

大孔树脂纯化覆盆子黄酮的研究

张家瑞

(衡水学院, 河北衡水 053000)

摘要: 本实验采用大孔树脂对覆盆子黄酮进行分离纯化, 确定其分离纯化条件, 树脂的筛选实验结果和静态吸附动力学研究表明: 所选的 7 种大孔树脂, AB-8 树脂属于快速吸附树脂, 吸附率和解吸率都很高, 是理想用于覆盆子黄酮分离纯化的树脂, AB-8 树脂动态吸附、解吸实验表明: 当上样流速 0.2 mL/min, 上样浓度 1.2 mg/mL, pH=4.5, 用 2.0 mL/min 70% 的乙醇做解吸剂进行解吸时, 覆盆子黄酮纯度可达到 40.32%, 纯度提高 7.16 倍。

关键词: 覆盆子; 黄酮; 纯化; 树脂

文章篇号: 1673-9078(2013)4-817-821

Purification of Raspberry Flavonoids Using Macro-porous Resin

ZHANG Jia-rui

(Hengshui College, Hengshui 053000, China)

Abstract: Raspberry flavonoids were isolated and purified by macro-porous resin in this article. The results showed that AB-8 resin can rapidly adsorb flavonoids with higher adsorption and desorption rates than other macro-porous resin. Therefore, AB-8 resin was chosen as the best resin to isolate and purify raspberry flavonoids. Dynamic adsorption and desorption experiments showed that, when the sample flow rate, sample concentration, pH, desorption reagent, desorption reagent concentration and elution rate were 0.2 mL/min, 1.2 mg/mL, 4.5, ethanol, 70% and 2.0 mL/min, respectively, the raspberry flavonoids purity can reach 40.32%.

Key words: raspberry; flavonoids; purification; AB-8

覆盆子(raspberry)又称树莓、大号角公, 蔷薇科悬钩子属浆果植物。覆盆子果实富含氨基酸、矿物质、有机酸和 VE 人体必需的营养素外, 还含有黄酮、多糖、粗三萜等功能性物质^[1-2]。

大孔吸附树脂是一类有机高聚物吸附剂。它具有比表面积较大、交换速度较快、机械强度高、对被提取物污染小、热稳定好等特点^[3]。与其它分离技术相比, 它具有提高有效成分的相对含量、产品不吸潮、生产周期短、树脂再生方便、可重复使用等优点, 因而近几年在天然产物的分离纯化中被广泛应用, 尤其适用于黄酮类化学物的分离纯化^[4-5]。本实验采用大孔树脂对覆盆子总黄酮进行分离纯化, 确定其分离纯化条件, 为工业化生产提供实验依据。

1 材料

1.1 材料

覆盆子: 购自河北省衡水市中医药店; 试剂: 试剂均为分析纯; 树脂: S-8、D4006、D3520、AB-8、NKA-9, D101, D4020 购置于天津市南大和成树脂厂。

收稿日期: 2012-12-05

作者简介: 张家瑞, 男, 主管护师, 主要从事临床医疗、护理、保健等方面的研究

1.2 仪器

722 型光栅分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; 山奈酚对照品: 国家标准物质网; 层析柱 26 mm×146 mm (天津玻璃仪器厂)。

2 方法

2.1 供试液的制备

覆盆子→粉碎、过筛→乙醇提取→抽滤→减压蒸发→加水溶解→萃取→分液→旋蒸→乙醇溶解→备用

2.2 检测方法标准曲线的回归方程

精确称取山奈酚标准品 100 mg, 用 70% 乙醇溶解, 超声溶解后定容至 100 mL, 准确吸取 0、1、2、3、4、5、6 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加 2 mL 1% 的三氯化铝溶液进行显色反应, 用 70% 乙醇定容至刻度, 利用紫外分光光度计测定 270、290、320 三波长下吸光度值, 计算得到 ΔA , 绘图得到标准曲线方程如图 1 所示。

由图 1 得到标准曲线回归方程为 $C=1.443\Delta A$, 其中 C 为覆盆子黄酮浓度, 单位 mg/mL, R 值为 0.9998, 标准曲线具有显著相关性。

2.3 树脂预处理

用 2 倍体积的 95% 乙醇浸泡树脂 24 h 溶胀, 然后

用 95%乙醇洗至洗出液加适量水无白色浑浊,再用去离子水洗尽醇,转入酸碱处理,用体积分数 5% HCl 溶液浸泡 24 h,然后用去离子水洗至 pH 值为中性,接着用体积分数 5%的 NaOH 溶液浸泡 24 h,最后用去离子水洗至 pH 值为中性,浸泡于去离子水中备用。

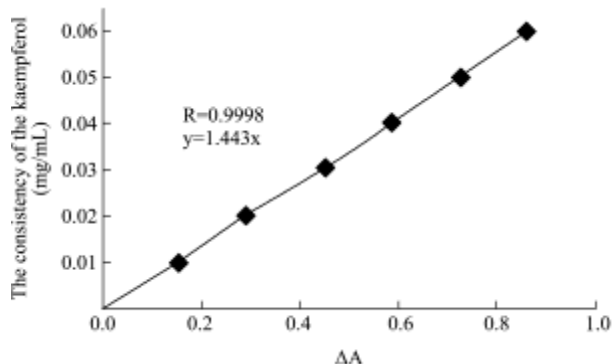


图 1 山奈酚标准曲线

Fig.1 The standard curve of the kaempferol

2.4 树脂的选择

根据吸附率、解吸及树脂的静态吸附动力学特性,从 7 种树脂中选出较理想的树脂。

2.4.1 树脂物理性质

各种树脂的物理指标如表 1 所示。

表 1 吸附树脂的物理性质

Table 1 The physical properties of adsorption resins

树脂类型	极性	颗粒直径/mm	平均孔径/nm	孔容/(mL/g)
D4006	非极性	0.3~1.25	6.5~7.5	0.73~0.77
D4020	非极性	0.3~1.25	10~10.5	2.88~2.92
D3520	非极性	0.3~1.25	10~10.5	2.10~2.15
D101	极性			
NKA-9	弱极性	0.3~1.25		
AB-8	非极性	0.3~1.25	13~14	0.73~0.77
S-8	极性	0.3~1.25	28~30	0.78~0.82

2.4.2 吸附率、吸附量和解吸率的测定

2.4.2.1 吸附率、吸附量

称取已处理好的 7 种湿树脂各 1 g,加入浓度为 1.6 mg/mL 的覆盆子黄酮提取液 50 mL,在摇床上以 100 r/min 的频率振摇 24 h 后,测定吸附液中黄酮的浓度,计算吸附率和吸附量。

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

注: C_0 为吸附前样液中黄酮的浓度, mg/mL; C_1 为吸附后上清液中黄酮的浓度, mg/mL。

$$\text{吸附量}(\text{mg/g}) = (C_0 - C_1) \times V / W$$

注: V 为溶液体积, mL; W 为树脂质量 g。

2.4.2.2 解吸率

去除吸附液后,将树脂加入 70%的乙醇溶液 100

mL,摇床上以 100 r/min 的频率振摇 24 h 后,测定解吸液中黄酮的浓度,计算树脂解吸率。

$$\text{树脂解吸率}(\%) = [C_2 / (C_0 - C_1)] \times 100$$

注: C_0 为吸附前样液中黄酮的浓度, mg/mL; C_1 为吸附后上清液中黄酮的浓度, mg/mL; C_2 为解吸液中黄酮的浓度, mg/mL。

2.4.3 大孔树脂静态吸附动力学特性^[6]

取大孔吸附树脂 AB-8、S-8、D3520 1.0 g(用滤纸吸干)装入三角瓶,精密加入覆盆子黄酮提取液 50 mL。摇床转速 100 r/min,震荡 10 h,每小时取 1 mL,测定黄酮含量,绘静态吸附动力学曲线。

2.5 树脂 AB-8 动态吸附工艺参数的确定

2.5.1 吸附流速的确定

将树脂以径高比 1:6 装柱,在上柱液浓度和上柱量一致的情况下,改变吸附流速进行动态吸附,每流出 10 mL 流出液收集并测定有效成分浓度。以流出液体积为横坐标,流出液黄酮浓度为纵坐标,绘制曲线。流出液黄酮浓度占上柱覆盆子黄酮浓度的百分比为泄漏率,当泄漏率为 10% 即为泄漏点,此时为吸附终点。根据泄漏点的定义在泄漏率曲线中找出合适的吸附速率。

2.5.2 上柱液浓度的确定

将树脂以径高比 1:6 装柱,取 100 mL 不同浓度上柱液,分别在最佳流速下通过树脂柱,进行动态吸附,计算吸附率和总吸附量。根据吸附率及总吸附量的变化,综合分析,确定最佳的上柱液浓度。

$$\text{总吸附量}(\text{mg}) = (C_0 - C_1) \times V$$

注: C_0 为吸附前样液中黄酮的浓度, mg/mL; C_1 为吸附后上清液中黄酮的浓度, mg/mL; V 为溶液体积, mL。

2.5.3 上柱提取液 pH 的确定

以 10% 的 HCL 和 NaOH 分别调节上柱提取液 pH 为一定值,在不同 pH 条件下测定树脂吸附量。

2.5.4 洗脱剂浓度的确定

取适宜浓度、适宜量的上柱液,在适宜的吸附流速下动态吸附后,用不同浓度的乙醇作为洗脱剂在相同洗脱流速下进行解吸,每 10 mL 洗脱液收集测定黄酮浓度,并计算解吸率。

$$\text{解吸率}(\%) = [(V_1 \times C_1) / (V_0 \times C_0)] \times 100$$

注: V_1 为洗脱液浓组分体积, mL; C_1 为洗脱液浓度, mg/mL; V_0 为上柱液体积, mL; C_0 为上柱液浓度, mg/mL。

2.5.5 洗脱流速的确定

取适宜的上柱液,在适宜的吸附流速下动态吸附后,用不同浓度的乙醇作为洗脱剂在不同洗脱流速下进行解吸,并计算解吸率。

2.6 回收率及再生

取浓度为 1.6 mg/mL 覆盆子黄酮提取液, 按 2.5 完成 AB-8 吸附和解吸后, 测定洗脱液中覆盆子黄酮浓度, 计算回收率。

$$D(\%) = \frac{W_1}{W_2}$$

注: D 回收率; W_1 覆盆子黄酮解吸量; W_2 原液中覆盆子黄酮量。

覆盆子黄酮在 AB-8 柱上进行吸附后, 用去离子水洗涤, 用 70% 乙醇洗脱, 最后用去离子水洗涤至无醇后进行再生, 反复 10 次后计算吸附率。

2.7 覆盆子黄酮纯度测定

取覆盆子黄酮提取液, 测其吸光度值, 带入回归方程计算相应的黄酮浓度, 再乘以提取液体积得产品中总黄酮质量, 记为 A, 然后将该提取液在电恒温干燥箱中干燥, 得到产品干燥后的质量, 记为 B, 按下式计算黄酮纯度:

$$\text{纯度} = A/B \times 100\%$$

3 结果与讨论

3.1 大孔树脂静态吸附研究

3.1.1 大孔树脂对覆盆子黄酮的静态吸附与解吸

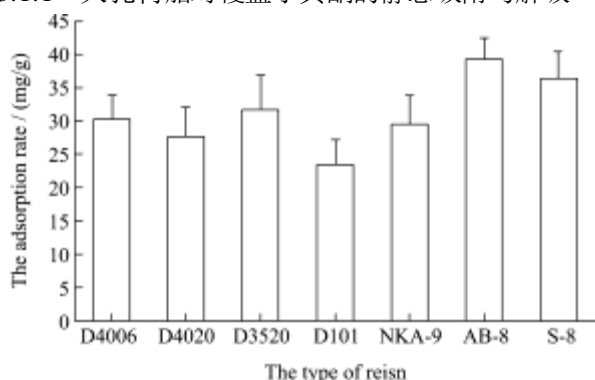


图 2 大孔树脂对覆盆子黄酮的静态吸附

Fig.2 The static adsorption of macroporous resin to raspberry flavonoids

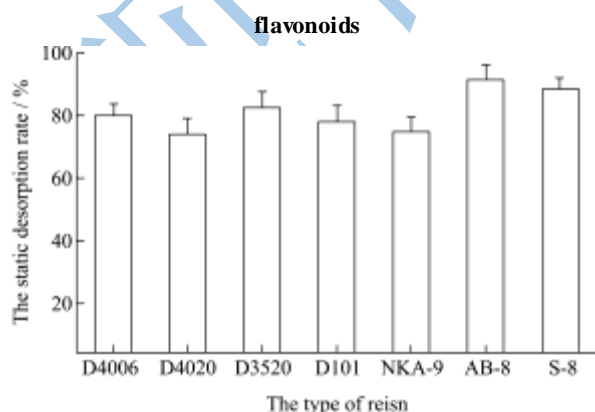


图 3 大孔树脂对覆盆子黄酮的静态解吸率

Fig.3 The static desorption rate of macroporous resin to raspberry flavonoids

称取已处理好的 7 种湿树脂各 1 g, 加入浓度为 1.6 mg/mL 的黄酮上柱液 50 mL, 在摇床上以 100 rpm 的频率振荡 24 h 后, 测定吸附液中黄酮的浓度, 计算吸附率和解吸率, 结果如图 2、3 所示。

由图 2、3 可知, 所选的几种吸附树脂对覆盆子黄酮的吸附及解吸率不同, 吸附率实验中, AB-8 树脂的吸附量最高达到 40.23 mg/g, 其次是 S-8、D3520, 而其它四种树脂的吸附量较低。解吸率实验中, AB-8 树脂的解吸率高于其他三种树脂, 达到 91%, 说明 AB-8 树脂对覆盆子黄酮有较好的吸附和解吸性, AB-8 树脂属于弱极性大孔吸附树脂, 此树脂的吸附率较大, 说明粗提液中的黄酮主要是弱极性成分。

通过以上分析, 树脂 AB-8、S-8、D3520 这三种树脂对覆盆子黄酮即具有较高的吸附量也具有较高的解吸率。

3.1.2 大孔树脂对覆盆子黄酮的静态吸附动力学特征

仅用树脂的吸附量和解吸率评价树脂的吸附性能具有不全面性, 适合的树脂不仅要有较高的吸附量、良好的吸附率, 同时吸附速率也应较快, 为此, 根据以上实验选取 AB-8、S-8、D3520 三种树脂研究了树脂的静态吸附动力学特征, 结果如图 4、5 所示。

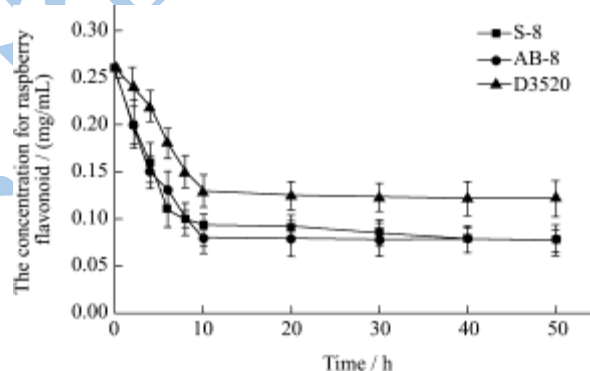


图 4 三种树脂静态吸附动力学曲线

Fig.4 The static adsorption kinetics of three resin

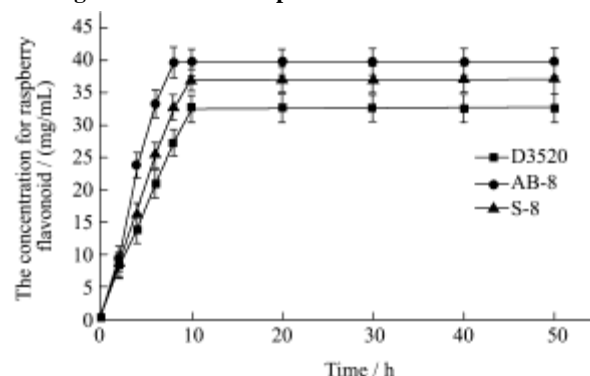


图 5 三种树脂对覆盆子黄酮吸附率与时间的关系

Fig.5 The relationship of adsorption rate of raspberry flavonoids with time by three kinds of resin

由图 4、5 可以看出, 树脂 AB-8 对覆盆子黄酮的

吸附为快速平衡型, 起初吸附量较大, 而后 8 h 达到吸附平衡, 树脂 S-8、D3520 达到吸附平衡的时间较长, 吸附速率较小。

为定量比较树脂 AB-8、S-8、D3520 对覆盆子黄酮的吸附速率, 研究了三种树脂对覆盆子黄酮吸附速率常数[K]。

根据 Langmuir 的吸附速率方程:

$$\ln \frac{Q_e}{Q_e - Q_t} = Kt + m$$

注: Q_e 为树脂对覆盆子黄酮的平衡吸附量; Q_t 为树脂对覆盆子黄酮在 t 时刻的吸附量; K 为平衡吸附速率常数; m 为截距; t 为吸附时间。

上式经变换后为 $-\ln(1-Q_t/Q_e)=Kt+m$, 以 $-\ln(1-Q_t/Q_e)$ 对时间 t 作图, 得到的直线方程中的斜率为平衡吸附速率常数 K , 截距为 m , 经计算后得到三种树脂的吸附速率常数及 m 值, 结果如表 2 所示。

表 2 三种树脂的平衡吸附速率常数

Table 2 the balance adsorption rate constant of the three resin

树脂类型	平衡速率常数(s^{-1})K	m	回归系数 R^2
AB-8	0.7813	0.5572	0.9907
S-8	0.6281	0.5389	0.9448
D3520	0.25043	0.3433	0.9468

由表 2 可知, 三种树脂的平衡吸附速率常数对比中, 树脂 AB-8 的 K 值最大, 因此, 选择 AB-8 树脂为覆盆子黄酮上柱纯化树脂。

3.2 大孔树脂 AB-8 对覆盆子黄酮动态吸附研究

3.2.1 覆盆子黄酮提取液上柱流速对 AB-8 吸附的影响

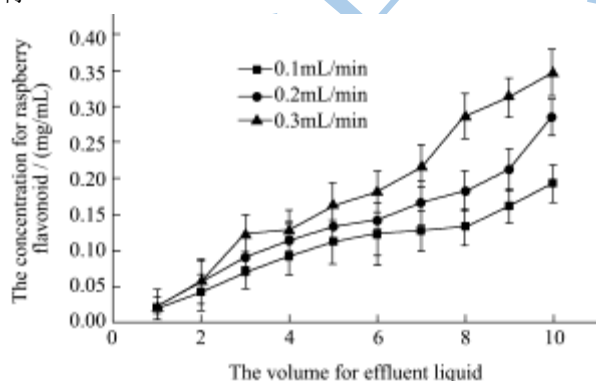


图 6 上柱流速对 AB-8 树脂吸附覆盆子黄酮的影响

Fig.6 The influence of column flow rate on AB-8 resin absorbing flavonoids of raspberry

AB-8 树脂以径高比 1:6 装柱, 上柱黄酮浓度为 1.6 mg/mL, 上柱量为 100 mL, 改变吸附流速(0.1、0.2、0.3 mL/min)进行动态吸附, 每流出 10 mL 流出液收集并测定有效成分浓度。以流出液体积为横坐标, 流出液黄酮浓度为纵坐标, 绘制曲线, 结果如图 6 所示。

由图 6 可知, 流速为 0.1、0.2、0.3 mL/min 时, 泄漏点分别在 90、70、50 mL 时出现。吸附流速增大时泄漏率呈增大趋势, 流速小时, 黄酮与固定相之间作用的时间较长, 吸附作用的几率较大, 吸附效果好, 但流速过慢, 周期长, 效率低。综合考虑, 选择 0.2 mL/min 为适宜吸附流速。

3.2.2 覆盆子黄酮提取液上柱浓度对 AB-8 吸附的影响

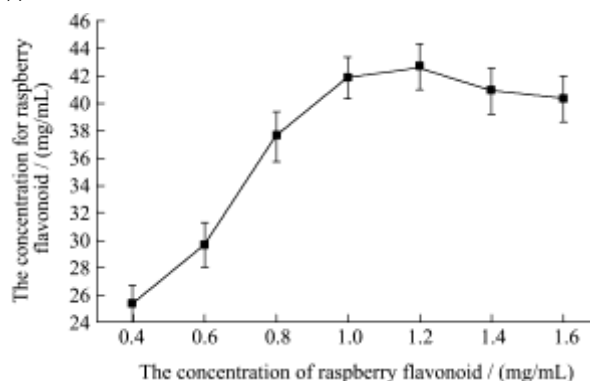


图 7 上柱浓度对 AB-8 树脂吸附覆盆子黄酮的影响

Fig.7 The influence of column density on AB-8 resin absorbing flavonoids of raspberry

将 AB-8 树脂以径高比 1:6 装柱, 取 100 mL 浓度分别为 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mg/mL 的上柱液, 分别在 0.2 mL/min 流速下通过 AB-8 树脂柱, 进行动态吸附, 计算吸附率和总吸附量结果如图 7 所示。由图 7 可知, 相同上柱量, 不同浓度的山茱萸黄酮提取液, AB-8 树脂的吸附率随覆盆子黄酮提取液浓度的增加而降低, 而吸附量随黄酮提取液浓度的增加而增加。上柱液浓度越大, 总吸附量增大同时树脂就越容易饱和, 从而降低了吸附率。实际中, 既要考虑吸附量又要考虑吸附率, 综合考虑, 选择山茱萸提取液上柱液浓度 1.2 mg/mL。

3.2.3 覆盆子黄酮提取液 pH 对 AB-8 吸附的影响

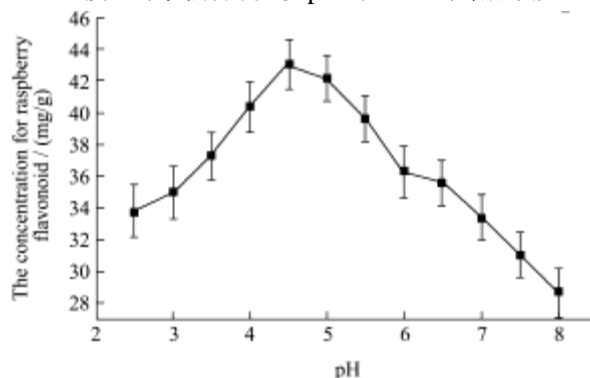


图 8 pH 对 AB-8 树脂吸附覆盆子黄酮的影响

Fig.8 Influence of pH on AB-8 resin absorbing flavonoids of raspberry

将覆盆子黄酮提取液用 HCL 和 NaOH 调节 pH 分

别为 2.5、3、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0。pH 对 AB-8 吸附影响如图 8 所示。

由图 8 可知, 随覆盆子黄酮提取液 pH 值的升高, AB-8 对覆盆子黄酮的吸附量逐渐升高, 当 pH 值为 4.5 时, 吸附量达到最大, 之后随 pH 的升高, 吸附量呈逐渐减小的趋势, AB-8 对物质的吸附取决于物质的酸碱性, 酸性物质在酸性溶液中易于吸附, 碱性物质在碱性条件下易于吸附。覆盆子黄酮呈现弱碱性, 因此在 pH 为 4.5 时吸附量最大。

3.2.4 解吸剂乙醇浓度对覆盆子黄酮解吸率的影响

取适宜浓度、适宜量的上柱液, 在适宜的吸附流速下动态吸附后, 用 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%(V/V)乙醇解吸剂在相同解吸流速下进行解吸, 每 10 mL 解吸液收集测定覆盆子黄酮浓度, 并计算解吸率, 结果如图 9 所示。

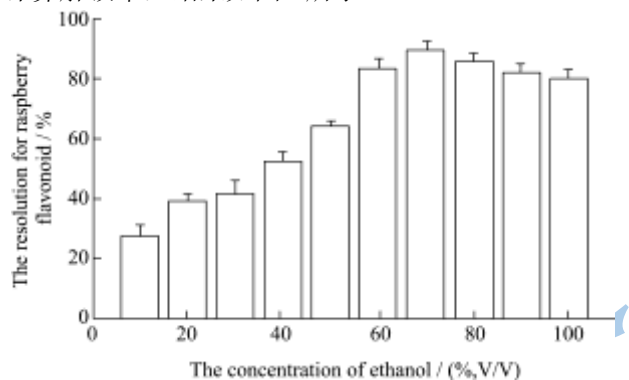


图 9 流动相乙醇浓度对覆盆子黄酮解吸的影响

Fig 9 The effect of concentration of ethanol on the desorption of raspberry flavonoids

由图 9 可知, 随乙醇浓度的增加, 覆盆子黄酮的解吸率逐渐升高, 当乙醇浓度为 70% 时, 解吸率达到

表 3 树脂 AB-8 使用次数对吸附率的影响

Table 3 Influence of reuse number of AB-8 resin on adsorption rate

使用次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
吸附率/%	85.23	84.86	84.75	84.52	84.36	84.18	84.01	83.92	83.85	83.70

由表 3 可知, 覆盆子黄酮在 AB-8 上的回收率达到 85.23%, 经循环 10 次后, 吸附率变化不大, 表明树脂 AB-8 经再生后可以重复使用多次。但使用过程中, 树脂上残留的部分色素物质未能被洗脱下来, 从而造成树脂颜色变深, 吸附率有所下降, 此时用 5% NaOH 溶液进行洗涤, 然后进行醇抛, 水洗后进行再生。

3.4 子黄酮纯度检测

按纯度检测方法, 经计算, 原覆盆子黄酮提取液中黄酮纯度为 5.63%, 经 AB-8 树脂纯化后黄酮纯度为 40.32%, 是原纯度的 7.16 倍, 说明大孔树脂技术可以用于覆盆子黄酮的分离纯化工艺中。

最大为 85%, 之后随乙醇浓度的提高, 解吸率有所下降, 所以 70%(V/V)为覆盆子黄酮适宜流动相浓度。

3.2.5 解吸剂乙醇流速对覆盆子黄酮解吸率的影响

取适宜的上柱液, 在适宜的吸附流速下动态吸附后, 用 70%(V/V)浓度的乙醇作为解吸剂在 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL/min 下进行解吸, 并计算解吸率, 结果如图 10 所示。

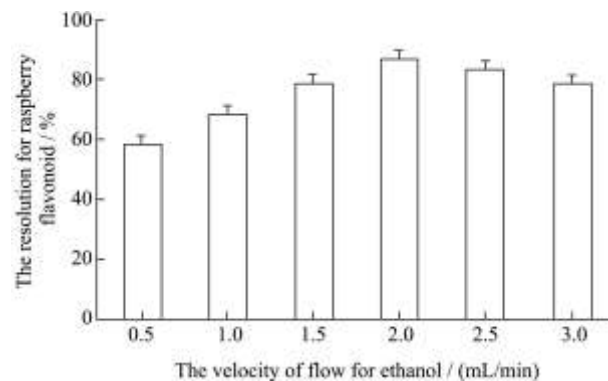


图 10 流动相乙醇流速对覆盆子黄酮解吸的影响

Fig 10 Effect of flow rate of ethanol on the desorption of raspberry

解吸是一个解吸剂与树脂竞争作用的过程, 解吸过慢, 生产周期也会延长; 而解吸过快, 解吸剂在还没有来得及将被吸附在树脂颗粒上的物质带走, 就已经离开了树脂颗粒。因此, 解吸速度过慢或者过快都不利于解吸。图 10 结果表明, 70%乙醇以 2.0 mL/min 的流速进行解吸时, 解吸率较高。

3.3 树脂 AB-8 回收率及再生

树脂 AB-8 经使用后进行回收率及再生实验结果如表 3 所示。

4 结论

在所选的 7 中树脂中, AB-8 树脂属于快速吸附树脂, 吸附率和解吸率都较高, 用于山茱萸黄酮的纯化较理想, 分离纯化山茱萸黄酮的最佳条件为: 上样流速 0.2 mL/min, 上样浓度为 1.2 mg/mL, 原液 pH 值为 4.5, 用 2.0 mL/min 的 70%的乙醇做为解吸剂进行解吸, 纯度测定结果表明, 经 AB-8 树脂纯化后, 山茱萸黄酮的纯度为 40.32%, 是原液纯度的 7.16 倍, 具有一定的应用价值。

参考文献

- [1] 郭启雷,杨峻山.掌叶覆盆子的化学成分研究[J].中国中药杂志,2005,30(3):198-200
- [2] 肖洪明,祖灵博,李石平等.掌叶覆盆子化学成分研究[J].2011,21(3):220-223
- [3] 于智峰,王敏.大孔吸附树脂在黄酮类化合物分离中的应用[J].中药材,2006,29(12):1380-1382
- [4] 袁尔东,肖仔君,刘本国,等.亮叶杨桐叶总黄酮提取及抑菌活性的研究[J].现代食品科技,2009,25(3):305-308
- [5] 周燕芳,赖春李.葫芦茶叶子黄酮的提取及结构的初步鉴定[J].现代食品科技,2009,25(9):1076-1078
- [6] 杨芙莲,夏银,任蓓蕾.大孔树脂对甜荞麦壳类黄酮的纯化研究[J].食品科技,2009,34(1):135-139

现代食品科技