60%乙醇溶液,放入恒温摇床30℃、100 r/min振荡,每隔0.5 h测定1次吸光值,直至洗脱剂溶液吸光值不再上升达到解吸平衡为止,记录达到解吸平衡的时间。

表1 大孔树脂型号及物理参数

Table 1 Macroporous resin model and its physical parameters

树脂型号	外观	极性	比表面积 (m ² /g)	孔径 (nm)	生产厂家
HPD100	乳白色小球	非极性	650~700	8.5~9.0	陕西乐博生化科技有限公司
X-5	白色小球	非极性	500~600	29~30	陕西乐博生化科技有限公司
AB-8	乳白色小球	弱极性	480~520	12~16	陕西乐博生化科技有限公司
NKA-9	乳白色小球	极性	250~290	15.5~16.5	陕西乐博生化科技有限公司
D101	乳白色小球	非极性	480~520	25~28	陕西乐博生化科技有限公司

1.3.5 花青素浓度对吸附效果的影响 准确称取经过预处理的大孔树脂 1 g 若干份,将其放入 150 mL 锥形瓶中,分别加入浓度为 0.5、1、1.5、2、2.5 mg/mL pH 为 1 的花青素提取液 25 mL,放入恒温摇床 30 ℃、100 r/min 振荡 13 h,测定花青素提取液在 531 nm 处的吸光值,通过公式计算大孔树脂吸附率,筛选出最佳花青素浓度。

1.3.6 pH 对吸附效果的影响 准确称取经过预处理的大孔树脂 1 g 若干份,将其放入 150 mL 锥形瓶中,分别加入 pH 为 1、2、3、4、5 浓度为 2 mg/mL 花青素提取液 25 mL,放入恒温摇床 30 ℃、100 r/min 振荡 13 h,测定花青素提取液在 531 nm 处的吸光值,通过公式计算大孔树脂吸附率,确定最佳 pH。

1.3.7 洗脱剂体积分数对解吸效果的影响 准确称取吸附饱和的大孔树脂 1 g 若干份,将其放入 150 mL 锥形瓶中,分别加入 pH 为 1 乙醇体积分数 30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 % 的洗脱剂 25 mL,放入恒温摇床 30 ℃、100 r/min 振荡 6 h,取洗脱的花青素溶液于 531 nm 处测定吸光值,通过公式计算大孔树脂解吸率,确定最佳洗脱剂体积分数。

1.3.8 上样流速对吸附效果的影响 准确称取 25 mL、pH 为 1 浓度为 2 mg/mL 的花青素溶液若干份,分别控制在流速 0.5、1、1.5、2、2.5 mL/min,收集滤液在 531 nm 处测吸光值,通过公式计算吸附率,确定最佳上样流速。

1.3.9 洗脱流速对解吸效果的影响 准确称取若

表 2 不同大孔树脂对青稞花青素吸附和解吸性能的比较

Table 2 Comparison of adsorption and desorption efficiencies of barley anthocyanins with different resins

大孔树脂	吸附率(%)	解吸率(%)
HPD100	68.1	61.2
X-5	65.5	73.5
AB-8	72.4	71.3
NKA-9	59.7	68.6
D101	63.8	70.4

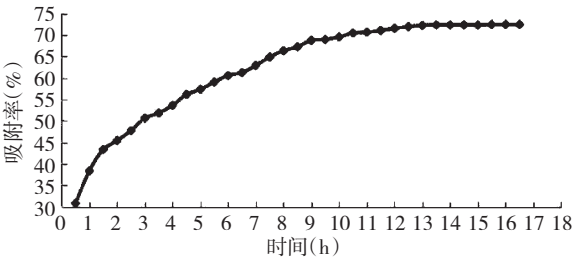


图 1 AB-8 对花青素吸附率随时间的变化

Fig. 1 The adsorption rate changes over time of anthocyanins by AB-8

干份吸附饱和的 AB-8 大孔树脂装柱,收集好滤液,配备 50 mL pH 为 1、浓度为 2 mg/mL 的 60 % 的乙醇溶液若干份,控制洗脱流速在 0.5、1、1.5、2、2.5 mL/min,收集滤液测在 531 nm 处测吸光值,通过公式计算解吸率,确定最佳解吸流速。

2 结果与分析

2.1 大孔树脂的筛选

由表 2 可知,AB-8 的吸附率最高,达到 72.4 %,可能是因为 AB-8 的极性是弱极性,在吸附过程中形成氢键结合在一起^[6]。除去极性原因,其他大孔树脂吸附率吸附能力与比表面积有关,随着比表面积的增大,吸附率也增大,吸附的花青素含量增加^[7]。X-5 的解吸率达到 73.5 %,可能是因为其孔径大,有助于花青素的洗脱,大孔树脂过大不利于花青素分子的吸附,过小不利于花青素分子的洗脱^[8]。综合考虑,AB-8 有着较高的吸附能力和解析能力,可以成为较好的纯化花青素溶液的大孔树脂。

2.2 静态吸附和解吸平衡时间的确定

由图 1 可知,大孔树脂 AB-8 对青稞花青素的吸附率随着时间的延长先快速上升,随后趋于平缓。在 13 h 时,AB-8 大孔树脂的吸附率达到最大。13 h 后吸附率趋于平稳,这是因为大孔树脂的吸附能力有限,此时树脂已经达到吸附平衡,表明 AB-8 大孔

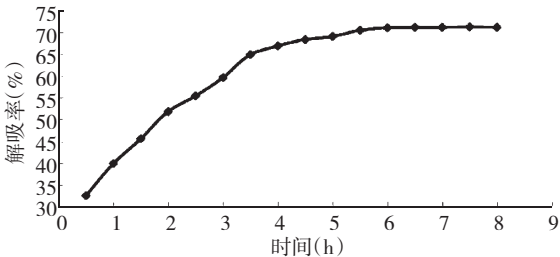


图 2 AB-8 对花青素解吸率随时间的变化

Fig. 2 The desorption rate changes over time of anthocyanins by AB-8

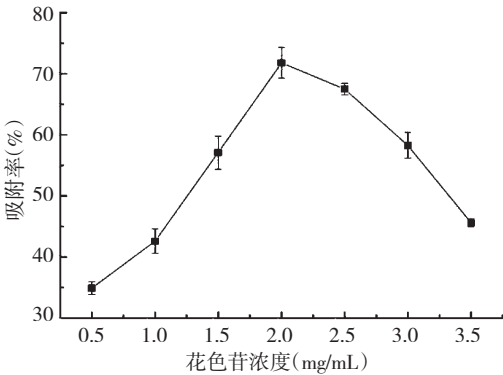


图 3 不同样液浓度对 AB-8 吸附花青素的影响

Fig. 3 Influence of different concentrations on adsorption ratio of anthocyanins by AB-8

树脂对青稞花青素溶液的吸附平衡时间为 13 h。

由图 2 可知,在解吸的前 4 h 中,解吸率随时间变化较快,AB-8 大孔树脂对青稞花青素溶液的解吸率随着时间的延长而增加,当 6 h 后,解吸率增加速度趋于平缓,这是由于花青素溶液解吸达到平衡状态,得出结论 AB-8 大孔树脂对青稞花青素溶液的解吸平衡时间为 6 h。

2.3 花青素浓度对吸附效果的影响

由图 3 可知,吸附率先是随着花青素浓度的升高而升高,当花青素浓度达到 2 mg/mL 时,吸附率也达到最大值。随后吸附率随着花青素浓度的增大而减小,这是由于大孔树脂的吸附能力有限,当花青素的浓度超过其吸附的值,吸附率反而下降,原因可能是随着浓度的增加,花青素溶液中的杂质增多,这些杂质与花青素同树脂结合产生竞争,导致吸附性能下降,这与唐璐^[9]等的结果一致。

2.4 pH 对吸附效果的影响

由图 4 可知,花青素溶液 pH 在 1 时,此时吸附率最大达到 70.6 %。随着 pH 的增加,溶液吸附率缓慢降低,但总体吸附效果下降不明显,同时因为花青素在酸性条件下稳定性强,因此选取样液 pH 为 1。

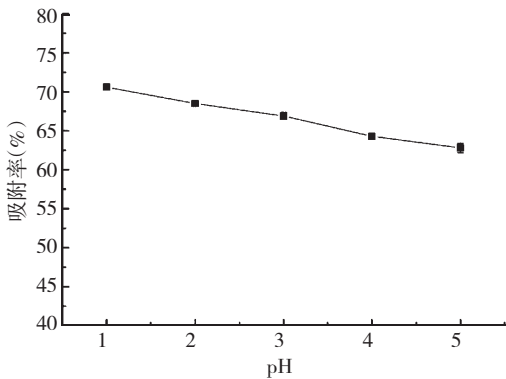


图 4 不同花青素 pH 值对吸附率的影响

Fig. 4 The effect of different pH values of anthocyanins on adsorption rate

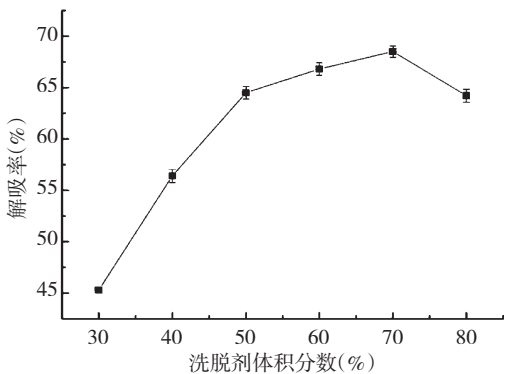


图 5 洗脱剂体积分数对解吸率的影响

Fig. 5 The effect of volume fraction of ethanol on desorption rate

2.5 洗脱剂体积分数对解吸效果的影响

从图 3 ~ 5 可以看出,乙醇溶液随着浓度的上升,对花青素溶液的解吸效果增强,当乙醇体积分数达到 70 % 时,解吸率最高,随着乙醇体积分数的继续提高,解吸率反而下降。原因可能是 70 % 乙醇溶液极性与黑青稞花青素极性接近,因此解吸效果最好。这与李晨泓^[10]的 60 % 有差异,可能是组成花青素结构不同。

2.6 上样流速对吸附效果的影响

由图 6 可知,青稞花青素的吸附率随着上样流速的增大而降低,原因是花青素分子与 AB-8 大孔树脂是物理吸附,由于流速的增加,分子间接触降低,导致吸附率下降。图中 0.5 与 1 mL/min 的吸附率想接近,考虑到时间成本因素,选 1 mL/min 为上样流速。

2.7 洗脱流速对解吸效果的影响

由图 7 可知,随着洗脱剂流速的增加,青稞花青素的解吸率随之下降,这是因为洗脱剂流速过高,导致洗脱剂不能完全与花青素溶液接触并与之作用结合,造成洗脱效率低^[11]。图中 0.5 与 1 mL/min 洗脱流速对青稞花青素的解吸效果影响不大,考虑到经济效益,1 mL/min 为最佳洗脱速度。

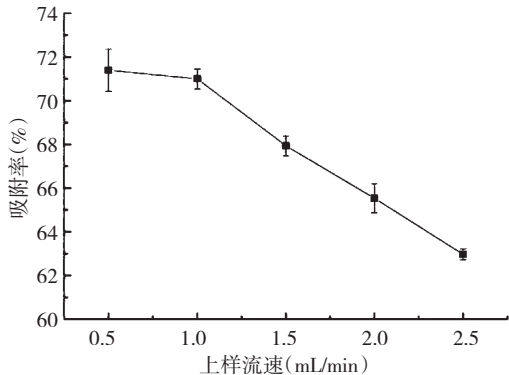


图 6 上样流速对吸附率的影响

Fig. 6 The effect of sample flow rate on adsorption rate

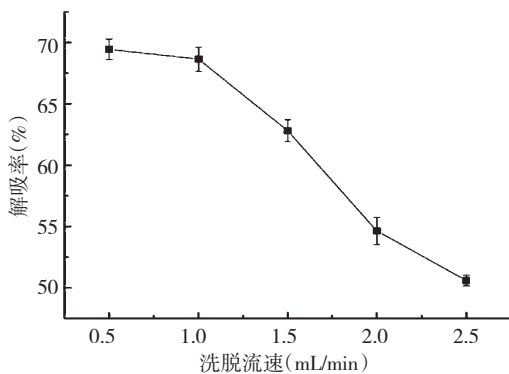


图 7 洗脱剂流速对解吸率的影响

Fig. 7 The effect of eluent flow rate on desorption rate

表 3 花青素色价

Table 3 The color value of anthocyanins

	纯化前	纯化后
色价	12.9	38.5
溶液颜色	红色	紫红色
冷冻干燥后状态	黑色固体	紫黑色粉末

2.8 纯化前后色价比较

由表 3 可以看出,纯化后花青素色价提高了近 3 倍,冷冻干燥后,花青素由黑色粘稠的固体改变成紫黑色粉末,表明去除了糖、蛋白质等大量杂质。

3 结 论

通过对 5 种大孔树脂的静态吸附和解吸试验,筛选出吸附率和解吸率效果都较好的 AB-8 大孔树脂,该树脂适用于青稞花青素的分离纯化。通过静态吸附和解吸平衡试验确定最优条件:吸附平衡时间为 13 h,解吸平衡时间为 6 h,静态吸附试验中花青素浓度 2 mg/mL、pH 为 1 最佳,静态解吸试验中洗脱剂体积分数 70 % 最佳,动态吸附和解吸试验中最佳上样流速和洗脱流速为 1 mL/min。纯化后花青素色价比纯化前提高了近 2 倍,花青素从黑色粘稠的膏状物纯化后成为紫黑色粉末,纯化效果明显,该结果表明可以利用 AB-8 分离纯化隆子黑青稞。

参考文献:

[1] Schwarz M, Hillebrand S, Habben S, et al. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins[J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 14(3): 179 - 189.

[2] Patil G, Madhusudhan M C, Babu B R, et al. Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish [J]. Chemical Engineering and Processing, 2009, 48(1): 364 - 369.

[3] 冯颖,甄国君,范文丽. 大孔树脂分离纯化无梗五加果中的多酚类化合物[J]. 保鲜与加工,2016,16(6):98 - 102, 106.

[4] 任萍,袁晓雨,赵晓萌,等. 大孔树脂分离纯化紫甘蓝中的花青素[J]. 食品工业,2016,37(4):1 - 6.

[5] 李伟. 黑粒小麦麸皮中花青素组分的分离、鉴定及抗氧化功能的研究[D]. 济南:山东农业大学,2011.

[6] 谭佳琪,孙旗,刘春成,等. 大孔树脂吸附树莓花青素的吸附性能[J]. 食品科技,2018,43(9):302 - 309.

[7] 曹群华,瞿伟菁,李家贵,等. 大孔树脂吸附纯化沙棘籽渣总黄酮的研究[J]. 中国中药杂志,2004(3):37 - 40.

[8] 国石磊,朱凤妹,王娜,等. 黑果腺肋花楸花青素树脂纯化工艺及其稳定性研究[J]. 天然产物研究与开发,2015,27(9):1636 - 1642.

[9] 唐璐,薛晓丽,李延辉,等. 黑果腺肋花楸花青素的提取分离纯化工艺[J]. 北方园艺,2020(3):111 - 119.

[10] 李晨泓,赵桃. 大孔树脂分离纯化青稞天然色素的工艺研究[J]. 上海工程技术大学学报,2011,25(4):309 - 313.

[11] 韩颖. 竹柳中黄酮类化合物的提取纯化和鉴定[D]. 天津:天津科技大学,2017.