

栀子黄色素纯化工艺的优化

张 徐¹, 方吉雷¹, 葛 青^{1,2,3}

(1. 浙江科技学院 生物与化学工程学院, 杭州 310023; 2. 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室, 杭州 310023; 3. 浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心, 杭州 310023)

摘 要: 为了提高栀子黄色素品质和提升产品附加值, 采用超声辅助有机溶液热回流萃取法制备栀子黄色素, 采用大孔树脂分离法分离纯化栀子黄色素。实验结果表明, 栀子黄色素的最佳提取条件为 60% 体积分数的乙醇溶液, 1:10 料液比, 60℃ 超声反应 30 min, 提取 2 次; 栀子黄色素的最佳纯化条件为用 25% 体积分数的乙醇溶液洗脱大孔树脂吸附的杂质、栀子苷、绿原酸, 用 80% 体积分数的乙醇溶液分离栀子黄色素, 经纯化得到的栀子黄色素色价大于 320, OD 值小于 0.2。

关键词: 栀子黄色素; 纯化工艺; 大孔树脂

中图分类号: TS264.4; R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1671-8798(2016)06-0456-06

Optimization of purification technology of gardenia yellow pigment

ZHANG Xu¹, FANG Jilei¹, GE Qing^{1,2,3}

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory for Chemical and Biological Processing Technology of Farm Produce, Hangzhou 310023, China; 3. Zhejiang Collaborative Innovation Center of Chemical and Biological Manufacturing for Agricultural Biological Resources, Hangzhou 310023, China)

Abstract: To improve the quality of the gardenia yellow pigment and improve the product added value, organic solvent extraction with ultrasonic-assisted was used to obtain gardenia yellow pigment, and macroporous resin adsorption method was used to purify gardenia yellow pigment. The results show that the optimal conditions of extraction are that solid to liquid ratio 1:10, the concentration of ethanol 60%, extraction temperature of 70℃, extraction time of 30 min, extraction twice. And the optimal conditions of purification are using 25% ethanol eluting macroporous resin adsorption solution to elute impurities, chlorogenic acid and gardenoside; using 80% ethanol solution to separate gardenia yellow pigment. As a result, the color scale of gardenia yellow pigment is more than 320, OD value is less than 0.2.

Keywords: gardenia yellow pigment; purification technology; macroporous resin

收稿日期: 2016-09-30

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题(2011BAD23B02)

作者简介: 张 徐(1990—), 男, 江苏省沭阳人, 硕士研究生, 研究方向为生物质资源利用及工程。

栀子是中国一种常见的景观植物,也是药食兼具植物。因产地不同,其成熟果实含有3%~8%的栀子黄色素,栀子黄色素作为一种天然色素具有十分广阔的应用前景^[1-8]。栀子的化学成分很复杂,有效成分为环烯醚萜类化合物^[9-11]。粗品的栀子黄色素色价较低、杂质含量高,有特殊的异味。此外,粗品中含有较多的栀子苷成分,可以与含氨基酸类的物质发生显色反应,生成栀子蓝色素,从而导致栀子黄色素发生绿变现象,以致严重影响了栀子黄色素的应用,因此,实际生产中迫切需要高质量的栀子黄色素^[12-13]。有实验证实,当OD值(栀子黄色素在238 nm处的吸光度比在440 nm处的吸光度)低于0.4时,可以防止绿变现象的发生^[14-15]。

传统的精制栀子黄色素的方法有溶剂回流法、酸碱沉淀法、酶法、超滤法和大孔树脂法等。其中,溶剂回流法成本低、操作简单,是生产栀子黄色素的主要方法,但用此方法会产生大量的栀子废液,有机溶剂大量残留,结果是既污染了环境又增加了生产的成本^[16-17]。大孔吸附树脂是20世纪60年代发展起来的一类新型不含交换基团的有机非离子高聚物吸附剂,有较大的孔径与比表面积,并且大孔树脂内部具有特定的空间立体孔结构,使得大孔树脂可以有选择地吸附溶液中有机物质。它具有理化性质稳定,不溶于酸、碱及各种有机溶剂,且不受无机盐类及低分子化合物的影响,可再生利用等优点。如今,大孔树脂在天然产物有效成分的分离、纯化领域已经有了越来越广泛的应用^[18-21]。然而,不同类型的大孔树脂在极性、适用pH范围和内部结构上有差异,因此,对特定物质的分离、纯化需选配合适的大孔树脂^[22-24]。本实验通过比较,选出适合栀子黄色素分离、纯化的大孔树脂,并探索其最佳纯化工艺。

1 材料、试剂及仪器

栀子干果,购自江苏亚邦药业股份有限公司。大孔树脂,上海长哲生物科技有限公司;乙醇AR级,成都市科龙化工试剂厂;KQ-300E超声清洗仪,昆山市超声仪器有限公司;TG18K-离心机,深圳市东旺机械设备有限公司;UV-5500pc紫外分光光度计,上海元析仪器有限公司;PHS-3C酸度计,杭州齐威仪器有限公司;TS-1102恒温摇床,上海天呈实验仪器制造有限公司。

2 方法与结果

2.1 栀子黄色素粗品的制备

本实验采用有机溶剂热回流萃取法制备栀子黄色素粗品。称取100 g栀子果研磨过60目分子筛,按1:10的料液比加60%体积分数的乙醇溶液,超声清洗机温度设置60℃,超声30 min后过滤,按相同条件对滤渣重复提取1次;合并2次的滤液,6 000 r/min条件下离心5 min,离心后的溶液旋转蒸发除去乙醇,通过真空冷冻干燥后得到栀子黄色素粗品。实验制得的栀子黄色素粗品色价约为92,OD值为1.25左右。

2.2 大孔树脂的筛选

为了得到品质较好的栀子黄色素,需要将制得的栀子黄色素粗品去杂质、纯化。本实验选取AB-8、HDP-300、HDP-500、D-101、X-5型大孔树脂进行实验,通过对比不同大孔树脂对绿原酸和栀子黄色素的吸附率与解析率,筛选性能较好的大孔树脂。由于制得的粗品成分相对复杂,因此,吸附率与解析率用吸光度来表征。

2.2.1 不同大孔树脂的静态吸附率和解析率

精确称取0.1 g栀子黄色素粗品,用去离子水定容至1 000 mL容量瓶中。采用全波长扫描方式,记录其在440、320 nm处的吸光度值 A_0 。精确称取不同大孔树脂2.0 g置于250 mL的锥形瓶中,加入栀子黄色素粗品溶液100 mL;在25℃、170 r/min的摇床中吸附24 h后,测定每组溶液在440、320 nm处的吸光值 A_1 。计算静态吸附率(Q),1/g。

$$Q = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

静态吸附结束后溶液过滤,用去离子水充分淋洗各组大孔树脂,然后用滤纸吸干大孔树脂,将大孔树

脂转移到 250 mL 的锥形瓶中,加入 70 mL 的 95% 体积分数的乙醇溶液,放入 25 ℃、170 r/min 的摇床中,24 h 后测定其吸光度值 A_2 。计算静态解析率(D),1/g。

$$D = \frac{A_2 \times 70}{A_0 - A_1} \times 100\%$$

2.2.2 不同大孔树脂的动态解析率

静态吸附结束后溶液过滤,用去离子水充分淋洗各组大孔树脂,然后用滤纸吸干大孔树脂,将大孔树脂转移到 250 mL 的锥形瓶中,加入 70 mL 的 95% 体积分数的乙醇溶液,放入 25 ℃、170 r/min 的摇床中,每 0.5 h 取样一次,记吸光度值为 A_n ,测定上清液在 440、320 nm 处的吸光值。计算解析率 D_n ,1/g。

$$D_n = \frac{A_n \times 70}{A_0 - A_1} \times 100\%$$

2.2.3 不同大孔树脂的吸附率与解析率比较

不同大孔树脂对栀子黄色素及绿原酸的静态吸附率和解析率见表 1,不同大孔树脂对栀子黄色素及绿原酸的动态吸附率和解析率见图 1、图 2。

表 1 栀子黄色素及绿原酸的静态吸附率与解析率

大孔树脂	440 nm 处		320 nm 处	
	吸附率	解析率	吸附率	解析率
X-5	88.11	73.35	82.73	72.61
HDP-300	95.70	85.26	88.61	82.76
HDP-100	91.52	81.47	83.94	80.11
AB-8	92.34	73.19	83.03	78.05
D-101	87.63	82.27	80.76	69.14

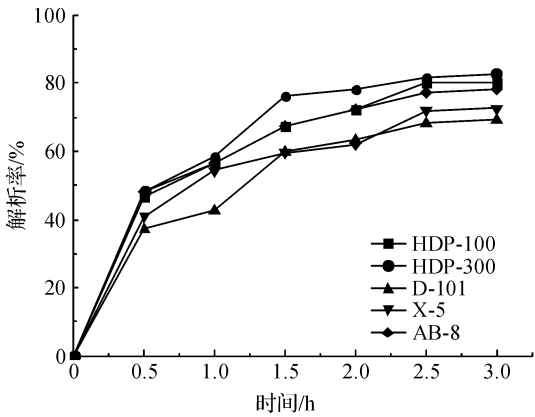


图 1 不同大孔树脂对栀子黄色素动态解析率的影响
Fig. 1 Effects of different resin on dynamic resolution of gardenia yellow pigment

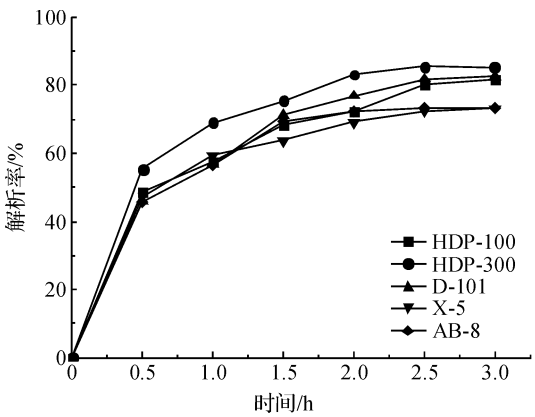


图 2 不同大孔树脂对绿原酸的动态解析率的影响
Fig. 2 Effects of different resin on dynamic resolution of chlorogenic acid

栀子黄色素中主要成分是藏花素和藏花酸,它们易溶于水、乙醇和丙二醇等极性溶剂,不溶于油脂,难溶于苯、汽油等非极性溶剂。结合表 1 和图 1、图 2 可以发现:AB-8、HDP-300、HDP-100、D-101、X-5 对栀子黄色素和绿原酸均有较强的吸附和解析能力,其中,HDP-300 大孔树脂的吸附和解析能力均优于其他 4 种类型的树脂。这是由于 HDP-300 和 AB-8 大孔树脂为弱极性大孔树脂,X-8、D-101 和 HDP-300 大孔树脂是非极性树脂;HDP-300 大孔树脂有较好的空间结构。因此,选取 HDP-300 大孔树脂对栀子黄色素粗品进行纯化。

2.3 制备栀子黄色素纯品

2.3.1 大孔树脂的预处理

用两倍体积 95% 体积分数的乙醇溶液浸泡大孔树脂 24 h,除去大孔树脂中可能含有的致孔剂、引发剂、分散剂等,同时,也使大孔树脂充分溶胀。然后,将大孔树脂采用湿法填柱(24 cm × 45 cm),用去离子

水以每小时2倍柱体积的洗脱速率清洗大孔树脂柱,至流出液无醇味即可认为洗脱完成,去离子水浸泡24 h备用。

2.3.2 大孔树脂吸附的杂质、绿原酸、栀子苷的洗脱

将栀子黄色素粗品制成浓溶液并吸附于填料柱中。待大孔树脂柱吸附饱和后,用3倍柱体积的去离子水洗脱吸附了栀子黄色素粗品的大孔树脂,除去大孔树脂吸附的杂质,去离子水洗脱后全波长结果见图3。利用低于30%体积分数的乙醇溶液洗脱,可以洗脱出栀子黄色素粗品中含有的栀子苷和绿原酸,而仅有少量的栀子黄色素被洗出。高于30%体积分数的乙醇溶液则会洗脱出较多的栀子黄色素。因此,本实验对比了体积分数为20%、25%、30%乙醇溶液的洗脱效果。不同低体积分数的乙醇溶液洗脱结果见图4。

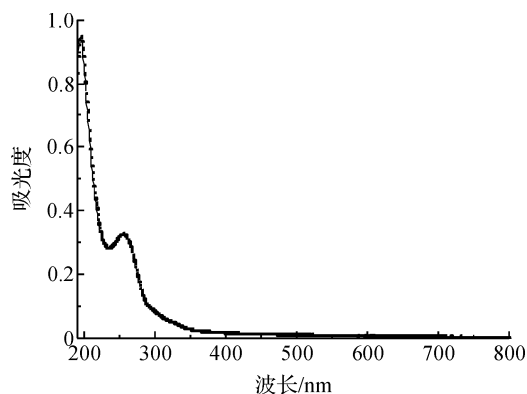


图3 去离子水洗脱后全波长扫描

Fig. 3 Wavelength scanning after demonized water elution

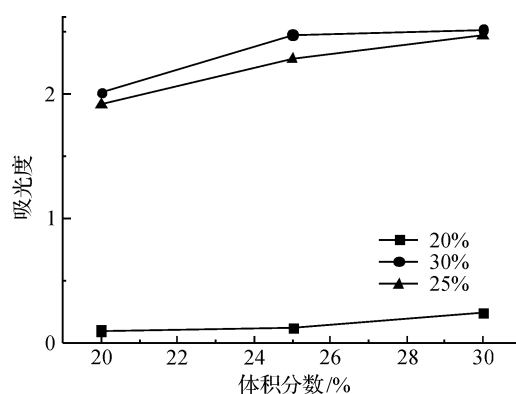


图4 不同低体积分数的乙醇溶液洗脱结果

Fig. 4 Result of different low concentration ethanol solution elution

由图3可以发现,用去离子水洗脱吸附饱和的大孔树脂,可以洗脱出树脂吸附的杂质,并且栀子苷和绿原酸都有部分被洗脱出,而栀子黄色素几乎没有被洗脱出。由图4中20%、25%、30%体积分数的乙醇溶液的洗脱结果可以发现,随着乙醇体积分数的增大,绿原酸和栀子苷的洗出率均上升,但用30%体积分数的乙醇溶液洗脱时,有较多的栀子黄色素也被洗脱,因此,本实验选取25%体积分数的乙醇溶液多次洗脱以除去粗品中的绿原酸与栀子苷。

2.3.3 大孔树脂吸附栀子黄色素的洗脱

用25%体积分数的乙醇溶液多次洗涤除去栀子苷和绿原酸后,分别配制50%、60%、70%、80%、90%体积分数的乙醇溶液,选取出洗脱栀子黄色素的最佳条件。收集不同体积分数的乙醇溶液的洗脱液,对不同洗脱液在200~800 nm进行全波长扫描,记录特定波长处的吸光度值和全波长扫描的峰型,从而得出最佳的洗脱条件。不同体积分数的乙醇溶液洗脱栀子黄色素的全波长扫描结果见图5~8。

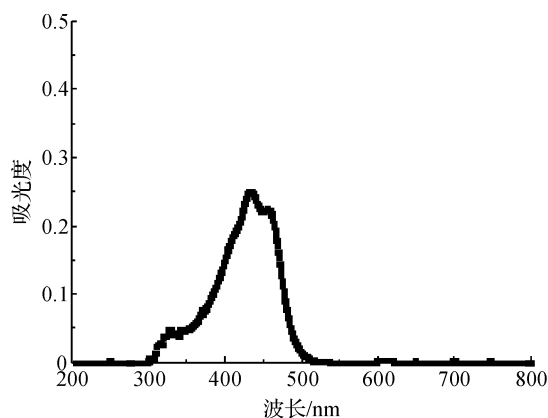


图5 50%体积分数的乙醇溶液洗脱后全波长扫描

Fig. 5 Full wavelength scanning after 50% ethanol solution elution

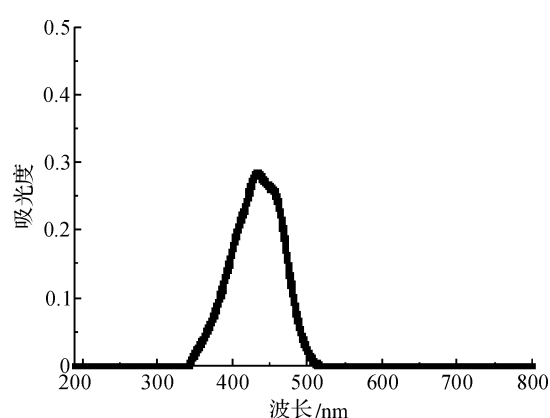


图6 60%体积分数的乙醇溶液洗脱后全波长扫描

Fig. 6 Full wavelength scanning after 60% ethanol solution elution

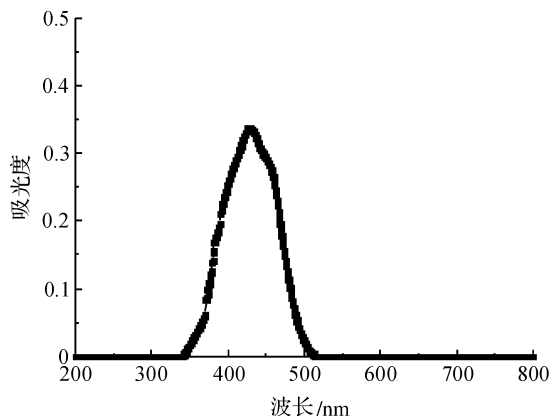


图 7 70% 体积分数的乙醇溶液洗脱后全波长扫描

Fig. 7 Full wavelength scanning after 70% ethanol solution elution

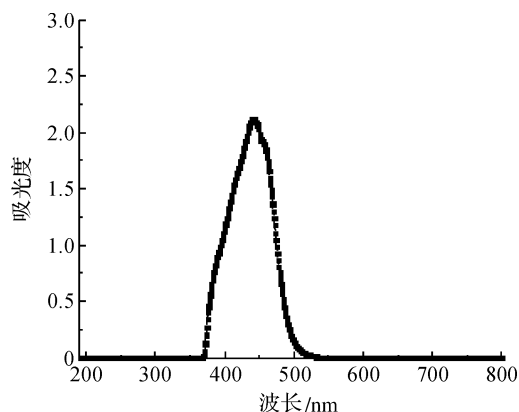


图 8 80% 体积分数的乙醇溶液洗脱后全波长扫描

Fig. 8 Full wavelength scanning after 80% ethanol solution elution

结合图 5 ~ 8, 对比体积分数分别为 50%、60%、70%、80% 的乙醇溶液洗脱效果可以发现, 随着乙醇体积分数的增加, 扫描峰变高且变窄, 这说明洗脱出的栀子黄色素品质更高。其中, 体积分数为 80% 的乙醇溶液洗脱效果明显优于体积分数为 50%、60%、70% 的乙醇溶液。因此, 本实验确定的最佳纯化条件为用体积分数为 80% 的乙醇溶液洗脱。

2.4 栀子黄色素色价和 OD 值的测定

栀子黄色素色价 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$

$$E_{1\text{cm}}^{1\%}(440\text{ nm}) = \frac{AV100}{m}$$

式中: $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 为用 1 cm 的比色皿, 波长为 440 nm, 栀子黄色素溶液质量浓度为 1% 时的色价; A 为栀子黄色素溶液的 $A_{440\text{ nm}}$ 值; V 为栀子黄色素溶液的体积, mL; m 为栀子黄色素质量, g。

栀子黄色素 OD 值为 238 nm 和 440 nm 处吸光度的比值。

$$\text{OD} = \frac{A_{238\text{ nm}}}{A_{440\text{ nm}}}$$

利用 HDP-300 型大孔树脂纯化分离后栀子黄色素的色价大于 320, OD 值小于 0.2, 实验制得的栀子黄色素粗品色价约为 92, OD 值为 1.25 左右, 因此, 利用大孔树脂吸附法可以大大地提高栀子黄色素的品质。

3 结 语

本实验利用自制的栀子黄色素, 选取 5 种大孔树脂, 以大孔树脂对栀子苷、绿原酸、栀子黄色素的吸附率与解析率为判断标准, 确定了 HDP-300 大孔树脂作为纯化栀子黄色素的大孔树脂; 考察了不同体积分数乙醇溶液的洗脱效果, 确定用体积分数为 25% 的乙醇溶液通过多次洗脱除去栀子黄色素粗品中吸附的杂质、绿原酸和栀子苷, 用体积分数为 80% 的乙醇溶液来洗脱栀子黄色素, 得到了色价大于 320、OD 值小于 0.2 的栀子黄色素。

参考文献:

- [1] 辛莎. 栀子果中栀子油、栀子黄色素、栀子甙和绿原酸的提取与精制工艺[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2011.
- [2] 程合理. 栀子环烯醚萜和栀子黄色素的提取、分离和纯化研究[D]. 济南: 山东大学, 2007.
- [3] PAN I H, CHIU H H, LU C H, et al. Aqueous two-phase extraction as an effective tool for isolation of geniposide from gardenia fruit[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 977(2): 239.
- [4] 孟祥乐, 李红伟, 李颜, 等. 栀子化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(11): 959.
- [5] DEBNATH T, PARK P, NATH N C D, et al. Antioxidant activity of gardenia jasminoides Ellis fruit extracts [J]. Food Chemistry, 2011, 128: 697.

- [6] SUZUKI Y, KONDO K, IKEDA Y, et al. Antithrombotic effect of geniposide and genipin in the mouse thrombosis model[J]. *Planta Medica*, 2001, 67(9): 807.
- [7] 徐春明, 李婷, 王英英, 等. 食用蓝色素及其使用现状研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2014(1): 208.
- [8] 宋伟. 栀子黄色素的提取纯化工艺及产品特性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014.
- [9] 何兵, 田吉, 李春红, 等. 不同成熟期和不同部位栀子中4种主要活性成分的含量变化[J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(5): 801.
- [10] 任淑娟, 孙辉, 丁野, 等. 栀子药材的 HPLC 指纹图谱研究[J]. *华西药学杂志*, 2012, 27(3): 309.
- [11] 陈绍成, 石燕红, 杨娜, 等. 重庆后山栀子和国内其他产区栀子主要药效成分含量对比[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(22): 131.
- [12] 刘慧璐, 冯建勇, 王增尚, 等. 高色价栀子黄的精制工艺研究[J]. *中国现代应用医学*, 2013, 30(12): 1315.
- [13] 陆伟, 钱骅, 张卫明, 等. 栀子黄色素的提取及精制研究[J]. *中国调味品*, 2009, 34(11): 77.
- [14] 梁华正, 刘富梁, 彭玲西, 等. 京尼平苷为底物测定 β -葡萄糖苷酶活力的方法[J]. *食品科学*, 2006, 27(4): 182.
- [15] 章建国, 余顺火, 李先祥, 等. 两步法生产栀子蓝色素工艺条件的研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(11): 186.
- [16] 朱琦, 余琪, 周丹英. 大孔树脂同步分离栀子中栀子苷和栀子黄色素工艺研究[J]. *中国现代应用药学*, 2009, 26(10): 823.
- [17] 任治军, 何开泽, 谭健, 等. 大孔吸附树脂精制栀子黄色素[J]. *食品科学*, 2005, 26(11): 157.
- [18] 刘伶文, 孙蕊, 刘倩, 等. 大孔树脂对茄子皮红色素的纯化[J]. *纺织高校基础科学学报*, 2014(4): 518.
- [19] 娄嵩, 刘永峰, 白清清, 等. 大孔吸附树脂的吸附机理[J]. *化学进展*, 2012, 24(8): 1427.
- [20] 王一敏, 任晓蕾. 大孔树脂的应用研究[J]. *中医药信息*, 2008, 25(4): 26.
- [21] 张庆华, 朱向东, 张宝, 等. 大孔树脂法精制栀子红色素[J]. *食品工业科技*, 2009(6): 229.
- [22] 张德权, 吕飞杰, 台建祥, 等. 用大孔树脂纯化栀子黄色素的研究[J]. *农业工程学报*, 2004, 20(4): 165.
- [23] 梁华正, 廖夫生, 乐长高. 大孔树脂分离纯化栀子黄色素的研究[J]. *广州食品工业科技*, 2004, 20(2): 9.
- [24] 胡居吾, 熊伟, 李雄辉, 等. 大孔树脂-溶剂萃取法精制高色价栀子黄色素的集成技术研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2011, 23(2): 304.