

大孔树脂纯化万寿菊花中叶黄素的工艺优化

Optimization of purification process of lutein from Marigold by macroporous resin

吴红艳 石 岩 李秀鑫 安 琪

WU Hong-yan SHI Yan LI Xiu-xin AN Qi

(齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161000)

(School of Food and Bioengineering, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161000, China)

摘要:目的:提高万寿菊花中叶黄素的纯度。方法:以葵花籽油微乳液作为提取剂提取万寿菊中的叶黄素。利用 KOH-C₂H₅OH 溶液对叶黄素粗提物进行皂化,再用大孔树脂进一步纯化。结果:静态试验中,HP-20 型大孔树脂对叶黄素的吸附及解析效果最好,以 80% 乙醇溶液作为吸附溶剂,无水乙醇溶液作为解析溶剂,上样质量浓度为 0.01 mg/mL,最佳静态吸附条件为温度 30 ℃,吸附时间 2.0 h, pH 7.0;最佳静态解析条件为温度 40 ℃,解析时间 1.0 h, pH 为 7.0。动态试验中,最佳上样质量浓度为 0.01 mg/mL,上样流速为 0.4 mL/min。经大孔树脂吸附后的叶黄素纯度可达 61.72%。结论:大孔树脂纯化后的万寿菊中叶黄素的纯度明显提高。

关键词:万寿菊;叶黄素;皂化;大孔树脂;微乳液

Abstract: **Objective:** This study aimed to improve the purity of lutein in Marigold. **Methods:** Lutein was extracted from marigold by sunflower seed oil microemulsion. The crude extract of lutein was saponified with KOH-C₂H₅OH solution and further purified with macroporous resin. **Results:** In the static test, HP-20 macroporous resin had the best adsorption and resolution effect of lutein. 80% ethanol solution was used as the adsorption solvent, and anhydrous ethanol solution was used as the analytical solvent, with the loading mass concentration of 0.01 mg/mL. The optimal static adsorption conditions were 30 ℃ temperature, adsorption for 2.0 h, at pH 7.0; the optimal static analytical conditions were temperature 40 ℃, analytical time 1.0 h, at pH 7.0. In the dynamic test, the optimal loading concentration was 0.01 mg/mL, and the loading flow rate was 0.4 mL/min. The purity of lutein after adsorption by macroporous resin reached 61.72%. **Conclusion:** The purity of lutein in marigold after

macroporous resin purification is obviously improved.

Keywords: marigold; lutein; saponification; column chromatography; microemulsion

万寿菊具有较高的营养保健价值,其花、叶可入药,有清热化痰、补血通经的功效^[1]。由万寿菊提取分离制成的叶黄素产品可作为食品及饲料着色剂使用,同时在预防视网膜黄斑病变和艾滋病、提高人和动物免疫力、预防心脑血管疾病、作为新型饮料等方面具有卓越的生理功能^[2]。万寿菊叶黄素提取后常用的纯化方法有柱色谱法、结晶法、高效逆流色谱法等,相比较而言,柱色谱法具有成本低廉、操作简单等特点,其中,大孔树脂被广泛应用于多酚、生物碱、黄酮等植物活性成分的分离纯化^[3-5]。李育楠^[6]采用 HZ816 树脂纯化玉米黄粉中的叶黄素,以 V_{无水乙醇}:V_{乙酸乙酯} 为 9:1 作洗脱剂进行洗脱,较皂化后叶黄素的纯度(92.17%)提高了 4.32%。目前,从万寿菊中制备高纯度叶黄素的研究较少,且一些有关叶黄素纯化方法的研究存在纯度低、工艺复杂以及溶剂有毒性等问题,影响了万寿菊花资源的开发利用^[7-8]。试验拟确定大孔树脂纯化万寿菊中叶黄素的工艺条件,进一步提高叶黄素的纯度,以期为后续工业化研究和开发万寿菊中叶黄素类产品提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

多力葵花油:佳格投资(中国)有限公司;

Tween80、Span80、氢氧化钾:河北市光复精细化工有限公司;

叶黄素标准品(纯度≥90%):上海源叶生物科技有限公司;

无水乙醇:河北市天力化工研究所;

万寿菊颗粒:广州立达尔生物科技股份有限公司;

X-5、S-8、D-352、D-101、HP-20 大孔树脂:南昌市广

基金项目:黑龙江省教育厅基本业务专项(编号:135409412)

作者简介:吴红艳(1969—),女,齐齐哈尔大学教授,博士。

E-mail: hljwuhongyan@163.com

收稿日期:2021-12-31 **改回日期:**2022-05-17

富药品有限公司。

1.2 仪器与设备

水浴恒温振荡器:SHA-C 型,河北阅近仪器有限公司;

可见分光光度计:722N 型,济南易农仪器有限公司;

电子天平:BSA124S-CW 型,德国赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;

磁力搅拌器:IKAC-MAG HS-4 型,艾卡(广州)仪器设备有限公司;

pH 计:Sartorius 谱及型,上海仪电科学仪器股份有限公司;

层析柱:1.5 cm×56 cm,河北庆傅仪器有限公司;

旋转蒸发器:RE-52AA 型,湖南雅阳仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 叶黄素粗制品的制备 万寿菊颗粒粉碎过 80 目筛,按 m 万寿菊粉 : V 葵花籽油微乳液 为 1 : 50 (g/mL) 将万寿菊粉和葵花籽油微乳液混合均匀,添加 1% 纤维素酶。45 °C 恒温水浴中振荡 2.0 h,用 0.45 μ m 滤膜抽滤,收集滤液,经旋转蒸发得叶黄素粗提物。

1.3.2 叶黄素粗制品的皂化 按 m 叶黄素粗提物 : $V_{\text{KOH-C}_2\text{H}_5\text{OH}}$ 溶液 为 5 : 6 (g/mL) 将叶黄素粗提物与 0.15 g/mL 的 KOH-C₂H₅OH 溶液混合均匀,50 °C 下超声皂化 58 min,将滤液旋转蒸发,得到浓缩液备用。

1.3.3 大孔树脂纯化叶黄素

(1) 最佳大孔树脂的选择:分别选取 X-5、D-352、D-101、HP-20、S-8 5 种大孔树脂,将纯品叶黄素分别与不同体积分数的乙醇混合均匀,制备成不同的叶黄素—乙醇稀释液,用叶黄素—乙醇稀释液吸附大孔树脂,真空抽滤,测定 447 nm 处吸光度值,并计算其吸附率。

(2) 静态吸附剂的选择:将纯品叶黄素分别与不同体积分数的乙醇混合均匀,制备成不同的叶黄素—乙醇稀释液,在不同温度、吸附时间、pH 下进行吸附,真空抽滤,测定 447 nm 处吸光度值,并计算其吸附率。

(3) 上样浓度对静态吸附的影响:将纯品叶黄素分别与不同体积分数的乙醇混合均匀,制备成不同的叶黄素—乙醇稀释液,将稀释液配制成不同浓度的上样液,采用大孔树脂进行吸附,真空抽滤,测定 447 nm 处吸光度值,并计算其吸附率。

(4) 静态解析剂的选择:用超纯水对已吸附叶黄素的 HP-20 大孔树脂进行清洗,清洗液置于 100 mL 锥形瓶中,分别加入不同体积分数的乙醇,制备成不同的叶黄素—乙醇稀释液,不同温度、解析时间、pH 下进行解析,真空抽滤,测定 447 nm 处吸光度值,并计算其解析率。

(5) HP-20 型大孔树脂动态条件优化:分别考察上样质量浓度(流速 0.4 mL/min, pH 6.0)和上样流速(pH 6.0,质量浓度 0.01 mg/mL)对动态吸附吸附率的影响。

影响。

1.3.4 吸附率、解析率的计算 分别按式(1)、式(2)计算吸附率和解析率。

$$Q_{\text{吸}} = \frac{A_a - A_b}{A_a} \times 100\%, \quad (1)$$

$$Q_{\text{解}} = \frac{A_c}{A_a - A_b} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

$Q_{\text{吸}}$ ——吸附率, %;

$Q_{\text{解}}$ ——解析率, %;

A_a ——叶黄素稀释液的吸光度值;

A_b ——大孔树脂吸附叶黄素后滤液的吸光度值;

A_c ——大孔树脂解析叶黄素后滤液的吸光度值。

1.3.5 高效液相色谱检测纯化后叶黄素纯度 准确称量 1 mg 叶黄素,将其完全溶解至 10 mL 甲醇中,稀释制成 0.1 mg/mL 的标准溶液。C₁₈ 反相色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m),流动相为乙酸乙酯,柱温 30 °C,进样量 1 μ L,流速 0.5 mL/min,检测波长 447 nm。

1.3.6 数据处理 所有试验重复 3 次,采用 Origin 和 Excel 软件进行图表绘制,通过 SPSS 软件对数据进行显著性分析,字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 最佳大孔树脂的选择

由图 1 可知,大孔树脂种类对色素的纯化效果存在差异,吸附率从高到低依次为大孔树脂 HP-20>D-101>X-5>S-8>D-352。HP-20、D-101、S-8 3 种大孔树脂均属于非极性,根据相似相溶的原理,如果树脂的极性接近吸附颗粒的极性,则其吸附能力会更好。S-8 和 D-352 是极性树脂,叶黄素是脂溶性色素,几乎不溶于水所以其吸附率较低。大孔树脂 HP-20 的解析率最高,是因为该树脂具有表面积大和孔径大的特点,更有助于色素的吸附和解析。故选取大孔树脂 HP-20 对万寿菊中的叶黄素进行纯化。

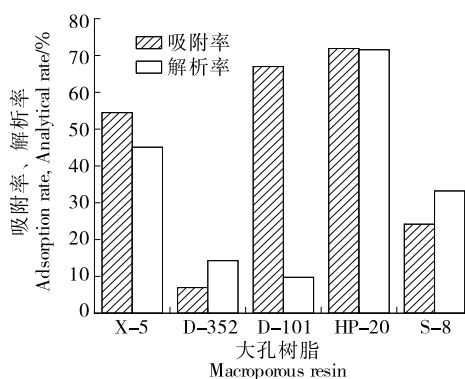


图 1 大孔树脂对叶黄素吸附率和解析率的影响
Figure 1 The effect of different resins on the adsorption and analytical rate of lutein

2.2 静态吸附剂的选择

由图 2 可知,当乙醇体积分数 $<80\%$ 时,吸附率与乙醇体积分数呈正比,是因为乙醇使大孔树脂发挥作用,使其得到了充分的溶胀,因此其吸附能力增强即吸附率高;当乙醇体积分数 $>80\%$ 时,吸附率呈下降趋势,可能是由于大孔树脂的吸附达到了饱和,故选择体积分数为 80% 的乙醇溶液作为吸附剂。

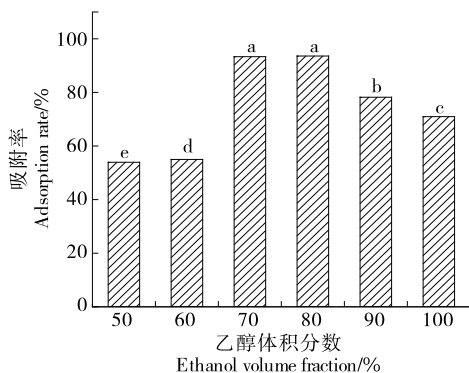


图 2 乙醇体积分数对叶黄素吸附率的影响

Figure 2 The effect of different adsorbents on the adsorption rate of lutein

2.3 上样质量浓度对静态吸附的影响

由图 3 可知,随着上部样品质量浓度的增加,吸附量先增大后减小。当上样质量浓度 $>0.01 \text{ mg/mL}$ 时,吸附速率趋于下降。上样质量浓度太高,杂质含量增加,叶黄素与大孔树脂之间的接触面积减少,可能会影响大孔树脂对叶黄素的吸附^[9]。因此,选择 0.01 mg/mL 的样品质量浓度作为最佳吸附条件。

2.4 静态吸附单因素试验

2.4.1 温度对静态吸附率的影响 由图 4 可知,当温度为 30°C 时,HP-20 型大孔树脂静态吸附率最高,当温度 $>30^\circ\text{C}$ 时,吸附率呈下降趋势。温度越高,叶黄素的稳定性越差,其稀释液更容易挥发,故吸附率降低^[10]。因

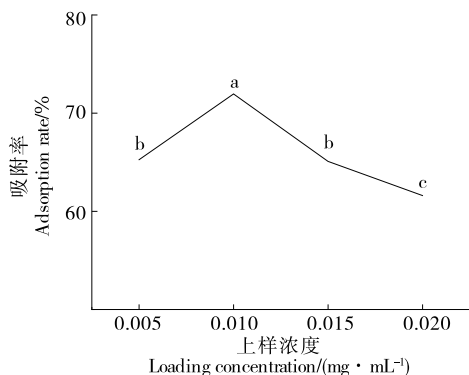
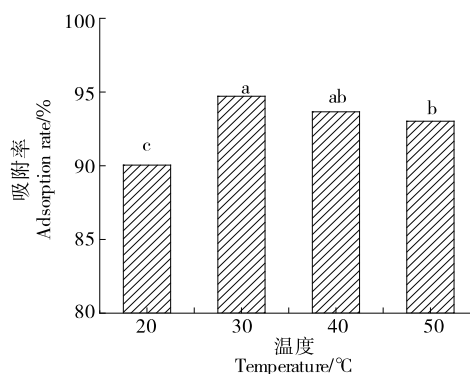


图 3 上样质量浓度对叶黄素静态吸附率的影响

Figure 3 The effect of different loading concentrations on the adsorption rate of lutein



80%乙醇, pH 5.0, 吸附时间 2 h

图 4 温度对叶黄素静态吸附率的影响

Figure 4 The effect of different temperatures on the static adsorption rate of lutein

此,选取静态吸附温度为 30°C 。

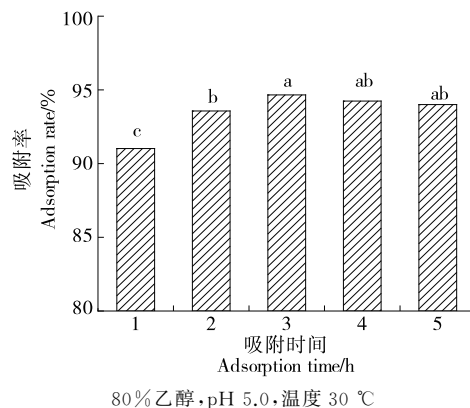
2.4.2 吸附时间对静态吸附率的影响 由图 5 可知,随着吸附时间的增加,静态吸附速率先增大后趋于稳定。当吸附时间 $>3 \text{ h}$ 时,吸附速率无明显变化,HP-20 大孔树脂已处于吸附饱和状态。因此,选择静态吸附时间为 3 h 。

2.4.3 pH 对静态吸附率的影响 由图 6 可知,当稀释液的 pH 为 $3.0\sim 6.0$ 时,叶黄素的吸附率呈上升的趋势,当稀释液的 pH >6.0 时,吸附率下降。这可能是由于弱酸条件下,叶黄素易与大孔树脂发生氢键作用,使其更容易吸附在大孔树脂上^[13],因此选取 pH 为 6。

2.5 静态吸附正交试验

在单因素试验的基础上,选择温度、吸附时间和 pH 为试验因素,以大孔树脂吸附率为考察指标,进行三因素三水平正交试验优化静态吸附工艺条件,试验因素水平见表 1,试验设计及结果见表 2。

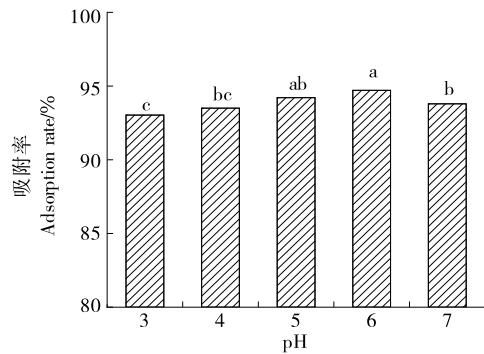
由表 2 可知,各因素对大孔树脂吸附率的影响顺序为温度 $>$ 吸附时间 $>$ pH,最佳试验组合为 $A_2 B_1 C_3$,即温



80%乙醇, pH 5.0, 温度 30°C

图 5 吸附时间对叶黄素静态吸附率的影响

Figure 5 The effect of different time on the static adsorption rate of lutein



80%乙醇,温度 30℃,吸附时间 2 h

图 6 pH 对叶黄素静态吸附率的影响

Figure 6 The effect of different pH values on the static adsorption rate of lutein

表 1 静态吸附正交试验因素水平表

Table 1 Factor level table of static adsorption orthogonal test

水平	A 温度/℃	B 吸附时间/h	C pH
1	20	2	5.0
2	30	3	6.0
3	40	4	7.0

表 2 静态吸附正交试验设计及结果

Table 2 Orthogonal test design analysis table

试验号	A	B	C	吸附率/%
1	1	1	1	94.45±0.102
2	1	2	2	95.24±0.091
3	1	3	3	93.81±0.081
4	2	1	2	94.05±0.055
5	2	2	3	96.24±0.034
6	2	3	1	94.99±0.065
7	3	1	3	91.86±0.036
8	3	2	1	91.05±0.077
9	3	3	2	92.41±0.075
k_1	94.470	94.423	93.467	
k_2	95.093	94.177	93.900	
k_3	91.773	93.737	93.970	
R	3.320	0.754	0.503	

度 30℃,吸附时间 2.0 h,pH 7.0,测得平均吸附率为 $(96.35\pm0.032)\%(n=3)$ 。

2.6 静态解析剂的选择

由图 7 可知,随着乙醇体积分数的增加,HP-20 型大孔树脂对叶黄素的解析率增加,是由于乙醇溶液可以使大孔树脂得到充分溶胀,同时叶黄素在乙醇中溶解度较高,使叶黄素和大孔树脂之间的作用力减小,将其叶黄素

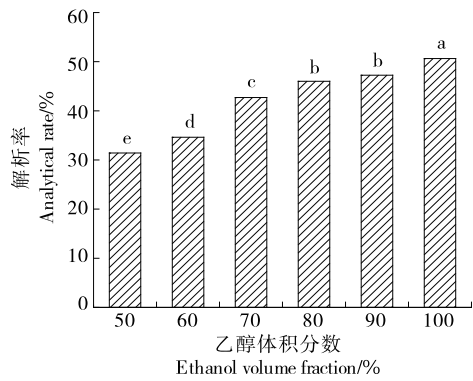


图 7 乙醇体积分数对静态解析率的影响

Figure 7 The effect of different analytical solvents on the static analytical rate

从大孔树脂中洗脱出来溶解于乙醇溶液中。由于无水乙醇的解析率最高,因此选取其作为大孔树脂的解析溶剂。

2.7 静态解析单因素试验

2.7.1 温度对静态解析率的影响 由图 8 可知,随着温度的升高,解析率先增加后降低。当温度为 40℃时,叶黄素的解析率最高。当温度>40℃时,解析率呈下降趋势。因此选取 40℃作为最佳解析温度。

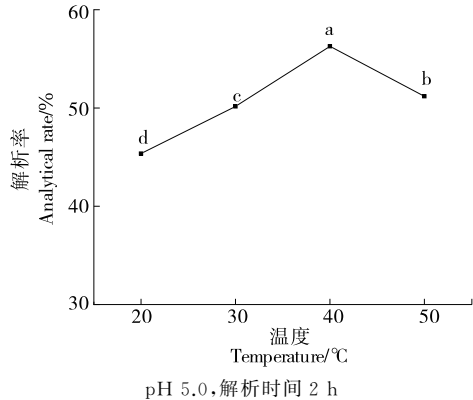


图 8 温度对静态解析率的影响

Figure 8 Effects of temperature on static resolution rate

2.7.2 pH 对静态解析率的影响 由图 9 可知,当 pH 为 3.0~5.0 时,解析率随之增加,当 pH>5.0 时,解析率趋于平稳,对叶黄素的解析率无显著性影响。为了节约实际用量,选取 pH 5.0 作为最佳解析条件。

2.7.3 解析时间对静态解析率的影响 由图 10 可知,随着解析时间的增加,解析率呈先增加后降低的趋势。当解析时间为 1~3 h 时,解析率基本不变,其中 2 h 时的解析率最高,当解析时间>3 h 后解析率出现了急剧下降,是因为解析时间过长,叶黄素的稳定性变差,且无水乙醇挥发,影响解析结果。因此选取 2 h 为最佳解析时间。

2.8 静态解析正交试验

在单因素试验的基础上,选择温度、解析时间和 pH

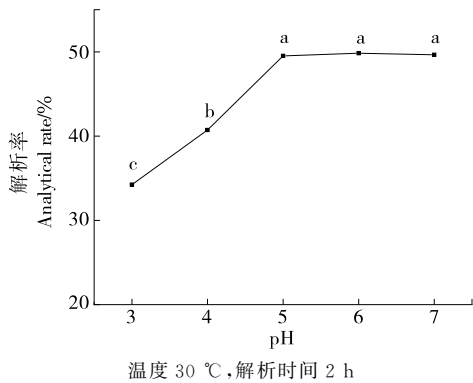


图 9 pH 对静态解析率的影响

Figure 9 Effects of pH on static resolution rate

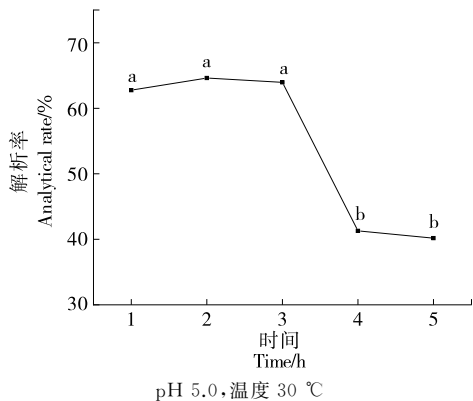


图 10 解析时间对静态解析率的影响

Figure 10 Effects of time on static resolution rate

为试验因素,以大孔树脂解析率为考察指标,进行三因素三水平正交试验优化静态解析工艺条件,试验因素水平见表 3,试验设计及结果见表 4。

由表 4 可知,各因素对大孔树脂吸附叶黄素解析率的影响依次为温度>解析时间>pH,最佳工艺组合为 A₂B₁C₃,即温度 40 ℃,解析时间 1.0 h,pH 7.0,测得平均解析率为(72.23±0.064)% (n=3)。

2.9 HP-20 型大孔树脂动态吸附条件优化

2.9.1 上样质量浓度对动态吸附的影响 由图 11 可知,叶黄素的吸附量随样品溶液质量浓度的增加而先增加后减少。当上部样品质量浓度>0.01 mg/mL 时,会发生部分溶质泄漏,导致叶黄素的损失和浪费^[11]。因此,当样品

表 3 静态解析正交试验因素水平表

Table 3 Factor level table of static analysis orthogonal test

水平	A 温度/℃	B 解析时间/h	C pH
1	30	1	5.0
2	40	2	6.0
3	50	3	7.0

表 4 静态解析正交试验设计及结果

Table 4 Analytical condition orthogonal test results

试验号	A	B	B	解析率/%
1	1	1	1	66.67±0.085
2	1	2	2	64.39±0.071
3	1	3	3	65.39±0.081
4	2	1	2	71.62±0.056
5	2	2	3	70.47±0.055
6	2	3	1	68.74±0.055
7	3	1	3	66.89±0.057
8	3	2	1	64.24±0.051
9	3	3	2	65.70±0.068
k ₁	65.483	68.393	66.550	
k ₂	70.277	66.367	67.237	
k ₃	65.610	66.610	67.583	
R	4.794	2.026	1.033	

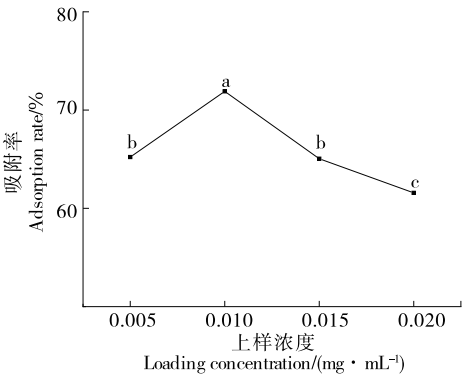


图 11 上样质量浓度对叶黄素动态吸附率的影响

Figure 11 The effect of loading concentration on dynamic adsorption rate

质量浓度为 0.01 mg/mL 时,叶黄素的动态吸附效果最好。

2.9.2 上样流速对动态吸附的影响 由图12可知,叶黄

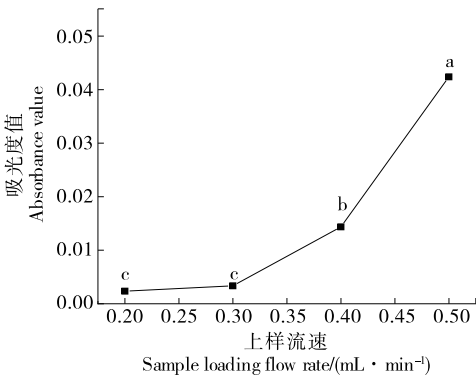


图 12 上样流速对叶黄素动态吸附的影响

Figure 12 The effect of loading concentration on dynamic adsorption rate

素的吸光度值随样品溶液上样流速的增加而增加。当上样流速 >0.4 mL/min 时,吸光度值突然升高,说明叶黄素并未被大孔树脂完全吸附便已流出^[12]。因此,当上样流速为 0.4 mL/min 时,叶黄素的动态吸附效果最好。

2.10 纯化样品与叶黄素标准品的对比

由图 13 可知,试验所纯化的叶黄素与纯品叶黄素的出峰时间基本一致,差距较小,出现偏差是因为样品浓缩液中不能完全去除杂质,但是经过大孔树脂吸附等一系列的提纯操作可以得到纯度为 61.72% 的万寿菊叶黄素纯度,基本达到提纯目的。

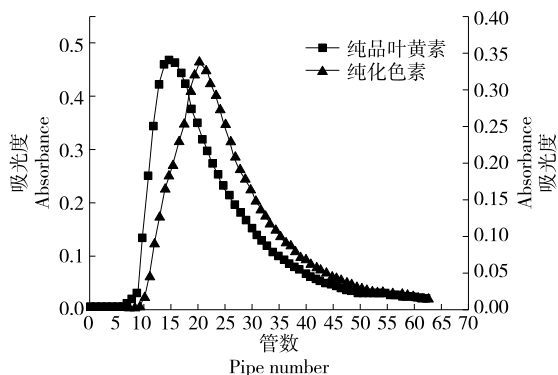


图 13 上样质量浓度对叶黄素动态吸附率的影响

Figure 13 The effect of loading concentration on dynamic adsorption rate

3 结论

采用大孔树脂将叶黄素粗品进行纯化,通过吸附率以及解析率对其静态和动态条件进行优化。结果表明:静态试验中,HP-20 型大孔树脂对叶黄素的吸附与解析效果最好,选取体积分数为 80% 的乙醇作为吸附剂,最佳静态吸附质量浓度为 0.01 mg/mL,选取无水乙醇作为解析剂。大孔树脂对叶黄素的最佳吸附工艺条件为温度 30°C ,吸附时间 2.0 h, pH 7.0;最佳解析工艺条件为温度 40°C ,解析时间 1.0 h, pH 7.0。动态试验中,样品溶液的最佳吸附质量浓度为 0.01 mg/mL,最佳样品流速为 0.4 mL/min。通过高效液相色谱法测定其纯度可达 61.72%。后续需进一步分离纯化以提高叶黄素纯度。

参考文献

- [1] 郭耀东, 牛仙, 任嘉瑜. 万寿菊资源综合开发利用研究进展[J]. 商洛学院学报, 2019, 33(2): 18-23.
GUO Y D, NIU X, REN J Y. Research progress on comprehensive development and utilization of marigold resources[J]. Journal of Shangluo University, 2019, 33(2): 18-23.
- [2] FU X, MA N, SUN W, et al. Microwave and enzyme co-assisted aqueous two-phase extraction of polyphenol and lutein from marigold (*Tagetes erecta* L.) flower [J]. Industrial Crops &

Products, 2018, 123: 296-302.

- [3] 蒋凌志. 玉米蛋白粉中叶黄素的提取工艺研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011: 33-35.
JIANG L Z. Study on extraction technology of lutein from corn gluten powder[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011: 33-35.
- [4] 蔡婧婧. 生姜姜黄素纯化、脂质体制备及对小鼠溃疡性结肠炎治疗的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2020: 32-38.
CAI J J. Study on purification, lipid preparation and treatment of ulcerative colitis in mice[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2020: 32-38.
- [5] 许英一, 吴红艳, 王宇, 等. 大孔树脂纯化苜蓿叶蛋白肽的工艺优化[J]. 食品与机械, 2019, 35(5): 167-171.
XU Y Y, WU H Y, WANG Y, et al. Optimization of purification process of alfalfa leaf protein peptide by macroporous resin[J]. Food & Machinery, 2019, 35(5): 167-171.
- [6] 李育楠. 玉米叶黄素提取纯化技术研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2014: 43-48.
LI Y N. Study on Extraction and purification technology of lutein from maize [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University, 2014: 43-48.
- [7] KUMAR R, YU W, JIANG C, et al. Improvement of the isolation and purification of lutein from marigold flower (*Tagetes erecta* L.) and its antioxidant activity[J]. Journal of Food Process Engineering, 2010, 33(6): 1 065-1 078.
- [8] GIORDANO E, QUADRO L. Lutein, zeaxanthin and mammalian development: Metabolism, functions and implications for health[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2018, 647: 33-40.
- [9] 冯倩, 郑伟, 关永霞, 等. 紫花地丁中秦皮乙素、总香豆素大孔树脂纯化工艺研究[J]. 现代中药研究与实践, 2020, 34(4): 39-43.
FENG Q, ZHENG W, GUAN Y X, et al. Study on purification process of Aesculetin and total coumarin in *Viola yedoensis* by macroporous resin[J]. Research and Practice of Modern Traditional Chinese Medicine, 2020, 34(4): 39-43.
- [10] ZHANG J, FENG C R, GE P, et al. High purity separation of hypericin from *Hypericum perforatum* L. extract with macroporous resin column coupling preparative liquid chromatography [J]. Process Biochemistry, 2021, 103: 107-113.
- [11] 张丽丽. 天然叶黄素酯的树脂纯化及叶黄素双乙酰酯的催化合成研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2011: 15-22.
ZHANG L L. Study on resin purification of natural lutein ester and catalytic synthesis of luteindiacetyl ester[D]. Shanghai: East China University of Technology, 2011: 15-22.
- [12] 张德谨, 陈义勇, 胡雅琳, 等. 大孔树脂纯化乌饭树叶黄酮工艺研究[J]. 食品与机械, 2018, 34(2): 166-170, 194.
ZHANG D J, CHEN Y Y, HU Y L, et al. Study on purification of flavonoids from black rice leaves by macroporous resin[J]. Food & Machinery, 2018, 34(2): 166-170, 194.