非水介质大孔树脂分离纯化虾壳中虾青素

陈志强[1,2],金　杨[1],任　璐[1]

(1. 天津科技大学　食品工程与生物技术学院,教育部食品营养与安全重点实验室,天津 300457;
2. 天津市尖峰天然产物研究开发有限公司,天津 300457)

摘　要:通过7种大孔树脂对虾青素的静态吸附容量和解析率等指标的考察,筛选出AB-8大孔吸附树脂,用于分离虾壳中虾青素,同时利用高效液相色谱(HPLC)法测量虾青素的含量。结果表明,AB-8树脂对虾青素的吸附量为(24.17±0.5) mg/g,解吸率为95.2%,最大上样量(每g干树脂)以虾青素计为(23.07±0.2) mg,并确定用8倍量柱床体积的乙酸乙酯为洗脱剂,纯化所得虾青素的纯度为14.73%。

关键词:大孔树脂;虾壳;虾青素;吸附

中图分类号:TQ425.21+7　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1672-3678(2009)03-0039-04

Separation and purification of astaxanthin from shrimp waste by non-aqueous medium macroporous resin

CHEN Zhi-qiang[1,2], JIN Yang[1], REN Lu[1]

(1. College of Food Engineering and Biotechnology, Key Laboratory of Food Nutrition and Safety of Ministry of Education, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2. Jianfeng Natural Product R&D Co. Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: Seven types of macroporous adsorption resins were screened with respect to the static adsorption capacity and desorption ratio of astaxantin of shrimp waste and the AB-8 type was chosen as the best one. Astaxantin of shrimp waste was analyzed by high performance liquid chromatography. The results showed that the static adsorption quantity reached (24.17±0.5) mg/g, the desorption rate was 95.2%. The maximal adsorption quantity of astaxantin was (23.07±0.2) mg/g dry resin, the determined elution solvent was eight-fold column volume of ethlacetate, and the product purity was 14.73%.

Key words: macroporous resin; shrimp waste; astaxantin; adsorption

虾青素(astaxanthin,3,3'-二羟基-4,4'-二酮基-β,β'-胡萝卜素),又名虾黄质、龙虾壳色素,是海洋生物体内主要的类胡萝卜素之一[1-2]。鱼类和甲壳类对虾青素的吸收和积累要比其他类胡萝卜素如角黄质(canthaxanthin)、叶黄素(lutein)和玉米黄质(zeaxanthin)有效得多[3]。近年来常用的虾青素分离纯化方法主要有有机溶剂萃取法、超临界流体萃取法、硅胶柱层析法等[4]。这些方法普遍存在虾青素纯化效率不高、不适于工业化生产等缺点。大孔吸附树脂为多种功能相结合的分离材料,具有选择性好、吸附容量大、机械强度高、再生处理方便等优点。因其吸附速度快、解吸容易,在天然产物

收稿日期:2008-05-29

基金项目:天津科技大学引进人才科研启动基金资助项目(20060439, 0200096)

作者简介:陈志强(1972—),男,天津人,博士,副教授,研究方向:天然产物化学,E-mail:tedvchen@yahoo.com.cn

成分研究领域得到了广泛的应用[5]。目前,吸附树脂主要应用在以水为介质的体系中,非水介质体系中应用大孔树脂的研究尚很少见,尤其是类似于虾青素的脂溶性成分的分离纯化,在应用大孔树脂进行产业化生产方面,一直是困扰天然产物提取行业的难点。本文对7种大孔吸附树脂在丙酮、氯仿、甲醇和乙酸乙酯4种非水介质中对虾青素的吸附分离特性进行研究,筛选最佳树脂 AB-8,并确定最佳吸附与解吸附的工艺参数。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

高效液相色谱仪,Laballiance 公司;FA1604S 型电子天平,上海天平仪器厂;RE-5203A 型旋转蒸发仪,上海振捷实验设备有限公司;玻璃层析柱(2.0 cm×30 cm)、LSA-5B、LX-16、AB-8、LX-20、LSA-21、ADS-17 和 D-101 树脂、虾青素标准品为 Roche 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 虾青素薄层层析(TLC)方法的建立

用微量进样器吸取虾青素标准品和试样溶液各5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,吹干溶剂后,置于展开剂(V(正己烷):V(丙酮)=4:1)中展开完全,取出薄层层析板吹干,置于可见光下检视,试样在与标准品相应的位置上呈椭圆形红色斑点。

1.2.2 虾青素标准曲线的测定

用 HPLC 法测定[6]。

HPLC 色谱条件:Laballiance 色谱工作站;色谱柱,Kromasil-C18 (250 mm×4.6 mm);检测器,500型紫外检测器;泵,双 series III 型;柱温30 ℃;流动相为甲醇;流速1.0 mL/min;检测波长478 nm。

1.2.3 虾壳中虾青素提取液的制备

将新鲜虾壳洗净、烘干,破碎成1 cm左右的碎片,称取80 g虾壳试样,用1 mol/L HCl 浸泡24 h后,滤去酸液,用清水淋洗至 pH=7。将淋洗过的虾壳移至棕色磨口瓶中,加入95%乙醇浸泡2 d,抽滤,至虾壳发白。滤液于旋转蒸发器60 ℃真空浓缩至干,加入无水乙醇溶解得待试验用虾青素提取液。

1.2.4 大孔树脂静态吸附率及解吸率测定

分别称取预处理好的7种大孔吸附树脂2.0 g(通过含水率换算得干质量),置于250 mL具塞锥形瓶中,分别加入100 mL试样溶液,25 ℃恒温振荡24 h(60 r/min),过滤,测定滤液中虾青素的质量浓度。每种树脂平行测定3次。按式(1)计算虾青素的吸附量和吸附率。取过滤后的树脂,精密加入100 mL无水乙醇,与吸附相同条件下充分解吸,测其洗脱液质量浓度。每种树脂平行测定3次。按式(1)计算虾青素的解吸率。

$$Q_e(\text{mg/g 树脂})=(\rho_0-\rho_e)V_1/m;E(\%)=(\rho_0-\rho_e)/\rho_0;D(\%)=\rho_X V_2/(\rho_0-\rho_e)V_1 \quad (1)$$

式中:Q_e 为吸附量,mg/g;ρ_0 为初始质量浓度,mg/mL;ρ_e 为平衡质量浓度,mg/mL;V_1 为加入试样液体积,mL;m 为树脂干质量,g;E 为吸附率;D 为解吸率;ρ_X 为洗脱液质量浓度,mg/mL;V_2 为洗脱液体积,mL。

1.2.5 大孔树脂吸附动力学研究方法

准确称取已预处理的大孔树脂2.0 g,置于250 mL三角瓶中,加入100 mL的色素溶液,置于25 ℃水浴摇床12 h(60 r/min)振荡,每隔一定时间测定一次吸附量,连续测定4 h,计算树脂对虾青素的吸附量与时间的关系。

1.2.6 大孔树脂吸附等温线的测定

准确称取 AB-8 树脂1.0 g,加入不同质量浓度的虾青素醇溶液25 mL,分别置于25、35 和45 ℃水浴摇床振荡吸附12 h,测其上清液中虾青素质量浓度,计算吸附量。根据吸附平衡后吸附量与溶液中虾青素质量浓度之间的关系,得到树脂吸附虾青素的等温曲线。

1.2.7 动态吸附与解吸

动态吸附曲线的绘制:取 AB-8 大孔树脂10 g,湿法装入 ϕ 2.0 cm×30 cm的玻璃层析柱中,树脂厚度约12.5 cm(柱床体积10 mL)。试样液以每小时1倍量柱床体积的流速上柱,分段收集过柱流出液,测定其中有效成分的质量浓度,按(流出液质量浓度/上柱液质量浓度)×100%计算未吸附率(%)。以流出液体积(mL)为横坐标,虾青素的未吸附率(%)为纵坐标,绘制洗脱曲线。平行测定3次。

洗脱溶剂用量的确定:按确定的工艺条件,取供试品溶液30 mL,以每小时1倍量柱床体积的流速上柱,分别通过 AB-8 树脂柱(10 g)进行吸附,按1.2.2方法检测虾青素是否吸附完全。用乙酸乙酯洗脱,洗脱速度为0.2 mL/min。每份收集10 mL,测定各份洗脱液中有效成分的质量浓度。

1.2.8 纯化后虾青素含量的测定

上柱纯化后,虾青素提取液于旋转蒸发器60 ℃真空蒸发至干。精密称取干燥粉末3.0 mg,按

1.2.2 法测定其中虾青素含量。

2　结果与讨论

2.1　线性回归方程

按 1.2.2 法求虾青素峰面积与对应标样进样量之间线性相关性。结果显示,虾青素的线性相关系数 r 为 0.999 9,呈现出良好的线性关系,其线性回归方程为:$Y = 8 \times 10^6 X + 60\ 290$。

2.2　大孔吸附树脂的静态吸附-解吸附实验结果

2.2.1　树脂的筛选

在相同实验条件下进行静态吸附与解吸附,其中洗脱剂为乙酸乙酯,静态吸附与解吸附实验结果见表 1。

表 1　不同树脂对虾青素的吸附率和解吸率

Table 1　The adsorption rate and desorption rate of astaxantin on different resins

树脂型号	吸附量/($mg \cdot g^{-1}$)	吸附率/%	解吸率/%
LSA-5B	21.76	75.4	31.1
LX-16	21.67	74.1	46.7
AB-8	24.17	87.1	95.2
LX-20	21.09	68.7	64.9
LSA-21	22.89	81.3	72.4
ADS-17	22.01	78.7	67.5
D-101	20.61	61.2	57.2

根据表 1 中吸附率和解吸率的测定比较,可以看出 AB-8、LX-20、LSA-21 和 ADS-17 树脂的吸附率和解吸率较高,因此进一步探讨虾青素在这 4 种树脂上的吸附行为。

2.2.2　树脂静态吸附动力学曲线

树脂的吸附动力学特性与吸附效率密切相关。选择 4 种较理想的树脂测定吸附量,在有充分时间吸附的情况下,有些树脂可能具有相近的饱和吸附量,但是由于各树脂化学和物理结构的差别,其吸附动力学过程是有差异的。因此,通过实验比较 4 种树脂的吸附动力学过程。测定各树脂在 t 时刻内($t = 10$、60、120、180、240 min)达到平衡时的吸附量 Q_e,以 Q_e 对 t 作图,得 4 种树脂对虾青素的吸附动力学曲线,如图 1 所示。由图 1 可见,筛选的 4 种树脂在起始阶段吸附速率较大,60 min后,吸附量增加缓慢,4 h基本达到吸附饱和,且任意时间 AB-8 树脂的吸附量大于其他 3 种树脂的吸附量。因此确定 AB-8 为本实验的最佳树脂。

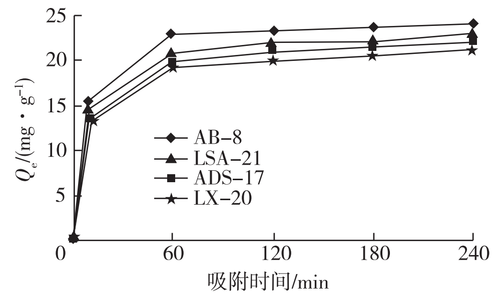

图 1　静态吸附动力学曲线

Fig. 1　Static adsorption kinetics curve

2.2.3　温度对吸附的影响

图 2 为 3 个温度下 AB-8 树脂对虾青素的吸附等温线。

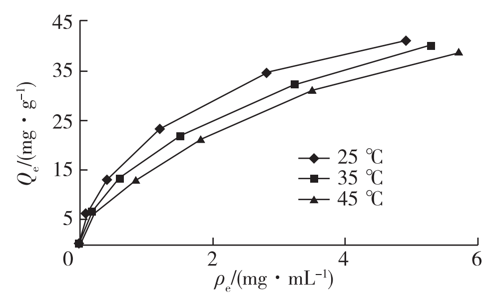

图 2　AB-8 树脂在不同温度下吸附 OPC 的等温线

Fig. 2　Adsorption isotherm of astaxantin on AB-8 resin at different temperatures

吸附等温线为上凸型,属优惠型吸附。在本实验研究的范围内,虾青素在 AB-8 树脂上吸附量随温度的升高略有下降,说明吸附过程有少量的热放出。对 3 条等温线分别用 Langmuir($q = \dfrac{KQ_m\rho}{1 + K\rho}$)和 Freundlich($q = K_f \rho^{\frac{1}{n}}$)吸附等温式进行非线性回归,结果见表 2。由表 2 可知,Langmuir 及 Freundlich 等温吸附方程均能较好地描述虾青素在 AB-8 树脂上的物理吸附平衡,说明吸附趋近单分子层吸附。

表 2　AB-8 树脂对虾青素的吸附方程

Table 2　The adsorption equations of astaxantin on AB-8 resin

温度/K	Langmuir 方程			Freundlich 方程		
	K	Q_m/($mg \cdot g^{-1}$)	相关系数(R^2)	K_f	n	相关系数(R^2)
298	3.15	25.75	0.993 1	22.30	1.80	0.992 4
308	1.38	29.97	0.992 3	19.12	1.49	0.996 2
318	0.51	45.08	0.991 8	14.93	1.61	0.995 7

2.3　洗脱剂的选择

室温下,吸附相同量虾青素的 AB-8 树脂分别用丙酮、氯仿、甲醇和乙酸乙酯进行洗脱,结果表明,氯仿及乙酸乙酯的解吸率及所得虾青素含量均较高,但氯仿洗脱的极性杂质多,故选择乙酸乙酯为洗脱剂。

2.4　动态吸附曲线的绘制

由测定结果可知,过柱流出液为280 mL时,虾青素泄漏量开始显著增大,其累积泄漏百分率在5%左右;说明此时开始明显泄漏,故确定树脂的最大上样量为24 mL/g,即每 g 干树脂吸附虾青素(23.07 ± 0.2) mg。动态吸附曲线见图3。

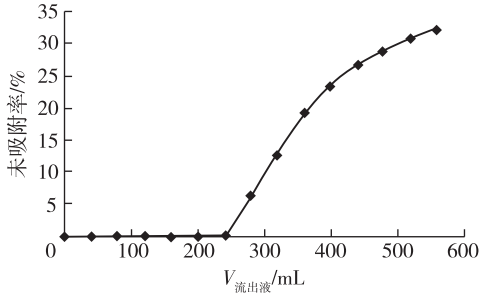

图3　AB-8 树脂对虾青素的动态吸附曲线

Fig. 3　Dynamic adsorption kinetics curve of astaxanthin on AB-8 resin

2.5　洗脱溶剂用量的确定

以体积(mL)为横坐标,虾青素质量浓度(mg/mL)为纵坐标,绘制洗脱曲线,结果见图4。由图4可知,在洗脱剂用量为80 mL时,能将大部分有效成分解吸下来,故确定洗脱剂用量为8倍量柱床体积。解吸液浓缩至干后可获得虾青素粗品,经 HPLC 测定,其纯度为14.73%。

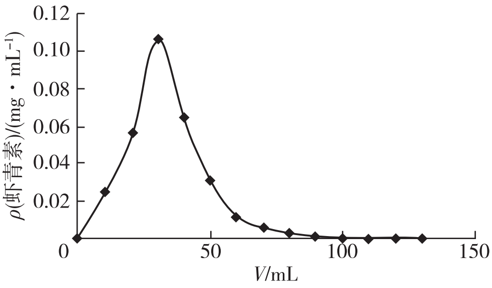

图4　乙酸乙酯对虾青素的洗脱曲线

Fig. 4　Elution curve of astaxanthin by ethyl acetate

3　结　论

通过实验比较得出树脂 AB-8 比较适合于吸附提取虾青素。应用 AB-8 大孔树脂,其吸附量为(24.17 ±0.5) mg/g,解吸率为95.2%,最大上样量为24 mL/g,即每 g 干树脂吸附虾青素(23.07 ± 0.2) mg/g,用8倍量柱床体积的乙酸乙酯洗脱可以得到比较理想的产品。经 HPLC 测定,纯化所得虾青素的纯度为14.73%。

参考文献:

[1] Yokoyama A, Miki W. Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum*[J]. FEMS Microbiol Lett, 1995, 128(1): 139-143.

[2] 郑裕国, 王远山, 薛亚平. 抗氧化剂的生产及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.

[3] Torrissen O J, Christiansen R. Requirements for carotenoids in fish diets[J]. J Appl Ichthyol, 1995, 32(11): 225-230.

[4] 宋杉霖,阎杰,王荣辉,等.天然虾青素的提取纯化及其应用[J].广东化工,2007,34(11):63-66.
Song Shanlin, Yan Jie, Wang Ronghui, et al. Extraction, purification and application of natural astaxanthin[J]. Guangdong Chemical Industry,2007,34(11):63-66.

[5] 何炳林, 黄文强. 离子交换与吸附树脂[M]. 上海: 上海科教出版社, 1995.

[6] 谢虹,张慧碧,何国平,等.高效液相色谱法测定虾青素的含量[J].粮食与饲料工业,2003(1):46-47.
Xie Hong, Zhang Huibi, He Guoping, et al. Determination of astaxanthin by HPLC[J]. Cereal & Feed Industry, 2003(1): 46-47.