

大孔树脂纯化蓝莓中花青素工艺的研究

孙倩怡¹, 蔡恩博¹, 夏玉婷², 鲁宝君², 张 晶^{1*}

1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

2. 杭州睦山农实业投资有限公司, 浙江 杭州 311604

摘要:目的 建立并优化大孔树脂法纯化蓝莓花青素的最佳工艺条件, 为蓝莓花青素工业化生产提供参考。方法 选用 HPD-600、HPD-100A、DM130、D4020、D3520 5 种大孔树脂, 比较蓝莓花青素粗提物在其上的静态吸附及解吸效果, 筛选适合蓝莓花青素纯化的大孔树脂, 通过单因素实验和正交试验分析蓝莓花青素样液质量浓度、pH 值、吸附体积流量、洗脱液乙醇体积分数、乙醇用量及洗脱体积流量对树脂吸附-解吸的影响。结果 D3520 大孔树脂是纯化蓝莓花青素的最佳树脂, 当大孔树脂上样量(g)与蓝莓花青素的上样量(mL)为 1:5 时, 最佳工艺为蓝莓花青素样液 pH 3, 质量浓度为 1.0 mg/mL, 吸附体积流量为 2.0 mL/min 时, 吸附率为 92.82%; 洗脱液乙醇体积分数为 70%; 洗脱体积流量为 2.0 mL/min, 洗脱液用量为 60 mL, 解吸率为 91.58%。结论 纯化后的蓝莓花青素色价提高了 11 倍, 纯化后花青素的质量分数为 96.17%, 纯度提高了 5 倍, 花青素的得率为 14.271%, 此工艺有效地提高了蓝莓花青素的纯化效率, 适用于蓝莓花青素日后的工业化生产。

关键词: 蓝莓; 花青素; 纯化效果; 大孔树脂; 色价; 正交试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)22-4668-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.22.012

Purification of anthocyanins from blueberry using macroporous resin

SUN Qian-yi¹, CAI En-bo¹, XIA Yu-ting², LU Bao-jun², ZHANG Jing¹

1. College of Chinese Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. Hangzhou Mu Mountain Industrial Investment, Hangzhou 311604, China

Abstract: **Objective** The separation and purification of anthocyanin from blueberry was studied to determine the optimum purification conditions. **Methods** Static adsorption and desorption analytical test was conducted to screen the best macroporous resin from HPD-600, HPD-100A, DM130, D4020, and D3520 for purification of anthocyanins from blueberry. Effects of the sample liquid concentration, pH, adsorption flow rate, eluent ethanol concentration, eluent ethanol amount, and elution flow rate were investigated through dynamic adsorption-desorption test by single factor and orthogonal experiments. **Results** D3520 resin was the most effective resin for adsorption and desorption of anthocyanins from blueberry, when the amount of macroporous resin (g) and the amount of anthocyanin from blueberry (mL) was 1:5. The optimal conditions were as follows: The concentration of sample was 1.0 mg/mL, adsorption flow rate was 2.0 mL/min, and sample solution pH value was 3. Under the optimal conditions, eluent ethanol concentration 70%, elution flow rate 2.0 mL/min, eluent ethanol amount 60 mL, and the adsorption rate and desorption rate can reach 92.82% and 91.58% respectively. **Conclusion** The color value of purified products under the optimized conditions was increased by 11 times; The purity fraction of anthocyanin was 96.17% and the purity was increased by 5 times; And the yield of anthocyanin was 14.271%. This process effectively improves the efficiency of anthocyanin from blueberry purification, which is suitable for the future production of anthocyanin from blueberry.

Key words: blueberry; anthocyanins; purification effect; macroporous resin; color price; orthogonal test

蓝莓又称越橘 *Vaccinium vitis-idaea* Linn., 为杜鹃花科 (Ericaceae) 越橘属 *Vaccinium* Linn. 植物, 果实多呈蓝色。越橘属植物资源丰富, 其浆果中富

含花青素, 蓝莓中的花色素量尤其高。花青素不仅是一种天然着色剂, 其还具有抗肿瘤^[1]、抗突变、抗炎、抗氧化等多种生理功能^[2-3], 在食品、化妆品、

收稿日期: 2017-05-31

基金项目: 吉林省科技发展规划项目 (20140204063YY); 杭州市钱江学者计划 (2015 年)

作者简介: 孙倩怡 (1992—), 女, 硕士在读, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: 764615935@qq.com

*通信作者 张 晶 (1971—), 女, 博士, 教授, 主要从事天然产物化学与新药开发研究。E-mail: zhjing0701@163.com

医药等领域有着巨大的应用价值^[4]。目前市场上的蓝莓以原料应用居多,而其花青素的产品中,花青素的纯度都较低,而杂质的存在会降低花青素自身的稳定性,使其发生降解。因此,提高蓝莓花青素的纯度将利于花青素的深入研究和开发应用。冯颖等^[5]使用 X-5 大孔树脂纯化无梗五加果花色苷,得到了色价为 35.2 的花青素。张赛男等^[6]使用 HPD-100 大孔树脂纯化玫瑰茄花色苷,得到了色价为 38.5 的花青素。王宏等^[7]选用 AB-8 大孔树脂来纯化黑枸杞中的花青素,发现纯化后的花青素纯度较高。对于蓝莓花青素纯化方法的研究已有文献报道^[5-7],但是得到的花青素色价和纯度较低,本实验将对不同的大孔树脂进行筛选,优选出最适合纯化蓝莓花青素的树脂和与其相对应的最佳工艺,以期蓝莓花青素工业化生产工艺的建立及优化提供理论依据。

1 材料与仪器

蓝莓由杭州睦山农实业投资有限公司提供,由吉林农业大学中药材学院张晶教授鉴定为杜鹃花科越橘属 *Vaccinium* Linn. 浆果类植物果实,具体品种为杭州兔眼蓝莓 *Vaccinium ashei* Reade, 蓝莓鲜果避光匀浆后,冻干成粉状, -20 ℃ 避光保存,待用。对照品矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷,质量分数>98%,四川省维克奇生物科技有限公司,批号 150823;对照品飞燕草色素-3-*O*-葡萄糖苷(批号 ZES-0938)、锦葵色素-3-*O*-葡萄糖苷(批号 ZES-0911S),质量分数≥95%,上海斯信生物科技有限公司。

无水乙醇、盐酸、氢氧化钠均为分析级;色谱甲醇,购于赛默飞世尔科技有限公司;大孔吸附树脂 HPD-600、HPD-100A、DM130、D4020、D3520,购于沧州宝恩吸附材料科技有限公司。

T6 新世纪紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;PL303 电子分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;Telstar LyoQuest 冷冻干燥机、Thermo Fisher ST 16R 高速冷冻离心机,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;PB-10 酸度计,德国赛多利斯公司;KQ5200DB 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;THZ-82A 水浴恒温振荡器,金坛市荣华仪器制造有限公司;Waters2695-996 高效液相色谱仪,Acquity UPLC-Class Bio 系统,UV 检测器,沃特世科技(上海)有限公司。

2 方法与结果

2.1 供试品蓝莓花青素粗提液的制备

取蓝莓冻干粉 10.000 g,按照料液比 1:30 加

入酸化的乙醇(70%乙醇-1 mol/L 盐酸 9:1),超声提取 3 次,30 min/次,合并 3 次提取液,8 000 r/min 离心 15 min,取上清液减压浓缩,除去乙醇,得花青素粗提液,用蒸馏水定容于 100 mL 量瓶中。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷对照品 1.0 mg,用甲醇定容至 5 mL,摇匀,备用。

2.3 蓝莓花青素定量测定

2.3.1 标准曲线的绘制 从对照品溶液中分别取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 于试管中,取 2 组,均用甲醇定容至 1 mL,其中的 1 组以 pH 1.0 的缓冲液定容至 5 mL;另外 1 组以 pH 4.5 的缓冲液定容至 5 mL,将 2 组梯度对照品溶液分别于 530 nm 和 700 nm 测定其吸光度(A)值,按公式计算 $A_{\text{实际}}$,以 $A_{\text{实际}}$ 为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,得回归方程为 $Y=4.757\ 1\ X-0.009\ 71$, $R^2=0.999\ 3$,线性范围 0.02~0.12 mg/mL。

$$A_{\text{实际}}=(A_{530}-A_{700})_{\text{pH}\ 1.0}-(A_{530}-A_{700})_{\text{pH}\ 4.5}$$

2.3.2 蓝莓花青素的定量测定 取“2.1”项下制备的供试品溶液 1 mL,分别加入 pH 1.0 和 pH 4.5 的缓冲溶液,按“2.3.1”项测定 A 值,按标准曲线计算总花青素质量浓度,按公式计算花青素量。

$$\text{花青素量}=C\times V_1\times V_2/V_3$$

$$\text{花青素得率}=C\times V_2/M$$

C 为花青素质量浓度, V_1 为供试液体积, V_2 为提取液总体积, V_3 为待测液体积, M 为蓝莓干粉的质量

2.3.3 方法学考察 参照文献方法^[8]进行,结果得到精密度的 RSD 值为 0.86%($n=6$),稳定性的 RSD 值为 0.87%($n=6$),重复性的 RSD 值为 1.42%($n=6$),加样回收率的 RSD 值为 1.82%($n=6$)。

2.4 大孔树脂的筛选

2.4.1 大孔树脂的预处理 称取一定量的大孔树脂用 95%乙醇溶液浸泡 24 h 后,用蒸馏水洗至中性无醇味;再用 3% HCl 水溶液浸泡 3 h 后,用蒸馏水洗至中性;最后用 3% NaOH 溶液浸泡 3 h,用蒸馏水洗至中性,备用。

2.4.2 大孔树脂的静态吸附比较 准确称取预处理好的 5 种供试大孔树脂各 2.000 g(用滤纸吸干表面水份),分别置于锥形瓶中,各加入 10 mL 的蓝莓花青素粗提液,封口,置于恒温摇床(25 ℃、100 r/min)振荡吸附 3 h,分别测定 5 种大孔树脂吸附后蓝莓花青素粗提液的 A 值(A_1),按以下公式计算吸附率。结果见表 1。

表1 树脂的吸附解吸结果

Table 1 Resin adsorption and desorption results

树脂型号	吸附率/%	解吸率/%
HPD-600	75	73
HPD-100A	84	82
DW130	80	78
D4020	89	88
D3520	92	90

$$\text{吸附率} = (A_0 \times V_0 - A_1 \times V_1) / (A_0 \times V_0)$$

A_0 为吸附前样液的吸光度, V_0 为吸附前样液的体积, A_1 为吸附后样液的吸光度, V_1 为吸附后样液的体积

2.4.3 大孔树脂的静态解吸比较 准确取 2.000 g 吸附有蓝莓花青素的 5 种供试大孔树脂, 分别置于锥形瓶中, 分别加入 10 mL 的体积分数为 70% 乙醇溶液, 用封口膜封口, 置于恒温摇床 (25 °C、100 r/min) 振荡解吸 3 h, 然后分别测定解吸后每个锥形瓶中液体的 A 值 (A_2), 按以下公式计算解吸率。结果见表 1。

$$\text{解吸率} = A_2 \times V_2 / (A_0 \times V_0 - A_1 \times V_1)$$

A_2 为解吸后样液的吸光度, V_2 为解吸后样液的体积

由表 1 可以看出, D3520 树脂与其他树脂相比, 无论是吸附和解吸解吸效果都是最佳的, 因此选择具有最佳吸附与解吸性能的 D3520 型号的树脂对蓝莓花青素进行后续的纯化。

2.5 D3520 大孔树脂动态吸附、解吸因素分析

称取活化后的 D3520 大孔树脂 2.000 g 装柱, 以吸附率为优化指标, 对蓝莓花青素上样质量浓度、吸附体积流量、蓝莓花青素粗提液 pH 值等影响因素进行分析。

2.5.1 蓝莓花青素样液质量浓度对树脂吸附率的影响 分别取 1.0、1.33、1.67、2.0、2.33 mL 的蓝莓花青素粗提液, 分别用水定容至 10 mL, 使其质量浓度分别为 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mg/mL, 5 个样品溶液上样体积流量均为 2 mL/min, 进行动态吸附实验, 通过其吸附前后 A 值的变化, 计算吸附率, 结果分别为 85.51%、87.64%、89.33%、84.78%、78.42%, 可以看出随着样液质量浓度的增加, 吸附率先增加后降低, 当质量浓度为 1.0 mg/mL 时, 吸附率出现最大值, 吸附达到饱和状态, 随着质量浓度继续增加, 相应的杂质也会增加, 从而阻碍了色素在树脂中的扩散, 使其吸附率降低^[5-6]。因此蓝莓花青素的样液质量浓度为 1.0 mg/mL 最佳。

2.5.2 吸附体积流量对树脂吸附率的影响 取 5 份

pH 3.0 的蓝莓花青素粗提液 2 mL, 分别用水定容至 10 mL, 控制 5 个柱子的体积流量分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL/min, 进行动态吸附试验, 通过其吸附前后 A 值的变化, 计算吸附率, 结果分别为 90.13%、91.67%、92.34%、89.72%、88.45%, 可以看出随着吸附体积流量的逐渐增加, 吸附率先增加后降低, 吸附体积流量为 2.0 mL/min 的时候, 吸附率出现最大值, 当吸附体积流量小于 2.0 mL/min 的时候, 吸附率降低可能是因为柱子上层树脂吸附过饱和, 反而使其树脂结构部分被破坏, 导致其吸附率降低; 当吸附体积流量大于 2.0 mL/min 时, 吸附率呈大幅度下降趋势, 可能是因为吸附体积流量过快的时候, 花青素来不及扩散到树脂内部, 花青素流失, 导致其吸附率降低^[5-6], 因此吸附体积流量为 2.0 mL/min 最佳。

2.5.3 蓝莓花青素粗提液 pH 值对树脂吸附率的影响 取 4 份蓝莓花青素粗提液 2 mL, 分别用水定容至 10 mL, 调节其 pH 值分别为 1.0、2.0、3.0、4.0, 控制上样体积流量均为 2.0 mL/min, 进行动态吸附试验, 通过其吸附前后 A 值的变化, 计算吸附率, 结果分别为 84.32%、88.49%、92.73%、83.46%, 可以看出随着 pH 值的不断增加, 吸附率先增加后降低, 当 pH 为 3.0 的时候, 吸附率出现最大值, 可能是因为花青素在酸性条件下最稳定, 且当 pH 为 3.0 的时候, 样液的极性更接近树脂的极性, 使得吸附率最高^[5-6], 因此蓝莓花青素上样液的最佳 pH 值为 3.0。

2.5.4 正交试验 在单因素实验的基础上, 选取花青素上样质量浓度 (A)、吸附体积流量 (B)、pH 值 (C) 为影响因素进行正交试验 (表 2)。结果由表 2、3 可以看出, D3520 树脂的最佳吸附条件是 $A_1B_2C_2$, 由极差分析可知影响程度大小依次为 pH 值 > 吸附体积流量 > 样液质量浓度。故综上所述, D3520 大孔树脂的最佳吸附条件是样液质量浓度为 1.0 mg/mL, 上样体积流量为 2.0 mL/min, 蓝莓花青素上样液 pH 值为 3.0。

2.5.5 洗脱体积流量对树脂解吸率的影响 以不同体积分数的乙醇作为洗脱液, 称取吸附饱和的 D3450 大孔树脂各 2 g 装柱, 以解吸率为优化指标, 对洗脱体积流量、洗脱液的用量和乙醇体积分数 3 个因素进行分析。先用 50 mL 蒸馏水进行冲洗, 然后用 60 mL 70% 乙醇冲洗, 控制 5 个柱子的体积流量分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL/min, 进行动态解吸实验, 通过其解吸前后 A 值的变化, 计算解

表 2 动态吸附 $L_9(3^4)$ 正交试验设计结果Table 2 Results of dynamic adsorption $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

试验号	A/ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	B/ ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	C	D (误差)	吸附率/%
1	1.0 (1)	1.5 (1)	2 (1)	(1)	80.63
2	1.0 (1)	2.0 (2)	3 (2)	(2)	92.82
3	1.0 (1)	2.5 (3)	4 (3)	(3)	82.17
4	1.2 (2)	1.5 (1)	4 (3)	(2)	90.52
5	1.2 (2)	2.0 (2)	2 (1)	(3)	84.38
6	1.2 (2)	2.5 (3)	3 (2)	(1)	77.45
7	1.4 (3)	1.5 (1)	3 (2)	(3)	82.47
8	1.4 (3)	2.0 (2)	4 (3)	(1)	78.96
9	1.4 (3)	2.5 (3)	2 (1)	(2)	83.21
K_1	255.62	253.62	237.04	248.22	
K_2	252.35	256.16	266.55	252.74	
K_3	244.64	242.83	249.02	251.65	
R	10.98	13.33	29.51	4.52	

表 3 动态吸附方差分析结果

Table 3 Verification results of orthogonal experiment

变异来源	平方和	自由度	F 值	显著性
A	21.188 6	2	5.712 3	
B	33.396 1	2	9.003 4	
C	146.851 3	2	39.590 4	$P<0.05$
D (误差)	3.709 3	2		

吸率,结果分别为 88.61%、90.12%、91.34%、89.09%、83.44%,可以看出随着洗脱体积分数的增加,解吸率先增加后降低,当洗脱体积分数为 2.0 mL/min 时,解吸率出现最大值,当流速较慢的时候,乙醇对花青素与树脂之间的冲击力较弱,乙醇分子与花青素分子之间的作用力较花青素与树脂之间的作用力小,不能将花青素从树脂上完全冲洗下来;当流速过快的时候,也不利于花青素类物质的解吸,原因是流速过快时解吸液不能与被吸附的花青素充分作用而将其从树脂上解吸出来^[9-11],因此最佳的洗脱体积分数为 2.0 mL/min。

2.5.6 洗脱液用量对树脂解吸率的影响 控制洗脱体积分数为 2.0 mL/min,先用 50 mL 蒸馏水进行冲洗,然后用 70%乙醇作为洗脱液进行冲洗,每 5 min 收集 1 次洗脱液,进行动态解吸试验,通过其解吸前后 A 值的变化,计算解吸率,结果分别为 76.41%、82.11%、87.71%、91.27%、90.83%、91.33%,可以看出随着洗脱液用量的增加,解吸率逐渐增加,当洗脱液用量为 60 mL 时,解吸率开始趋于稳定状态,

之后随着洗脱液用量的增加,解吸率便一直处于平稳状态^[9-11],因此最佳的洗脱液用量为 60 mL。

2.5.7 乙醇体积分数对树脂解吸率的影响 控制洗脱体积分数为 2.0 mL/min,先用 50 mL 蒸馏水进行冲洗,然后分别用 60 mL 体积分数为 30%、40%、50%、60%、70%、80%的乙醇冲洗对应的柱子,进行动态解吸试验,通过其解吸前后 A 值的变化,计算解吸率,结果分别为 73.53%、82.06%、85.67%、88.79%、92.07%、88.41%,可以看出随着乙醇体积分数的增加,解吸率先增加后降低,当乙醇体积分数为 70%时,解吸率出现最大值,因为当乙醇溶液与花青素分子间的作用力和树脂与花青素分子间的作用力处于某种状态的时候,树脂中的花青素便转移到乙醇溶液中,而一旦这种作用力不处于平衡状态,将会导致解吸率降低^[9-11],因此最佳的乙醇体积分数为 70%。

2.5.8 正交试验 在单因素实验基础上,选取乙醇体积分数(A)、洗脱体积分数(B)、洗脱液用量(C)为影响因素进行正交试验,由表 4、5 可以看出,D3520 树脂的最佳解吸条件是 $A_2B_3C_1$,由极差分析可知影响程度大小为洗脱体积分数>洗脱液用量>乙醇体积分数。综上所述,最佳解吸条件是洗脱液为 70%乙醇,洗脱体积分数为 2.0 mL/min,洗脱液用量为 60 mL。

2.6 HPLC 法分析纯化前后蓝莓花青素提取物

对纯化前后蓝莓花青素进行成分分析,HPLC

表 4 动态解吸 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果Table 4 Results of dynamic desorption $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

试验号	A/%	B/($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	C/mL	D (误差)	解吸率/%
1	60 (1)	1.0 (1)	60 (1)	(1)	80.76
2	60 (1)	1.5 (2)	70 (2)	(2)	84.19
3	60 (1)	2.0 (3)	80 (3)	(3)	87.45
4	70 (2)	1.0 (1)	80 (3)	(2)	76.51
5	70 (2)	1.5 (2)	60 (1)	(3)	86.67
6	70 (2)	2.0 (3)	70 (2)	(1)	91.58
7	80 (3)	1.0 (1)	70 (2)	(3)	75.42
8	80 (3)	1.5 (2)	80 (3)	(1)	86.12
9	80 (3)	2.0 (3)	60 (1)	(2)	81.55
K_1	252.40	232.69	258.46	248.98	
K_2	254.76	256.98	242.25	251.19	
K_3	243.09	260.58	249.54	250.08	
R	11.67	27.89	16.21	2.21	

表 5 动态解吸方差分析结果

Table 5 Verification results of orthogonal experiment

变异来源	平方和	自由度	F 值	显著性
A	25.381 6	2	31.180 5	$P < 0.05$
B	153.424 0	2	188.476 5	$P < 0.01$
C	43.941 6	2	53.980 9	$P < 0.05$
D (误差)	0.814 0	2		

分析条件: Lichrospher5-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 流动相为甲醇-5%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 15%甲醇; 5~10 min, 20%甲醇; 10~25 min, 25%甲醇; 25~45 min, 30%甲醇; 45~50 min, 70%甲醇; 50~65 min, 15%甲醇。检测波长为 530 nm, 体积流量为 0.5 mL/min, 进样量为 10 μL。结果由图 1 可知, 纯化后的蓝莓花青素有 13 种成分, 与对照品峰对比可知峰 2 为飞燕草色素-3-*O*-葡萄糖苷, 峰 5 为矢车菊色素-3-*O*-葡萄糖苷, 峰 12 为锦葵色素-3-*O*-葡萄糖苷。对比提取物纯化前后的 HPLC 谱图, 纯化前峰 2、5、12 的峰面积百分量分别占到总量的 2.27%、0.47%、3.26%; 纯化后峰 2、5、12 的峰面积百分量分别占到总量的 4.08%、1.94%、5.57%; 明显看出经 D3520 大孔树脂纯化后, 蓝莓花青素各峰所占比例及其质量分数都有较大的提高。

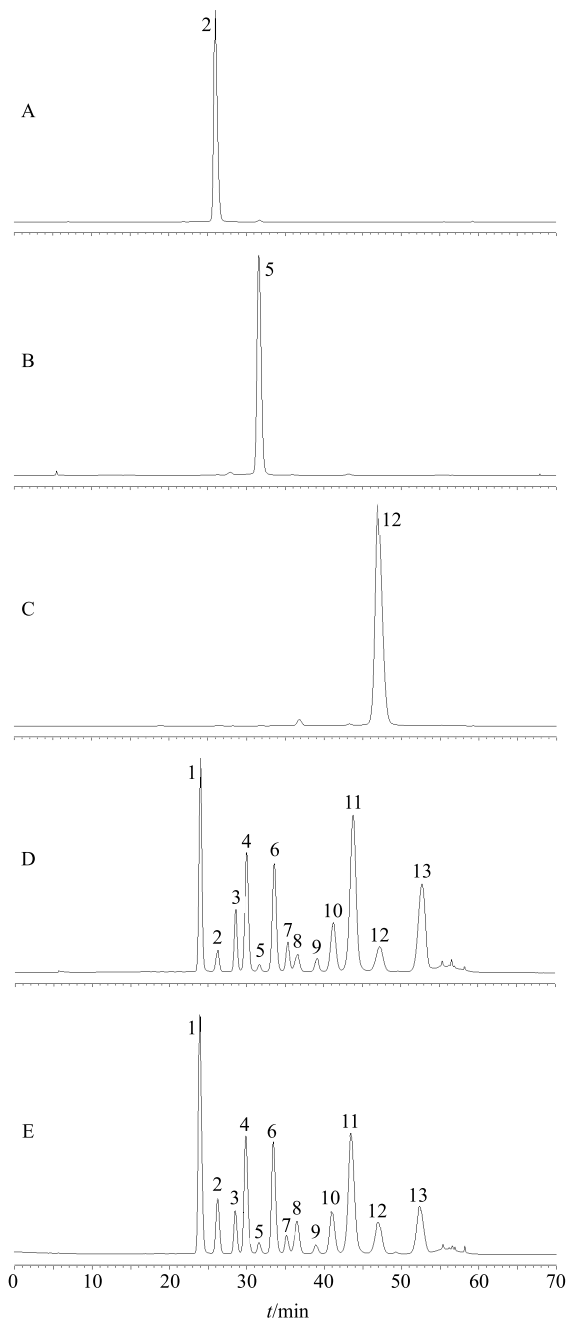
2.7 蓝莓花青素色价纯度的测定

取纯化后的蓝莓花青素溶液, 除去乙醇, 用冷冻干燥机进行冻干, 得纯化后的花青素粉末, 采用色价表示, 称取纯化前后的蓝莓花青素粉末 10.0 mg, 用 pH 3.0 的盐酸水溶液定容于 100 mL 量瓶中, 以 pH 3.0 的盐酸水溶液为空白对照, 在 520 nm 下测得 A 值, 根据公式 $E=A/m$ (其中 E 为色价, m 为蓝莓花青素粉末质量) 进行纯化前后色价的计算, 根据公式计算纯化前后质量分数, 结果可以看出采用 D3520 大孔吸附树脂在最佳工艺的条件下纯化蓝莓花青素, 纯化后的蓝莓花青素色价为 58.6, 原蓝莓花青素提取物的色价为 5.37, 色价约提高了 11 倍, 纯化前花青素的质量分数为 18.13%, 纯化后花青素的质量分数为 96.17%, 质量分数提高了 5 倍。

$$\text{纯化前花青素质量分数} = m_1/m_2$$

$$\text{纯化后花青素质量分数} = m_3/m_4$$

m_1 为实验测得的蓝莓花青素粗提液中花青素的质量, m_2 为蓝莓花青素粗提物干燥后的粉末质量, m_3 为实验测得的蓝莓花青素纯化后的花青素的质量, m_4 为蓝莓花青素纯化干燥后的粉末质量



2-飞燕草色素-3-*O*-葡萄糖苷 5-矢车菊色素-3-*O*-葡萄糖苷 12-锦葵色素-3-*O*-葡萄糖苷
2-delphinidin-3-*O*-glucosidechloride 5-cyanidin-3-*O*-glucosidechloride
12-malvidin-3-*O*-glucosidechloride

图 1 对照品 (A~C)、纯化前 (D) 及纯化后 (E) 蓝莓花青素的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of reference substances (A—C), blueberry anthocyanin before (D) and after (E) purification

2.8 最佳工艺验证

取 3 份取蓝莓冻干粉 10.000 g, 按照“2.1”项制备方法进行制备, 得花青素提取液, 按最佳工艺条件进行验证, 分别选用 D3520 型大孔树脂, 花青

素上样质量浓度为 1.0 mg/mL; 吸附体积流量为 2.0 mL/min; 样液 pH 3.0; 洗脱液为 70%乙醇; 洗脱体积流量为 2.0 mL/min; 洗脱液用量 60 mL, 计算样品纯化工艺参数。验证试验结果发现经纯化后蓝莓花青素的质量分数分别为 95.78%、96.17%、96.82%, 平均为 96.26%, 平均得率为 14.183%。

3 讨论

本实验采用大孔树脂吸附法对蓝莓花青素粗提取物进行纯化研究, 选用大孔树脂进行纯化得到的提取物不仅具有不吸潮, 工艺简单, 成本相对较低等优点, 同时树脂可反复使用适合工业化生产^[12-19]。通过静态吸附-解吸实验, 对 HPD-600、HPD-100A、DM130、D4020、D3520 5 种大孔树脂树脂进行筛选, 得到 D3520 树脂对蓝莓花青素的吸附-解吸效果最佳。通过对比纯化前后的蓝莓花色苷提取物的色价, HPLC 谱图的相应峰面积值可以看出, 蓝莓花青素经 D3520 纯化后的色价明显升高, 纯度增加, 说明 D3520 大孔树脂有利于蓝莓花青素的纯化。与目前广泛使用的 AB-8 大孔吸附树脂^[19-26]比较, 相同处是都是通过吸附-解析原理达到纯化的目的; 不同处是 D3520 大孔吸附树脂吸附-解吸率与 AB-8 大孔吸附树脂吸附-解吸率相比能提高约 13%左右, 且经 D3520 大孔吸附树脂纯化后的蓝莓花青素色价能提高 11 倍, 纯化前花青素的质量分数为 18.13%, 纯化后花青素的质量分数为 96.17%。D3520 树脂纯化效果更好的原因可能是由于该树脂的苯乙烯型共聚体结构比较符合蓝莓花青素 C₆-C₃-C₆ 的结构特性^[26-30]。

工艺筛选中, 虽然样液浓度、吸附体积流量、洗脱液乙醇浓度等因素对吸附-解析都有一定程度的影响, 但影响相对于树脂类型和 pH 的影响较小。目前国内的关于花青素纯化方面的研究不是很多, 还处于起步阶段, 因此, 关于花青素的纯化方法有着更广泛的研究价值。

本实验选用 D3520 作为最佳吸附树脂来进行蓝莓花青素的纯化实验, 得到最佳的纯化工艺为花青素上样质量浓度为 1.0 mg/mL, 吸附体积流量为 2.0 mL/min, 样液 pH 3.0; 洗脱液为 70%乙醇, 洗脱体积流量为 2.0 mL/min, 洗脱液用量 60 mL, 在此实验条件下, 不论从花青素的色价或是纯度等方面考虑, 蓝莓花青素的纯化效果都是最好的, 此工艺得到的蓝莓花青素色价较高, 为其日后的应用有较大的参考价值。

参考文献

- [1] 唐丽萍, 杨艳梅, 李艳凤, 等. 越橘提取物抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖及诱导其凋亡的实验研究 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1120-1122.
- [2] 孟宪军, 邵春霖, 毕金峰, 等. 国内外蓝莓加工技术研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(8): 172-175.
- [3] 王艳春, 任 旷, 顾饶胜, 等. 越橘中原花青素抑制新生大鼠心肌成纤维细胞增殖及其作用机制 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1280-1284.
- [4] Jing P, Ruan S Y, Dong Y, et al. Optimization of purification conditions of radish (*Raphanus sativus* L.) anthocyanin-rich extracts using chitosan [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2011, 44(10): 1-7.
- [5] 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.
- [6] 张赛男, 李林福, 陈毅勇, 等. 玫瑰茄花色苷纯化工艺优化研究 [J]. 粮油食品科技, 2015, 23(5): 55-60.
- [7] 王 宏, 付燕秋, 韩 静, 等. AB-8 大孔树脂吸附黑枸杞中花青素行为研究 [J]. 林产化学与工业, 2016, 36(4): 79-86.
- [8] 罗 华, 林 丽, 晋 玲, 等. UV 法测定黑河流域不同产地黑果枸杞中花青素的含量 [J]. 现代中药研究与实践, 2015(3): 24-27.
- [9] 李明瑾, 林松毅, 王二雷, 等. 笃斯越橘笃斯越桔花青素的分离纯化研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(11): 139-141.
- [10] 赵贝塔, 赵 巍, 刘邻渭, 等. 大孔树脂纯化酸石榴汁中花青素的研究 [J]. 西北农林科技大学学报, 2014, 42(10): 199-204.
- [11] Tong K S, Kassim M J, Azraa A. Adsorption of copper(II) from its aqueous solution by a novel biosorbent *Uncaria gambir*: Equilibrium, kinetics, and thermodynamic studies [J]. *Chem Eng J*, 2011, 170(1): 145-153.
- [12] 李颖畅. 蓝莓花色苷提取纯化及生理功能研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2008.
- [13] 何春喜, 余泽义, 何毓敏, 等. 竹节参总皂苷的大孔吸附树脂纯化与离子交换树脂脱色工艺研究 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1146-1152.
- [14] Toki K, Saito N, Irie Y, et al. 7-O-methylated anthocyanidin glycosides from *Catharanthus roseus* [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(5): 1215-1219.
- [15] Kong J M, Chia L S, Goh N K, et al. Analysis and biological activities of anthocyanins [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(5): 923-933.
- [16] Zhang J, Ding C X, Wang L S, et al. Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild *Lycium ruthenicum* Murr. from Qinghai-Tibet Plateau [J]. *Food*

- Chem*, 2011, 126(3): 859-865.
- [17] Liu T X, Cao Y N, Zhao M M. Extraction optimization, purification and antioxidant activity of procyanidins from hawthorn (*C. pinnatifida* Bge. var. *major*) fruits [J]. *Chin J Microecol*, 2010, 119(4): 1656-1662.
- [18] 张金花, 刘陶世, 程建明, 等. 多指标综合评分优选大孔树脂分离纯化三拗缓释片提取液工艺研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(2): 255-261.
- [19] Charpe T W, Rathod V K. Separation of glycyrrhizic acid from licorice root extract using macroporous resin [J]. *Food Bioprod Process*, 2015, 93(1): 51-57.
- [20] Du Z, Wang K, Tao Y, *et al.* Purification of baicalin and wogonoside from *Scutellaria baicalensis* extracts by macroporous resin adsorption chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 2012, 908(22): 143-149.
- [21] Xiong Q P, Zhang Q H, Zhang D Y, *et al.* Preliminary separation and purification of resveratrol from extract of peanut (*Arachis hypogaea*) sprouts by macroporous adsorption resins [J]. *Food Chem*, 2014, 145(15): 1-7.
- [22] Zou S P, Liu M, Wang Q L, *et al.* Preparative separation of echinocandin B from *Aspergillus nidulans* broth using macroporous resin adsorption chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 978/979(26): 111-117.
- [23] Chandrasekhar J, Madhusudhan M C, Raghavarao K S M S. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption [J]. *Food Bioprod Process*, 2012, 90(4): 615-623.
- [24] Lopes T J, Quadri M G N, Quadri M B. Recovery of anthocyanins from red cabbage using sandy porous medium enriched with clay [J]. *Appl Clay Sci*, 2007, 37(1/2): 97-106.
- [25] Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, *et al.* Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- β -D-glucoside and cyanidin [J]. *J Agr Food Chem*, 1994, 42(11): 2407-2410.
- [26] Schwarz M, Hillebrand S, Habben S, *et al.* Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins [J]. *Biochem Eng J*, 2003, 14(3): 179-189.
- [27] Müller D, Schantz M, Richling E. High performance liquid chromatography analysis of anthocyanins in bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), and corresponding juices [J]. *J Food Sci*, 2012, 77(4): 340-345.
- [28] Cuevas-Rodríguez E O, Yousef G G, García-Saucedo P A, *et al.* Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in wild and domesticated Mexican blackberries (*Rubus* spp.) [J]. *J Agr Food Chem*, 2010, 58(12): 7458-7464.
- [29] Bunea A, Rugin A D, Scon T A N, *et al.* Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells [J]. *Phytochemistry*, 2013, 95(6): 436-444.
- [30] Kammerer D R, Carle R, Stanley R A, *et al.* Pilot-scale resin adsorption as a means to recover and fractionate apple polyphenols [J]. *J Agr Food Chem*, 2010, 58(11): 6787-6796.