

大孔树脂吸附法纯化紫薯花色苷的研究

魏好程^{1,2}, 米 聪¹, 王瑞芳¹, 何传波¹, 吴国宏¹, 熊何健^{1*}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 厦门 361021; 2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 厦门 361021)

摘 要: **目的** 研究大孔吸附树脂吸附法纯化紫薯花色苷成分。**方法** 采用大孔吸附树脂静态和动态吸附解吸实验, 结合花色苷 pH 示差法检测技术, 分别考察了 D101、AB-8、XDA-7、HPD-722、HPD-750、HPD-450、XDA-6、NKA-II、NKA9 和 S-8 10 种吸附树脂对紫薯花色苷的吸附和洗脱性能, 探讨大孔树脂柱层析纯化工艺。**结果** XDA-7 大孔吸附树脂对紫薯花色苷的吸附和洗脱性能较好。吸附过程中上样液浓度为 450 mg/L, 样液 pH 为 4.0, 上样速率为 1 BV/h, 树脂的饱和吸附容量为 10.2 mg/g; 洗脱液为 60%乙醇溶液, 洗脱速率为 2 BV/h 时, 洗脱解析率在 94%以上, 纯化效果较好。**结论** XDA-7 大孔吸附树脂可用于紫薯花色苷的纯化应用, 该纯化分离工艺简单快速, 适合紫薯类花色苷的纯化制备。

关键词: 紫薯; 花色苷; 纯化

Purification of anthocyanins from purple sweet potato by macroporous adsorption resin

WEI Hao-Cheng^{1,2}, MI Cong¹, WANG Rui-Fang¹, HE Chuan-Bo¹, WU Guo-Hong¹, XIONG He-Jian^{1*}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, China)

ABSTRACT: Objective To study the purification of anthocyanins from purple sweet potato by macroporous adsorption resins. **Methods** The static & dynamic adsorption and desorption characteristics of macroporous adsorption resins including D101, AB-8, XDA-7, HPD-722, HPD-750, HPD-450, XDA-6, NKA-II, NKA9 and S-8 for anthocyanins were investigated, combined with pH differential detection technology, and the purple potato anthocyanins macroporous adsorption purification technology and parameters optimization were discussed. **Results** Resin XDA-7 showed a satisfactory adsorption-desorption capacity for purification of anthocyanins from purple sweet potato. In the course of adsorption, the concentration of adsorption solution was 450 mg/L with the adsorption solution pH 4.0, the flowing rate was 1 BV/h, and the saturated adsorption capacity of the resin was 10.2 mg/g. In the course of elution, the elution rate was more than 94% when the eluent was 60% ethanol aqueous and its flowing rate was 2 BV/h. **Conclusion** The developed method is easy to implement and can be applied to the purification of anthocyanins from purple sweet potato.

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2013J01134)、福建省教育厅(面上)项目(JA13177)、福建省食品微生物与酶工程重点实验室开放基金项目(M20130910)、厦门市科技计划项目(3502Z20153014)

Fund: Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Provincial Government (2013J01134), the Fujian Provincial Education Foundation (JA13177), the Fujian Province Key Laboratory of Food Microorganism and Enzyme Engineering Foundation (M20130910), and the Technology Plan Fund Project of Xiamen Province (3502Z20153014)

*通讯作者: 熊何健, 研究员, 主要研究方向为功能性食品。E-mail: hxjiong@jmu.edu.cn

*Corresponding author: XIONG He-Jian, Researcher, College of Food and Biological Engineering, Jimei University, No.34, Yindou Road, Jimei District, Xiamen 361021, China. E-mail: hxjiong@jmu.edu.cn

KEY WORDS: purple sweet potato; anthocyanins; purification

1 引言

紫薯(*Solanum tuberosum*), 又名紫肉甘薯, 属旋花科(*Convolvulaceae*)甘薯属(*Ipomoea*)一年生或多年生双子叶植物^[1]。由于其色泽鲜艳, 而且富含一般甘薯所不具有的营养物质——花色苷, 深受大众喜爱^[2-4]。研究表明, 紫薯中花色苷是一类羟基和甲基化的 2-苯基苯并吡喃阳离子与一个或多个糖分子通过糖苷键结合而成的化合物^[5]。其结构中的酚羟基具有良好的抗氧化性, 表现出抗肿瘤、抗突变以及抗动脉硬化等功能活性功效。Teow、Kano 等研究表明, 紫薯花色苷体外清除 DPPH 能力优于 V_C ^[6,7]。Hagiwara 等^[8]发现紫薯提取物对实验小鼠结肠癌有一定的抑制效果。Ghiselli 等^[9]研究发现花色素可以保护动脉血管内壁柔韧性, 增强血液循环, Yamakawa 等^[10]进一步研究表明紫薯花色苷对血管紧张素转化酶(ACE)具有良好的抑制作用, 在小鼠实验^[11]和人体实验^[12]中均表现出良好的降血压功效。紫薯花色苷可以改善糖尿病大鼠的血糖和血脂异常, 加强糖代谢和脂代谢的良性循环, 对肝功能和肝细胞膜结构也有一定的保护作用^[13]。

花色苷来源广泛、毒副作用小, 加之良好的生物活性功能, 作为一种天然色素在食品添加剂领域的应用前景十分可观。但是天然产物花色苷也存在自身缺陷, 易受到外界条件的影响、稳定性差、纯化分离效率低等^[14], 有待于进一步研究。

目前, 天然花色苷的提取方法主要有层析法和膜分离技术^[15]。柱层析技术使用较为广泛, 主要有大孔吸附树脂、凝胶树脂、离子交换树脂, 何会筛选 XAD-7HP 大孔吸附树脂用于荔枝花色苷粗提物进行初步纯化, 使其含量提高了 9 倍左右^[16]。膜分离技术用于花色苷的提取, 主要有微滤、超滤、纳滤、电渗透、反渗透等技术^[17]。Patil 等利用膜分离技术使红萝卜花色苷的含量增加了近一倍^[18]。李金林利用 100 nm 超滤膜对紫薯花色苷粗提液进行过滤, 去除杂质率 38%^[19]。研究表明, 膜材料加工水平对膜分离技术在花色苷分离中的应用还具有一定的限制作用, 而利用大孔树脂吸附法从天然植物中提取花色苷的最大优点在于该分离过程无需加热, 可避免加热分解

损失和生物活性降低, 同时可大幅度降低能耗。本文以紫薯花色苷乙醇粗提浓缩液为原料, 研究了大孔吸附树脂对紫薯花色苷的吸附分离效果, 为花色苷的树脂法纯化提供一定的理论依据。

2 材料与方法

2.1 试剂和仪器

“济黑”紫薯购于济南紫薯农业种植专业合作社; 乙腈、甲酸购自 TEDIA, 色谱纯; 其他试剂均为国产分析纯。

大孔吸附树脂: D101、AB-8、NKA-II、NKA-9、S-8 购自南开大学化工厂; XDA-6、XDA-7 购自西安蓝晓科技有限公司; HPD-722、HPD-750、HPD-450 购自沧州宝恩化工有限公司。

ULTIMATE3000 高效液相色谱(美国戴安有限公司); HD-21-88 自动柱层析仪(上海琪特分析仪器有限公司); RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); UV-8000 紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司); JDG-0.2T 真空冷冻干燥机(兰州科近真空冻干技术有限公司)。

2.2 紫薯花色苷提取液的制备

紫薯花色苷粗提液由“济黑”紫薯冻干粉, 经单因素实验和响应面优化设计, 确定以 60%乙醇为提取剂, 液料比 18:1($V:m$), 浸提时间 127 min 条件下粗提液中花色苷含量最高, 平均含量达 2.680 mg/g(DW)。粗提液于 4500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 继续在 40 °C、0.1 MPa 进行旋转蒸发浓缩, 制得花色苷提取液, 于 4 °C 冰箱保存备用。

2.3 花色苷含量的检测

精确称取一定量紫薯粉末, 以酸化乙醇溶液为溶剂, 于 25 °C 恒温摇床(110 r/min)中浸提一定时间, 于 4500 r/min 转速下离心 15 min, 取上清液定容至 100 mL。取浸提液分别加入一定体积的 pH 1.0、pH 4.5 缓冲液稀释一定的倍数, 混匀, 静置 15 min。以蒸馏水调零, 在 700 nm 和 $\lambda_{vis-max}$ 处测定其吸光值, 并记录。根据公式 1、公式 2, 计算样品中花色苷的含量。

花色苷浓度 $C(\text{mg/L}) = [(A_{\lambda_{vis-max}} - A_{\lambda_{700}}) \text{pH } 1.0 -$

$(A_{\lambda\text{vis-max}}-A_{\lambda700})\text{pH } 4.5] \times M_W \times DF \times 1000/\varepsilon$ (公式 1)

花色苷含量 $m(\text{mg/g, DW})=C \times V/m_0$ (公式 2)

式中: M_W ——相对分子质量;
 DF ——样品稀释倍数;
 ε ——摩尔消光系数。(注: 当 ε 未知或样品成分未知, 则将矢车菊素-3-葡萄糖苷作为标准物, 此时 $M_W=449.2$, $\varepsilon=26900$ 。)
 DW ——样品为干重状态;
 V ——浸提液体积, L;
 m_0 ——样品干重时的质量, g。

2.4 静态吸附、解吸实验

准确称取一定量的树脂, 分别加入浓度约为 350 mg/L 的紫薯花色苷粗提液 70 mL 于 25 ℃进行静态吸附试验。充分吸附后, 过滤, 将树脂移入干净锥形瓶, 加入乙醇水溶液 70 mL, 25 ℃恒温解析, 待其充分解吸, pH 示差法测定吸附残液及解吸液中花色苷的含量, 计算其吸附量及解吸率。

2.5 动态吸附-解吸实验

2.5.1 吸附穿透曲线的测定

选择吸附容量较大的树脂湿法装柱(层析柱 1.0 cm×30.0 cm), 适量浓度的花色苷粗提液上柱吸附, 蠕动泵恒定流速, 流出液分步收集, 以 pH 示差法^[19]计算花色苷浓度, 测定穿透曲线, 并选择不同的流速进行实验, 比较流速对穿透曲线的影响。

2.5.2 洗脱曲线的测定

动态吸附穿透后, 1.5 BV 的水冲洗柱子, 顶出料液, 而后用 60%乙醇水溶液淋洗, 淋洗液分步收集,

检测, 绘制洗脱曲线。

2.6 高效液相色谱分析

采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法对树脂纯化前后的紫薯花色苷进行组分分析, 色谱条件为: 乙腈为流动相 A, 0.5%甲酸为流动相 B, C_{18} 色谱柱(Boston Green ODS, 4.6 mm×250 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 进样量 20 μL , 检测波长 525 nm, 梯度洗脱条件为 0~30 min, 100%~80% B; 30~40 min, 80%~60% B。

3 结果与分析

3.1 树脂吸附性能的比较

由表 1 可知, 非极性的 D101 和弱极性的 XDA-7 对紫薯花色苷的吸附量较高, 达到了 10 mg/g 湿树脂。花色苷属 2-苯基苯并吡喃阳离子化合物, 其分子结构中含有极性较小的内酯环, 还含羟基等极性基团, 整个分子呈中等偏弱极性, 因此, 在极性适中的吸附树脂上的吸附容量较大, 在极性吸附树脂上吸附容量较小。比表面积较大的树脂吸附容量较大, 而比表面积较小的树脂吸附容量较小, 说明树脂对花色苷的吸附主要是靠表面物理吸附作用。

静态解吸实验表明 AB-8、HPD450、HPD722、S-8、XDA-6 和 XDA-7 的解吸率都达到了 90%以上。综合考虑, 选取吸附量最高, 解吸率也良好的 XDA-7 型号的大孔吸附树脂进行对紫薯花色苷的动态吸附和解吸实验。

表 1 大孔吸附树脂对紫薯花色苷吸附量、解析率及其物理性能的比较
Table 1 Comparison of the results about static adsorption, deadsorption and physical properties

树脂种类	表面性质	比表面积(m^2/g)	吸附量(mg/g)	解吸率(%)
D101	非极性	550~650	10.21	72.41
AB-8	弱极性	480~520	7.29	96.64
XDA-7	弱极性	≥ 800	10.19	94.79
HPD-722	弱极性	485~530	8.90	94.62
HPD-750	中极性	650~700	8.60	87.64
HPD-450	中极性	500~550	4.19	93.45
XDA-6	中极性	≥ 630	7.67	92.99
NKA-II	极性	160~200	0.42	48.64
NKA9	极性	250~290	3.40	80.76
S-8	极性	100~120	5.45	94.43

3.2 乙醇浓度对解吸效果的影响

配制不同浓度乙醇水溶液, 对吸附饱和的 XDA-7 树脂进行解吸实验, 静态解吸实验结果如图 1 所示。

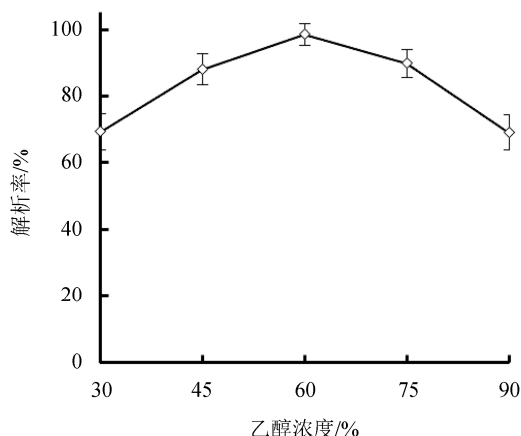


图 1 不同乙醇浓度对 XDA-7 树脂解吸率的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentrations on adsorption ratio of XDA-7 macroreticular resin

由图 1 可知, 乙醇浓度 60% 时解吸效果最好, 故洗脱动态洗脱实验中选用 60% 的乙醇水溶液作为洗脱剂。

3.3 上样速率对吸附效果的影响

考察了不同上样速率对动态吸附效果的影响, 结果如图 2 所示。

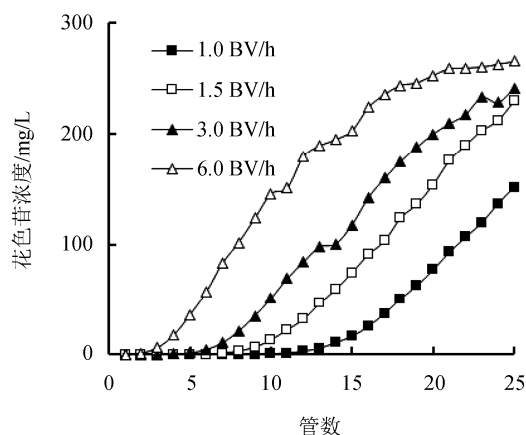


图 2 不同上样速率下的动态吸附泄漏曲线

Fig. 2 Breakthrough curve of dynamic adsorption under different flow rate

由图 2 可知, 上样速率越快, 泄露越快, 吸附效

果较差。原因在于流速过快, 导致样液与大孔树脂的接触时间过短, 不能够充分吸附, 导致泄露较快, 故选择 1 BV/h 为最佳上样速率。

3.4 洗脱速率对解吸效果的影响

对已吸附饱和的 XDA-7 树脂用 60% 的乙醇以不同的速率进行洗脱, 其结果见图 3。

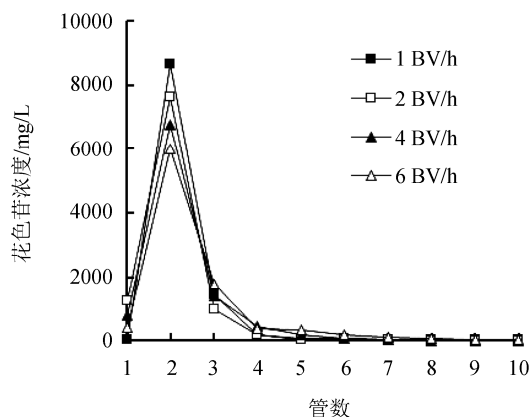


图 3 不同流速下的动态洗脱曲线

Fig. 3 Dynamic desorption curve under different elution rate

由图 3 可知, 当洗脱体积达到 4 BV 时, 1、2、4、6 BV/h 的流速下, 花色苷的累积洗脱量分别是 102.92、100.53、94.16、85.76 mg。1 BV/h 的速率的洗脱量虽多但拖尾较长, 综合分析考虑, 可以选择 2 BV/h 为最佳洗脱速率, 最小洗脱剂量为 4 BV。

3.5 树脂纯化效果评价

采用 HPLC 法对树脂纯化前后的紫薯花色苷进行纯化效果比较分析, 色谱图如图 4 所示。图中谱图 a 为花色苷提取原液 HPLC 谱图, 谱图 b 为 XDA-7 大孔树脂纯化后 HPLC 谱图。谱图 a、b 中标示的保留时间分别为 31.613 min、32.713 min、33.133 min、34.313 min 和 35.607 min 的 5 个峰为紫薯花色苷的 5 个主要组分, 与江连洲等^[20]文献中紫薯花色苷组分图谱一致。未经纯化的 a 谱线中其余谱峰为杂质峰, 从 a、b 谱线对比可知, 经过大孔树脂纯化后保留时间小于 31 min 的杂质峰显著减小, 表明纯化效果较好。但 5 个主要组分结构鉴定还需进一步研究。纯化后花色苷含量提高了 7.3 倍, 回收率达 83.8 %。

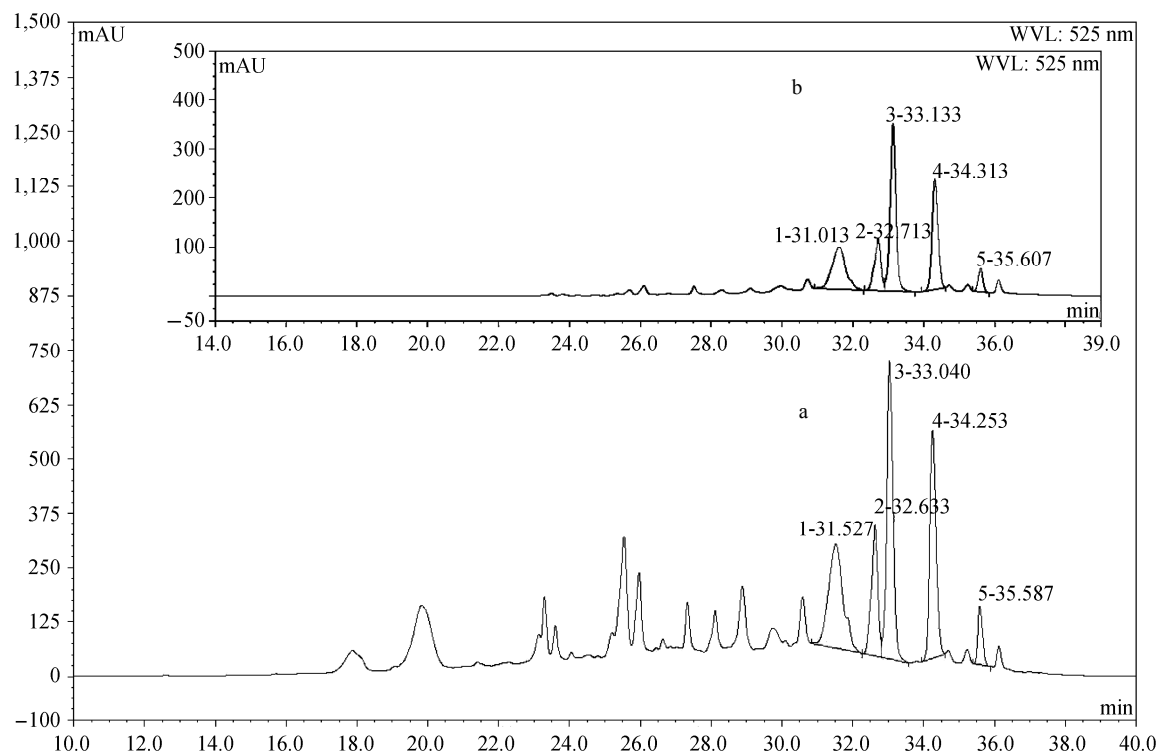


图4 紫薯花色苷浸提液大孔树脂纯化前后 HPLC 图谱

Fig. 4 HPLC chromatograms of purple sweet potato anthocyanins and purifying by XDA-7 resins

4 结 论

采用大孔吸附树脂法对紫薯花色苷进行分离纯化, 工艺流程简单, 且室温操作, 可避免花色苷高温氧化。实验结果表明 XDA-7 树脂对紫薯花色苷具有较高的吸附容量和良好的解吸效果, 适用于紫薯花色苷的富集纯化, HPLC 检测结果显示经 XDA-7 树脂吸附、解吸, 杂质峰明显减少, 纯化效果良好。试验结果对紫薯花色苷工业化分离纯化具有指导意义。

参考文献

- [1] 王智勇. 紫甘薯色素提取纯化工艺及性质研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
Wang ZY. Study on the technology conditions of extraction and purification and property of purple sweet potato color [D]. Chongqing: Southwest University, 2008.
- [2] 孙荣琴, 郭华春. 七个紫甘薯品种块根花色苷含量的比较[J]. 作物杂志, 2008, 6(1): 56-59.
Sun RQ, Guo CH. Comparison of anthocyanin content from storage roots of seven purple sweet potato varieties [J]. Crops, 2008, 6(1): 56-59.
- [3] 庞巧玲, 赖珍华. 紫薯的开发前景及丰产栽培技术[J]. 陕西农业科学, 2010, 1(1): 275-276.
Pang QL, Lai ZH. Development prospect and tissue culture technology on purple sweet potato [J]. Shaanxi J Agric Sci, 2010, 1(1): 275-276.
- [4] 张明晶. 紫心甘薯的研究进展与综合开发利用[J]. 中国食物与营养, 2006, 3(4): 19-21.
Zhang MJ. Research progress of purple sweet potato on comprehensive development and utilization [J]. Food Nutr China, 2006, 3(4): 19-21.
- [5] Suda I, Oki T, Masuda M, *et al.* Physiological functionality of purple-fleshed sweet potatoes containing anthocyanins and their utilization in foods [J]. Japan Agric Res Quart, 2003, 37(3): 167-173.
- [6] Teow CC, Truong VD, Mcfeeters RF, *et al.* Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colors [J]. Food Chem, 2007, 103(3): 829-838.
- [7] Kano M, Takayanagi T, Harada K, *et al.* Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato, Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki [J]. Biosci, Biotechnol Biochem, 2005, 69(5): 979-988.
- [8] Hagiwara A, Yoshino H, Ichihara T, *et al.* Prevention by natural

- food anthocyanins, purple sweet potato color and red cabbage color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine [J]. *J Toxicol Sci*, 2002, 27(1): 57–68.
- [9] Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, *et al*. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(2): 361–367.
- [10] Yamakawa O, Suda I, Yoshimoto M. Development and utilization of sweet potato cultivars with high anthocyanin content [J]. *J Food Ingrid*, 1998, 178(3): 69–77.
- [11] Kobayashi M, Oki T, Masuda M, *et al*. Hypotensive effect of anthocyanin-rich extract from purple-fleshed sweet potato cultivar Ayamurasaki in spontaneously hypertensive rats [J]. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 2005, 52(1): 41–44.
- [12] Suda I, Yamakawa O, Matsugano K, *et al*. Changes of serum-GTP, GOT and GPT levels in hepatic function-weakling subjects by ingestion of high anthocyanin sweetpotato juice [J]. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 1998, 45(10): 611–617.
- [13] 马淑青, 吕晓玲, 范辉. 紫甘薯花色苷对糖尿病大鼠血糖和血脂的影响[J]. *营养学报*, 2010, 32(1): 88–90.
- Ma SQ, Lv XL, Fan H. Effect of anthocyanins from purple sweet potato on blood glucose and serum lipid levels in diabetic rats [J]. *Nutr Sin*, 2010, 32(1): 88–90.
- [14] 熊何健, 庞杰, 烟利亚, 等. 桑葚花色苷热降解动力学及清除 DPPH 活性的热稳定研究[J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 2010, 43(5): 15–20.
- Xiong HJ, Pang J, Yan LY, *et al*. Thermal degradation kinetics of mulberry anthocyanin and its thermal stability of DPPH radical scavenging activity [J]. *Acta Sci Nat Univ Nankaiensis*, 2010, 43(5): 15–20.
- [15] 凌文华. 植物花色苷[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- Ling WH. Plant anthocyanins [M]. Beijing: Science Press, 2009.
- [16] 何会. 荔枝果皮中花色苷的分离纯化、结构鉴定及其抗氧化活性[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- He H. Isolation, purification and structure identification of anthocyanins and its antioxidant activity from lichi pericarp [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009.
- [17] 任建新. 膜分离技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- Ren JX. Membrane separation technology and application [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003.
- [18] Patil G, Madhusudhan MC, Babu BR, *et al*. Extraction, dealeoholization and concentration of anthocyanin from red radish [J]. *Chem Eng Proc*, 2009, 48(1): 364–369.
- [19] 李金林. 紫甘薯花色苷提取、膜分离及加工稳定性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2007.
- Li JL. Study of the extraction, purification by membrane technology and stability of anthocyanin pigment from purple sweet potato [D]. Nanchang: Nanchang University, 2007.
- [20] 毛建霏, 付成平, 郭灵安, 等. 可见分光光度法测定紫甘薯总花青素含量[J]. *食品与发酵科技*, 2010, 46(2): 101–104.
- Mao JF, Fu CP, Guo LA, *et al*. Determination of total anthocyanidins in purple sweet potato by vis spectrophotometry [J]. *Food Ferment Technol*, 2010, 46(2): 101–104.
- [21] 江连洲, 王晰锐, 张超, 等. HPLC-MS 法鉴定不同品种紫甘薯中花色苷组成[J]. *中国食品学报*, 2011, 11(5): 176–181.
- Jiang LZ, Wang XR, Zhang C, *et al*. Identification of anthocyanin in different varieties of purple sweet potatoes by HPLC-MS [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2011, 11(5): 176–181.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



魏好程, 在职博士研究生, 主要研究方向为农产品加工及天然活性产物。
E-mail: whc_xm@jmu.edu.cn



熊何健, 研究员, 主要研究方向为功能性食品。
E-mail: hjxiong@jmu.edu.cn