

凝胶层析法精制栀子黄色素的研究

吕晓玲 姚中铭 姜平平

(天津轻工业学院食品工程系, 天津, 300222)

摘要 研究了凝胶层析法精制栀子黄色素的工艺条件。其较佳的工艺条件是:以葡聚糖凝胶为支持剂,双柱串联层析(联洗),单柱高30 cm,柱径2 cm,洗脱流速4 mL/min,以蒸馏水为洗脱剂,加样量1.8 mL,精制得率48.9%。

关键词 凝胶层析法 栀子黄色素 精制

栀子黄色素是从茜草科植物栀子的果实中提取的一种类胡萝卜素类的色素^[1]。主要成分是藏花素(水溶液的最大吸收波长440 nm)。GB2760-1996规定在一些食品中允许使用,最大使用量为0.3 g/kg。研究表明栀子黄色素能防止亚油酸的氧化,对热和光较稳定,对蛋白质和淀粉具有良好的染色性^[2]。但由于粗提的色素溶液中含有大量的杂质——栀子苷(水溶液的最大吸收波长238 nm),该物质在 β -葡萄糖苷酶的作用下水解为苷元,这种苷元同氨基酸生成蓝色色素^[3,4],导致用栀子黄色素染色的面制品发生绿变。研究还表明,当色素溶液在栀子苷的最大吸收波长238 nm处的吸光度值(A_{238})与藏花素的最大吸收波长440 nm处的吸光度值(A_{440})的比值(A_{238}/A_{440})小于0.20时,可以避免绿变现象的发生^[4]。据报道国际市场上的栀子黄色素产品的 A_{238}/A_{440} 范围在0.40~1.60之间,日本已经可以生产 A_{238}/A_{440} 小于0.20的栀子黄色素精制液^[5],但作为商业秘密,没有关于精制方法的报道。南开大学高分子化学研究所用吸附树脂法对栀子黄色素的粗提液进行精制,使 A_{238}/A_{440} 从3.20降低到0.71^[6]。无锡天彩生物有限公司生产的栀子黄色素的 A_{238}/A_{440} 已经达到0.60。但目前国际市场出口质量要求 A_{238}/A_{440} 达到0.2左右甚至更低,

国内的产品难以达到要求。因此必须采取更有效的方法对栀子黄色素进行精制。本文尝试了采用凝胶层析法对栀子黄色素进行精制,并获得良好的精制效果。作为一种新兴的分离方法,凝胶层析法相对于吸附树脂法具有操作上更简单、分离效果更好以及能有效地保护被分离物质活性的优点^[7],因此具有良好的应用前景。

1 实验原理

凝胶层析是一种液相层析,用于层析的凝胶有交联葡聚糖(其商品名称是Sephadex)、琼脂糖凝胶(其商品名称是Sephacrose)等。其机理是分子筛效应。即被分离物质的分子质量不同,能够渗入凝胶颗粒内部的程度不同,它们在凝胶柱中层析时被洗脱下来的速度也不同,从而实现不同分子质量物质的分离。本文利用此原理将分子质量存在差别的栀子甙和藏花素分开,实现栀子黄色素精制。

2 材料与方法

2.1 实验原料

无锡天彩生物有限公司提供的栀子黄色素($A_{238}/A_{440}=0.600$)。

2.2 主要仪器与设备

恒流泵(HL-2,上海青浦沪西仪器厂);自动部分收集器(BS-100A,上海沪西电机

厂);紫外可见分光光度计(UV-120-02,日本岛津);电子天平(JA2003,上海天平仪器厂)。

2.3 主要试剂

葡聚糖凝胶(天津化学试剂二厂),盐酸(天津市双庆试剂厂),氢氧化钠(天津市化学试剂三厂)。

2.4 实验方法

2.4.1 凝胶的溶胀

用电子天平称取一定量葡聚糖凝胶,平均分成3份。分别置于3个烧杯中,依次加入足够量的蒸馏水、0.1 mol/L NaCl溶液和0.1 mol/L NaOH溶液,在沸水浴中溶胀2 h,取出冷却至室温,备用。

2.4.2 洗脱流速的选择

将经过蒸馏水溶胀的凝胶,装入内径为2 cm的层析柱中,单柱高度为30 cm,双柱联洗。加样1.5 mL,以蒸馏水为洗脱剂在不同流速下洗脱,分段收集流出液,绘制洗脱曲线,并计算精制得率(A_{238}/A_{440} 小于0.200的色素液的产率)。

2.4.3 洗脱剂的选择

将用蒸馏水、0.1 mol/L NaCl溶液、0.1 mol/L NaOH溶液溶胀的凝胶,分别装入内径为2 cm的层析柱中,单柱高度为30 cm,双柱联洗,加样1.5 mL。依次以蒸馏水、0.1 mol/L NaCl溶液、0.1 mol/L NaOH溶液为洗脱剂,洗脱流速4.0 mL/min。分段收集流出液,绘制洗脱曲线,计算精制得率。

2.4.4 加样量的选择

将经过溶胀的凝胶,装入内径为2 cm的吸附柱中,单柱高度为30 cm,双柱联洗。加样分别为1.5、1.8 mL。以蒸馏水为洗脱剂,洗脱流速4.0 mL/min。分段收集流出液,绘制洗脱曲线,计算精制得率。

3 结果与讨论

3.1 柱长的确定

增加柱长可以提高分离能力,但同时使流速降低。本实验采用串联层析。单柱高为

30 cm,两柱串联。这样既可增加有效柱高,又可获得较满意的流速。

3.2 柱径的确定

为了避免管壁效应(即粗颗粒接近管壁,细颗粒集中于柱床中间)对分离效果的影响,应采用直径较大的层析柱。本实验选柱径为2 cm的层析柱。

3.3 流速的选择

不同洗脱流速下的洗脱曲线和精制得率见表1和图1~图4。

表1 不同流速下的洗脱效果

流速/mL·min ⁻¹	1.0	2.0	3.0	4.0
精制得率/%	0	43.6	46.4	47.2
洗脱时间/min	500	300	250	160

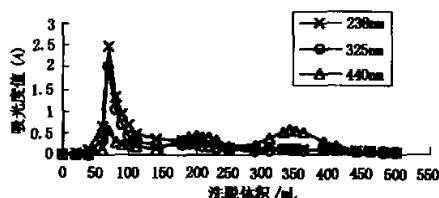


图1 洗脱流速为1.0 mL/min时的分离曲线

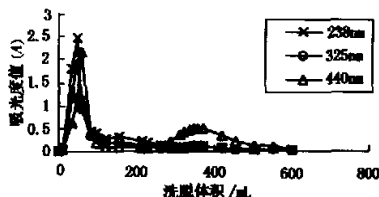


图2 洗脱流速为2.0 mL/min时的分离曲线

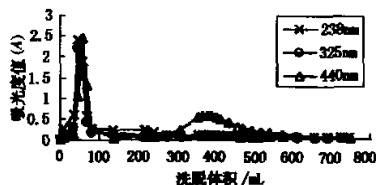


图3 洗脱流速为3.0 mL/min时的分离曲线

由表1和图1~图4可知:当流速为1.0 mL/min时,不仅分离效果差,而且洗脱时间长;当流速为2 mL/min时,分离效果好,但精制得率较低;当流速为3 mL/min时,精制得率有较大提高;当流速为4.0 mL/min时,

不但洗脱时间相对较短,而且精制得率得到进一步的提高。由此可知,提高流速可以缩短洗脱时间,同时可以提高精制得率。但流速不能无限得增大,否则会导致层析床压紧,而使流速发生变化,影响分离效果。所以选定流速为4 mL/min。

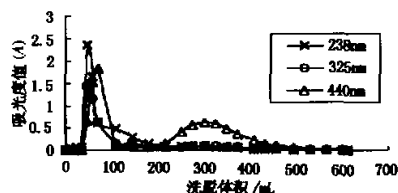


图4 洗脱流速为4.0 mL/min时的分离曲线

3.4 洗脱剂的选择

不同洗脱剂的洗脱曲线和精制得率见表2和图5~图7。

表2 不同洗脱剂下的洗脱效果

洗脱剂	水	0.1 mol/L NaCl	0.1 mol/L NaOH
精制得率/%	47.2	0	48.5
洗脱时间/min	160	360	170

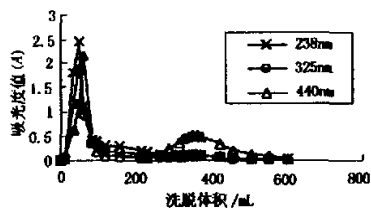


图5 洗脱剂为蒸馏水时的分离曲线

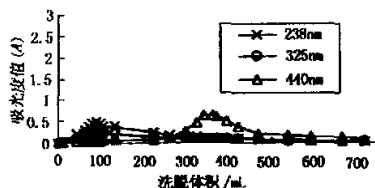


图6 洗脱剂为0.1 mol/L NaCl溶液时的分离曲线

由表2和图5~图7可知:0.1 mol/L NaCl溶液作为洗脱剂,精制得率低,洗脱时间长,洗脱峰扁平,符合精制要求的产品得率很低。蒸馏水作为洗脱剂:洗脱峰窄且高,峰间距较大,洗脱时间较短,得率47.2%;0.1

mol/L NaOH作为洗脱剂:洗脱峰同样窄且高,峰间距较大,洗脱时间较短,得率48.5%。但栀子黄色素在碱液中吸光度值偏高。因此实际得率低于48.5%。同时考虑到用碱液作为洗脱剂会增加生产成本,所以选定蒸馏水作为洗脱剂。

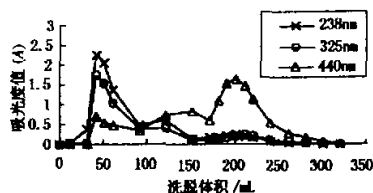


图7 洗脱剂为0.1 mol/L NaOH溶液时的分离曲线

3.5 加样量得选择

不同加样量的洗脱曲线和精制得率见表3和图8~图9。

表3 不同加样量下的洗脱效果

加样量/mL	1.5	1.8
精制得率/%	47.2	48.9
时间/min	160	290

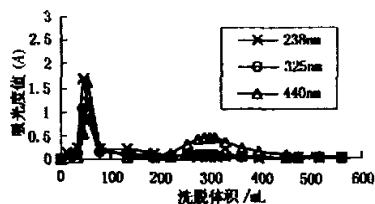


图8 加样量为1.5 mL时的分离曲线

表3、图8、图9结果表明:在不降低精制得率的条件下可以适当提高加样量,而且可以得到12.75%纯度更高($A_{238}/A_{440} = 0$)的色素。故选定加样量为1.8 mL。

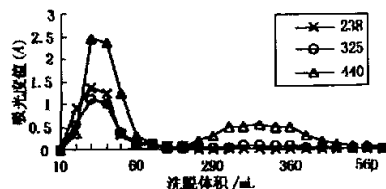


图9 加样量为1.8 mL时的分离曲线

3.6 色素溶液的光谱性质

分离前后色素液的紫外-可见光谱图分别如图 10 所示,分离前 $A_{238}/A_{440} = 0.60$,分离后 $A_{238}/A_{440} = 0.16$,杂质峰值大大降低。

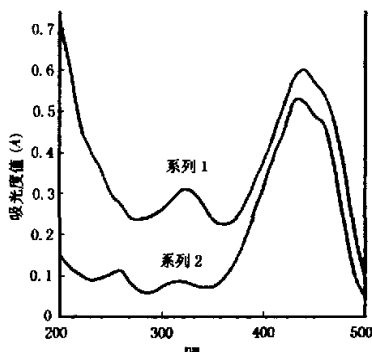


图 10 分离前后色素稀溶液的紫外-可见光谱图
(系列 1—分离前,系列 2—分离后)

4 结 语

以葡聚糖凝胶为支持剂,采用双柱联洗法精制栀子黄色素较适宜的工艺条件为:葡聚糖凝胶为支持剂,柱径 2 cm,双柱联洗单柱高 30 cm,洗脱流速 4 mL/min,蒸馏水为洗脱剂,加样量 1.8 mL。在此条件下精制得率 48.9%。精制前后的光谱图显示,精制后色素中的栀子苷吸收峰明显降低,同时,凝胶层析法也能除去部分栀子黄色素中造成其色调

变暗的多酚类物质——绿原酸(水溶液的最大吸收波长 325 nm)。后续的稳定性和可加工性都得到了很大的提高。

本研究探索的精制方法为工业化生产杂质含量低、符合国际市场要求的栀子黄色素提供了参考。凝胶可以反复使用,洗脱溶剂为水,消耗成本较低。在工业化生产中可以扩大柱的直径以增加柱的容量,柱径可达到 100 cm,不会降低层析的分辨率。分离后没有达到精制要求的色素液可以回收再精制,不会造成大的浪费。

参 考 文 献

- 1 马自超,庞世珍.天然食用色素化学及生产工艺学.北京:中国轻工业出版社,1992. 35
- 2 Ichi T, Higashimura Y, Katayama T et al. J. of Japanese Society of Food Science and Technology, 1995, 42(10): 784~789
- 3 施琴.食品工业,1992(1):35~36
- 4 刘峰,彭瑞琪,李定芳.广西轻工业,1995(1):33~35
- 5 Kamkura M, Nakazato K. J. of the Food Hygienic Society of Japan, 1985, 26(2): 150~159
- 6 郭克琳,史作清等.中国食品添加剂,1996(2):4~7
- 7 严希康.生化分离技术.上海:华东理工大学出版社,1996.49~54

A Study on the Refinement of Gardenia Yellow with Gel Filtration Chromatography

Lu Xiaoling Yao Zhongming Jiang Pingping

(Department of Food Engineering, Tianjin Institute of Light Industry, Tianjin, 300222)

ABSTRACT Adopting the gel filtration chromatography to refine gardenia yellow was studied in this article. The optimum conditions were in the following process: loading a 30 cm × 2 Sephadex column with a diameter of 2 cm, adding 1.8 millitre sample of pigment and washing with distilled water at a flow rate of 4 mL/min. The refinement yield is 48.9%.

Key words gel filtration chromatography, gardenia yellow, refinement