

大孔树脂纯化红芸豆种皮花色苷

郝瑞林¹, 谭午芳¹, 董倩倩¹, 范建凤^{2*} (1. 忻州师范学院生物系, 山西忻州 034000; 2. 忻州师范学院化学系, 山西忻州 034000)

摘要 [目的]研究大孔树脂柱层析法纯化红芸豆种皮花色苷的条件并对纯化产物进行高效液相色谱(HPLC)分析。[方法]通过静态吸附和解吸试验比较了 AB-8、D101、SP825、NKA-9、XAD-16 和 HPD100 这 6 种不同类型大孔树脂对红芸豆种皮花色苷的吸附和洗脱性能,优化了 AB-8 树脂纯化红芸豆种皮花色苷的工艺,HPLC 对比分析纯化产物与粗提物。[结果]AB-8 大孔树脂对红芸豆种皮花色苷吸附和洗脱性能较好,最佳上样流速为 3.0 BV/h。最佳洗脱条件为 pH 1.0、100% 乙醇作为洗脱液,洗脱流速为 4.5 BV/h,得到的花色苷纯度达 86.05%。HPLC 检测结果表明纯化效果明显。[结论]AB-8 大孔树脂可有效分离红芸豆种皮花色苷。

关键词 红芸豆;花色苷;大孔树脂;纯化;HPLC

中图分类号 TS264.4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)26-0011-04

Purification of Anthocyanins from Seed Coat of Red Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Macroporous Adsorption Resin

HAO Rui-lin¹, TAN Wu-fang¹, DONG Qian-qian¹, FAN Jian-feng^{2*} (1. Department of Biology, Xinzhou Teachers' University, Xinzhou, Shanxi 034000; 2. Department of Chemistry, Xinzhou Teachers' University, Xinzhou, Shanxi 034000)

Abstract [Objective] The aim was to study purification of anthocyanins from seed coat of red kidney bean by macroporous adsorption resin. [Method] The static adsorption and desorption characteristics of macroporous adsorption resins including AB-8, D101, SP825, NKA-9, XAD-16 and HPD100 for anthocyanins were investigated and the purification technology of anthocyanins by AB-8 macroporous adsorption resin were optimized. And the HPLC technology were applied to analyze the purified. [Result] Resin AB-8 showed a satisfactory adsorption-desorption capacity for purification of anthocyanins from seed coat of red kidney bean. The optimized purification condition as the flow rate of adsorption solution was 3.0 BV/h, and the optimized desorption solution was 100% ethanol (modified to pH 1.0 by hydrochloric acid) with the flow rate of 4.5 BV/h. The purified powder owned a purity of 86.05% and HPLC method proved the purification was effective. [Conclusion] The developed method can be applied to the purification of anthocyanins from seed coat of red kidney bean.

Key words Red kidney bean; Anthocyanins; Macroporous adsorption resin; Purification; HPLC

花色苷属黄酮类化合物,主要分布在植物表皮细胞的液泡中,是植物呈现蓝色、紫色、红色和黄色的主要原因^[1-2]。目前已有超过 500 种天然花色苷被发现,其基本构成单元为矢车菊色素、天竺葵色素、飞燕草色素、芍药色素、矮牵牛色素、锦葵色素^[3-4]。研究发现花色苷具有抗氧化、抗肿瘤、修复胰岛组织损伤等生理功效,在心脑血管疾病、肿瘤、糖尿病等的预防和治疗领域有广泛的应用前景^[5]。红芸豆(*Phaseolus vulgaris* L.)属蝶形花科菜豆属,色泽鲜艳且含有丰富的蛋白质、维生素及钙、铁、镁等微量元素^[6]。大孔树脂柱层析是目前从植物粗提物中分离、精制黄酮类化合物时应用最广泛的技术,具有吸附容量大、分离速度快、再生简便、生产成本低等优点^[7]。笔者对应用大孔树脂柱层析初步纯化红芸豆种皮中花色苷的条件进行了研究,旨在为红芸豆的开发利用和深加工提供参考。

1 材料与方

1.1 材料 红芸豆购自岢岚县农贸市场。JY92-IIIDN 超声波细胞破碎仪购自江苏省昆山市超声仪器有限公司;UV-2250 紫外可见光谱仪购自日本岛津公司;SH2-D(III)循环水真空泵、RE-52AA 旋转蒸发器购自河南省巩义市市华仪器有限公司;DZF-6050 真空干燥箱购自上海龙跃仪器设备有限公司;SCIENTZ-10N 低温冷冻干燥机购自浙江宁波新芝生物科技股份有限公司;BS-100A 自动部分收集器、BT-100 恒流泵购自上海泸西分析仪器厂有限公司;LC-20AT 高效液相色谱仪购自日本岛津公司。AB-8、D101、NKA-9 购

于天津市光复精细化工研究所,其余树脂购于上海摩速科学器材有限公司。

1.2 方法

1.2.1 红芸豆种皮花色苷的提取。红芸豆筛选洗净后剥皮,将红芸豆皮在 30 ℃、0.05 MPa 条件下真空干燥后粉碎,过 60 目筛,经单因素试验和响应面优化设计,确定以 40% 乙醇(浓盐酸调 pH 1.0)为提取剂,料液比 1:24,68 ℃、160 W 超声波辅助提取 78 min 时,花色苷得率最大为 1 855.70 g/kg。将粗提液 4 000 r/min、20 min 离心后取上清,50 ℃减压蒸发除去乙醇后得到花色苷含量为 50.27 mg/L 的提取液,置于 4 ℃冰箱备用。

1.2.2 花色苷浓度测定。pH 示差法测定花色苷得率^[8]:红芸豆种皮花色苷浓度以矢车菊素-3-葡萄糖苷计,取 2 mL 上清液用 pH 1.0、0.025 mol/L 氯化钾缓冲液稀释至 25 mL,另取 2 mL 上清液用 pH 4.5、0.4 mol/L 醋酸钠缓冲液稀释至 25 mL。分别测定稀释液 517、700 nm 波长处吸光值,记作 A_{517} 与 A_{700} 。按公式(1)计算花色苷浓度:

$$C = \frac{A \times 449.2 \times 1\,000 \times DF}{26\,900} \quad (1)$$

式(1)中, C 为花色苷质量浓度(mg/L); $A = (A_{525} - A_{700})_{pH\,1.0} - (A_{525} - A_{700})_{pH\,4.5}$;449.2 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的相对分子量;DF 为稀释倍数;26 900 为摩尔消光系数。

1.2.3 树脂的预处理与再生。将树脂用 2 倍体积无水乙醇浸泡 24 h,待树脂充分溶胀后装柱,无水乙醇洗至流出液不再浑浊,蒸馏水洗脱至无乙醇味,浸于蒸馏水中备用^[9]。

1.2.4 树脂的筛选。分别取处理好的树脂各 1 g 置于锥形瓶,加入花色苷浓度为 50.27 mg/L 的粗提液 100 mL,封口,

作者简介 郝瑞林(1987—),男,山西忻州人,助教,硕士,从事植物色素开发研究。*通讯作者,教授,硕士,从事天然产物开发研究。

收稿日期 2017-07-12

置于 25 ℃ 水浴恒温振荡器, 100 r/min 振荡吸附 12 h 后测定溶液中花色苷含量。吸附饱和后, 过滤树脂除去残留花色苷, 加入 100 mL 60% 乙醇溶液 (盐酸调 pH 为 1.0), 25 ℃、100 r/min 振荡解吸附, 定时从上清液取样, 测定上清中花色苷质量浓度, 按照公式 (2) 和 (3) 计算树脂的吸附量与解吸率, 重复试验 3 次。

$$\text{静态吸附量 (mg/g)} = (C_0 - C_1) / 10 \quad (2)$$

$$\text{静态解吸率} = (C_0 - C_1) / C_2 \times 100\% \quad (3)$$

式 (2)、(3) 中, C_0 为提取液花色苷的初始浓度 (mg/L); C_1 为吸附平衡后的溶液中花色苷浓度 (mg/L); C_2 为解吸液花色苷浓度 (mg/L)。

1.2.5 AB-8 树脂对红芸豆种皮花色苷的静态吸附动力学。称取处理好的 AB-8 大孔树脂 1 g, 置于锥形瓶中, 加入浓度为 50.27 mg/L 的红芸豆种皮花色苷粗提液 100 mL, 置于 25 ℃ 水浴恒温振荡器, 100 r/min 振荡吸附, 分别在 15、30、45、60、120、180、240、300 min 时取样, 按公式 (2) 计算吸附量, 并绘制 AB-8 大孔树脂对红芸豆种皮花色苷的吸附动力学曲线^[10]。

1.2.6 动态吸附条件选择。在 $\Phi 1.0 \text{ cm} \times 50.0 \text{ cm}$ 玻璃柱中装入处理好的 AB-8 树脂至柱高为 12.7 cm (约 10 mL), 红芸豆花色苷提取液以不同流速上样至吸附饱和, 每隔一定时间收集流出液, 按公式 (1) 计算每份流出液花色苷质量浓度及合并后的流出液中花色苷的浓度, 绘制动态吸附曲线, 按公式 (4) 计算动态吸附量, 并以上样流速对动态吸附量作图^[11]。

$$\text{动态吸附量 (mg/mL)} = (C_s - C_{3\text{总}}) \times V_s / 10 \quad (4)$$

式 (4) 中, C_s 为上样液中花色苷含量 (mg/L); $C_{3\text{总}}$ 为合并后流出液中花色苷含量 (mg/L); V_s 为上样液体积 (mL)。

1.2.7 动态解吸附条件选择。在 $\Phi 1.0 \text{ cm} \times 50.0 \text{ cm}$ 玻璃柱中装入动态吸附饱和的 AB-8 树脂至柱高为 12.7 cm (约 10 mL)。分别用不同体积分数的乙醇溶液 (浓盐酸调 pH 为 1.0) 以 3.0 BV/h 的流速洗脱 8 BV, 考察洗脱液中乙醇浓度对解吸效果的影响; 用 60% 乙醇 (浓盐酸调 pH 为 1.0) 以不同的流速洗脱 8 BV, 考察洗脱流速对解吸效果的影响。每隔一定时间收集洗脱液, 测定每份洗脱液中花色苷质量浓度及合并后洗脱液中花色苷质量浓度, 绘制动态解吸曲线, 按照公式 (5) 计算动态解吸率并分别以乙醇体积分数及洗脱流速对动态解吸率作图^[12]。

$$\text{动态解吸率} = \frac{C_{4\text{总}} V_4}{(C_s - C_{3\text{总}}) V_s} \times 100\% \quad (5)$$

式 (5) 中, $C_{4\text{总}}$ 为合并后洗脱液中花色苷含量 (mg/L); V_4 为洗脱液总体积 (mL)。

1.2.8 纯化产物纯度的测定。经大孔树脂柱层析纯化后, 花色苷洗脱液 30 ℃ 减压浓缩, 冻干成粉。称取 20 mg 花色苷粉末, 用 pH 1.0 甲醇溶液溶解并定容至 100 mL 容量瓶中, 利用 pH 示差法测定该溶液的花色苷浓度, 用公式 (6) 计算产物纯度^[13]。

$$\text{产物纯度} = C / 200 \times 100\% \quad (6)$$

式 (6) 中, C 为测定花色苷质量浓度 (mg/L)。

1.2.9 HPLC 检测条件。参考 Jampani 等^[14] 的方法并稍作修改, 采用 Wondasil C_{18} 柱 (250 nm \times 4.6 mm, 5 μm), 检测温度 25 ℃, 流速 1 mL/min, 进样体积 20 μL , A 相为 5% 甲酸水溶液, B 相为乙腈, 检测波长为 525 nm, 洗脱条件: 0 ~ 5 min, 5% B; 5 ~ 12 min, 5% ~ 12% B; 12 ~ 20 min, 12% ~ 18% B; 20 ~ 70 min, 18% ~ 70% B; 70 ~ 80 min, 70% B; 80 ~ 85 min, 70% ~ 100% B; 85.01 min, 5% B。

1.3 数据处理 试验数据采用 SPSS 软件作图, 利用 Design-Expert 8.0.6 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 红芸豆种皮花色苷乙醇提取液最大吸收波长的确定 图 1 为红芸豆种皮花色苷提取液 (pH = 1.0, 含 40% 乙醇) 在 400 ~ 700 nm 波长处的吸收光谱。由图 1 可见, 用酸性乙醇提取的红芸豆种皮花色苷溶液在可见光区最大吸收波长 λ_{max} 为 517 nm。

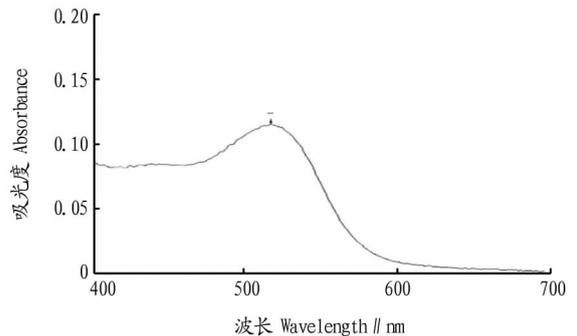


图 1 红芸豆种皮花色苷光谱图谱

Fig. 1 UV-Vis absorption spectrum of anthocyanins from seed coat of red kidney bean

2.2 红芸豆种皮花色苷纯化工艺研究 花色苷粗提液中通常包含大量的多糖、有机酸、矿物质及其他的水溶性杂质^[15]。大孔树脂理化性质稳定, 不溶于水、酸、碱及甲醇、乙醇等常用有机溶剂。树脂内部分布有网状孔穴, 因而具有较高的比表面积和吸附能力。同时, 树脂合成时通过引入酰胺基、酚羟基等极性基团从而使树脂具有极性化合物吸附能力进而具备较强的分离能力。常用于花色苷类物质纯化的大孔树脂有 AB-8、HP-20、NKA-9、HPD-700、D-101 等^[16-20]。

2.2.1 树脂吸附性能的比较。由图 2(A) 可见, AB-8 树脂对红芸豆种皮花色苷吸附能力最强, 12 h 吸附量为 0.63 mg/g, 其次为 DI01 和 XAD-16 树脂。由图 2(B) 可见, 采用 pH 1.0、60% 乙醇洗脱时, AB-8 树脂的解吸率最高达 92.11%, 且解吸速率快, 3 h 解吸率达 90%。XAD-16 树脂解吸率最低, 9 h 解吸率为 63.43%。综合静态吸附和解吸试验结果, 选择 AB-8 树脂作为红芸豆种皮花色苷纯化介质。

2.2.2 AB-8 大孔吸附树脂静态吸附动力学曲线。由图 3 可见, 在 1 h 内, AB-8 树脂对红芸豆种皮花色苷的吸附量随着时间的延长而快速增加, 1 h 时吸附量达 0.51 mg/g, 超过 1 h 后, 吸附速率下降, 3 h 时逐渐达到吸附平衡, 之后随着时间的延长, 吸附量缓慢增加。

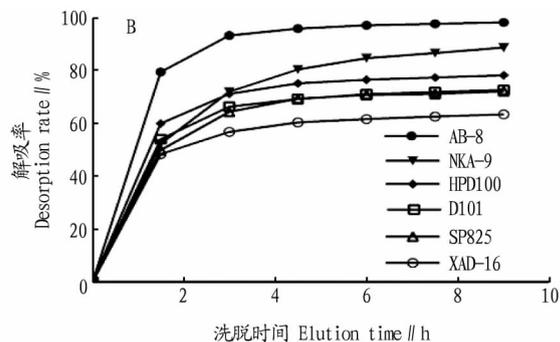
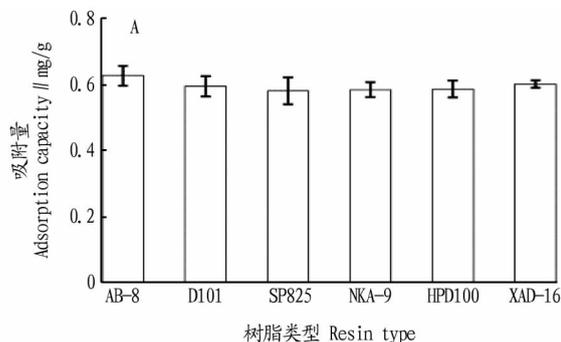


图2 大孔吸附树脂对红芸豆种皮花色苷的静态吸附量及解吸率比较

Fig. 2 Comparison of the results about static adsorption and desorption properties of red kidney bean anthocyanins by different resins

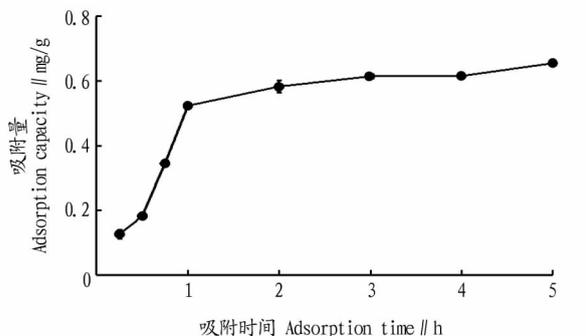


图3 AB-8大孔树脂对红芸豆种皮花色苷吸附动力学曲线

Fig. 3 Adsorption dynamics curve of macroporous resin AB-8 for anthocyanins from seed coat of red kidney bean

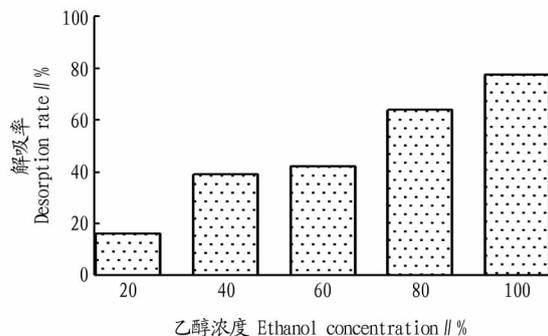


图5 乙醇浓度对AB-8树脂解吸红芸豆种皮花色苷解吸率的影响

Fig. 5 Effect of ethanol concentration on desorption ratio of AB-8 macroporous adsorption resin

2.2.3 上样流速对吸附效果的影响。由图4可见,上样流速越快,泄漏越快,吸附量越小,吸附效果越差。以9 BV/h的流速上样时,15 min即可达到吸附饱和,但AB-8树脂对红芸豆种皮花色苷的吸附量只有0.29 mg/g,以3 BV/h的流速上样时,达到吸附饱和和需要45 min,吸附量达0.59 mg/g,因此选择3.0 BV/h为最佳上样流速。

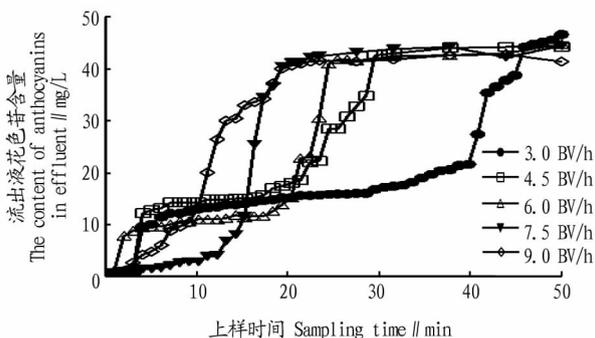


图4 不同上样流速下红芸豆种皮花色苷动态吸附泄漏曲线

Fig. 4 Breakthrough curve of dynamic adsorption of anthocyanins in seed coat of red kidney bean under different flow rate

2.2.4 乙醇浓度对解吸效果的影响。由图5可见,当洗脱液中乙醇浓度为100%时,洗脱速度最快,且动态解吸率最高达77.68%。20%乙醇洗脱速度慢,且动态解吸率最低为16.34%。选择100%酸性乙醇(pH 1.0)为最佳洗脱剂。

2.2.5 洗脱速率对解吸效果的影响。由图6可见,当洗脱体积达到8.0 BV时,9.0 BV/h流速下洗脱速度最快,40 min

洗脱完成。1.5 BV/h洗脱速度最慢,300 min才洗脱完成。由图7可见,解吸率随洗脱流速的增加呈先增大后降低的趋势,当流速为4.5 BV/h时解吸率最大为81.41%。综合分析选择4.5 BV/h为最佳洗脱流速,最小洗脱剂量为6.0 BV。

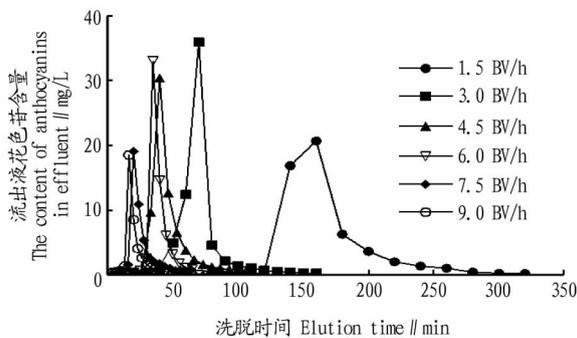


图6 不同流速下红芸豆种皮花色苷动态洗脱曲线

Fig. 6 Dynamic desorption curve of anthocyanins in seed coat of red kidney bean under different elution rates

2.2.6 花色苷纯度。红芸豆种皮花色苷提取液经AB-8大孔树脂柱层析纯化后,经30℃减压浓缩除去乙醇,再经冷冻干燥后成为暗红色粉末,经检测其纯度达86.05%。

2.3 纯化产物的HPLC分析 由图8可见,该试验条件下粗提物有6个主要组分峰。由图9可见,纯化产物有3个主要组分峰。图8与图9对比可知,经过AB-8大孔树脂纯化后,杂峰有效减少,同时发现保留时间超过50 min的2个组分峰显著减少,可能是由于这2种组分与大孔吸附树脂形成较强的分子间作用力,导致洗脱剂无法有效洗脱。

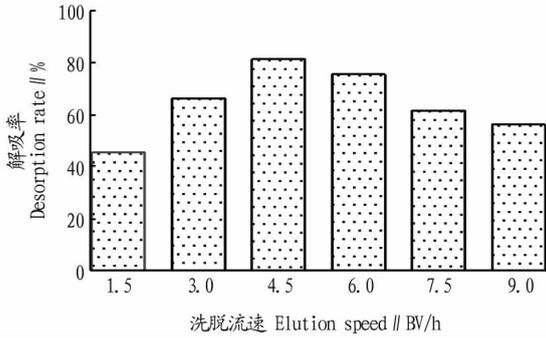


图7 洗脱流速对红芸豆种皮花色苷解吸率的影响

Fig.7 Effect of elution speed on desorption ratio of anthocyanins in seed coat of red kidney bean

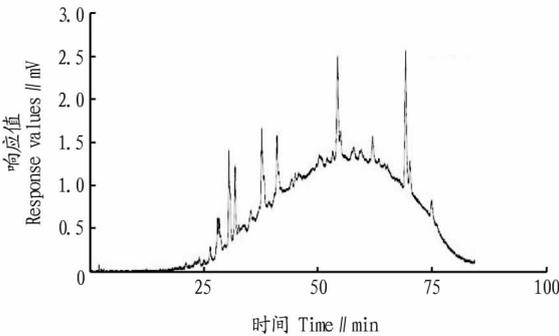


图8 红芸豆种皮花色苷提取物 HPLC 检测图谱

Fig.8 HPLC chromatograms of extrude extracts of anthocyanins from seed coat of red kidney bean

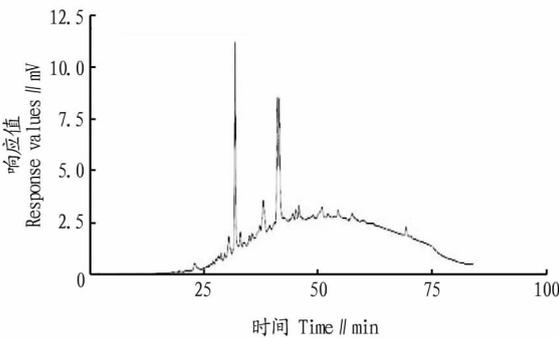


图9 纯化产物 HPLC 检测图谱

Fig.9 HPLC chromatograms of purified samples

3 结论

红芸豆种皮色泽艳丽,含有丰富的花色苷。花色苷作为天然色素具有食用安全性高、多种生理功能、色调自然等特点,因而在食品和保健品领域扮演重要的角色。该研究以红芸豆种皮为原料,研究和优化了大孔树脂柱层析纯化红芸豆种皮花色苷的方法,并对纯化产物的纯度和成分进行分析,

为红芸豆的开发利用提供了参考。

AB-8 大孔树脂对红芸豆种皮花色苷具有良好的吸附与解吸性能。采用 AB-8 大孔树脂柱层析法纯化红芸豆种皮花色苷时上样流速宜选择 3.0 BV/h,采用 100% 乙醇(浓盐酸调 pH 为 1.0)以 4.5 BV/h 洗脱 6 BV 时解吸率最高,产品纯度可达 86.05%。HPLC 对比分析提取物与纯化产物发现纯化效果明显。

参考文献

- [1] Andersen Ø M. Chemical studies of anthocyanins in plants: Isolation, qualitative and quantitative determination [D]. Bergen: University of Bergen, 1988.
- [2] ELISIA I, KITTS D D. Anthocyanins inhibit peroxyl radical-induced apoptosis in Caco-2 cells [J]. Molecular and cellular biochemistry, 2008, 312(1/2): 139-145.
- [3] ANDERSEN Ø M, MARKHAM K R. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications [M]. Boca Raton: CRC Press, 2005.
- [4] CASTAÑEDA-OVANDO A, DE LOURDES PACHECO-HERNÁNDEZ M, PÁEZ-HEMÁNDEZ M E, et al. Chemical studies of anthocyanins: A review [J]. Food chemistry, 2009, 113(4): 859-871.
- [5] ZAFRA-STONE S, YASMIN T, BAGCHI M, et al. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention [J]. Molecular nutrition & food research, 2007, 51(6): 675-683.
- [6] 晁刚, 杜双奎, 任美娟, 等. 常见杂豆的蛋白质与矿物质评价 [J]. 西北农业学报, 2013, 22(12): 31-35.
- [7] 吕春茂, 包静, 孟宪军, 等. HPD-700 型大孔树脂对野生越橘花色苷分离的研究 [J]. 食品科学, 2012, 33(10): 78-83.
- [8] 殷丽琴, 韦献雅, 钟成, 等. 不同品种彩色马铃薯总花色苷含量与总抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2014, 35(5): 96-100.
- [9] 郑红岩, 于华忠, 刘建兰, 等. 大孔吸附树脂对蓝莓花色苷的分离工艺 [J]. 林产化学与工业, 2014, 34(4): 59-65.
- [10] 吴丽莎, 王瑞欣, 吴志霜, 等. 水提紫甘薯色素废渣花色苷纯化工艺研究 [J]. 昆明医科大学学报, 2015, 36(1): 48-51.
- [11] 魏好程, 米聪, 王瑞芳, 等. 大孔树脂吸附法纯化紫薯花色苷的研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2015(8): 3186-3191.
- [12] 任萍, 袁晓雨, 赵晓萌, 等. 大孔树脂分离纯化紫甘蓝中的花色苷 [J]. 食品工业, 2016, 37(4): 1-6.
- [13] 李芳. 黑小豆种皮花色苷的提取、纯化及体外抗氧化活性研究 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2016.
- [14] JAMPANI C, NAIK A, RAGHAVARAO K S M S. Purification of anthocyanins from jamun (*Syzygium cumini* L.) employing adsorption [J]. Separation and purification technology, 2014, 125(7): 170-178.
- [15] MONTILLA E C, HILLEBRAND S, BUTSCHBACH D, et al. Preparative isolation of anthocyanins from Japanese purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) varieties by high-speed countercurrent chromatography [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2010, 58(18): 9899-9904.
- [16] 董周永, 阿嘎, 赵国建, 等. 大孔树脂对红心萝卜花色苷的纯化 [J]. 食品科学, 2011, 32(4): 21-24.
- [17] 刘剑俐, 刘晓, 曹向宇, 等. 稠李花色苷的纯化及体外抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2015, 36(15): 5-10.
- [18] 王仁雷, 周峰, 周泉澄, 等. 紫马铃薯花色苷的提取纯化与鉴定 [J]. 食品科学, 2011, 32(22): 55-59.
- [19] 曾绍校, 彭彬, 陈洁, 等. 大孔树脂纯化西番莲果皮花色苷工艺 [J]. 食品科学, 2013, 34(20): 61-66.
- [20] 吕春茂, 包静, 孟宪军, 等. HPD-700 型大孔树脂对野生越橘花色苷分离的研究 [J]. 食品科学, 2012, 33(10): 78-83.

科技论文写作规范——讨论

着重于研究中新的发现和重要方面,以及从中得出的结论。不必重复在结果中已评述过的资料,也不要模棱两可的语言,或随意扩大范围,讨论与文中无多大关联的内容。