

文章编号:1673-1689(2009)04-0496-05

大孔树脂纯化蓝莓果中花色苷的研究

李颖畅^{1,2}, 郑凤娥², 孟宪军^{*2}

(1. 渤海大学生物与食品学院, 辽宁锦州 121000; 2. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110161)

摘要: 比较了 10 种大孔树脂对蓝莓花色苷的吸附和解吸效果, 研究了 AB-8 型大孔树脂对蓝莓花色苷的吸附与解吸条件。结果表明, AB-8 型大孔树脂是纯化蓝莓花色苷效果较好的树脂; 蓝莓花色苷在 AB-8 型树脂上的吸附平衡时间为 4 h, 解吸平衡时间为 2 h, 吸附的最适质量浓度为 750 mg/L; 30 ℃, pH 3.0 时吸附能力比较强, 解吸时宜选用体积分数 60 % 乙醇溶液。该工艺生产的花色苷产品为紫黑色粉末, 色价为 54.10, 回收率为 88.20 %。

关键词: 蓝莓果; 花色苷; 大孔树脂

中图分类号: TQ 325

文献标识码: A

Studies on Purification of Anthocyanins from Blueberry Fruits by Macroporous Resins

LI Ying-chang^{1,2}, ZHENG Feng-e², MENG Xian-jun^{*2}

(1. College of Biology and Food Science, Bohai University, Jinzhou 121000, China; 2. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

Abstract: The adsorption and desorption effects of ten kinds of macroporous resins to blueberry anthocyanins were carefully investigated. Among of them, AB-8 macroporous resins exhibited the excellent characteristics for blueberry anthocyanins purification and then further explored. It was found that the time of absorption and desorption equilibrium was 4 h and 2 h, respectively, and the concentration of absorption equilibrium was 750 mg/L. At the conditions of pH 3.0 and 30 ℃, the highest adsorption ability for blueberry anthocyanins was achieved, and 60 % ethanol solution was used to desorpt the anthocyanins blueberry from AB-8 macroporous resins. By combination of those optimum conditions, a purplish dark powder with colour value 54.10 anthocyanins was achieved with 88.20% of the recovery rate.

Key words: blueberry, anthocyanins, macroporous resins

收稿日期: 2008-04-17

基金项目: 辽宁省科技厅基金项目(41302-53102-222-100036)。

作者简介: 李颖畅(1973-), 女, 辽宁朝阳人, 工学博士, 副教授, 主要从事天然产物功效成分研究。

Email: liyingchangsy@126.com

* 通讯作者: 孟宪军(1960-), 男, 内蒙古赤峰人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品制造与保藏研究。

Email: mengxjysy@126.com

蓝莓(blueberry),又称越橘、蓝浆果,属杜鹃花科越橘属多年生落叶或常绿灌木。蓝莓果实呈深蓝色,近圆形,含有丰富的花色苷。花色苷是花青素与糖以糖苷键结合而成的一类化合物,具有促进视红素再合成、抗炎症、提高免疫力、抗心血管疾病、抗衰老、抗癌等多种生理功能,在食品、药品、化妆品等领域有着广阔的应用前景^[1-3]。国内外对蓝莓花色苷的研究主要集中在其生理功能方面^[2-6],对其纯化研究较少。目前对花色苷类化合物纯化的方法主要有大孔树脂吸附精制法、超滤法及高速逆流色谱法,其中大孔树脂吸附精制法以效率高、质量稳定、成本低且操作简单易行等特点而成为当前分离纯化天然化合物的主要方法^[7]。用大孔树脂纯化萝卜色素^[8]、蜀葵花色苷^[9]等已有文献报道,但有关纯化蓝莓花色苷的研究尚未见报道。作者选用10种不同类型吸附树脂对蓝莓果中花色苷粗提物进行吸附解吸,从中筛选出较为适合蓝莓果中花色苷分离纯化的树脂类型,并对其吸附和解吸性能进行研究,为蓝莓花色苷在食品、药品领域的开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 蓝莓果:沈阳市双翼果业生产示范基地提供,7月中旬采收。

1.1.2 试剂 无水乙醇、盐酸、氢氧化钠、柠檬酸、柠檬酸钠:均为分析纯试剂;树脂:AB-8、X-5、S-8,天津南开大学化工厂产品;HPD-100、HPD-300、HPD-450、HPD-600、HPD-700:河北沧州宝恩化工有限公司产品;DA-201、DM-301:天津海光有限公司产品。

1.1.3 仪器 7200型可见分光光度计:上海尤尼柯有限公司产品;UV-1600型紫外可见分光光度计:北京瑞利分析仪器公司产品;pHS-25型酸度计:上海理达仪器厂产品;电热恒温水浴锅:常州国华电器有限公司产品;RE-52型旋转蒸发器:上海博通经贸有限公司产品;SHZ-III B型循环水真空泵:上海华琦科学仪器有限公司产品;HZQ-F全温振荡培养箱:哈尔滨市东联电子技术开发有限公司产品;DZF-6050型真空干燥箱:上海精宏仪器设备有限公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 蓝莓花色苷粗提物的制备 取一定量蓝莓果,破碎,用pH 3.0体积分数的60%乙醇溶液按1g:15 mL的比例混合均匀,于40℃下浸提2 h后

抽滤,收集滤液,40℃减压浓缩得到红色粘稠的粗提液。

1.2.2 蓝莓花色苷吸收光谱的测定和工作曲线的制作 用pH 3.0的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制少量花色苷溶液,在400~750 nm范围内对其进行波长扫描,得到花色苷的吸收光谱图。

准确称取蓝莓花色苷粉末,用pH 3.0的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液定容,根据比耳定律制作花色苷的工作曲线。

1.2.3 最佳树脂类型的筛选

1)树脂预处理:10种大孔树脂分别用无水乙醇浸泡24 h,充分溶胀,用无水乙醇淋洗直至洗出液加适量水无白色浑浊为止,再用去离子水洗至无醇,吸干树脂中水分。

2)树脂吸附率和解吸率的测定:准确称取预处理大孔树脂若干份,每份2 g,置于100 mL三角瓶中,用pH 3.0的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液稀释花色苷粗提物,波长520 nm测其吸光值 A_0 。分别取其50 mL加入到盛有2 g树脂的三角瓶中,置恒温振荡器上30℃、110 r/min振荡24 h,充分吸附后,过滤,测滤液吸光值 A_1 ,向滤出的树脂中加入50 mL、pH 3.0的体积分数60%乙醇溶液,30℃、110 r/min振荡24 h,充分解吸后过滤,测滤液的吸光值 A_2 ,计算吸附率 α 和解吸率 β 。

$$\alpha = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$$

$$\beta = A_2 / (A_0 - A_1) \times 100\%$$

1.2.4 蓝莓花色苷在AB-8树脂上吸附平衡时间的测定 测定pH 3.0的花色苷稀释液吸光值 A_0 ,取其50 mL放入100 mL三角瓶中,加入预处理树脂2 g,置振荡器上30℃、110 r/min振荡,每30 min测定溶液的吸光度 A_t ,以 $(A_0 - A_t) / A_0 \times 100\%$ 表示吸附率,对时间作图,绘制静态吸附动力学曲线。

1.2.5 蓝莓花色苷在AB-8树脂上解吸平衡时间的测定 称取吸附花色苷饱和树脂2 g,加入pH 3.0的体积分数为60%的乙醇溶液50 mL,置振荡器上30℃、110 r/min振荡,每30 min取0.5 mL花色苷解吸液,稀释10倍,测定吸光值,对时间作图,绘制静态解吸动力学曲线。

1.2.6 蓝莓花色苷在AB-8树脂上的吸附等温线 准确称取预处理的大孔树脂若干份,每份2 g,置于100 mL三角瓶中,加入不同质量浓度的花色苷溶液50 mL,置振荡器上110 r/min振荡4 h,吸附平衡后测定溶液的平衡质量浓度,计算吸附量,以吸附量对平衡质量浓度作图,绘制吸附等温曲线。

1.2.7 pH值对AB-8树脂吸附的影响 将一定量的花色苷粗提物用缓冲溶液配制成不同pH值的花色苷溶液,测定吸光值 A_0 ,分别取其50 mL放入盛有2 g树脂100 mL三角瓶中,30 ℃、110 r/min振荡4 h,取上清液于520 nm处测定吸光值 A_1 ,计算吸附率。

1.2.8 温度对AB-8树脂吸附的影响 测定pH 3.0的花色苷稀液吸光值 A_0 ,取其50 mL放入100 mL三角瓶中,加入预处理过的树脂2 g,不同温度下110 r/min振荡4 h,然后取上清液于520 nm处测定吸光值 A_1 ,计算吸附率。

1.2.9 乙醇体积分数对AB-8树脂解吸的影响 取吸附花色苷饱和的树脂2 g若干份,加入体积分数为20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的pH 3.0乙醇溶液50 mL,30 ℃、110 r/min振荡2 h,取洗脱的花色苷溶液1 mL,用pH 3.0的柠檬酸-柠檬酸钠溶液定容到25 mL容量瓶中,520 nm处测定吸光值,以吸光值表示花色苷的解吸量。

1.2.10 蓝莓花色苷回收率和色价的测定 精确称取自制的花色苷产品0.05 g,用pH 3.0的柠檬酸缓冲液定容至100 mL容量瓶中,稀释至一定倍数,在520 nm处测定其吸光值,用公式色价 $=A \times r/W$ 计算色价,式中 A 为吸光度, W 为样品的质量(g), r 为测定吸光度时所吸取样品的稀释倍数^[10]。

回收率(%)=实际回收花色苷质量/理论回收花色苷质量 $\times 100\%$ ^[11]

1.2.11 数据分析 试验均重复3次,取平均值,采用DPS统计软件进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 蓝莓花色苷吸收光谱和工作曲线

由图1可知,蓝莓花色苷在pH 3.0的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中,在520 nm处有一最大吸收峰,该吸收峰是花色苷的特征峰(465~560 nm)^[12]。由图2可知,在pH 3.0的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中吸光度与花色苷质量浓度成很好的线性关系,标准曲线方程 $A = 3.3502C - 0.0073$, $R^2 = 0.9996$ (A 为吸光度, C 为花色苷质量浓度(mg/mL))。

2.2 大孔树脂对蓝莓花色苷吸附和解吸特性比较

从表1可以看出,不同类型的树脂对花色苷的吸附程度不同,吸附率比较高的是非极性HPD300、HPD100、HPD700和弱极性的AB-8,均可达到70%以上,可能原因是花色苷类物质属于弱极性化合物,但又有一定的极性和亲水性,因此有利于弱极

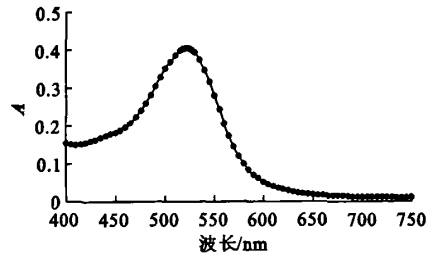


图1 蓝莓花色苷吸收光谱图

Fig. 1 Spectrum of absorption of blueberry anthocyanins

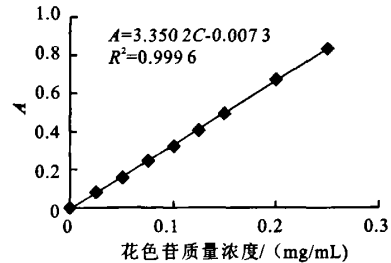


图2 蓝莓花色苷的工作曲线

Fig. 2 Standard curve equation of blueberry anthocyanins

性或非极性树脂的吸附。此外,其吸附能力大小还与表面积等关系密切。同时解吸率也是衡量大孔树脂纯化天然产物的重要技术参数之一,而解吸率比较好的X-5、HPD-600、AB-8、S-8,综合吸附率和解吸率两个参数,认为AB-8类型树脂是比较好的吸附树脂,故以下试验重点考察AB-8大孔树脂对蓝莓花色苷的纯化效果。

表1 不同大孔树脂对蓝莓花色苷静态吸附和解吸性能

Tab. 1 Absorption and desorption capabilities of the different macroporous resins to blueberry anthocyanins

树脂类型	吸附率/%	解吸率/%
HPD-100	78.22 \pm 0.54 ^b	58.15 \pm 1.01 ^c
HPD-300	82.44 \pm 0.84 ^a	50.18 \pm 0.74 ^e
HPD-450	68.63 \pm 1.09 ^d	56.55 \pm 1.22 ^c
HPD-600	64.05 \pm 0.58 ^f	63.75 \pm 1.05 ^b
HPD-700	76.91 \pm 0.51 ^b	52.48 \pm 1.35 ^f
AB-8	75.24 \pm 1.29 ^c	62.04 \pm 1.48 ^{bc}
DA-201	57.56 \pm 0.74 ^a	58.53 \pm 0.84 ^{de}
DM-301	57.68 \pm 0.82 ^a	54.37 \pm 1.51 ^f
X-5	66.97 \pm 0.47 ^c	66.40 \pm 1.39 ^a
S-8	49.52 \pm 1.15 ^b	60.32 \pm 1.04 ^{cd}

注:不同小写字母差异显著($P < 0.05$),相同小写字母差异不显著($P > 0.05$)。

2.3 蓝莓花色苷在 AB-8 大孔树脂上的吸附动力学曲线

从图 3 可以看出:在开始的一段时间内,AB-8 树脂对花色苷的吸附率在逐渐增大。随着时间的延长,吸附逐渐达到饱和,当吸附 4 h 时,AB-8 树脂对花色苷的吸附达到平衡,吸附率增加很少。

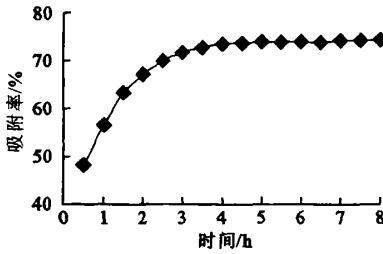


图 3 AB-8 大孔树脂对花色苷吸附动力学曲线

Fig. 3 Absorption dynamics curves of AB-8 macroporous resins to blueberry anthocyanins

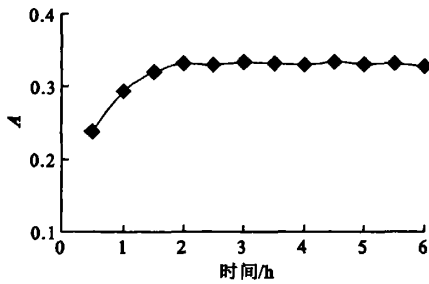


图 4 AB-8 大孔树脂对花色苷解吸动力学曲线

Fig. 4 Desorption dynamics curves of AB-8 macroporous resins to blueberry anthocyanins

2.4 蓝莓花色苷在 AB-8 大孔树脂上的解吸动力学曲线

从图 4 可以看出:在开始的一段时间内,蓝莓花色苷的吸光度在逐渐增加;当解吸时间 2 h 时,解吸基本达到平衡,花色苷的吸光度不再增加。

2.5 蓝莓花色苷在 AB-8 大孔树脂上的吸附等温曲线

图 5 吸附等温线可知,花色苷溶液在大孔吸附树脂上的吸附等温线有明显的拐点,属于多分子层吸附。随着溶液质量浓度的增加,树脂对花色苷的吸附量逐渐增大。在低质量浓度下,花色苷在 AB-8 大孔吸附树脂上是单分子层吸附,由于花色苷分子中存在大量羟基,当花色苷分子在吸附树脂表面吸满一层后,溶液中花色苷分子还可通过分子间作用力与吸附树脂表面吸附的花色苷分子结合,从而表现为多分子层吸附,由图 5 可知,最适的质量浓度应为 750 mg/L。

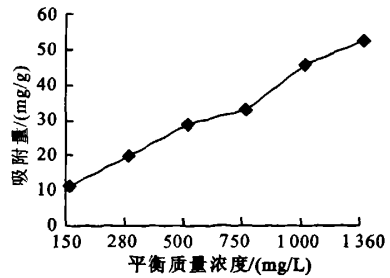


图 5 蓝莓花色苷的吸附等温线

Fig. 5 Adsorption isotherm of AB-8 macroporous resins to blueberry anthocyanins

2.6 pH 值对 AB-8 大孔树脂吸附的影响

从图 6 可以看出:pH 值对 AB-8 树脂的吸附率影响比较大,随着 pH 值升高,花色苷吸附率降低。这可能是因为花色苷在不同 pH 值溶液中其存在的 4 种结构形式比例不同而造成极性差异影响了吸附率。pH 3.0 时花色苷的吸附率与 pH 2.0、pH 1.0 时花色苷的吸附率无显著差异,pH 2.0、pH 1.0 时花色苷的糖基容易水解,造成花色苷不稳定,选择 pH 3.0。

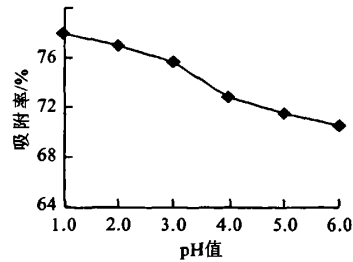


图 6 pH 值对蓝莓花色苷吸附的影响

Fig. 6 Effect of pH value on adsorption to blueberry anthocyanins

2.7 温度对 AB-8 大孔树脂吸附的影响

从图 7 可以看出,花色苷吸附率随温度的升高呈先降低然后又升高的趋势,这是因为在温度较低时,花色苷相对比较稳定,温度升高使树脂对花色苷的吸附率降低。当温度达到 60~70 °C 时花色苷不稳定,有部分花色苷分解,使测定的吸光值偏低,导致计算的吸附率偏高。

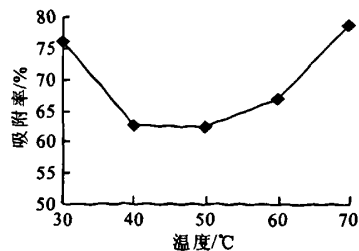


图 7 温度对蓝莓花色苷吸附的影响

Fig. 7 Effect of temperature on adsorption to blueberry anthocyanins

2.8 乙醇体积分数对 AB-8 大孔树脂解吸的影响

乙醇具有使大孔树脂溶胀,减弱被吸附物质与树脂之间吸附力的作用,并可溶解被吸附物质。由图 8 可知,乙醇体积分数低于 60% 时,随着乙醇体积分数的增加,花色苷解吸量增加。乙醇体积分数为 60%、70%、80% 和 90% 花色苷解吸量比较高,

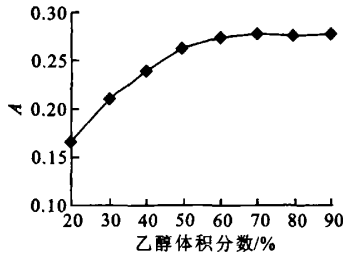


图 8 乙醇体积分数对蓝莓花色苷解吸的影响

Fig. 8 The effect of ethanol concentrations on desorption to blueberry anthocyanins

参考文献 (References):

- [1] 马艳萍. 蓝莓的生物学特性、栽培技术与营养保健功能[J]. 中国水土保持, 2006, (2): 47-49.
MA Yan-ping. Biology properties, planting technique and function of nutrition and health protection[J]. *Soil and Water Conservation in China*, 2006, (2): 47-49. (in Chinese)
- [2] 凌凌庭. 可供开发食品添加剂(IX): 蓝莓提取物及其抗氧化作用[J]. 粮食与油脂, 2003, (6): 45-48.
LING Guan-ting. Exploitable food additives(IX): Blueberry extract and its antioxidant effect[J]. *Journal of Cereals & Oils*, 2003, (6): 45-48. (in Chinese)
- [3] 孙志健, 张燕, 陈芳, 等. 对蓝莓产业化发展的思考[J]. 食品工业科技, 2005, 26(12): 183-184.
SUN Zhi-jian, ZHANG Yan, CHEN Fang, et al. Considering blueberry industrialization [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2005, 26(12): 183-184. (in Chinese)
- [4] Weiguang Yi, Casimir C A, Joan Fischer, et al. Effects of phenolic compounds in blueberries and muscadine grapes on HepG2 cell viability and apoptosis[J]. *Food Research International*, 2006, 39(5): 628-638.
- [5] Yun Wang, Chen-Fu Chang, Jenny Chou, et al. Dietary supplementation with blueberries, spinach, or spirulina reduces ischemic brain damage[J]. *Experimental Neurology*, 2005, 193(1): 75-84.
- [6] Francis C, Barbara shukitt-Hale, James A. Joseph. The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging[J]. *Neurobiology of Aging*, 2005, 26(1): 128-132.
- [7] 钱竹, 徐鹏, 章克昌, 等. 大孔树脂分离提取发酵液中灵芝三萜类物质[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(6): 111-114, 126.
QIAN Zhu, XUN Peng, ZHANG Ke-chang, et al. Extraction of Ganoderic Triterpenes from fermented broth by macroporous resin[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(6): 111-114, 126. (in Chinese)
- [8] 徐忠, 张亚丽. D101 大孔树脂对萝卜红色素的吸附特性研究[J]. 食品科学, 2002(1): 59-60.
XU Zhong, ZHANG Ya-li. Study on the absorption properties of raphanus stauvus pigment by DA101 macroporous resin [J]. *Food Science*, 2002(1): 59-60.
- [9] 孙健, 蒋跃明, 彭子模. 利用大孔吸附树脂提取蜀葵花色苷的研究[J]. 生物技术, 2005(1): 65-67.
SUN Jian, JIANG Yue-ming, PENG Zi-mo. Research on extracting pigment from flower of *Althaea rosea* (L.) Cav. With macroporous resin[J]. *Biotechnology*, 2005(1): 65-67. (in Chinese)
- [10] Quan Q Z, Dang R Y, Li T S. Adsorbing and separating radish red pigment by X-5 resin[J]. *Acta Botanica Boreal-Occidentalia Sinica*, 2001, 21(6): 1218-1222.
- [11] Ma Y H, Li W L, Peng Y F, et al. The extractive technique of red pigment of *Bougainvillea spectabilis* wild[J]. *Food Sciences*, 2003, 24(1): 78-80.
- [12] K. R. 马卡姆. 黄酮类化合物结构鉴定技术[M]. 张宝琛译. 北京: 科学出版社, 1990.

(责任编辑: 朱明)