

大孔吸附树脂分离纯化枸杞叶总黄酮的研究

刘安军¹, 刘慧慧¹, 郭丹霄¹, 滕安国¹, 周绍迁²

(1. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)(2. 福建仙洋洋食品科技有限公司, 福建宁德 352100)

摘要: 研究应用大孔树脂纯化枸杞叶总黄酮的工艺, 比较了 AB-8、ADS-5、ADS-7、ADS-17、ADS-21、HP-20 六种大孔树脂分离纯化枸杞叶总黄酮的优劣, 结果表明, HP-20 型大孔树脂对枸杞叶总黄酮的吸附性能与解吸效果最好。确定了其最佳工艺为: 上柱液 13 BV, 上样流速 2 mL/min, 上样浓度 2.336 mg/mL, 以 70%乙醇为洗脱液, 洗脱流速 2 mL/min, 洗脱剂用量 3.5 BV。在此条件纯化后, 枸杞叶黄酮提取物中总黄酮含量由 29.02%提高到 83.75%。该工艺条件科学合理, 可有效地用于枸杞叶黄酮的分离富集。高效液相色谱检测芦丁含量由 9.88%提高到 23.79%。

关键词: 枸杞叶黄酮; 大孔树脂; 纯化

文章编号: 1673-9078(2012)3-292-296

Separation and Purification of Total Flavones from *Lycium barbarum* Leaves by Macroreticular Resin

LIU An-jun¹, LIU Hui-hui¹, GUO Dan-xiao¹, TENG An-guo¹, ZHOU Shao-qian²

(1 College of Food Science and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

(2.Fujian Xianyangyang Food Science and Technology Co., Ltd, Ningde 352100, China)

Abstract: Purification of total flavones of Lycium Chinese leaves using macroreticular resins was investigated. Dynamic elution ratio of AB-8, ADS-5, ADS-7, ADS-17, ADS-21, and HP-20 were studied respectively and compared in order to find the optimum macroreticular resin. Results indicated that the HP-20 resin was the best due to its highest adsorption and desorption properties. The optimum conditions were: ratio of flavonoid volume to the bed volume of 13 BV, the pH value of sample 6, concentration of sample 2.336 mg/mL, current velocity 2 BV/h, 70% alcohol as eluant for desorption, current velocity 2 BV/h and eluant volume 3.5 BV. Under those conditions, and the content of Lycium Chinese leaves flavonoids increased from 29.02% to 83.75%. The technique condition is scientific and reasonable. It can be used to separate and purificate total flavonoids from Lycium Chinese leaves. Flavonoid compounds in leaves of Lycium barbarum were analyzed by using HPLC. Lutein content greatly increased from 9.88% to 23.79% after the column purification.

Key words: flavonoids from *Lycium barbarum* leaves; macroporus resin; purification

枸杞叶 (*Lycium barbarum* leaves) 俗称天精草, 现代医药学研究表明, 枸杞叶含有丰富的营养成分和活性物质, 具有降血压、降血脂、降血糖、预防心血管疾病、预防白内障、清除自由基、促进益生菌细胞生长、抗氧化、抗疲劳、抗癌、抗衰老、耐缺氧、抗微生物感染等功能^[1]。枸杞黄酮类化合物是枸杞果实和枸杞叶中的有效生物活性物质之一, 枸杞叶是一种廉价而丰富的黄酮提取原料^[2]。大孔吸附树脂是由聚合单体和交联剂、致孔剂、分散剂等添加剂经聚合反应制备而成的一类有机高聚物吸附剂。其原理是选择性吸附中药及其复方的有效成分, 从而达到提取精

收稿日期: 2011-08-26

基金项目: 天津市科技成果转化及产业化推进计划项目 (09ZXHNC04900);

福建仙洋洋食品科技有限公司资助项目

作者简介: 刘安军 (1963-) 男, 教授, 博导

的目的。对具体分离物要选择合适的树脂, 目前已被广泛应用于多种植物黄酮类化合物的分离提纯中^[3,4]。本文研究大孔树脂分离纯化枸杞叶总黄酮的工艺及效果, 为枸杞叶黄酮类化合物的进一步开发应用及枸杞资源的综合开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用材料为枸杞叶茶, 购自宁夏银川市。

1.2 试剂

芦丁标品 (BR), 乙醇 (AR), 氢氧化钠 (AR), 亚硝酸钠 (AR), 硝酸铝 (AR), 石油醚 (AR), 天津江天试剂厂; 大孔吸附树脂 AB-8、ADS-5、ADS-7、ADS-17、ADS-21、HP-20, 南开大学化工厂。

1.3 仪器设备

旋转蒸发仪, 上海亚荣仪器有限公司; 循环水真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; 电子分析天平, 上海精天电子仪器有限公司; 恒温水浴锅, 天津市泰斯特仪器有限公司; 微机型 pH 计, 上海理达仪器厂; 冷冻干燥机, 德国 KENDRO 公司; 真空干燥箱, 上海益恒科技有限公司; 恒流泵, 保定兰格恒流泵有限公司; 电脑全自动部分收集器, 上海沪西分析仪器厂; 紫外可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; 高效液相色谱仪, 上海雷勃分析仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 枸杞叶粗黄酮的提取

准确称取粉碎的枸杞叶茶 50 g, 加入 1000 mL 蒸馏水 80 °C 浸提 2 次, 每次 3 h; 残渣加入 1000 mL 75% 乙醇回流提取两次, 每次 2 h, 温度 70 °C, 抽滤, 合并滤液, 浓缩至无醇味, 用石油醚除去色素类杂质, 浓缩, 冷冻干燥, 得粗黄酮样品。

1.4.2 枸杞叶总黄酮含量测定

参考文献^[5]。

1.4.3 树脂的预处理

取 6 种大孔吸附树脂, 先以蒸馏水洗去破碎树脂和杂质, 湿法装入 1.6 cm×40 cm 的玻璃层析柱, 用高于树脂层的 95% 乙醇浸泡 24 h, 放出浸液, 继续用无水乙醇冲洗至洗出液加 5 倍体积水振摇不出现白色浑浊, 再用蒸馏水洗至无醇味。树脂装柱后, 用 5% NaOH 溶液以 2 BV/h 流速酸洗, 蒸馏水洗至中性; 再用 5% HCL 溶液以 2 BV/h 流速碱洗, 蒸馏水洗至中性, 放入烘箱 50 °C 烘干, 备用。

1.4.4 大孔吸附树脂的筛选

取 6 种已经预处理好的不同型号树脂各 2.0 g, 加入 250 mL 具塞三角瓶中, 加入样品液 (总黄酮浓度为 1.110 mg/mL) 100 mL, 室温置于摇床上振荡 24 h。将充分吸附后的树脂过滤, 置于 250 mL 三角瓶中, 再加入 70% 的乙醇 100 mL, 室温置于摇床上振荡解吸 24 h, 测定吸附前后样液的总黄酮浓度, 计算树脂的静态饱和吸附量、吸附率和解吸率。计算公式如下:

$$\text{静态饱和吸附量}(\text{mg/g})=(C_0-C_1)V_1/W$$

$$\text{吸附率}(\%)=(C_0-C_1)/C_0 \times 100$$

$$\text{解吸率}(\%)=C_2V_2/(C_0-C_1)V_1 \times 100$$

注: C_0 为起始浓度, mg/mL; C_1 为平衡浓度, mg/mL; C_2 为解吸液浓度; W 为干树脂质量, g; V_1 为吸附液体积, mL; V_2 为解吸液体积, mL。

1.4.5 HP-20 型树脂吸附性能考察

1.4.5.1 泄漏点与最大吸附量的考察

选用 $\Phi 1.6 \times 40$ cm 的玻璃层析柱, 采用湿法装柱, 床体积约为 40 mL。准确称取枸杞叶粗黄酮, 配成浓

度约为 8 mg/mL 的溶液 (总黄酮浓度约 2.336 mg/mL), 上样流速为 2 mL/min, 处理 25 倍树脂床体积的物料液, 每处理 1 BV 的物料液收集一次流出液, 测定其枸杞叶黄酮的含量, 以上样体积对流出液中黄酮含量绘制泄露曲线。

1.4.5.2 上样液 pH 值的考察

将总黄酮浓度为 2.336 mg/mL pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 的上样液 100 mL 以 2 mL/min 流速通过 HP-20 型树脂柱 (床体积约为 40 mL), 并用蒸馏水洗至流出液无色, 检测流出液黄酮含量, 计算总黄酮吸附率。计算公式如下:

$$\text{吸附率}(\%)=(C_0-C_1)/C_0 \times 100$$

注: C_0 为上柱液中总黄酮浓度, mg/mL; C_1 为过柱流出液及水洗液中总黄酮浓度, mg/mL。

1.4.5.3 上样浓度的考察

将枸杞叶总黄酮浓度分别为 0.584、1.168、2.336、3.504、4.672 mg/mL 的上样液 400、200、100、76.5、50 mL 以 2 mL/min 流速分别通过 HP-20 树脂柱 (床体积约为 40 mL), 并用蒸馏水洗至流出液无色, 检测流出液黄酮含量, 计算总黄酮吸附率。

1.4.5.4 上样流速的考察

将总黄酮浓度为 2.336 mg/mL 的上样液 100 mL 分别以 1、2、3、4、5 mL/min 的流速通过 HP-20 型树脂柱 (床体积约为 40 mL), 并用蒸馏水洗至流出液无色, 检测流出液黄酮含量, 计算总黄酮吸附率。

1.4.6 HP-20 型树脂洗脱性能考察

1.4.6.1 洗脱剂浓度的考察

按照上述实验确定的吸附条件, 将 5 份总黄酮浓度为 2.336 mg/mL 上样液分别通过大孔树脂柱, 上样完毕后, 用蒸馏水洗至流出液无色, 再分别用体积分数为 30%、50%、70%、90% 的乙醇溶液以 2 mL/min 流速洗脱至洗脱液无色, 收集洗脱液, 浓缩、冻干, 计算洗脱率、总黄酮回收率及纯化后黄酮干物质的纯度。计算公式如下:

$$\text{洗脱率}(\%)=C_2V_2/(C_0V_0-C_1V_1) \times 100$$

$$\text{回收率}(\%)=C_2V_2/C_0V_0 \times 100$$

$$\text{纯度}(\%)=C_2V_2/m \times 100$$

注: C_0 为上柱液中总黄酮浓度, mg/mL; C_1 为过柱流出液及水洗液中总黄酮浓度, mg/mL; C_2 为洗脱液中总黄酮浓度; V_0 为上柱液体积, mL; V_1 为过柱流出液及水洗液体积, mL; V_2 为洗脱液体积, mL; m 为纯化后黄酮干物质的质量, mg。

1.4.6.2 洗脱剂流速的考察

按照上述实验确定的吸附条件, 将 5 份枸总黄酮浓度为 2.336 mg/mL 上样液分别通过大孔树脂柱, 上样完毕后, 用蒸馏水洗至流出液无色, 以 70% 乙醇分

别以 1、2、3、4、5 mL/min 的流速洗脱, 收集洗脱液, 计算洗脱率。

1.4.6.3 洗脱曲线考察

按照上述实验所确定的吸附和洗脱条件, 将总黄酮含量 2.336 mg/mL 的上样液 100 mL 进行吸附和洗脱, 分段收集洗脱液, 测定每 0.5 份洗脱液中总黄酮浓度, 绘制解吸曲线。

1.4.7 HPLC 检测芦丁含量

1.4.7.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent: Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm×200 mm, 5μm), 流动相为甲醇: 1%醋酸溶液 (1:1), 柱温 30 °C, 流速 0.7 mL/min, 检测波长为 360 nm, 进样量 20 μL。

1.4.7.2 芦丁标准曲线的制作

精密称取芦丁 10 mg, 用流动相溶解定容至 50 mL, 得浓度 0.2 mg/mL 芦丁标准溶液, 再将其稀释为浓度 2.5、5、10、20、40、80、160 μg/mL 的标准溶液, 分别精密吸取对照品溶液 20 μL, 按照色谱条件进行测定, 得标准曲线方程为 $Y=23870X-29997$, $R^2=0.9994$ 表明此芦丁对照品在 2.5~5 μL 范围内峰面积与浓度的线性关系良好。

1.4.7.3 样品芦丁含量 HPLC 测定

精密称取 10 mg, 用流动相溶解定容至 50 mL, 得浓度 0.2 mg/mL 样品溶液, 再将其稀释为浓度 160 μg/mL 溶液, 用 0.45 μm 有机系微孔滤膜过滤, 取对照品溶液 20 μL, 按照色谱条件检测芦丁含量。

2 结果与讨论

2.1 枸杞叶总黄酮含量测定

经测定, 未纯化的枸杞叶总黄酮含量为 29.02%, 表明去除杂质及叶绿素的样品总黄酮含量较高。

2.2 大孔吸附树脂的筛选

表 1 不同树脂对总黄酮的吸附与解吸

Table 1 The static absorption and elution ratio with different types of macroreticular resins on total flavones

树脂型号	饱和吸附量/(mg/g)	吸附率/%	解析率/%
AB-8	30.33±1.29	63.26±1.76	59.77±2.19
ADS-5	35.92±1.22	74.95±3.12	90.69±3.08
ADS-7	27.57±1.06	57.41±2.85	42.18±2.20
ADS-17	19.53±0.82	40.71±1.49	67.69±3.44
ADS-21	20.18±0.98	41.96±1.26	47.76±1.58
HP-20	49.65±2.11	78.38±3.23	95.79±3.64

由表 1 可以看出, HP-20 型树脂吸附枸杞叶总黄酮量最大, 解吸率也最高, 表现出较好的综合性能, 故选择 HP-20 做进一步研究。

2.3 HP-20 型树脂吸附性能考察

2.3.1 泄漏点与最大吸附量的确定

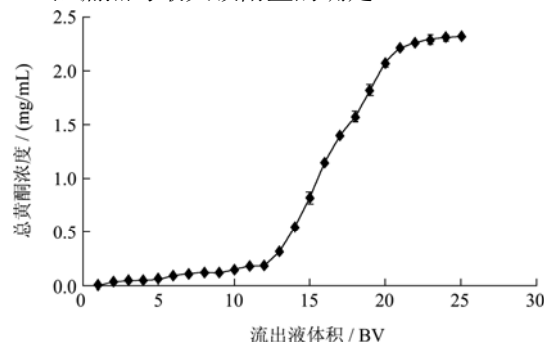


图 1 HP-20 树脂泄露曲线

Fig.1 Dynamic breakthrough curve of the HP-20 resin

从图 1 可以看出, 此浓度的枸杞叶黄酮上样液从第 13 BV 起开始明显泄漏, 当上样量为 21 BV 时, 树脂已达到吸附饱和, 为避免造成总黄酮的泄漏损失, 控制粗黄酮上样量不得超过 28.03 mg/mL 湿树脂。

2.3.2 上样液 pH 值的影响

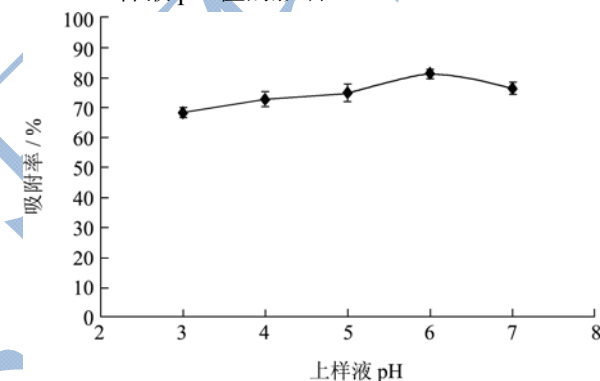


图 2 上样液 pH 值对吸附效果的影响

Fig.2 Effect of pH value of the sample on adsorption capacity

由图 2 可见, pH 对枸杞叶黄酮吸附率影响不大, pH6 时吸附率略高。黄酮类化合物为多羟基酚类, 呈弱酸性, 因而在弱酸性或酸性条件下易被吸附^[6]。分析图 2 的结果发现, 本实验中黄酮原液 pH (5.89) 近似为 6, 故不需调整上柱液 pH。

2.3.3 上样浓度的影响

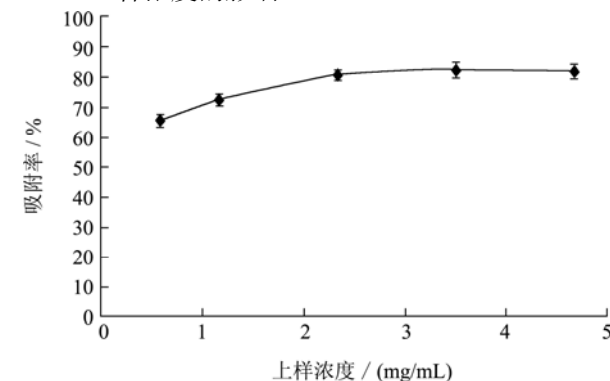


图 3 上样液浓度对吸附效果的影响

Fig.3 Effect of sample concentration on adsorption capacity

由图 3 可知, 上样浓度较小时, 吸附率也较低, 随着上样浓度的增加, 吸附率也不断增大, 当上样浓度达到 2.336 mg/mL 后吸附率变化不显著, 所以选择上样液总黄酮浓度为 2.336 mg/mL 比较合适。

2.3.4 上样流速的影响

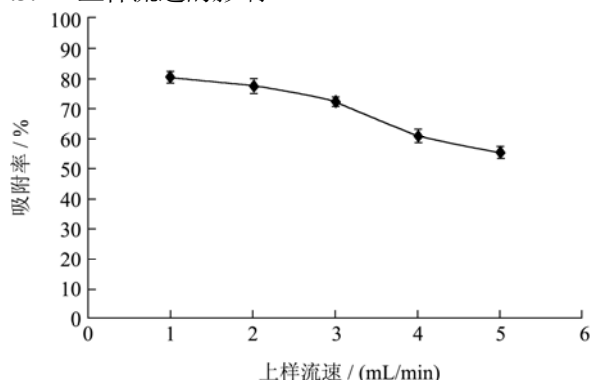


图 4 上样流速对吸附效果的影响

Fig.4 Effect of adsorption flow rat on adsorption capacity

由图 4 可知, 上样速度对吸附能力影响较大, 当上样流速为 1 mL/min 时吸附率最大, 但是操作周期过长, 且与流速为 2 mL/min 时吸附率相差不大, 为了提高纯化效率, 选择上样流速为 2 mL/min。

2.4 HP-20 型树脂的洗脱性能

2.4.1 洗脱剂浓度的影响

表 2 洗脱剂浓度对洗脱效果的影响

Table 2 Effect of eluent concentration on desorption efficiency

乙醇浓度/%	洗脱率/%	回收率/%	纯度/%
30	65.81±1.96	52.41±1.67	69.59±2.74
50	77.41±3.22	62.75±2.39	78.08±2.85
70	92.90±3.76	73.22±2.15	83.75±3.49
90	82.58±2.83	65.79±1.81	79.33±2.73

由表 2 可见, 当乙醇浓度为 70% 后, 洗脱率最高, 达 92.90%, 继续增加乙醇浓度洗脱率反而下降。且 70% 的乙醇洗脱的黄酮干物质的回收率最高, 纯度最高, 达到 83.75%。综合考虑黄酮回收率、纯度和原料成本, 本实验选用 70% 的乙醇为洗脱剂。

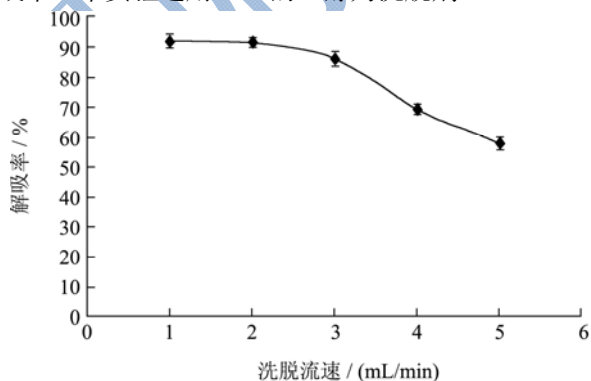


图 5 洗脱剂流速对洗脱效果的影响

Fig.5 Effect of desorption flow rate on desorption efficiency

2.4.2 洗脱剂流速的影响

图 5 结果表明, 脱附剂的流速越慢洗脱效果越好, 但流速太慢又会使工作周期过长。2 mL/min 洗脱流速与 1 mL/min 流速洗脱率相差不大, 可达到 91.25% 的洗脱率, 故选择洗脱速率为 2 mL/min。

2.4.3 洗脱曲线

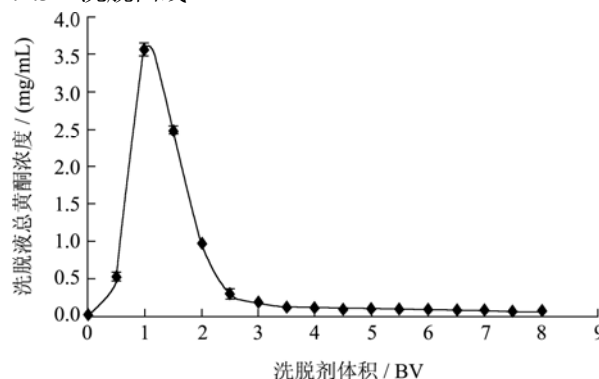


图 6 HP-20 树脂洗脱曲线

Fig.6 Dynamic desorption curve of the HP-20 resin

由图 6 可见, 在此条件下没出现拖尾现象, 用 3.5 倍树脂床体积的乙醇即可将枸杞叶黄酮基本洗脱完全。

2.5 HPLC 检测芦丁含量

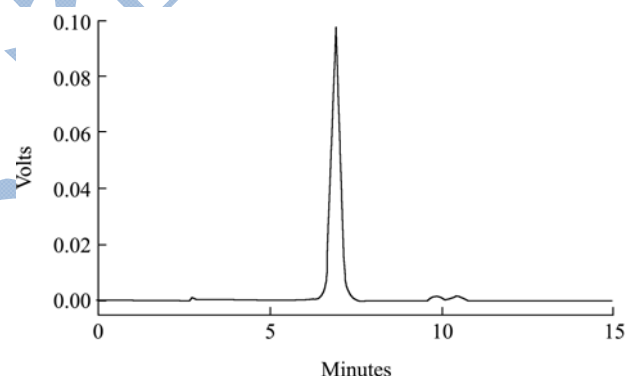


图 7 芦丁对照品 HPLC 图谱

Fig.7 HPLC chromatogram of lutein

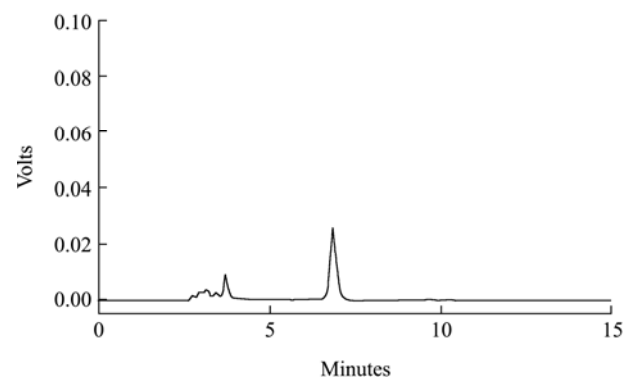


图 8 上柱前样品 HPLC 图谱

Fig.8 HPLC chromatogram of original sample

芦丁对照品及样品上柱前后 HPLC 分析图谱如图 7~9 为所示。可以看出枸杞叶黄酮成分中存在五个小

吸收带和一个大的吸收收带,且大的吸收带与芦丁标准品的出峰时间(6.927 min)一致。代入标准曲线得出黄酮上柱前芦丁含量为 9.88%,上柱后芦丁含量为 23.79%。

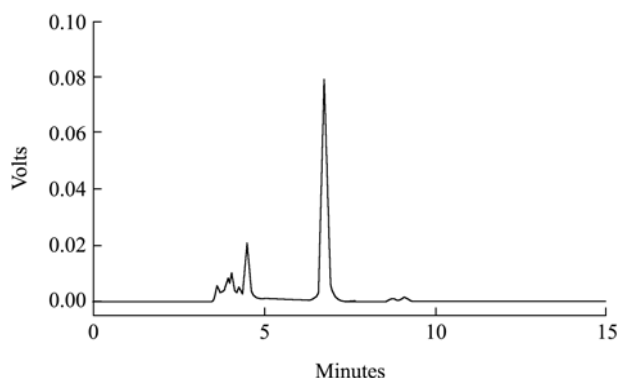


图9 上柱后样品 HPLC 图谱

Fig.9 HPLC chromatogram of purified sample

3 结论

本文对水提后枸杞叶残渣采用乙醇回流法提取总黄酮,并去除其中叶绿素等杂质,进而探索大孔吸附树脂分离纯化枸杞叶总黄酮工艺路线。通过对所选六种大孔吸附树脂对枸杞叶黄酮的吸附与解吸性能的研究,筛选出 HP-20 型树脂为理想的枸杞叶黄酮分离纯化的树脂。吸附分离的最佳工艺参数为:上柱液 13

BV,上柱速度 2 mL/min,上样浓度 2.336 mg/mL,以 70%乙醇为洗脱液,洗脱流速 2 mL/min,洗脱剂用量 3.5 BV。在此条件下,根据计算得出纯化前后的总黄酮纯度分别为 29.02%和 83.75%,总黄酮的纯度提高近 3 倍,总黄酮回收率为 73.22%,说明 HP-20 型树脂可有效地分离纯化枸杞叶黄酮。高效液相色谱检测纯化前后芦丁含量由 9.88%提高到 23.79%。

参考文献

- [1] 张华峰,杨晓华.枸杞叶的生物活性成分及其在食品工业中的应用[J].食品工业科技,2010,31(2):369-373
- [2] 刘兰英,曹有龙,赵友谊.枸杞叶黄酮纯化工艺研究[J].食品科技,2009,34(8):134-137
- [3] 雍晓静,刘钢,张境.应用大孔树脂分离纯化枸杞叶总黄酮的研究[J].宁夏大学学报(自然科学版),2005,26(2):148-150
- [4] 蔡丹昭,刘华钢,陈洪涛.大孔吸附树脂分离纯化番石榴叶总黄酮的研究[J].生命科学研究,2008,12(1):57-60
- [5] 吕凇,陶宁萍.紫外分光光度法检测桔皮中总黄酮含量的方法研究[J].现代食品科技,2009,25(2):217-220
- [6] 黄阿根,董瑞建,韦红,等.大孔树脂对荷叶黄酮的分离纯化[J].现代食品科技,2008,24(12):1202-1206