

兰 蓉,刘 卉,李 淳. 大孔树脂分离纯化沙枣总黄酮的工艺[J]. 江苏农业科学,2017,45(15):160-163.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.15.043

大孔树脂分离纯化沙枣总黄酮的工艺

兰 蓉,刘 卉,李 淳

(北京电子科技职业学院生物工程学院,北京 100176)

摘要:为了确定大孔树脂分离和纯化沙枣总黄酮的工艺条件,以大孔树脂静态吸附量和解吸率为指标,在 7 种大孔树脂中筛选出分离沙枣总黄酮的最佳大孔树脂型号,采用单因素试验优化这种大孔树脂的吸附、洗脱条件。结果表明,在 7 种大孔树脂中,XAD7HP 型树脂纯化沙枣总黄酮的性能最好,其最佳分离、纯化工艺条件如下:样品质量浓度 0.05 mg/mL,上样 pH 值为 4,上样流速为 0.5 mL/min,最大上样量为 30 mL,洗脱液为 60% 乙醇,洗脱流速为 0.5 mL/min,最大洗脱体积为 40 mL。在所确定的工艺条件下,XAD7HP 型大孔树脂能较好地用于沙枣总黄酮的分离纯化,总黄酮的纯度由原来的 15.24% 提高到了 48.77%。

关键词:沙枣;总黄酮;大孔树脂;分离纯化

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)15-0160-04

沙枣(*Elaeagnus Angustifolia* L.),别称桂香柳、七里香等,为胡颓子科胡颓子属植物,在我国新疆、青海和宁夏等西北省(区)的栽培面积达 13 万 hm^2 以上^[1],是民间治疗呕吐和胃胀的传统药方,多用于脾胃虚弱、消化不良、肠炎腹泻、肺热咳嗽等疾病的治疗^[2]。据报道,沙枣果实富含黄酮、鞣质、齐墩

果酸等功能性成分和营养成分,具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节、抗炎镇痛、抗腹泻和抗疲劳等多种药物用途和营养价值,是西北地区具有开发利用前景的重要资源^[3-9]。

近年来,国内外科研工作者对沙枣中的主要功能性成分——黄酮开展了一些研究工作。比如 Si 等从沙枣树皮中分离得到了儿茶素、表儿茶酸、没食子儿茶素没食子酸酯、表没食子儿茶素、槲皮素和毛地黄黄酮等黄酮类化合物^[10]。王基云等研究发现,沙枣花醇提物的总黄酮含量为 27 mg/g,能够抑制自由基诱导的肝脏脂质过氧化损伤作用^[11]。但是目前仍未有沙枣果黄酮分离纯化的研究报道,所以本试验通过比较 7 种不同型号的大孔吸附树脂对沙枣果总黄酮吸附性能的差异,探讨分离纯化沙枣果总黄酮的工艺条件,以期沙枣

收稿日期:2016-11-15

基金项目:北京市高等学校教学名师资助项目(编号:PXM2014-014306-000075);北京电子科技职业学院科技类重点课题(编号:YZK2013016)。

作者简介:兰 蓉(1974—),女,江西樟树人,硕士,副教授,从事天然产物研究。E-mail:lanrong1688@sina.com。

粉糊达到的最高黏度;76℃的淀粉糊黏度值与95℃保温30 min的黏度值差值为降落值或破损值,其值变化越小,说明淀粉糊黏度的热稳定性越高;淀粉糊95℃保温30 min的黏度值与淀粉糊冷却到50℃时的黏度值差值反映淀粉糊的老化或回生程度及冷却时形成凝胶的强弱,其差值越小,说明莲藕淀粉糊的凝胶性越强,不易老化;淀粉糊冷却到50℃时的黏度值与淀粉糊50℃保温30 min的黏度值差值反映淀粉糊的冷稳定性,变化越小,说明淀粉的冷稳定性越好。

3 结论

莲藕淀粉提取单因素试验结果表明,料水比为1 g:3 mL、温度为30℃、浸泡时间为60 min时,淀粉的提取率相对较高;对料水比(1 g:2.5 mL、1 g:3.0 mL、1 g:3.5 mL)、温度(25、30、35℃)、浸泡时间(40、60、80 min)进行正交试验,得出莲藕淀粉提取的最优组合为料水比1 g:2.5 mL、温度30℃、时间60 min;经光学显微镜观察发现,莲藕淀粉有圆形和椭圆形2种颗粒形状,且多为椭圆形,长径比为1.55,平均粒径为33.16 μm ,最大粒径为65.61 μm 。经黏度计测定,莲藕淀粉的糊化温度为60℃;莲藕淀粉中水分、灰分、粗蛋白、粗脂肪、直链淀粉含量分别为

13.560%、1.210%、0.230%、0.471%、23.742%;莲藕淀粉的膨润力和溶解度均随温度的升高而升高。

参考文献:

- [1]王清章,邱承光. 莲藕粉糊的流变特性实验研究[J]. 农业工程学报,2002,18(4):116-119.
- [2]吉宏武,丁霄霖. 马铃薯直链淀粉与支链淀粉的分离方法[J]. 食品科技,2000(6):6-7.
- [3]张美霞. 藕淀粉与超微全藕粉的制备技术及性质研究[D]. 重庆:西南大学,2009.
- [4]樊明涛,艾启俊. 绿豆淀粉的提取和绿豆淀粉性质的研究[J]. 北京农学院学报,1996,11(2):57-62.
- [5]孙忠伟. 芋头淀粉的提取及其性质的研究[D]. 无锡:江南大学,2004.
- [6]李 洁,王清章. 莲藕中的酶促褐变及其控制[J]. 山西食品工业,2000,2(6):10-12.
- [7]袁 超. 小麦淀粉特性研究[D]. 郑州:河南工业大学,2004.
- [8]李 洁,田翠华,王清章. 莲藕淀粉的晶体特性研究[J]. 食品科学,2007,28(2):50-52.
- [9]秦志荣,许荣年,汪庆旗,等. 藕淀粉颗粒性质的研究及藕粉产品的鉴定[J]. 食品与发酵工业,2005,31(1):136-138.

这一特色资源的开发利用提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

SHA-C 型恒温振荡器(常州国华电器有限公司);玻璃柱(Φ 1 cm \times 30 cm,上海琪特分析有限公司);BT300-2J/YZ II 25 型恒流泵(保定兰格恒流泵有限公司);SHB-IV 型双循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);AR2140 型电子分析天平(奥豪斯国际贸易有限公司);LABOROTA 4000 型旋转蒸发仪(Heidolph);UV-1800PC-DSLL 型紫外-可见分光光度计(上海美普达仪器有限公司);PHS-3C 型酸度计(上海楚柏仪器有限公司)。

1.2 材料与试剂

试验材料:沙枣,购自新疆哈密瓜乡果业股份有限公司。试验试剂:D101 型大孔树脂(国药集团化学试剂有限公司);XAD7HP 型大孔树脂(美国罗门哈斯公司);NKA-2、X-5、NKA-9 型大孔树脂(郑州勤实科技有限公司);HPD100B、AB-8 型树脂(河北沧州宝恩化工有限公司);其他试剂均为国产分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 大孔树脂的预处理 大孔树脂用体积分数 95% 乙醇浸泡 24 h 充分溶胀后,湿法装柱,再用体积分数 95% 乙醇淋洗至流出液与水混合液(体积比 1:5)不呈白色为止,然后用大量纯净水洗净乙醇(无醇味),备用。

1.3.2 样品制备^[12] 取粉碎后的沙枣,加入 20 倍(质量体积比)的 85% 乙醇常温浸泡 24 h 后过滤、减压浓缩、60 ℃ 干燥,制得干燥浸膏样品。精确称取干燥浸膏 2 g,加 90 mL 水超声处理,使其充分溶解后,将溶液定容至 100 mL 量瓶中,作为备用液。

1.3.3 黄酮含量的测定

1.3.3.1 黄酮标准曲线的制备 称取芸香苷 10.0 mg,用 60% 乙醇完全溶解,在 50 mL 容量瓶中定容,得到 0.2 mg/mL 芸香苷对照品溶液。

精确吸取芸香苷对照品 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 分别置于 25 mL 容量瓶中,补加蒸馏水使所有容量瓶内液体都在相同刻度线,加 1 mL 5% NaNO₂,室温放置 6 min;加 1 mL 10% Al(NO₃)₃,室温放置 6 min;加 1 mol/L NaOH 10 mL,用 60% 乙醇定容至 25.00 mL,摇匀后放置 15 min,在波长 505 nm 处测各溶液的吸光度。以吸光度(ρ)为纵坐标、浓度(C)为横坐标制作工作曲线,结果得到标准方程为 $\rho = 0.0869C - 0.0006$, $r^2 = 0.9999$ 。

1.3.3.2 样品黄酮含量的测定 称取固体样品 100 mg,加入 HCl-乙醇(体积比 1:25, HCl、乙醇浓度分别为 1%、70%)定容到 10.0 mL,超声 15 min,取 2.0 mL 上清液,加 1 mL 5% NaNO₂,室温放置 6 min;加 1 mL 10% Al(NO₃)₃,室温放置 6 min,加 1 mol/L NaOH 10 mL,用 60% 乙醇定容至 25.00 mL,在波长 505 nm 处测吸光度。

1.3.4 树脂的筛选

1.3.4.1 树脂含水量的测定 称取 2 g 预处理后抽干水分的大孔树脂,置于 80 ℃ 的干燥箱中干燥至恒质量,根据树脂的湿质量和干质量,用公式 $Y = (1 - m_1/m_0) \times 100\%$ 计算树

脂的含水量。其中: Y 为树脂的含水量,%; m_1 为干树脂的质量,g; m_0 为湿树脂的质量,g。

1.3.4.2 各种树脂静态吸附量和解吸率的测定 准确称取 5 g 各种型号湿树脂(用滤纸吸干表面水分),置于 100 mL 三角锥形瓶中,加入 30 mL 配制好的沙枣总黄酮水溶液,在 30 ℃ 下以 100 r/min 的转速在恒温摇床中振荡 2 h,过滤后取样品,通过紫外-可见分光光度法测定过滤液浓度,用以下公式可以计算树脂的静态饱和吸附量、吸附率:

$$\text{静态吸附量 } E = (P_0 - P_a) V_a / [m \times (1 - Y)];$$

$$\text{吸附率 } S = (P_0 - P_a) / P_0 \times 100\%。$$

式中: P_0 为样品液中总黄酮的初始浓度,mg/mL; P_a 为吸附平衡后溶液中总黄酮的浓度,mg/mL; V_a 为样品液体积,mL; m 为湿树脂质量,g; Y 为树脂的含水量,%。

取上述经静态饱和吸附总黄酮后滤出的树脂,用纯净水冲洗 10 min 后,用滤纸吸干表面水分,置于锥形瓶中,分别精确加入 50 mL 体积分数 95% 的乙醇,用摇床持续振荡 5 h 后,分别测定洗脱液中总黄酮浓度,按下式计算各型号树脂的解吸率:解吸率 = [洗脱液浓度 \times 洗脱液体积]/[($P_0 - P_a$) $\times V_a$] $\times 100\%$ 。

1.3.5 大孔树脂分离纯化沙枣总黄酮的工艺优化

1.3.5.1 最佳上样浓度的确定 精确称取 5.0 g 抽干水分的优选树脂,各 7 份,分别加入 30 mL 不同质量浓度的沙枣黄酮粗提液,在 30 ℃ 下以 100 r/min 的转速在恒温摇床中振荡 2 h,过滤,测定滤液中黄酮含量,计算吸附率。

1.3.5.2 最佳上样 pH 值的确定 精确称取 5.0 g 抽干水分的优选树脂,各 5 份,分别加入 30 mL 质量浓度为 0.05 mg/mL, pH 值为 2、4、6、8、10 的沙枣黄酮粗提液,在 30 ℃ 下以 100 r/min 的转速在恒温摇床中振荡 2 h,过滤,测定滤液中黄酮含量,计算吸附率。

1.3.5.3 最佳上样流速的确定 选用 1 cm \times 30 cm 玻璃柱,用优选后的树脂湿法装柱,按径高比 1:10 装柱。分别取 10 mL 质量浓度 0.05 mg/mL, pH 值为 4 的沙枣黄酮粗提液,分别以 0.2、0.5、1.0、2.0、3.0 mL/min 流速上样,然后用蒸馏水洗脱至流出液接近无色,分别收集流出残余液、水洗液,继而用 70% 乙醇进行洗脱,收集流出液至无色,测定各个收集液中的黄酮含量,并计算吸附率。

1.3.5.4 最佳洗脱液浓度的确定 精确称取 5.0 g 抽干水分的优选树脂,各 5 份,分别加入 30 mL 质量浓度为 0.05 mg/mL, pH 值为 4 的沙枣黄酮粗提液,在 30 ℃ 下以 100 r/min 的转速在恒温摇床中振荡 2 h,过滤,过滤后收集吸附残液,测定 P_a ,继续用蒸馏水洗脱至流出液接近无色,收集水洗液,然后分别用 50 mL 30%、45%、60%、75%、95% 乙醇溶液洗脱吸附饱和树脂,用摇床持续振荡 5 h 后,分别测定洗脱液中总黄酮浓度,计算解吸率,筛选最佳洗脱液浓度。

1.3.5.5 最佳洗脱流速的确定 参照“1.3.5.3”节方法制备沙枣黄酮粗提液,以 0.5 mL/min 流速上样,待吸附完全后,先用纯净水洗去未吸附部分至水洗流出液无色后,再用 60% 乙醇分别以 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL/min 的流速洗脱,收集洗脱液,测定洗脱液中总黄酮含量,计算各条件下的解吸率。

1.3.5.6 泄漏曲线制备 按“1.3.5.5”节上样、冲洗后,再用 60% 乙醇以 0.5 mL/min 流速洗脱、分段收集流出液,每

5 mL 收集 1 次,测定收集液中黄酮含量,绘制泄漏曲线。

1.3.5.7 洗脱曲线制备 根据泄漏曲线试验结果,取 30 mL 质量浓度为 0.05 mg/mL、pH 值为 4 的沙枣黄酮粗提液,以 0.5 mL/min 流速通过层析柱,吸附饱和后,先用蒸馏水洗去树脂表面的糖类及杂质,直至流出液为无色后,再用 60% 乙醇以 0.5 mL/min 流速洗脱,每 5 mL 收集 1 次,测定洗脱液黄酮含量,绘制洗脱曲线。

1.3.5.8 工艺验证试验 根据上述试验结果,确定沙枣总黄酮最佳纯化工艺条件,按此条件平行做 3 次试验,分别计算得率和纯度,相关公式:

黄酮得率 = 洗脱液中总黄酮质量/上样液中总黄酮质量 × 100% ;

黄酮纯度 = 洗脱液中总黄酮质量/洗脱液中总固形物质量 × 100% 。

2 结果与分析

2.1 树脂的筛选结果

由表 1 可知,XAD7HP、X-5 型大孔树脂的吸附能力较强,其中 XAD7HP 型树脂吸附量最大,而且解吸率比 X-5 高 18.06%。经比较,确定选用 XAD7HP 型大孔树脂。

表 1 7 种大孔树脂对沙枣黄酮静态吸附与解吸性能比较

树脂名称	静态吸附量 (mg/g)	解吸率 (%)
DI01	0.431	55.22
HPD100B	0.423	67.10
XAD7HP	0.499	77.89
X-5	0.489	59.83
NKA-2	0.457	71.28
NKA-9	0.456	65.65
AB-8	0.501	67.08

2.2 大孔树脂分离纯化沙枣总黄酮的工艺优化结果

2.2.1 最佳上样浓度的确定 由图 1 可以看出,随着样品质量浓度的增加,树脂吸附率先上升后下降并趋于平缓,当样品质量浓度为 0.05 mg/mL 时,树脂吸附率达到最大值 84.86%。黄酮溶液浓度是影响树脂吸附性能的重要因素之一,样品质量浓度增加,则其黏度增大,黄酮向树脂内部传质速度慢,使得有些黄酮没有及时被吸附就流出来;此外,样品浓度增加,竞争性吸附的杂质也在增加,这些杂质的存在减少了有效吸附面积,导致树脂吸附率下降。从图 1 还可看出,提高样品质量浓度有利于提高树脂的吸附效果,但是样品质量浓度过高的话,反而会降低树脂吸附率,因此用 XAD7HP 树脂吸附沙枣黄酮时,样品质量浓度以 0.05 mg/mL 左右为宜。

2.2.2 最佳上样 pH 值的确定 从图 2 可以看出,样品液 pH 值为 4 时,XAD7HP 树脂的吸附率最高;当 pH 值 >4 时,随着 pH 值升高,XAD7HP 树脂的吸附率下降。原因可能是 pH 值是影响大孔树脂吸附能力的因素之一,一般来说,酸性化合物在酸性介质中的吸附较充分。黄酮类化合物具有酚羟基,显弱酸性,在酸性条件下吸附较好,但是本试验中样品液 pH 值为 2 时吸附率不升反降,可能是酸性太强,样品液中的黄酮类化合物转变为伴盐而溶解,因而不易被吸附^[13]。所以,本试验选择 pH 值为 4 的沙枣黄酮粗提液上样。

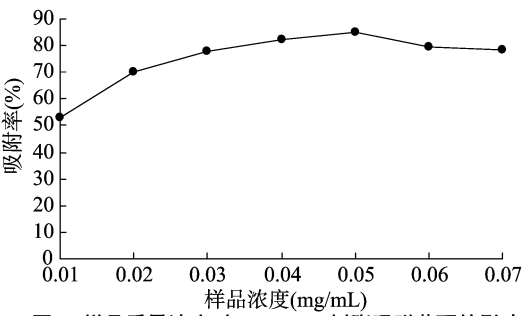


图1 样品质量浓度对 XAD7HP 树脂吸附黄酮的影响

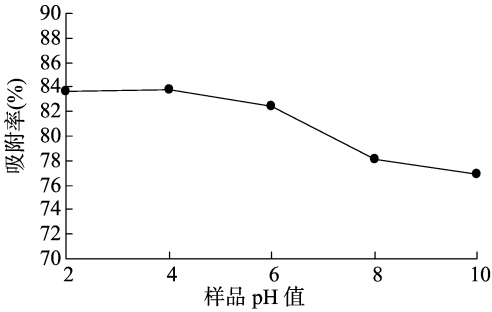


图2 料品 pH 值对 XAD7HP 树脂吸附黄酮的影响

2.2.3 最佳上样流速的确定 表 2 结果表明,随着上样流速的增大,XAD7HP 型大孔树脂的吸附率下降。原因可能是减慢流速能使待分离物质和树脂充分接触,有利于吸附;但是,流速太慢容易造成死吸附且费时,故根据试验结果,选择上样流速为 0.5 mL/min。

表 2 上样流速对 XAD7HP 树脂吸附黄酮的影响

上样流速 (mL/min)	吸附率 (%)
0.2	83.0
0.5	81.7
1.0	81.2
2.0	79.1
5.0	75.0

2.2.4 最佳洗脱液浓度的确定 由表 3 可知,随着乙醇体积分数的不断加大,沙枣总黄酮的解吸率先表现为不断上升;但当体积分数 ≥ 75% 时,解吸率反而有所下降。可能原因是由于乙醇体积分数的升高会增加醇溶性杂质含量,使得沙枣总黄酮在洗脱液中的溶解度减小,从而造成了解吸率的先升后降。因此,本试验选择 60% 乙醇作为洗脱剂较为适宜。

表 3 洗脱液浓度(乙醇体积分数)对 XAD7HP 树脂解吸黄酮的影响

乙醇体积分数 (%)	解吸率 (%)
30	39.2
45	77.6
60	92.4
75	91.5
95	88.5

2.2.5 最佳洗脱流速的确定 从图 3 可以看出,随洗脱流速的加快,沙枣总黄酮的解吸率整体呈下降趋势。对于一定量的洗脱剂而言,加快洗脱流速,会使洗脱剂中的溶质分子与大孔树脂的作用时间缩短,溶质分子来不及扩散到树脂的内表

面将黄酮彻底洗脱下来,从而使解吸率下降;但流速过慢时,又会导致操作时间过长,降低生产效率。因此本研究选择洗脱流速为 0.5 mL/min。

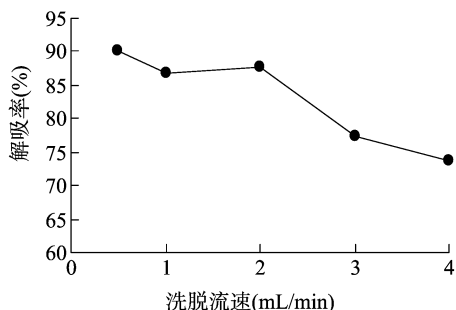


图3 洗脱流速对 XAD7HP 树脂解吸黄酮的影响

2.2.6 泄漏曲线 图4结果表明,沙枣总黄酮在第6份流出液处未吸附率(即洗脱液黄酮浓度)明显增大,之后变化趋于平缓,说明树脂柱在第6份流出液处出现泄漏拐点。为最大程度地吸附沙枣总黄酮,同时又节约料液、提高生产效率,设定第6份处为泄漏点,据此确定 30 mL 作为最大上样量。

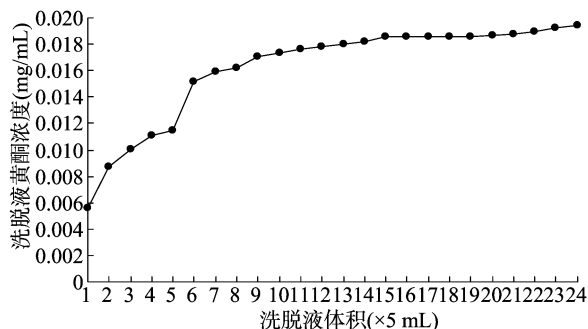


图4 XAD7HP 型大孔树脂泄漏曲线

2.2.7 洗脱曲线 由图5可以看出,XAD7HP 型树脂的洗脱峰窄而尖锐,被解吸的黄酮主要集中在 10~30 mL 体积范围内。从第8份流出液开始,总黄酮浓度几乎没有变化,说明树脂柱基本被洗脱干净。为了节约洗脱剂,缩短生产周期,确定 40 mL 作为最大洗脱体积。

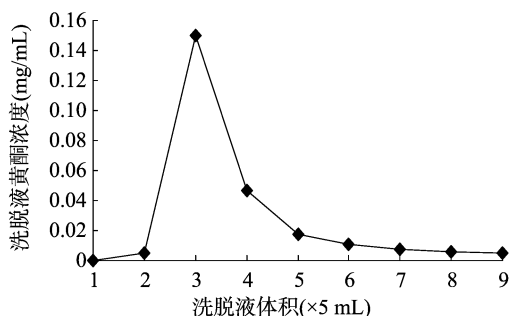


图5 XAD7HP 型大孔树脂洗脱曲线

2.2.8 工艺验证结果 在最佳工艺条件下,沙枣料液中总黄酮的得率分别为 76.42%、78.17%、79.54%,平均得率为 78.04%;总黄酮的纯度由原来的 15.24% 提高到 48.77%。

3 结论与讨论

在 1 cm × 30 cm 玻璃柱中,按径高比 1:10 湿法装柱,考察了 7 种不同型号大孔树脂对沙枣总黄酮的静态吸附及解吸性能,由于 XAD7HP 型大孔树脂对沙枣总黄酮有较高吸附量和解吸率,故选用 XAD7HP 型树脂进一步优化沙枣总黄酮的分离纯化参数。综合各项试验结果可以确定:采用 30 mL 质量浓度为 0.05 mg/mL、pH 值为 4 的沙枣黄酮粗提液以 0.5 mL/min 流速上样,完全吸附后用蒸馏水洗脱至流出液接近无色,继而用 40 mL、60% 乙醇以 0.5 mL/min 速度进行洗脱,可达到 XAD7HP 型树脂对沙枣总黄酮分离纯化的最佳效果,总黄酮的纯度由原来的 15.24% 提高到了 48.77%,试验结果比较理想。笔者所在课题组将在此试验结果的基础上,继续深入研究沙枣中的黄酮类化合物成分,采用先进分离纯化手段,以期得到高纯度的沙枣黄酮单体,并研究其体外抗氧化活性,为更好地开发利用沙枣这种中药提供更多科学依据。

参考文献:

- [1] 于玮玮,阎国荣. 沙枣的资源及研究现状[J]. 天津农学院学报, 2009,16(2):46-50.
- [2] 买尔旦·马合木提,努尔墩·麦提尼亚孜,古丽仙·胡加,等. 沙枣果实 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 新疆医科大学学报,2011,34(1):32-35.
- [3] 梁琪,毕阳,米兰,等. 沙枣细粉超微粉碎后对物化特性的影响研究[J]. 食品工业科技,2012,33(11):76-78.
- [4] Cansev A, Sahan Y, Celik G, et al. Chemical properties and antioxidant capacity of *Elaeagnus angustifolia* L. fruits[J]. Asian Journal of Chemistry,2011,23(6):2661-2665.
- [5] 廉宜君,李炳奇,肖芙蓉,等. 沙枣多糖对小鼠免疫功能影响的研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(5):1126-1127.
- [6] 孙建新,朱虎虎,肖辉,等. 4 种新疆植物提取物对人肝癌细胞生长抑制作用的研究[J]. 新疆医科大学学报,2008,31(7):828-830.
- [7] 买尔旦·马合木提,阿孜古力·吾司曼,古丽仙·胡加. 沙枣水提物抗炎、镇痛、解热及抗菌作用研究[J]. 西北药学杂志,2011,26(1):43-46.
- [8] 麦合苏木·艾克木,买尔旦·马合木提. 新疆沙枣提取物对实验性小鼠腹泻以及小肠推进功能的影响[J]. 新疆医学,2007,37(3):1-3.
- [9] 丁玉松,王忠,马儒林,等. 沙枣多糖抗疲劳作用及其机制的研究[J]. 食品科学,2010,31(11):255-257.
- [10] Si C L, Xu J, Wu L, et al. Antioxidant flavonoids from bark of *Elaeagnus angustifolia* [J]. Planta Medica, 2009, 75(9):943-944.
- [11] 王基云,姚遥,肖旭,等. 沙枣花黄酮成分的含量测定及其药理作用的初步研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(4):812-814.
- [12] 徐泉,王培先,程芬,等. 大孔吸附树脂富集沙枣花中总黄酮的工艺研究[J]. 中国药学杂志,2012,22(9):673-678.
- [13] 傅华强,邹建国,刘飞,等. 大孔树脂分离纯化枳壳中总黄酮的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(4):14-17.