

师仁丽,于文龙,梁娜,等.大孔吸附树脂分离纯化金丝小枣总黄酮工艺研究[J].江苏农业科学,2017,45(8):172-175.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.049

大孔吸附树脂分离纯化金丝小枣总黄酮工艺研究

师仁丽,于文龙,梁娜,张群,王向红

(河北农业大学食品科技学院,河北保定 071001)

摘要:以静态吸附与解吸率为指标,考察了6种大孔吸附树脂对金丝小枣总黄酮的分离纯化效果,从而筛选出1种效果最佳的大孔吸附树脂。采用正交优化的方法确定出纯化金丝小枣总黄酮的工艺参数。确定AB-8树脂对金丝小枣总黄酮的分离纯化效果最好,其对金丝小枣总黄酮的吸附率可达88.57%,解吸率为99.71%。最佳工艺条件为上样液pH值为3、吸附流速3 mL/min、上样浓度0.35 mg/mL、洗脱剂为70%乙醇,此时总黄酮收率可达到93.39%。同时,绘制了泄露曲线与解吸曲线,确定了最佳上样体积与洗脱剂用量分别为40、70 mL。

关键词:金丝小枣;黄酮;大孔吸附树脂;纯化

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)08-0172-04

枣(*Ziziphus jujuba* Mill.)是鼠李科(Rhamnaceae)枣属植物的成熟果实,原产于中国,栽培已有4 000年的历史^[1]。红枣营养价值高,且有很高的药用价值,是营养和医疗保健的优质滋补果品,是很重要的食用材料和经济产品,享有“营养保健丸、木本粮食”的美誉^[2]。由于其具有抗氧化、抗炎、抗癌、保护心肌等功能而被用作营养食品和传统药品^[3]。金丝小枣广泛分布在河北沧州一带,果核细小、可食率达97%、含可溶性固形物40%~45%、制干率约55%、质脆细嫩、品质优良等特点^[4]。

黄酮类化合物是植物产生的一类次生代谢产物,是一类重要的天然化合物,对人体健康起着重要的作用。大量研究表明黄酮类物质具有降血压、降血脂、增大心脏血流量、增强心脏收缩、减少心脏搏动数、止咳祛痰、抗菌消炎的功效^[5]。

在提取的粗黄酮中一般含有多种杂质,如糖类、色素、蛋白质、氨基酸等。为了提高黄酮纯度,需要对粗提物进行进一步的分离纯化,从而提高黄酮含量。目前,使用的黄酮类化合物纯化方法很多,主要有柱层析、薄层层析、气相层析、溶剂萃取、沉淀法等方法,在工业生产中均存在一定的缺点。大孔吸

附树脂纯化法是目前使用最为广泛的纯化方法^[6-7]。该技术具有生产成本低、周期短、效率高、可再生等优点,所以在天然产物有效成分的分离技术中有较好的应用发展趋势。

本试验选取6种在黄酮类化合物纯化中应用较为广泛的大孔吸附树脂,通过研究金丝小枣黄酮类化合物在不同树脂上的静态吸附、解吸效果,从而选择出1种精制金丝小枣黄酮较理想的吸附树脂,并采用正交优化法对该树脂的各种纯化工艺参数进行研究,以期对金丝小枣黄酮的分离纯化提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

金丝小枣,购自河北省沧州市;芸香苷对照品(≥99%),购自上海源叶生物科技有限公司;石油醚(60~90℃)、无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、盐酸,购自天津市天力试剂;AB-8树脂、D-101树脂、HPD-600树脂、ADS-17树脂、HPD-826树脂、聚酰胺树脂,购自沧州宝恩吸附材料科技有限公司;101-OAB电热鼓风干燥箱,购自天津市泰斯特仪器有限公司;UV-2008H型紫外可见分光光度计,购自上海UNIC公司;HT-300BQ型数控超声提取器,购自天津市瑞普电子仪器公司;DZWK-C型恒温水浴锅,购自北京市光明医疗仪器厂;BS-214D型电子分析天平,购自Sartorius公司;TGL-16M快速离心机,购自浙江金坛市杰瑞尔电器有限公司;层析柱,购自华美仪器公司;RE-52A型旋转蒸发仪,购自上海亚荣生化仪器厂;真空恒流泵,购自上海沪粤明科学仪

收稿日期:2016-02-23

基金项目:国家林业局公益性行业科研专项(编号:201304708)。

作者简介:师仁丽(1990—),女,硕士,主要研究方向为食品工程。

E-mail:15231228206@163.com。

通信作者:王向红,女,教授,博士生导师,主要研究方向为食品营养与安全。E-mail:wangxianghong73@sina.com。

[4]李利军,冯军,黄文艺,等.高效毛细管电泳同时分离测定栀子苷、芍药苷及丹皮酚的研究[J].分析试验室,2007,26(5):38-41.

[5]彭进进,罗泽娇,李龙媛.高效毛细管电泳-二极管阵列检测法测定土壤中的苯酚[J].分析科学学报,2012,28(1):98-100.

[6]张泽宇,李林志.高效毛细管电泳法测定地榆中没食子酸的含量[J].中国药师,2015,18(7):1233-1235.

[7]张云伟,万勇平,鄢兵,等.超高效液相色谱法测定水果中3种外源植物激素[J].中国卫生检验杂志,2015,25(14):2277-

2279,2283.

[8]刘宏程,林涛,邵金良,等.高效液相色谱测定水果中外源植物激素的快速前处理方法研究[J].分析科学学报,2014,30(4):497-500.

[9]牟艳莉,郭德华,丁卓平,等.高效液相色谱-串联质谱法测定瓜果中11种植物生长调节剂的残留量[J].分析化学,2013,41(11):1640-1646.

[10]钟宁,侯彩云.高效毛细管电泳测定液态乳中乳糖[J].中国乳品工业,2011,39(10):44-47.

器有限公司;自动收集器,购自上海嘉鹏科技有限公司;FZG-4A 型真空干燥箱,购自南京天利制药设备有限公司。

1.2 原料预处理

将金丝小枣洗净烘干、去核、取 1 g 加 10 mL 石油醚(60~90℃),超声(180 W,45℃)30 min,置于 60℃水浴锅中挥发干,加入 20 mL 70%乙醇,超声 50 min,取上层清液,重复 3 次,最后合并清液,在 3 500 r/min 的离心条件下,离心 10 min,弃去沉淀,得到总黄酮粗提液。旋转蒸发去除乙醇,至无醇味,加入蒸馏水定容至 500 mL 得到样品液。

1.3 芸香苷标准曲线的绘制

准确称取干燥至恒质量的芸香苷标准品 1 mg,置于 10 mL 容量瓶中,用 95%乙醇溶解至刻度、摇匀、得到 1 mg/mL 的芸香苷标准液。分别精密吸取标准液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,置于 5 mL 容量瓶中,用 95%乙醇定容至刻度,加入 5%NaNO₂ 溶液 0.5 mL。摇匀,静置 6 min;再加入 10%Al(NO₃)₃ 溶液 0.5 mL,混匀,静置 6 min;最后加入 4%NaOH 溶液 4 mL,摇匀,放置 10 min,以不加标准品的空白作参比,测定 510 nm 处吸光度(*D*),作 3 个平行,取平均值。以标准品浓度与吸光度作线性回归,绘制芸香苷标准曲线。

1.4 测定样品总黄酮含量

用标准曲线的方法测定样品的吸光度,作 3 个平行,取平均值,根据线性回归方程计算样品中总黄酮浓度。

1.5 黄酮纯化工艺研究

1.5.1 大孔树脂的筛选

1.5.1.1 大孔树脂的预处理 将 6 种大孔吸附树脂(AB-8 树脂、D-101 树脂、HPD-600 树脂、ADS-17 树脂、HPD-826 树脂、聚酰胺树脂)取适量,用 95%乙醇浸泡 24 h,使其充分溶胀,后用乙醇清洗,当流出液与水以 1:5 的比例混合时,无浑浊出现为止,用蒸馏水洗至无醇味。之后用 4% HCl 溶液浸泡 3 h 后水洗至中性,再用 2% NaOH 浸泡 3 h 水洗至中性,最后浸泡于蒸馏水中备用。

1.5.1.2 大孔树脂饱和吸附量的测定 准确称取已处理好的树脂 2 g(湿质量),至于 200 mL 具塞磨口三角瓶中,加入已知浓度的全枣黄酮溶液 25 mL、100 r/min,在电动振荡机上振荡 24 h,充分吸附后,抽滤,计算滤液中黄酮的质量浓度,按下列公式计算各树脂的饱和吸附量 *Q*(mg/g)。

$$Q = \frac{(C_0 - C_1) \times V}{m} \quad (1)$$

式中:*C*₀ 为样品液起始浓度(mg/mL);*C*₁ 为滤液中黄酮浓度(mg/mL);*V* 为溶液体积(mL);*m* 为树脂质量(g)。

1.5.1.3 大孔树脂解吸率的测定 取上述吸附饱和的大孔树脂,用蒸馏水清洗至洗脱液无色,转移至干净的具塞磨口三角瓶中,加入 70%的乙醇溶液 50 mL,100 r/min,在电动振荡机上振荡 24 h,抽滤,测定滤液中黄酮浓度,计算解吸率 *P*(%)。

$$P(\%) = \frac{C \times V}{Q \times m \times 100} \quad (2)$$

式中:*C* 为解吸液中黄酮浓度(mg/mL);*V* 为解吸液体积(mL);*Q* 为饱和吸附量(mg/g);*m* 为树脂质量(g)。

1.5.2 单因素试验 由上述试验筛选出效果最佳的大孔吸附树脂,进行上样液 pH 值、流速、浓度、用量,解吸液浓度及

用量的动态吸附与解吸试验。取出层析柱(10×30 mm),将 10 g 预处理好的 AB-8 型树脂采用湿法装柱,使树脂沿着玻璃棒缓慢倒入层析柱中,及时将产生的气泡赶出,装柱高度为 10 cm。

1.5.2.1 pH 值对黄酮吸附的影响 取 6 份已知浓度的全枣黄酮粗提液 25 mL,分别调节其 pH 值为 3、4、5、6、7、8,以 1 mL/min 的流速上柱吸附,分管收集流出液(5 mL/管),测定每管的黄酮浓度,从而计算到达吸附饱和时的流出液体积,并计算吸附量。

吸附量(mg) = 上样液浓度(mg/mL) × 流出液体积(mL)。

(3)

1.5.2.2 上样流速对黄酮吸附的影响 取已知浓度的全枣黄酮粗提液(pH 值=4),分别以 1、2、3、4 mL/min 的速度上柱吸附,利用自动收集器,分管收集流出液(5 mL/管),测定每管的黄酮浓度,从而计算到达吸附饱和时的流出液体积,按(3)式计算不同流速下的吸附量。

1.5.2.3 上样浓度对黄酮吸附的影响 分别取 4 份浓度分别为 0.05、0.15、0.25、0.35 mg/mL 的样品溶液(pH 值=4),以 2 mL/min 的流速上样,分管收集流出液(5 mL/管),测定每管的黄酮浓度,从而计算到达吸附饱和时的流出液体积,按(3)式计算不同流速下的吸附量。

1.5.2.4 解吸液浓度的考察 取一定量样品黄酮粗提液(pH 值=4,*C*=0.25 mg/mL),以 2 mL/min 的流速上柱吸附,做 4 组试验,待吸附饱和后,用蒸馏水清洗树脂,之后用 50 mL 浓度分别为 30%、50%、70%、90%的乙醇以 2 mL/min 的流速进行洗脱,测得洗脱液黄酮浓度,计算黄酮含量。

黄酮含量(mg) = 洗脱液黄酮浓度(mg/mL) × 洗脱剂用量(mL)。

(4)

1.5.2.5 泄露曲线的绘制 按上述已确定的吸附条件,取浓度为 0.25 mg/mL 的黄酮粗提液适量,pH 值=4,以 2 mL/min 的流速上样,分管收集流出液(5 mL/管),测定每管在 510 nm 处的吸光度,以吸光度为纵坐标,试管号为横坐标,绘制泄露曲线,确定泄漏点。

1.5.2.6 洗脱曲线的绘制 取一定量全枣黄酮粗提液,按上述已确定的吸附及解吸条件,即样液浓度为 0.25 mg/mL、pH 值=4,上样流速为 2 mL/min,待吸附饱和后,用 70%乙醇洗脱,分管收集洗脱液(7 mL/管),测定洗脱液的吸光度,绘制解吸曲线,从而确定洗脱剂用量。

1.5.3 正交试验优化纯化工艺 为确定金丝小枣总黄酮提取物的纯化工艺,精确量取体积为 40 mL 的枣黄酮提取液,以上样液 pH 值(A)、上样流速(B)、上样浓度(C)、洗脱剂浓度(D)4 个因素作为试验因子,以总黄酮收率为指标,进行 4 因素 3 水平的 L₉(3⁴)正交试验,因素水平见表 1。

表 1 金丝小枣总黄酮提取正交试验因素水平

水平级别	因素			
	A: pH 值	B: 上样流速 (mL/min)	C: 上样浓度 (mg/mL)	D: 洗脱剂 浓度(%)
水平 1	3	1	0.35	30
水平 2	4	2	0.25	50
水平 3	5	3	0.15	70

2 结果与分析

2.1 标准曲线测定结果分析

由图 1 可以看出,芸香苷标准曲线方程为 $y = 13.629x - 0.000\ 05$,决定系数 $r^2 = 0.999\ 62$ 。结果表明,黄酮标准品的吸光度在 0.0~0.7 范围内,线性关系良好,因此在相同的条件下,由样品的吸光度可计算出其相应的黄酮浓度。

2.2 大孔树脂的筛选

通过对 6 种大孔吸附树脂的静态吸附与解吸试验,得出每种树脂的饱和吸附量和解吸率(表 2)。

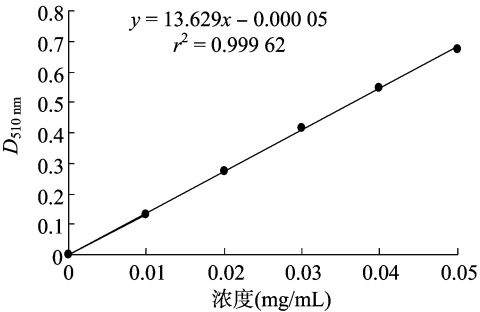


图1 芸香苷溶液的标准曲线

表 2 大孔树脂的吸附与解吸性能

树脂名称	起始液浓度 (mg/mL)	吸附后样液浓度 (mg/mL)	吸附率 (%)	饱和吸附量 (mg/g)	洗脱液浓度 (mg/mL)	解吸率 (%)
HPD-826	0.077	0.009 67	87.44	0.84	0.028 7	85.25
D-101	0.077	0.007 56	90.18	0.87	0.028 3	81.51
ADS-17	0.077	0.032 30	58.05	0.56	0.018 7	83.67
AB-8	0.077	0.008 80	88.57	0.85	0.03 4	99.71
HPD-600	0.077	0.008 10	89.48	0.86	0.03 0	87.08
聚酰胺	0.077	0.026 40	65.71	0.63	0.008 4	33.20

由表 2 可以看出,D-101 树脂的饱和吸附量最大,可达到 0.87 mg/g,HPD-600 树脂和 AB-8 树脂次之,分别为 0.86、0.85 mg/g,但相差均不大。D-101 和 HPD-600 树脂的解吸率分别为 81.51%、87.08%,均明显小于 AB-8 树脂的解吸率(99.71%)。综合考虑,选择 AB-8 型树脂对金丝小枣黄酮提取液进行纯化。

2.3 单因素试验结果与分析

2.3.1 pH 值对黄酮吸附影响的结果 黄酮类化合物含有羟基,是弱酸性类物质,适宜在酸性条件下进行吸附。所以根据被吸附物的结构特点,调整粗提液的 pH 值可以达到较佳的吸附效果。由图 2 可以看出,上样液的 pH 值对大孔吸附树脂的吸附效果影响较大,pH 值在 3~4 时,吸附量逐渐增大;当黄酮粗提液的 pH 值=4 时,树脂对枣黄酮的吸附量最大;之后随着 pH 的增加,树脂的吸附量逐渐减小。因此确定 4 为最佳的吸附液 pH 值。

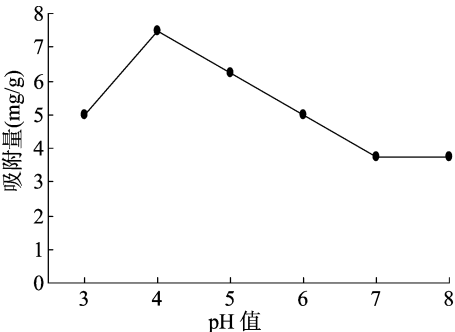


图2 黄酮吸附量的影响

2.3.2 上样流速对黄酮吸附的影响 由图 3 可知,上样流速对黄酮吸附量的影响,总黄酮的吸附率在一定范围内与上样流速成反比,流速越大吸附率越小。但当流速过低时,虽然吸附率较大,但吸附时间过长。流速过快时,被吸附物质来不及被树脂吸附而泄露出去,降低树脂的吸附率。流速为

1 mL/min 时,吸附率为 77.89%;流速为 2 mL/min 时,吸附率为 71.58%,两者相差较小,综合考虑,选择 2 mL/min 为最佳吸附流速。

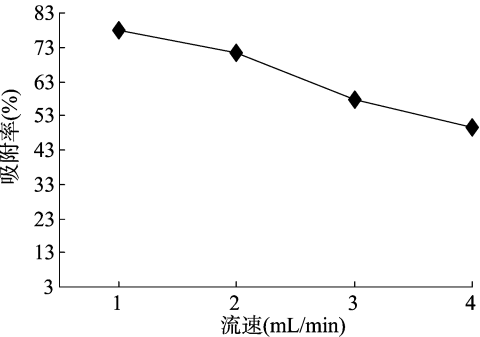


图3 上样流速对黄酮吸附率的影响

2.3.3 上样浓度对黄酮吸附的影响 由图 4 可知,在 0.05~0.25 mg/mL 的浓度范围内,总黄酮收率随浓度的升高而增大,但 0.25~0.35 mg/mL 的浓度范围内总黄酮收率不再增大确,有略微降低的趋势。推测认为,适当增加上样浓度就增大了树脂与被吸附物的接触机会,树脂的吸附作用增强,但浓度过高,导致树脂的选择吸附性降低,使总黄酮过早泄露。因此,选择 0.25 mg/mL 为最适宜的上样浓度。

2.3.4 解吸液浓度对黄酮含量的影响 由图 5 可知,选择不同浓度的含水乙醇作为解吸液,30%~70% 浓度的乙醇对总黄酮的洗脱效果逐渐增强,大于 70% 的乙醇的洗脱效果下降。因此,选择 70% 作为最佳解吸液浓度。

2.3.5 泄露曲线的绘制 在动态吸附过程中,提取液首先与树脂上层接触,达到饱和状态,随后这种状态逐渐向下推移,当所有树脂吸附饱和时,停止吸附,提取液开始泄露。由图 6 可知,总黄酮从第 8 管开始泄露,此时上柱液体积为 40 mL,所以选择 40 mL 为最佳上柱液体积。

2.3.6 洗脱曲线的绘制 由图 7 可知,洗脱液用量在 3 号试

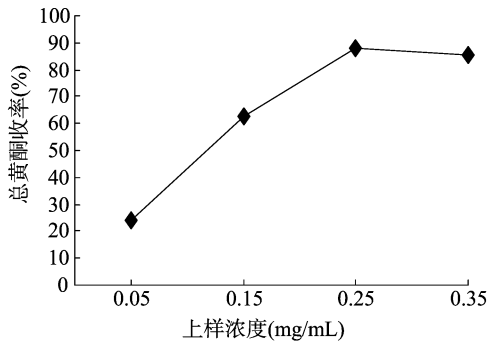


图4 上样浓度对总黄酮收率的影响

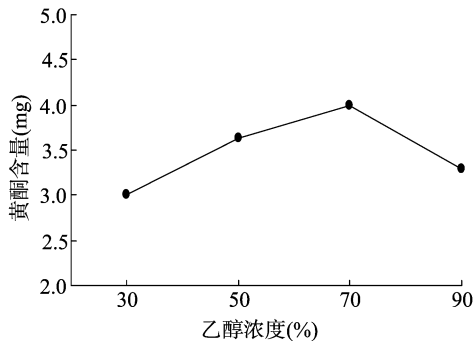


图5 解析液浓度对黄酮含量的影响

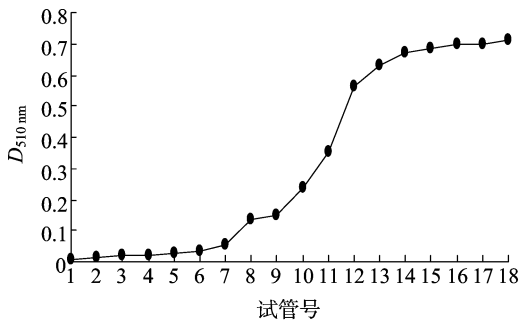


图6 泄露曲线

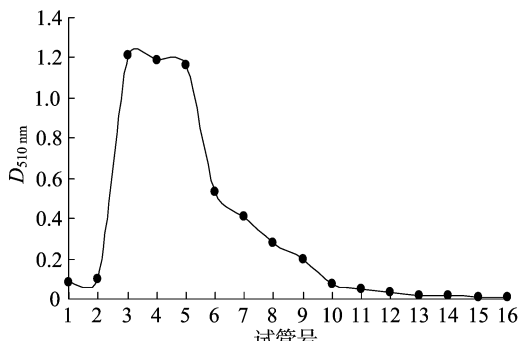


图7 洗脱曲线

管之前,随洗脱液用量增加,流出液中黄酮的质量浓度不断增加;洗脱液用量继续增大,流出液中黄酮的质量浓度逐渐减小。在第 10 管时,黄酮质量浓度基本无变化,此时洗脱液用量为 70 mL。因此,确定洗脱液最佳体积为 70 mL。

2.4 正交试验优化纯化工艺结果

由表 3 可以看出,各因素对黄酮动态吸附率的影响程度

依次为 D>B>A>C,且最佳组合为 A₁B₃C₂D₁,即最佳吸附条件为 pH 值=3,流速为 3 mL/min,洗脱剂浓度 70%,上样浓度 0.35 mg/mL,而该试验组在正交试验中未涉及,所以要经过验证试验,其吸附率可以达到 93.39%,高于以上试验组合。

表 3 金丝小枣总黄酮提取正交试验结果

试验编号	因素				总黄酮收率 (%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	90.00
2	1	2	2	2	75.25
3	1	3	3	3	87.00
4	2	1	2	3	78.75
5	2	2	3	1	91.00
6	2	3	1	2	81.67
7	3	1	3	2	65.80
8	3	2	1	3	44.33
9	3	3	2	1	92.50
均值 1	84.083	78.183	72.000	91.167	
均值 2	83.807	70.193	82.167	74.240	
均值 3	67.543	87.057	81.267	70.027	
极差	16.540	16.864	10.167	21.140	

3 结论

通过静态吸附试验发现 AB-8 树脂在 6 种常用的纯化黄酮类化合物的大孔吸附树脂中对金丝小枣黄酮化合物的吸附与解吸性能较好,吸附率为 88.57%,解吸率为 99.71%。通过正交优化试验继续考察了 AB-8 树脂的动态吸附与解吸条件,最佳工艺条件为上样液 pH 值=3,吸附流速为 3 mL/min,上样浓度为 0.35 mg/mL,洗脱剂为 70% 乙醇,总黄酮收率可达到 93.39%,同时测定了最佳上样体积与洗脱剂体积分别为 40、70 mL。

参考文献:

[1] Kou X, Chen Q, Li X, et al. Quantitative assessment of bioactive compounds and the antioxidant activity of 15 jujube cultivars [J]. Food Chemistry, 2015, 173: 1037-1044.

[2] 杨永祥, 陈锦屏, 吴曼. 红枣营养保健价值及其加工利用的研究进展 [J]. 农产品加工, 2009 (1): 52-53, 56.

[3] Gao Q H, Wu P T, Liu J R, et al. Physico-chemical properties and antioxidant capacity of different jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) cultivars grown in loess plateau of China [J]. Scientia Horticulturae, 2011, 130 (1): 67-72.

[4] 张平平, 李黎, 张东东, 等. 金丝新 4 号枣果中黄酮类物质提取及纯化工艺的研究 [J]. 食品与机械, 2009, 25 (6): 75-79.

[5] 孙智敏, 李发堂, 殷蓉, 等. 黄酮类化合物提取工艺研究进展 [J]. 河北化工, 2005 (4): 7-8, 30.

[6] Yoon S Y, Choi W J, Moon Park J, et al. Selective adsorption of flavonoid compounds from the leaf extract of *Ginkgo biloba* L. [J]. Biotechnology Techniques, 1997, 11 (8): 553-556.

[7] 李国丽, 李春霞, 王威强. 银杏叶黄酮类化合物提取分离研究现状和展望 [J]. 山东轻工业学院学报 (自然科学版), 2005, 19 (3): 18-23.