

文章编号:1673-1689(2011)06-0852-05

大孔树脂吸附分离藿香蓟花蓝色素的研究

张桂玲, 谢宝东

(临沂大学 生命科学学院, 山东 临沂 276005)

摘要: 采用大孔树脂对藿香蓟花蓝色素的提取液进行了吸附和洗脱试验,并确定藿香蓟花蓝色素的分离最佳工艺条件。结果表明,D301树脂对藿香蓟花蓝色素的静态吸附率达到90 mg/g,吸附蓝色素的平衡时间较短且重复使用20次后吸附性能依然稳定;上柱优化条件为流速为3 mL/min,质量浓度为0.2 mg/mL,温度为20℃;柱层析饱和和吸附后用1 mol/L盐酸洗脱,洗脱率达到96.08%。

关键词: 藿香蓟;蓝色素;吸附分离;大孔树脂

中图分类号:TS 202.3

文献标识码:A

The Study on Adsorption and Separation of *Ageratum Conyzoides* Blue Pigment by Macroporous Resin

ZHANG Gui-ling, XIE Bao-dong

(College of Life Science, Linyi University, Linyi 276005, China)

Abstract: Adsorption on macroporous resin was studied as a method to separate *Ageratum conyzoides* Flowers blue pigment in this manuscript. The optimum conditions for adsorption and desorption of *Ageratum conyzoides* Flowers blue pigment was determined and listed as follows: D301 with the upper adsorption rate at 90.0mg/g, the stability and the little balance time was suitable for absorbing and separating *Ageratum conyzoides* Flowers blue pigment. The optimum condition was at the flow rate of 2.0mL/min, concentration of 0.2 mg/mL and the temperature of 20℃. D301 was washed with HCl of 2.0mol/L, and the washout rate achieved at 96.08%.

Key words: *Ageratum conyzoides*, blue pigment, adsorption and separation, resin

天然色素来源于自然界,具有安全性高、色泽自然鲜艳的特点,而且有些天然色素对人体的多种疾病的治疗、预防和保健等具有重要的意义。因此,天然色素替代化学合成色素势在必行^[1-2]。目前,对色素的研究大多集中在红、黄、黑等色素提取,而对蓝色素的提取及其稳定性研究的报道较

少,并且蓝色素提取材料主要集中在栀子^[3]、蓝藻、念珠藻、紫甘蓝和链霉菌方面^[4],提取材料的选择余地较小,限制了中国天然蓝色素的产量。如何开发提取天然蓝色素的材料来源,以及提取工艺的简化是当前蓝色素开发的一个重要课题。

藿香蓟(*Ageratum conyzoides*)为菊科藿香蓟

收稿日期:2010-10-08

基金项目:山东省自然科学基金项目(2009GG10007014)。

作者简介:张桂玲(1975-),女,黑龙江哈尔滨人,讲师,主要从事植物遗传育种研究。

Email:guilingzhang2003@126.com

属多年生草本植物,原产西非、南美洲热带,我国已引种栽培多年,主要用作花坛材料或盆栽观赏。藿香蓟株高约30~60 cm,植株基部多分枝,叶对生卵形,头状花序呈圆球状,花期7~11月,花色主要以蓝色和白色为主,另外,还有紫色和粉色,色素成分相当丰富,尤其蓝色素是良好的稀有天然色素资源。藿香蓟的药理功能表现为治疗腹泻、解热、止血、镇痛、神经疾病、传染病、哮喘、麻风病^[5];另外,藿香蓟可以治疗风湿、失眠症等^[6]。

藿香蓟花蓝色素的主要成分是花青苷,含有铁镁离子,易溶于乙醇和水等极性溶剂中。大孔树脂能除去粗提液中大量的糖类、蛋白质等成分,能使色素成分富集而提高色素品质,另外采用大孔树脂分离纯化色素工艺简单、再生方便、成本低廉。目前,关于藿香蓟花蓝色素的分离和纯化还没有相关报导。为此,本文采用大孔树脂对藿香蓟花蓝色素进行分离研究,优化分离工艺条件,旨在为藿香蓟蓝色素合理开发利用及安全生产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与试剂

1.1.1 材料 藿香蓟采自山东临沂苗圃

1.1.2 仪器 UV-9100型紫外可见光谱仪:北京瑞利产品;RE52-AA旋转蒸发器:上海亚荣生化试剂厂生产;LGJ0.5真空冷冻干燥机:北京四环科学仪器厂生产;5678恒流泵:上海精科实业有限公司生产;LRH-150-Z振荡培养箱:广东医疗器械厂产品。

1.1.3 试剂 蒸馏水、甲醇、乙醚、无水乙醇、丙酮、乙酸乙酯、1mol/L HCl、1mol/L NaOH;大孔树脂: D101、D113、D301;天津农药总厂产品;HPD100、HPD400、HPD600、HZ803、HZ816;沧州宝恩化工厂产品;AB-8树脂、X-5树脂:南开大学化工厂产品。新树脂按常规方法活化,试验中所用试剂均为化学纯。

1.2 试验方法

1.2.1 树脂提取藿香蓟花蓝色素工艺

藿香蓟花 $\xrightarrow{\text{酸水(pH2)}}$ 蓝色素提取液
 树脂吸附 水淋洗涤 $\xrightarrow{1\text{ mol/L HCl 解吸}}$ 解吸液
 减压浓缩 减压干燥 \rightarrow 藿香蓟花蓝色素干品

注:提取液为酸化乙醇(体积分数95%乙醇:1mol/L盐酸=90:10(V:V))。

1.2.2 藿香蓟花蓝色素溶液的制备方法 准确称取本工艺纯化的色素样品,溶解于0.1 mol/L HCl

并定容,得到蓝色素溶液。

1.2.3 藿香蓟花蓝色素吸收光谱 按照“1.2.2”方法配制0.2 mg/mL蓝色素溶液50 mL,吸取一定量该溶液用UV-9100型紫外可见光谱仪在400~610 nm内扫描得到该蓝色素的吸收光谱^[7-9]。

1.2.4 静态吸附筛选树脂试验 选用了10种不同的树脂各5.0 g,分别加入2.0 mg/mL蓝色素溶液250 mL,恒温振荡6 h,分别测定吸附前后样品的 A_{590} ,用回归方程计算吸附后浓度,计算静态吸附量^[10]。

吸附量(mg/g)=(初始质量浓度-吸附后质量浓度)/树脂重量 \times 色素液体积

1.2.5 树脂不同静态吸附时间试验 称取14份5.0 g活化“1.2.4”筛选出来的树脂置于烧杯中,分别加0.2 mg/mL蓝色素溶液100 mL,恒温搅拌,吸附时间依次为0、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160 min,到规定时间测定吸附后蓝色素的 A_{590} ,计算吸附率。吸附率=100 \times ($A_0 - A_e$)/ A_0 ,其中, A_0 为色素溶液的初始吸光度, A_e 为溶液平衡后色素溶液的吸光度^[11]。

1.2.6 蓝色素上柱条件的研究 称取5.0 g活化的“1.2.4”筛选出来的树脂上柱(50 mm \times 30 mm)。上柱条件:体积流量(mL/min)分别为2、3、4、5、6,温度分别20、30、40、50 $^{\circ}\text{C}$,蓝色素质量浓度分别为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL;测定各种条件下1000 mL流出液的 A_{590} ,计算总吸光度值(总 A_{590} = A_{590} \times 体积数)。

1.2.7 洗脱剂对蓝色素的静态洗脱试验 取称8份4 g已吸附藿香蓟花蓝色素的树脂,分别加入5倍体积的洗脱剂蒸馏水、甲醇、乙醚、无水乙醇、丙酮、乙酸乙酯、1 mol/L HCl、1mol/L NaOH;振荡洗脱时间4 h,过滤,测定各种洗脱液 A_{590} ,计算色素洗脱率。洗脱率(%)=总 A_{590} 后/总 A_{590} 前 \times 100,式中总 A_{590} 前一树脂已吸附的藿香蓟花蓝色素量。

1.2.8 树脂的重复使用性能试验 称取5.0 g活化的“1.2.4”筛选出来的树脂上柱。取0.2 mg/mL蓝色素溶液100 mL测定 A_{590} ,然后取该色素溶液50 mL进行流动吸附,控制体积流量为3 mL/min,重复吸附次数设定为2、4、6、8、10、12、14、16、18、20,测其流出液吸光度,计算吸附率。

2 结果与分析

2.1 藿香蓟花蓝色素吸收光谱

从图1中可以看出藿香蓟花蓝色素最大吸收

峰在 590nm 处,说明此色素的花色素苷是飞燕草色素,它是形成蓝色花的主要色素。

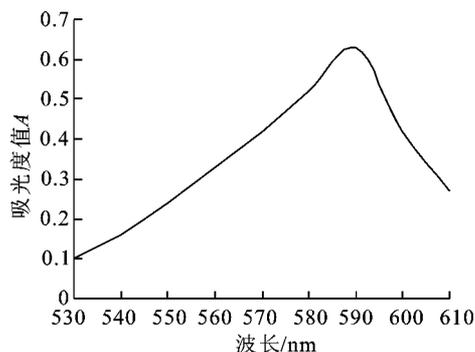


图1 藜香蓟花蓝色素光谱曲线

Fig. 1 Absorptive spectrogram of solution of blue pigment

2.2 不同树脂对蓝色素吸附量的影响

参照党蕊叶^[9]标准曲线制作方法:吸取蓝色素

溶液 1、3、5、8、10、12 和 14 mL,用 0.1 mol/L HCl 稀释至 50 mL,测量溶液的吸光度值。蓝色素浓度在一定范围内与吸光度 A 呈一元线性关系,用最小二次相乘法计算回归方程,来计算浓度。通过 SAS 软件分析线性方程为 $y=2.747x+0.067$ (y 代表溶液的吸光度值, x 代表溶液浓度),相关系数为 $r=0.9920$ 。从表 1 经 F 测验 ($F_{0.01(9,20)}=37.65^{**}$)、多重比较中可以看出不同树脂对蓝色素的吸附量有很大的影响,其中 D301 树脂的吸附量最高 (90.00 mg/g),显著高于其他 9 种树脂;AB-8 与 X-5 差异不显著 (分别为 83.35 mg/g 和 82.95 mg/g),仅次于 D301;HPD600 的吸附量最低为 63.80 mg/g。前期试验发现 D301 树脂的解吸率与 AB-8 与 X-5 相当,因而色素获得率最高,且 D301 树脂价格较低,因而 D301 树脂是最佳的吸附剂。

表 1 不同树脂对蓝色素吸附

Tab. 1 Adsorption blue pigment with different resins

树脂名称	A_{590} (吸附前)	A_{590} (吸附后)	吸附前质量浓度/ (mg/mL)	吸附后质量浓度/ (mg/mL)	树脂质量/ g	色素溶液 体积/mL	吸附量/ (mg/g)
D101	5.561	1.359	2	0.470	5	250	76.50c
D113	5.561	2.034	2	0.716	5	250	64.20f
D301	5.561	0.667	2	0.218	5	250	90.00a
HPD100	5.561	1.756	2	0.615	5	250	69.25de
HPD400	5.561	1.637	2	0.572	5	250	71.40d
HPD600	5.561	2.057	2	0.724	5	250	63.80f
HZ803	5.561	2.008	2	0.707	5	250	64.65ef
HZ816	5.561	2.006	2	0.706	5	250	64.70ef
AB-8	5.561	0.981	2	0.333	5	250	83.35b
X-5	5.561	1.003	2	0.341	5	250	82.95b

2.3 不同静态吸附时间对 D301 树脂吸附率的影响

由图 2 可知,D301 树脂静态吸附蓝色素的平衡时间较短,约 120 min 即可达到平衡,平衡后吸附率基本保持不变,因此可选用 D301 树脂分离栀子藜香蓟花蓝色素。

2.4 蓝色素上柱(D301 树脂)条件的研究

表 3 表明,色素溶液浓度、溶液上柱流速、上柱温度以及它们之间的互作均对 D301 树脂吸附性能有影响,经 F 测验均达到极显著水平(流速 $F_{0.01(4,200)}=24.258.80^{**}$;浓度 $F_{0.01(4,200)}=12.558.20^{**}$;温度 $F_{0.01(3,200)}=10.822.20^{**}$;流速、浓度、温度三者互作 $F_{0.01(48,200)}=55.88^{**}$)。三者中,流速影响最大,其次是浓度,温度影响相对较小。

多重比较(见表 4)结果表明树脂的吸附量随流速增加而降低,如果流速过大,大量蓝色素还没来

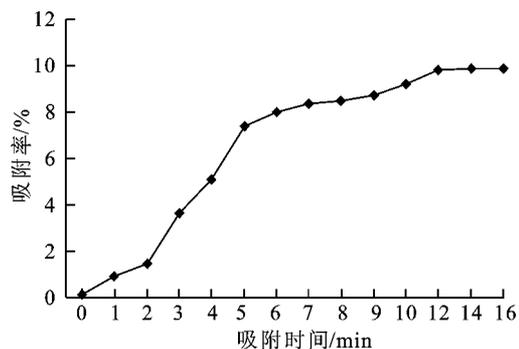


图 2 D301 对藜香蓟花蓝色素的静态吸附时间与吸附率的关系

Fig. 2 Relations between adsorption time of D301 resin and adsorption rate

得及被树脂吸附就提前漏掉,但流速过小,吸附时间延长使得树脂再生困难,树脂寿命降低^[12-13],因此流速应控制在适宜的范围内,我们选择体积流量为 3 mL/min。色素浓度是影响树脂吸附性能的重

要因素之一,色素浓度过高则泄漏点提早,树脂吸附总量减少,降低了吸附效果,如果色素浓度偏低,则工作效率降低,树脂吸附杂质质量增大,加大了色素与杂质分离的难度^[14-16],色素质量浓度为 0.2 mg/mL 时,树脂对色素的吸附量最大。温度对树脂吸附性能影响相对较小,30 °C 效果最好,但由于色素在高温下容易被氧化而褪色,所以本工艺选用在常温下进行吸附。综合各种因素最佳组合为:体积流量为 3 mL/min,质量浓度为 0.2 mg/mL,温度为 20 °C。

表 3 色素溶液质量浓度、体积流量与上柱温度对 D301 树脂吸附性能的影响

Tab. 3 Effect of adsorptive capability of D301 resin with different velocity of flow, concentration and temperature

体积流量/ (mL/min)	温度/(°C)	色素溶液质量浓度/(mg/mL)				
		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
2	20	632	781	820	528	410
	30	875	998	839	582	436
	40	620	771	821	508	390
	50	521	645	532	467	300
3	20	754	828	719	660	506
	30	776	895	738	684	538
	40	655	728	619	562	404
	50	555	631	520	460	305
4	20	525	618	507	462	306
	30	670	740	631	582	427
	40	565	638	529	484	326
	50	460	536	429	380	226
5	20	615	626	576	504	386
	30	635	708	632	552	402
	40	580	530	479	402	280
	50	450	428	379	302	186
6	20	404	376	277	205	89
	30	480	428	379	302	183
	40	196	278	179	99	6
	50	100	180	81	4	2

表 4 色素溶液浓度、流速与上柱温度多重比较表

Tab. 4 Comparison with different velocity of flow, concentration and temperature

体积流量/ (mL/min)	均值	质量浓度/ (mg/mL)	均值	温度/ °C	均值
3	627aA	0.2	618aA	30	603aA
2	624bA	0.1	553bB	20	525bB
4	502cB	0.3	533cC	40	466cC
5	482dC	0.4	437dD	50	363dD
6	212eD	0.5	305eE		

2.5 洗脱剂对 D301 树脂饱和吸附后静态洗脱的影响

洗脱剂对 D301 树脂吸附的藿香蓟花蓝色素洗脱率影响很大(见图 3)。其中 1 mol/L HCl 洗脱率高达 96.08%,极显著高于其他 7 种洗脱剂的洗脱率,其次是 1mol/L NaOH,洗脱率 34.65%,其他 6 种洗脱剂洗脱效果很差,结果说明 1mol/L HCl 对 D301 树脂蓝色素洗脱效果最好。

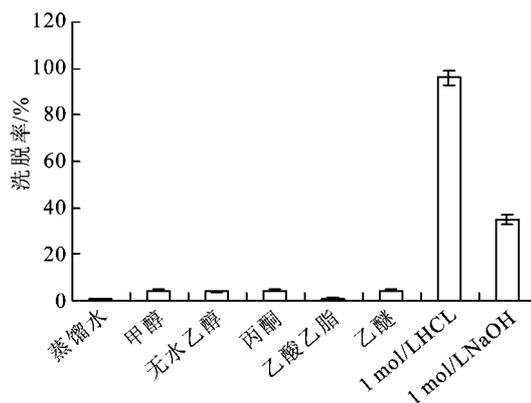


图 3 不同洗脱剂对蓝色素洗脱率的影响

Fig. 3 Elution effect of *Ageratum conyzoides* blue pigment with different eluents

2.6 D301 树脂的重复使用性能研究

D301 树脂重复循环使用 20 次后,流出液的光度变化较小(见表 5)。说明 D301 树脂重复使用性能好,使用 20 次后吸附率仅降低 1.13%,说明 D301 树脂对藿香蓟花蓝色素的吸附较好。综上所述,利用树脂法提取藿香蓟花蓝色素,用 D301 树脂吸附色素吸附率高,解吸容易。

表 5 D301 树脂使用次数与吸附率的关系

Tab. 5 Relations between times of using D301 resin and adsorption rate

吸附次数	A ₅₉₀ (吸附前)	A ₅₉₀ (吸附后)	吸附率/%
2	0.616	0.153	75.16
4	0.616	0.028	95.45
6	0.616	0.029	95.29
8	0.616	0.027	95.62
10	0.616	0.025	95.94
12	0.616	0.026	95.78
14	0.616	0.028	95.45
16	0.616	0.022	96.43
18	0.616	0.021	96.59
20	0.616	0.160	74.03

3 结 语

D301 交换树脂吸附量高,吸附蓝色素的平衡时

间较短,重复使用 20 次后吸附性能依然稳定;藿香蓟花蓝色素溶液流速、浓度及温度对 D301 交换树脂吸附性能有影响,体积流量为 3 mL/min、质量浓度为 0.2 mg/mL、温度为 20 °C 进行吸附,效果最佳;在进行洗脱试验时 1 mol/L HCl 盐酸溶液作为洗脱剂,洗脱率达到 96.08%。D301 大孔树脂是弱

碱性阴离子树脂,用这种树脂分离酸性生物活性物质,理论上其洗脱在碱性条件下效果更好,但本试验结果与之不同,本试验 1mol/L HCl 洗脱率高于 1mol/L NaOH 的,这个结果与李佳春等(2005)研究的结果一致。

参考文献(References):

- [1] 杨秀娟,赵晓燕,马越,等.花青素研究进展[J].中国食品添加剂,2005(4):40-42.
YANG Xiu-juan, ZHAO Xiao-yan, MA Yue, et al. The advancement of anthocyanins[J]. *China Food Additives*, 2005(4): 40-42. (in Chinese)
- [2] 徐清,戴思兰.蓝色花卉分子育种[J].分子植物育种,2004,1(2):93-99.
XU Qing-yu, DAI Si-lan. Blue Flowers' Molecular Breeding[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2004, 1(2):93-99. (in Chinese)
- [3] 李佳春,梁华正,吴志梅,李媛.大孔树脂分离纯化栀子蓝色素的研究[J].食品科技,2005,(7):50-53.
LI Jia-chun, LIANG Hua-zheng, WU Zhi-mei, LI Yuan. Investigation on isolation and purifying of gardenia blue pigment with D301 ion exchange resin[J]. *Food Science and Technology*, 2005,(7):50-53. (in Chinese)
- [4] 冯亚非,温燕梅,李先文.藻蓝—富有营养保健功能的天然色素[J].食品科技,2007(6):171-173.
FENG Ya-fei, WEN Yan-mei, LI Xian-wen. Spirulina blue-natural pigment with nutrition and health function[J]. *Food Science and Technology*, 2007(6):171-173. (in Chinese)
- [5] 钟渊隽.菊科植物藿香蓟成分和生物效应研究[D].杭州:浙江大学,2006.
- [6] Guttenson N. Anthocyanin biosynthetic genes and their application to flower color modification through sense suppression [J]. *Hort Sci*, 1995,30:964-966.
- [7] 姜平平,吕晓玲,朱惠丽.花色苷类物质分离鉴定方法[J].中国食品添加剂,2003(4):108-111.
JIANG Ping-ping, LV Xiao-ling, ZHU Hui-li. Review of isolation and identification methods of anthocyanins[J]. *China Food Additives*, 2003(4):108-111. (in Chinese)
- [8] 张廉奉,赵丽凤.紫色甘蓝天然色素的提取及其性质研究[J].南阳师范学院学报,2005,4(3):51-53.
ZHANG Lian-feng, ZHAO Li-feng. Study on extraction of a kind of natural pigment purple wild cabbage[J]. *Jourol of Nanyang Teachers' College*, 2005,4(3):51-53. (in Chinese)
- [9] 党蕊叶,权清转.大孔吸附树脂纯化矮牵牛花红色素[J].西北农业学报,2005,14(3):145-147.
DANG Rui-ye, QUAN Qing-zhuan. Adsorbing and separating petunia red pigment by resin[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentails Sinica*, 2005, 14(3):145-147. (in Chinese)
- [10] 赵彦杰.蓝靛果紫红色素的提取及其理化性质研究[J].食品科学,2006,10(27):276-278.
ZHAO Yan-jie. Extraction and Characteristic of Purplish Red Pigment from *Lonicera caerulea*[J]. *Food Science*, 2006,10(27):276-278. (in Chinese)
- [11] 姚增玉,赵忠,史清华,等.山杏种皮黑色素提取工艺研究[J].西北农林科技大学学报,2007,35(5):120-126.
YAO Zeng-yu, ZHAO Zhong, SHI Qing-hua, et al. Isolation of melanin from testae of *Prunus ameniaea* Linn[J]. *Journal of Northwest A & F University(Nat. Sci. Ed.)*, 2007,35(5):120-126. (in Chinese)
- [12] 唐克华,于华忠,熊玉双.二乔木兰花红色素的微波辅助提取工艺与特性[J].食品科学,2006,27(10):391-394.
TANG Ke-hua, YU Hua-zhong, XIONG Yu-shuang. Study on the microwave-assisted extraction of red pigments from *magnolia soulangeana* flower and its properties[J]. *Food Science*, 2006,27(10):391-394. (in Chinese)
- [13] JEE-EUN PARK, et al. Isolation and characterization of water-soluble intermediates of blue pigments transformed from geniposide of *gardenia jasminoides*[J]. *J Agric Food Chem*, 2002,50:6511-6514.
- [14] 王光全,孟庆杰,郭尚敬,等.紫叶稠李叶中总黄酮含量的研究[J].食品科学,2006,27(10):335-337.
WANG Guang-quan, MENG Qing-jie, GUO Shang-jing, et al. Study on the total flavonoids content in leaves of *prunus virgiana*[J]. *Food Science*, 2006,27(10):335-337. (in Chinese)
- [15] 郭立佳,陶文沂,徐锋,等.HZ818树脂在紫杉醇初分离工艺中的应用[J].食品与生物技术学报,2006,25(5):40-43.
GUO Li-jia, TAO Wen-yi, XU Feng, et al. The application of HZ818 macroreticular resin in pretreatment of taxol preparation[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006,25(5):40-43. (in Chinese)