

大孔树脂法分离二乔木兰花红色素

唐克华¹, 戴兰芳¹, 唐万勇¹, 于华忠²

(1. 吉首大学城乡资源与规划学院, 湖南 张家界 427000

2. 吉首大学 林产化工工程湖南省重点实验室, 湖南 张家界 427000)

摘要: 探讨了八种大孔树脂对二乔木兰花红色素组分的分离性能, 并进行了色素成分的高效液相色谱 (HPLC) 法分离。研究表明: LD-607 树脂对二乔木兰花红色素的纯化较为适宜, 其对该花色素制备样液的吸附容量达 23.8 ml/g 干树脂, 并可使样液中色素浓度提高为原来的 8 倍左右。HPLC 法分离结果表明, 在二乔木兰花红色素的 218、329 nm 两组分中, 每种组分均至少含两种色素成分。

关键词: 二乔木兰; 花; 色素; 树脂; 分离

Separation of Red Pigments from *Magnoliaceae* × *soulangeana* Flower by
Macroporus Resin Column Chromatography

TANG Ke-hua¹, DAI Lan-fang¹, TANG Wan-yong¹, YU Hua-zhong²

(1. College of Resources and Planning Sciences, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China;

2. Key Laboratory of Forest Product and Chemical Engineering of Hunan Province, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China)

Abstract: The adsorption and desorption performance of eight macroporus adsorbent resin for separation red pigments from *Magnoliaceae* × *soulangeana* flower, and determination of pigments by high pressure liquid chromatography (HPLC) were studied. The results showed that the LD-607 is optimum for absorbing pigments among the eight resins, and its adsorption capacity for the liquid pigments sample is 23.8 ml/g dry resin. The concentration of pigments in the liquid sample is eight times of the first concentration after the pigments separated from the sample. In pigments of 218 nm or 329 nm, more than two kinds of constituents are discovered by HPLC analysis.

Key words: *Magnoliaceae* × *soulangeana*; flower; pigments; resin; separation

中图分类号: 0652.63 R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)09-0235-04

木兰科 (*Magnoliaceae*) 全世界共 15 属, 约 246 种, 其大部分种类集中分布于东南亚和北美东南部^[1]。木兰科植物具有心皮离生、雄蕊多数且螺旋状排列, 以及花粉单沟等原始性状, 被公认为是研究被子植物起源、演化的一个关键类群, 一直是植物系统学研究的重点之一。虽然已积累了大量的形态学、分类学、解剖学、孢粉学、细胞学、区系地理学、植物化学和分子生物学等各方面的研究资料, 但对木兰科植物的分类问题, 特别是在属的划分上仍存在诸多争议^[1-2]。

二乔玉兰 (*M. × soulangeana*) 系国外用玉兰 (*M. denudata*) 与紫玉兰 (*M. liliflora*) 杂交培育而成^[3-4], 栽培品种多达 40 余个。木兰科植物中的木兰与玉兰两类群的名称混淆已久^[5], 这在二乔玉兰上也不例外, 权威著作称为 ‘二乔木兰’, 而生产实践中则多称作 ‘二乔玉兰’。关于二乔木兰研究的文献较少, 目前已开展了

总黄酮含量及提取工艺^[6]、花粉贮存条件^[7]、花期^[8]等方面的研究, 我们在二乔木兰花色素性质^[9]研究的基础上, 进行了花色素的树脂分离纯化初步研究。

1 材料与方法

1.1 树脂

HM-1、2[#]、LD-607、AB-8、BS-I、D101A、HZ-803、聚酰胺等 8 种大孔树脂均为国产产品。

1.2 试剂

色谱纯乙腈、甲醇, 分析纯丙酮、无水乙醇、乙酸乙酯、乙酸、甲酸等。

1.3 仪器

岛津 UV-160A 紫外可见分光光度计、冷冻离心机、旋转蒸发器、FD-230 红外水分计、岛津 LC-6A 高压液相色谱仪。

收稿日期: 2007-07-23

作者简介: 唐克华 (1965-), 男, 副教授, 主要从事生物化学及微生物学研究。

1.4 方法

1.4.1 色素原液制备

参考文献[9]制定如下色素原液制备流程:

清洗并晾干表面水分的鲜花蕾→破碎匀浆处理→稀乙醇微波辅助提取及减压浸提→提取液过滤→滤液减压(-0.81MPa)浓缩至1/4~1/5原体积→离心(8000~10000r/min)去沉淀→色素原液

1.4.2 色素的树脂法吸附与分离研究

1.4.2.1 树脂去杂质及活化

依据运用的树脂属性和产品说明, 参考文献[10]方法对树脂进行预处理及活化。

1.4.2.2 萃取色素的溶剂选择

取1.0ml色素原液分别加入到5.0ml的甲醇、水、乙酸乙酯、丙酮等各种溶剂中振荡均匀, 静置24h, 观察并分析处理过程中的溶液分层及颜色变化等, 从结果中判定可否利用溶剂直接萃取色素及初步选择出可作为树脂分离中洗脱剂的溶剂。

1.4.2.3 色素的树脂吸附与分离^[11-12]

(1) 静态吸附。测定已处理好的八种湿树脂含水量。称取0.50g已扣除含水量的树脂各三份, 装入洁净的三角烧瓶, 分别量取经25%乙醇稀释200倍的色素原液10ml加入其中, 摇床振荡24h吸附处理后取滤液扫描测定吸光度(A值), 根据振荡吸附前后的A值差异来选择适宜吸附色素的树脂。

(2) 动态吸附。对静态吸附中吸附色素性能表现适宜的树脂, 称取已扣除水分含量的树脂5.000g各三份, 分别装填柱并按不同树脂的产品属性以蒸馏水、稀酸、稀碱或乙醇进行交替清洗, 洗净后按要求平衡24h, 然后向树脂柱逐次缓慢加入色素原液, 定量收集其流出液并检测, 以收集流出液的A值达到同等稀释倍数下色素原液吸光度的五分之一大小时定为树脂对色素的吸附穿漏点, 同时停止加入色素原液。对吸附色素已达到穿漏点的树脂柱, 分别用每种湿树脂床3倍体积(3BV)的丙酮、乙酸乙酯和5BV的甲醇洗脱并连续收集每种洗脱液, 逐管测定收集液的A值、体积和观察收集液的颜色等, 根据检测及观察结果确认最适合吸附二乔木兰花色素的树脂。

1.4.3 色素的高压液相色谱(HPLC)法分离

取经树脂吸附、洗脱收集并高度浓缩的色素液, 根据待分离色素的主要组分溶解性质, 配制不同的流动相进行HPLC梯度洗脱。

分离条件为: Kromasil C₁₈ 5a(250mm×4.6mm)分离柱, 柱压0~220Pkg, 室温。梯度洗脱分离的流动相: 对色素329nm组分采用A泵乙腈、C泵超纯水; 色素218nm组分因不溶于中性甲醇, 参考文献[13]经验采用A

泵为乙腈:乙酸=19:1、C泵为乙酸:甲醇:水=1:14:5。流动相的梯度均由梯度仪按设定值自动调节和混合。

2 结果与分析

2.1 色素的树脂吸附与分离

2.1.1 萃取色素的溶剂筛选

二乔木兰花红色素有最大光吸收分别为218nm与329nm两组分。为选择适合于色素树脂吸附与分离的溶剂, 按方法得到不同溶剂萃取分离色素原液的结果(见表1)。从表1中可得出, 溶剂萃取方式基本上不能将色素的218nm和329nm两组分分开; 色素两大组分在不同pH值下的同种溶剂中存在溶解性差别。因此, 直接运用溶剂萃取法萃取分离色素组分似乎不太合适。

表1 不同溶剂萃取分离色素的结果
Table 1 Results of extraction and separation of pigments by different solvents

溶剂	萃取分离中的现象
甲醇	上层液为清澈亮红色, 下层液中有大量灰色沉淀。
丙酮	上层清液呈茶褐色, 下层液中有少量褐色沉淀。
乙酸乙酯	分层明显, 上层液呈浑浊、无色, 下层液颜色与色素原液近似。
乙酸乙酯:水=1:1	分层明显, 上层液浑浊无色, 下层液清亮红色。
乙酸乙酯:甲醇=1:1	上层液为清澈亮红色, 下层液有大量絮状灰色沉淀。
乙酸乙酯:丙酮=1:1	上层液为淡茶褐色, 下层液底部伴有红褐色油状沉淀。
乙酸乙酯:丙酮:水=1:1:1	分层明显, 上层液澄清亮无色, 下层液淡茶褐色。
甲醇:丙酮=1:1	上清液为茶褐色, 下层液中有大量絮状灰色沉淀。
pH3 丙酮	无沉淀产生, 混合液清亮呈茶褐色。
pH4 丙酮	无沉淀产生, 混合液清亮呈茶褐色。
pH5 丙酮	分层并有褐色沉淀产生。

2.1.2 静态吸附

色素原液经不同树脂静态吸附后的滤液测定结果见表2。从表2中可看出, 聚酰胺、2[#]、LD-607、D101A、HM-1树脂均能将色素329nm组分吸附, 但相比较而言, LD-607、HM-1及2[#]树脂可使色素218nm组分吸附并在吸附过程中不导致色素组分的光谱吸收性质改变。综合考虑确定使用LD-607、HM-1及2[#]树脂做二乔木兰花色素的动态吸附分离初步研究。

2.1.3 动态吸附

2.1.3.1 吸附容量

在树脂柱顶层液面加色素原液并维持1.5ml/min的流速, 收集流出液并测定其体积和A₂₁₈及A₃₂₉值, 作收

表2 不同树脂对色素静态吸附的测定结果
Table 2 Inactive adsorption determination results of pigments by different macroporus adsorbent resin

色素组分	树脂种类								色素原液
	聚酰胺	2 [#]	BS-I	LD-607	D101A	HZ-803	HM-1	AB-8	
A ₂₁₈	1.239	2.044	1.244	2.181	1.515	1.455	2.104	1.215	2.215
A ₂₆₇	0.570	0.517	0	0	0	0	1.615	0	0
A ₃₂₉	0	0	0.342	0	0	0.431	0	0.376	1.304

表3 LD-607树脂吸附色素后的洗脱液测定结果
Table 3 Determination results of pigments eluent after LD-607 resin adsorption

洗脱剂类型	收集液及其合并序号	合并洗脱液体积(ml)	A ₂₁₈	A ₂₆₇	A ₃₂₈	洗脱液测定稀释倍数
丙酮	1~3	18	0.619	0	0.304	250
	4~5	12	0.582	0	0.273	250
	6	8	1.320	0	0.671	250
	7~14	10	2.486	1.956	2.008	2000
	15	2	2.381	2.042	1.452	500
	16~17	12	1.880	1.802	0.690	250
	18~23	36	—	1.095	0.021	250
乙酸乙酯	1~2	18	0	0.481	0	250
	3~4	19	0	0.365	0	250
	5~6	18	0	0.116	0	250
	7~9	18	0	0.020	0	250
	1~2	6	1.176	0	0	250
甲醇	3~4	13	1.149	0	0.494	250
	5	7	0	0	0.195	250
	6~8	18	0	0	0.102	250
	9~16	45	0	0	0.063	250

注：纯丙酮的最大光吸收峰在266nm附近，纯乙酸乙酯的最大光吸收峰在212nm左右；稀释250倍的色素原液A₂₁₈=2.104，A₃₂₉=1.226。

集液体积—A值的曲线图，得到LD-607、HM-1和2[#]树脂对色素218nm组分及329nm组分吸附的曲线图(见图1和图2)。从图中可以看出，HM-1树脂对色素的吸附为快速吸附，其余两种树脂则为慢吸附。测得LD-607、HM-1和2[#]这三种树脂对二乔木兰色素的吸附穿漏点分别为119、11和34ml，换算为干树脂的饱和和吸附容量分别是：23.8、2.2和6.8ml/g。

2.1.3.2 吸附后的洗脱

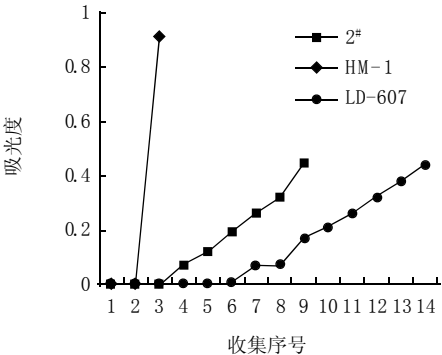


图1 色素218nm组分在三种树脂柱上的吸附曲线
Fig.1 Adsorption curves of 218 nm pigment component in three kinds of resin columns

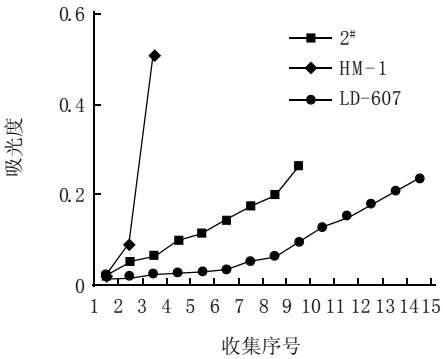


图2 色素329nm组分在三种树脂柱上的吸附曲线
Fig.2 Adsorption curves of 329 nm pigment component in three kinds of resin columns

每根树脂柱待分别达到LD-607、HM-1和2[#]树脂对色素原液的最大吸附量后，以装柱树脂的3倍床体积量丙酮、乙酸乙酯或5倍量甲醇洗脱，逐管收集洗脱液并测定其A值，然后合并吸光度大小相接近的色素组分，其中LD-607树脂柱吸附色素后的不同溶剂洗脱结果见表3。由表3测定结果可知，对吸附色素的LD-607树脂而言，乙酸乙酯几乎不能洗脱已吸附的色素，丙酮和甲醇的洗脱力均强，但这两种溶剂都将218nm和

329nm 两峰下的色素成分一并洗脱而使分离效果不佳。测定的吸光度结果也表明,经 LD-607 树脂吸附后用丙酮洗脱,可使色素组分的有效含量提高 8 倍以上,纯度大大提高(约 90%)。因此,实践中可考虑用该树脂进行色素提取液的浓缩处理。

色素经 2[#]、HM-1 这两种树脂吸附后进行的溶剂洗脱测定研究表明,丙酮、乙酸乙酯、甲醇等洗脱解吸附的效果均很差,在二乔木兰花红色素的吸附与分离上几乎无生产应用价值。

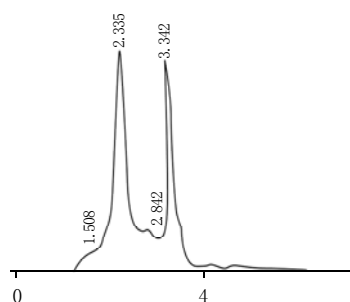


图3 色素 329nm 组分的 HPLC 分离图

Fig.3 HPLC separation chart of 329nm pigment component

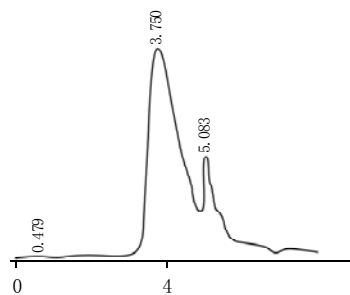


图4 色素 218nm 组分的 HPLC 分离图

Fig.4 HPLC separation chart of 218 nm pigment component

2.2 HPLC 法检测及分离

将经 LD607 树脂吸附、洗脱和浓缩得到的色素液以 90% 乙腈稀释 50 倍可得到均一样液,但以各种稀释倍数的甲醇溶解时均产生大量红褐色沉淀,该沉淀可溶于甲酸:甲醇:水=5:28:4 混合液。取经甲醇沉淀后的清液,以及其沉淀物用酸化醇完全溶解的溶液在分光光度计上扫描,发现色素 329nm 组分的光吸收波长稳定,而 218nm 组分的吸收波长向红位移到 246nm 处。据此决定在 HPLC 法分离与检测时的波长分别用 329nm 和 246nm,所用样液分别为甲醇处理得到的澄清液和其沉淀物的酸化醇溶解液,分离洗脱的流速依次为 1ml/min 和 0.5ml/min,进样量分别是 20 μ l/次和 2 μ l/次,所有操作均在 35 $^{\circ}$ C 的室

温下进行。分离与检测结果表明,二乔木兰花红色素 329nm 组分以乙腈:水=0.2:0.8(V:V)的条件分离效果(图3)较好,而 246nm 色素组分以酸化乙腈:酸化甲醇水=0.18:0.32(V:V)的条件分离效果(图4)较好。分离图形及结果也提示在二乔木兰花红色素的 218nm 和 329nm 两组分中,每一组分至少含有两种色素成分。

3 讨论

大多数天然色素若直接使用时都存在颜色欠鲜艳及应用稳定性能较差等缺陷。近些年来,对植物色素等含量较微的天然产物运用树脂吸附分离的研究及生产工艺实践越来越多,相关的研究均表明通过适当的树脂对色素进行纯化,不仅可以提高含量和色价,而且还能使某些性能改善和产品整体质量明显提高^[12]。在本研究所应用的八种树脂中,从吸附容量和解吸附性能而言,以 LD-607 对二乔木兰花红色素组分是较为适宜的。但通过色素的 HPLC 分离研究,表明筛选的洗脱溶剂对 LD-607 树脂柱中所吸附的每种色素组分的具体成分在解吸附性能上仍欠理想,显然,要获得二乔木兰花红色素组分的具体成分,只依靠单一树脂种类的分离纯化手段还存在一些问题,值得在该方面进一步探讨。

参考文献:

- [1] 刘玉壶,夏念和,杨惠秋. 木兰科(*Magnoliaceae*)的起源、进化和地理分布[J]. 热带亚热带植物学报, 1995, 3(4): 1-12.
- [2] 龚洵,施苏华,潘跃芝,等. 中国木兰亚科植物的主要分类性状观察[J]. 云南植物研究, 2003, 25(4): 447-456.
- [3] 高炳振. 二乔玉兰品种资源初报[J]. 河南林业科技, 22(4): 29.
- [4] 王亚玲,李勇,张寿洲,等. 几种玉兰亚属植物的 RAPD 亲缘关系分析[J]. 园艺学报, 2003, 30(3): 299-302.
- [5] 傅大立,杨绍彬,周道顺,等. 论玉兰与木兰的混淆[J]. 经济林研究, 2003, 21(4): 11-13.
- [6] 王琪,李洪玲. 木兰属植物花蕾总黄酮含量测定及提取工艺研究[J]. 现代中药研究与实践, 2003, 17(2): 32-33.
- [7] 张亚利,田振坤,刘燕. 二乔玉兰花粉贮存条件的比较研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2006, 14(4): 318-320.
- [8] 芮飞燕,彭祚登,马履一,等. 北京 4 个玉兰种花期物候观测及其分析[J]. 湖南林业科技, 2007, 34(2): 6-8.
- [9] 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): 391-395.
- [10] 卢锦花,胡小玲,岳红,等. 大孔吸附树脂对银杏叶黄酮类化合物吸附及解吸的研究[J]. 化学研究与应用, 2002, 14(2): 164-166.
- [11] 田呈瑞,徐建国,胡青平. 桑椹红色素纯化的动态吸附条件研究[J]. 西北植物学报, 2005, 25(6): 1166-1170.
- [12] 刘岱琳,董晋泉,王媚,等. YWD-01 大孔吸附树脂分离纯化黑豆红色素的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 85-88.
- [13] 刘玲,李霞,金同铭. 高压液相色谱在花色苷分析中的应用[J]. 北京农业科学, 1998, 16(2): 30-33.