

雷燕妮, 张小斌. 3 种大孔吸附树脂对黄芩苷的静态饱和吸附量和脱附率[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 279–281.

3 种大孔吸附树脂对黄芩苷的静态饱和吸附量和脱附率

雷燕妮, 张小斌

(商洛学院生物医药工程系/中国中医科学院商洛中药材 GAP 科研工程中心, 陕西商洛 726000)

摘要:以黄芩苷含量为考察指标, 用高效液相色谱法测定其含量, 通过黄芩上柱液的澄清处理方法, 比较 3 种大孔吸附树脂对黄芩苷的吸附量和脱附率。结果表明, 3 种树脂对黄芩苷的吸附能力大小为 AB-8 树脂 > LSA-40 树脂 > D101 树脂; 选用 50% 乙醇溶液作为洗脱剂效果最好; AB-8 树脂纯化黄芩苷效果最好, 黄芩苷纯度约 90%。

关键词:黄芩苷; 大孔树脂; 静态饱和吸附量; 脱附率; 纯化分离工艺

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0279-02

黄芩别名土金茶根、山茶根, 为唇形科植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 的干燥根^[1-2], 其有效成分为黄芩苷、黄芩苷元、汉黄芩素、汉黄芩苷、 β -谷甾醇等^[3]。黄芩苷、黄芩素产品不但可被应用于天然植物药领域, 还被应用于人体及动物病防治, 恶性疾病防治以及化妆品等众多领域, 应用领域非常广泛, 市场前景广阔, 已成为国内外研究热点。但有关大孔树脂对黄芩苷提取工艺的研究不多^[4]。大孔树脂是一种有机高分子聚合物, 不溶于酸、碱及各种有机溶剂, 具有较大的孔径与比表面积, 内部具有三维空间立体孔结构。大孔树脂具有物理化学稳定性高、选择性好、比表面积大、吸附容量大、吸附速度快、解吸条件温和、再生处理方便、易构成闭路循环、使用周期长、节省费用等诸多优点, 在天然产物的提取分离工作中得到广泛应用^[5-9]。本研究筛选黄芩苷富集与纯化的最佳大孔树脂, 以期为进一步研究黄芩苷的纯化分离工艺提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试黄芩采自陕西省柞水县, 经西北大学生命科学学院植物教研室鉴定; 黄芩苷对照品 (批号: 0751-9909), 由中国药品生物制品检定所提供; 大孔树脂 AB-8、D101、LSA-40, 由西安蓝晓科技开发有限公司提供; 盐酸、氢氧化钠、乙醇、硫酸铝钾等均为国产分析纯。

1.2 仪器

日本岛津 LC-20A 型高效液相色谱系统, 包括检测器 SPD-20A、高压恒流泵 LC-20A、工作站 LC Solution; FZ102 植物粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司; H·H·S21-6C 型电热恒温水浴锅, 上海医疗器械五厂; ME235S-型电子分析天平, 德国赛多利斯; RE-52AA 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; SHB-C 型循环水式多用真空泵, 郑州长城科工

贸有限公司; 101A-2 型鼓风干燥箱, 上海市实验仪器总厂; DE-10 型蒸馏水器, 上海悦丰仪器仪表有限公司; Milli-Q 型超纯水制备仪, 美国 Bedford 公司; 标准药筛 1-9 号, 上海市大亨桥化验仪器厂; THZ-C 型摇床, 江苏太仓市华美生化仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 黄芩上柱液的制备 称取 20 目黄芩粗粉 100 g, 用 15 倍质量的 75% 乙醇溶液于 85 °C 热回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 用 4 层纱布进行粗滤, 再进行细滤, 滤液用旋转蒸发器进行浓缩至无醇味, 加入蒸馏水稀释, 过滤除去不溶物得上柱清液。用该上柱清液上柱分离多次, 发现树脂吸附效果不佳, 其主要原因是该上柱清液中仍含大量果胶类等杂质, 严重影响树脂对黄芩苷的吸附能力, 因此设计如下上柱清液澄清处理试验。

分别称取 5 g 黄芩粉末 3 份, 各加入 pH 值 11 的水溶液 50 mL, 于 85 °C 热回流提取 2 h。对其中 1 份样品加入原料质量 1% 的硫酸铝钾搅拌均匀, 保温静置 0.5 h 后过滤, 滤液用水定容至 100 mL (A1 处理); 对另 1 份样品过滤后加入滤液等量的 95% 乙醇溶液进行醇沉, 2~3 h 后过滤, 滤液浓缩至无醇味后用水定容至 100 mL (A2 处理); 对最后 1 份样品过滤后直接用水定容至 100 mL (A3 处理)。

分别称取 5 g 黄芩粉末 3 份, 各加入 10 倍质量的 75% 乙醇溶液于 85 °C 热回流提取 2 h。对其中 1 份样品加入原料质量 1% 的硫酸铝钾搅拌均匀, 保温静置 0.5 h 后过滤, 滤液用水定容至 100 mL (B1 处理); 对另 1 份样品过滤后浓缩至无醇味, 加入滤液等质量的 95% 乙醇溶液进行醇沉, 2~3 h 后过滤, 滤液浓缩至无醇味后用水定容至 100 mL (B2 处理); 对最后 1 份样品过滤后直接用水定容至 100 mL (B3 处理)。

吸取 5 mL 提取液, 用水定容至 50 mL 后进行黄芩苷含量测定, 并进行澄清度对比分析以及树脂分离试验, 确定最佳澄清处理方法。

1.3.2 大孔吸附树脂的预处理 一般来说, 极性小的有机化合物适于在非极性树脂上分离, 极性较大的有机化合物适于在中极性、极性的树脂上分离。具有酚羟基和糖苷链的黄酮类化合物具有一定的极性、亲水性和较强的氢键生成能力, 易被弱极性和极性树脂吸附。黄芩苷是一类有葡萄糖醛酸结构的黄酮类化合物, 具有一定的亲水性和亲脂溶性, 适于 D101、

收稿日期: 2013-11-18

基金项目: 陕西省教育厅科学研究计划 (编号: 2013JK0778); 商洛学院科研项目 (编号: 11SKY006)。

作者简介: 雷燕妮 (1982—), 女, 陕西商洛人, 硕士, 讲师, 从事中草药种植和天然药物成分研究。Tel: (0914) 2986016; E-mail: leiyan-ni9999@sina.com。

AB-8、LSA-40 等弱极性或中极性树脂的吸附。表 1 是大孔吸附树脂的物理性能。

表 1 大孔吸附树脂的物理性能

树脂型号	极性	比表面积 (m ² /g)	孔径 (nm)
D101	弱极性	≥400	90 ~ 100
AB-8	弱极性	≥480	130 ~ 140
LSA-40	中极性	≥500	160 ~ 180

对新树脂用蒸馏水溶胀并浮选除去漂浮物,然后用 1 mol/L NaOH 溶液浸泡 4 h,期间不断搅拌,之后用蒸馏水洗至中性。再用 0.5 mol/L HCl 溶液浸泡 3 h,期间不断搅拌,之后用蒸馏水洗至中性,备用。

1.3.3 树脂静态饱和吸附量和脱附率的测定 称取经预处理并用吸水纸吸干表面水分的树脂 1 g,放入 250 mL 三角瓶中,吸取 20 mL 黄芩上柱清液加入其中,在 25 ℃、120 r/min 条件下摇床振荡吸附 18 ~ 24 h,用高效液相色谱法测定黄芩苷浓度,并按下式计算树脂对黄芩苷的饱和吸附量:
静态饱和吸附量 = (上柱液浓度 - 吸附剩余液浓度) × 上柱液体积/树脂质量。(1)

用吸水纸吸干上述经静态吸附黄芩苷分离出来树脂表面的水分,加入 75% 乙醇溶液 25 mL,然后在 25 ℃、120 r/min 条件下摇床振荡脱附 2 h。用高效液相色谱法测定黄芩苷浓度,按下式计算脱附率:
脱附率 = 洗脱出黄芩苷量/(加入黄芩苷量 - 未吸附的黄芩苷量) × 100%。(2)

1.3.4 大孔吸附树脂静态解吸特性的考察 洗脱剂极性对植物有效成分的洗脱有很大影响。常见洗脱剂有乙醇、甲醇、乙酸乙酯、丙酮等。在实际生产中,使用最多的洗脱剂是乙醇,一方面是因为乙醇无毒、安全,另一方面乙醇可以根据吸附能力调配成不同浓度的洗脱剂。对于中极性、极性树脂,宜用极性较大的洗脱剂;对于非极性、弱极性树脂,宜用极性较小的洗脱剂。

选择洗脱剂的原则是:不仅要求洗脱剂具有使大孔树脂溶胀、减弱树脂与被吸附物质之间的吸附力,而且要求被吸附物质可溶解在其中。本研究选用的洗脱剂为乙醇,考察不同浓度乙醇溶液对黄芩苷的解吸效果。

取饱和和吸附黄芩苷的 AB-8 树脂 5 份,分别加入 10%、30%、50%、70%、90% 乙醇溶液 20 mL 进行解吸附,用高效液相色谱法测定黄芩苷浓度,计算不同乙醇溶液浓度对黄芩苷的解吸率。

2 结果与分析

2.1 黄芩上柱液澄清处理结果

根据表 2 中的黄芩苷含量计算表明,A3 处理仅能提出 B3 处理中 64.104% 的黄芩苷,即有 35.896% 的黄芩苷没有被提出,说明 A 处理(pH 值 11 水提)效果远不如 B 处理(75% 醇提)。A1、A2、B1、B2 处理的柱分离效果都较好,由于 A 处理效果远不如 B 处理,故选用 B 处理。

确定的最佳黄芩上柱液制备方法为:称取 20 目黄芩粗粉 100 g,用 15 倍质量的 75% 乙醇溶液于 85 ℃热回流提取 2 次,

表 2 黄芩上柱液澄清处理结果

处理	澄清度	黄芩苷含量 (%)	成分损失率 (%)	柱分离效果
A1	清亮,无沉淀	4.741 8	2.426	较佳
A2	清亮,无沉淀	4.845 2	0.298	较佳
A3	浑浊,大量沉淀	4.859 7	0	不佳
B1	少量沉淀	7.218 0	4.788	较佳
B2	大量沉淀	6.624 7	12.614	较佳
B3	大量沉淀	7.581 0	0	不佳

每次 1.5 h。用 4 层纱布进行粗滤,粗滤液加入原料质量 1% 的硫酸铝钾搅拌均匀,保温静置 0.5 h 后过滤,滤液用旋转蒸发器浓缩至无醇味,加入蒸馏水稀释,过滤除去不溶物得上柱清液,用高效液相色谱法测定黄芩苷浓度,计算黄芩苷含量。

2.2 树脂静态饱和吸附量和脱附率

不同树脂对黄芩苷的吸附量和脱附率试验结果见表 3。黄芩中总异黄酮种类多,其极性有较大差异,主要是由黄酮母体结构上取代羟基和糖的数量不同所致。本研究选择 3 种弱极性或中极性树脂进行树脂吸附性能试验,在相同试验条件下,测定各树脂对黄芩苷的静态吸附和脱附效果。从表 3 可见,3 种树脂中 AB-8 树脂吸附量最大,LSA-40 树脂次之,D101 树脂吸附量最小。在实际生产中对树脂的要求是不仅吸附量大,而且要求解吸率高,这样才能保证植物有效成分的最大回收。在这 3 种树脂中,AB-8 树脂不仅具有较大的吸附量,而且具有较高的解吸率,因此富集纯化黄芩苷较为理想的吸附材料为 AB-8 树脂。

表 3 大孔树脂静态吸附及解吸性能试验结果

树脂型号	吸附量(mg/g)	脱附率(%)
D101	49.98	91.12
AB-8	68.62	90.06
LSA-40	51.55	89.47

2.3 大孔吸附树脂静态解吸特性

由图 1 可见,10%、30% 洗脱液解吸率较低,50% 洗脱液基本上可以将黄芩苷完全从树脂上解吸下来,从纯度和节约试剂用量的角度考虑,应选用 50% 乙醇作为洗脱剂,没有必要使用 70%、90% 乙醇溶液作为洗脱剂。

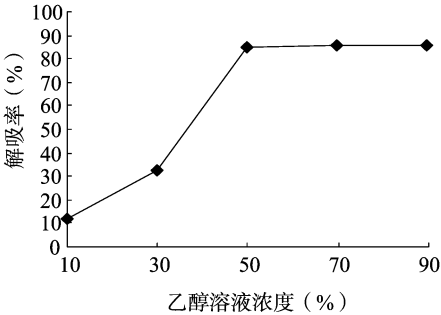


图1 洗脱剂浓度对黄芩苷解吸的影响

3 结论与讨论

AB-8 树脂孔容体小,体积比表面积(1 mL 湿树脂具有的比表面积)大,吸附量较大。通过3种大孔树脂对黄芩苷

刘宇鹏,潘 龙,郑小娟,等. 发酵液中 *L*-赤藓酮糖的紫外法测定[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):281-283.

发酵液中 *L*-赤藓酮糖的紫外法测定

刘宇鹏,潘 龙,郑小娟,靳魁奇,安珊珊

(河南大学生命科学学院生物工程研究所,河南开封 475004)

摘要:采用紫外法测定发酵液中的 *L*-赤藓酮糖。以谢里瓦诺夫(Seliwanoff)试剂为显色剂,考察了显色剂用量、反应温度、反应时间和显色稳定时间等因素,确定了优化后的试验条件。紫外法的线性范围为 0~1.2 g/L,样品回收率为 101.5%~101.9%,测定结果不受发酵液中底物及菌体自溶物影响,具有快速准确的优点。

关键词:*L*-赤藓酮糖;Seliwanoff 试剂;分光光度法;紫外法测定

中图分类号:TQ920.1;O657.32 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)08-0281-03

L-赤藓酮糖(*L*-erythrulose)^[1]是一种自然存在的四碳酮糖,是一种黏稠状液体,可溶于水,其醛糖形式是 *L*-赤藓糖,*L*-赤藓酮糖可以与皮肤外部或者老死表层中的角蛋白氨基酸(即表皮的角质层)发生反应,在化妆品工业中作为二羟基丙酮^[2]的替代品,解决了大多数人群对二羟基丙酮过敏的问题,同时是多种抗感染药物的前体化合物^[3]。传统生产 *L*-赤藓酮糖的方法是以赤藓糖醇(meso-erythritol)^[4]为前体的化学合成法,但此法比较繁琐,且产物为消旋体手性化合物,拆分困难。微生物转化法通过发酵过程中的酶促反应,可选择性生成 *L*型产物,且该法操作简便,绿色环保,能够解决化学合成法带来的一系列问题^[5]。因此以赤藓糖醇作为底物,通过微生物发酵转化生产 *L*-赤藓酮糖逐渐引起人们的关注。据报道,发酵液中 *L*-赤藓酮糖的检测方法有 HPLC 法^[6]、薄层色谱法^[7]和容量分析法^[8]等,其中薄层色谱法只能定性分析,无法精确定量;容量分析法的测定受发酵液中其

他物质的影响,无法精确测定 *L*-赤藓酮糖;HPLC 法则较为耗时。据报道,在酸性条件下发酵液中酮糖脱水生成糠醛,后者与谢里瓦诺夫(Seliwanoff)试剂反应生成红色复合物^[3]。研究表明,*L*-赤藓酮糖在酸性条件下也能与 Seliwanoff 试剂生成棕红色复合物,该复合物在 400 nm 处的吸光度与 *L*-赤藓酮糖浓度的线性关系良好;而底物赤藓糖醇在此条件下不干扰测定。本研究根据这一原理,建立了紫外法测定发酵液中的 *L*-赤藓酮糖,方法准确、简便、灵敏。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

UV-1750 型紫外-可见分光光度计,日本 Shimadzu 公司;752N 型紫外可见分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;1515 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司。

L-赤藓酮糖(美国 Sigma 公司);间苯二酚、浓盐酸、蛋白胨和磷酸二氢钾均为分析纯;酵母粉为生化试剂;水为蒸馏水。

试验菌种为氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans* 1.637),购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

发酵培养基配方为:赤藓糖醇 5%,蛋白胨 0.5%,酵母粉 1%,无水磷酸二氢钾 0.1%,碳酸钙 0.3%,pH 值 6.8。

收稿日期:2013-12-20

基金项目:河南省科技攻关项目(编号:132102210387)。

作者简介:刘宇鹏(1977—),男,河南邓州人,博士,副教授,主要从事发酵工程和生物催化研究。E-mail:liuyupenglw@126.com。

通信作者:潘龙,男,硕士,主要从事发酵工程和生物催化研究。E-mail:271692762@qq.com。

的纯化试验,结果表明:AB-8 树脂吸附量大,解吸率高,最佳解吸乙醇浓度为 50%,因此 AB-8 树脂是一种纯化黄芩苷性能良好的树脂,且该树脂可以再生利用,成本较低,生产周期较短,适宜大规模生产,值得推广应用。

在纯化黄芩苷的生产工艺中,为了充分利用大孔树脂,除选择性能优良的大孔树脂外,还要配合最佳的工艺条件,考虑原液浓度对吸附的影响、上样量对吸附的影响、流速对吸附的影响等,这方面工作还有待进一步完善,以促进大孔树脂在中药制药工业中的应用。

参考文献:

- [1]中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:六十五卷第二分册[M].北京:科学出版社,1977:136-219.
- [2]中国科学院西北植物研究所.秦岭植物志:第一卷第四册[M].

北京:科学出版社,1983.

- [3]高学敏.中药学[M].北京:中国中医药出版社,2002:406-407.
- [4]刘瑞源,钟 平,戴开金.大孔吸附树脂提取中草药有效成分的研究进展[J].时珍国医国药,2004,15(6):封3-封4.
- [5]周德庆,曾 骆.黄芩总黄酮的提取工艺研究[J].华西药学杂志,2003,18(1):78-79.
- [6]贝伟剑,彭文烈,罗 杰.柿叶黄酮的大孔吸附树脂分离提纯富集[J].中成药,2005,27(3):257-261.
- [7]向海艳,周春山,雷启福,等.大孔吸附树脂法分离纯化虎杖白藜芦醇苷的研究[J].中国药学杂志,2005,40(2):96-98.
- [8]尹蓉莉,江 靖,张淑儒,等.大孔吸附树脂纯化白芍总苷的工艺研究[J].时珍国医国药,2005,16(7):610-612.
- [9]刘友平,鄢 丹,秦春梅.大孔吸附树脂纯化中药有效成分的影响因素[J].中药新药与临床药理,2003,14(3):212-214.