

文章编号: 1673-1689(2011)02-0218-06

大孔树脂纯化笋壳中的黄酮物质

杨乐¹, 王洪新^{*1,2}, 秦晓娟¹

(1. 江南大学食品学院, 江苏无锡214122; 2. 食品科技与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏无锡214122)

摘要: 通过比较5种大孔吸附树脂对笋壳黄酮的吸附分离性能, 筛选出适合分离笋壳黄酮的树脂, 并对其动态吸附特性进行研究。结果表明: HPD600树脂对笋壳黄酮不仅吸附量大, 而且解吸率高, 适合笋壳黄酮的分离富集。其分离笋壳黄酮的工艺参数为: 上样质量浓度为3.89 mg/mL, pH 3.0, 上样量为7 BV, 流速3 BV/h; 用6 BV的体积分数40%乙醇洗脱, 解吸效果最佳, 黄酮总回收率为82.33%, 可得总黄酮质量分数为35.12%的笋壳提取物粉末。

关键词: 笋壳; 黄酮; 大孔吸附树脂; 吸附; 分离

中图分类号: S38

文献标识码: A

Purification of Flavonoids from Bamboo Shell by Macroporous Absorbent Resins

YANG Le¹, WANG Hongxin^{*1,2}, QIN Xiaojuan¹

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214112, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this manuscript, five types of macroporous resins were selected for adsorption and separation of flavonoids from Bamboo Shell. It was found that resin HPD600 was an excellent adsorbent with higher adsorption and desorption capacity. The effects of concentration, pH and flow rate of the solution on the dynamic adsorption of resin HPD600 were also studied. The results showed that the optimum adsorption conditions are listed as following: 7 BV flavonoids concentration of extract solution at 3.89 mg/mL, pH 3.0, flow rate at 3 BV/h using 6 BV 40% ethanol as the best desorption solvent, the total recovery of chlorogenic acid reached at 82.33%, and the content of flavonoids reached at 35.12% in the crude product.

Key words: bamboo shell, flavonoids, macroporous adsorption resin, adsorption, separation

黄酮类物质是一大类天然产物, 广泛存在于植物中的次级代谢产物, 具有抗癌^[1]、抗衰老^[2]、抗氧化^[3]、抗炎^[4]、降血压^[5]、降血脂、降血糖^[6-7]、调节

内分泌^[8-9]等诸多功能。目前, 从竹叶中提取活性物质已有报道, 但从笋壳中提取分离黄酮还鲜有报道。笋壳是竹笋制品加工的主要副产品, 以竹笋壳

收稿日期: 2010-04-16

基金项目: 贵州省科技支撑计划项目(黔科合NY字[2009]3028)。

* 通信作者: 王洪新(1964-), 男, 江苏徐州人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事天然功能因子方面的研究。Email: whx1964@126.com

为原料,提取黄酮类化合物,减少竹笋加工中大量次级原材料的浪费及环境污染。但是笋壳中黄酮类物质质量分数较低,需进一步分离纯化。大孔吸附树脂是 20 世纪 60 年代末发展起来的一类新型高分子分离材料,具有良好的吸附性能。进入 20 世纪 90 年代后,大孔吸附树脂广泛应用于天然产物的分离和纯化,具有吸附容量大,选择性好,吸附迅速,解吸容易,再生简单等优点^[10]。作者以竹笋加工废弃物笋壳来源的黄酮粗提物为对象进行吸附研究,选用了 5 种国产大孔吸附树脂进行筛选实验,并研究了树脂对笋壳黄酮的吸附特性,旨在寻找具有一定选择性、吸附容量大、易于解吸的树脂及最佳纯化工艺条件,对规模化分离纯化笋壳黄酮具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

表 1 大孔树脂型号及物理结构

Tab. 1 Physical properties and types of macroreticular resins

型号	粒径/mm	比表面积/(m ² /g)	孔径/Å	外观	极性
HPD450	0.3~1.25	500~550	90~110	乳白色小球	中性
HPD600	0.3~1.2	550~600	100~120	乳白色小球	极性
HPD826	0.3~1.25	500~600	90~100	乳白色小球	氢键
DA201	0.315~1.25	250~300	20~30	乳白色小球	极性
AB~8	0.3~1.25	480~520	130~140	乳白色小球	弱极性

1.2 实验方法

1.2.1 笋壳总黄酮的提取 根据前期试验结果,称取适量笋壳粉,用体积分数 80% 的乙醇在料液比 1:60 条件下,75 ℃ 提取 2 次,每次 3 h。再将浸提液过滤,真空旋转浓缩至无醇味,用去离子水稀释后备用。

1.2.2 总黄酮质量浓度测定方法 利用硝酸铝显色法测定提取液中总黄酮的质量浓度^[11]。根据标准曲线方程 $y = 1.0902x + 0.0013$ ($R^2 = 0.9992$) 计算结果。

1.2.3 树脂的预处理 参照文献[12]。

1.2.4 静态法筛选大孔吸附树脂

1) 大孔树脂吸附容量及吸附率的测定:准确称取经预处理的大孔吸附树脂 2.0 g 置于 50 mL 的三角瓶中,加入初始质量浓度为 3.25 mg/mL 的笋壳黄酮提取液 20 mL。盖紧瓶塞,固定在振荡器上,转速 150 r/min,室温振荡 24 h。充分吸附后,过滤,测定滤液中黄酮的质量浓度,按下式计算各种

树脂:由贵州省遵义市森林食品厂提供,50 ℃ 烘干后粉碎过 50 目筛。芦丁标准品:中国药品生物制品检定所提供;无水乙醇、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝:分析法,中国国药集团上海化学试剂有限公司产品;AB-8、HPD600、HPD450、HPD826 树脂:河北沧州宝恩化工有限公司产品;DA201 树脂:安徽三星树脂科技股份有限公司产品,见表 1。

UV2000 紫外可见分光光度计:上海尤尼柯有限公司制造;XW-80A 漩渦混合器:上海琪特分析仪器有限公司制造;HHS-4 数显恒温水浴锅:上海横平仪器仪表厂制造;AB203-S 型分析天平:METTLER 公司制造;BC-R202B 型旋转蒸发仪:上海贝凯生物化工设备有限公司制造;DELTA320 型 pH 计:梅特勒托利多仪器(上海)有限公司制造;KQ-50DE 型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司制造。

树脂的静态吸附量及吸附率:

$$Q = \frac{(c_0 - c_e) \times V}{W};$$

$$E(\%) = \frac{(c_0 - c_e)}{c_0} \times 100$$

式中:Q 为吸附量(mg/g); c_e 为吸附平衡后滤液中黄酮质量浓度(mg/mL);E 为吸附率; c_0 为初始液中黄酮质量浓度(mg/mL);V 为样液体积(mL);W 为干树脂质量(g)。

2) 黄酮解吸率的测定:将滤干且达到饱和的树脂用去离子水快速冲洗后,准确加入 20 mL 体积分数为 95% 的乙醇,置于振荡器上,转速 150 r/min,室温下振荡 24 h,过滤,测定解析液中黄酮质量浓度,按下式计算解析率:

$$B(\%) = \frac{c_1 V_1}{(c_0 - c_e) \times V} \times 100$$

式中:B 为解吸率; c_1 为解吸液中黄酮质量浓度(mg/mL); V_1 为解吸体积(mL)。

3) 黄酮吸附动力学特性的测定:根据上述吸附

率和解吸率的结果,选择 AB-8、DA201、HPD600 进行吸附动力学的研究。准确称取预处理后的大孔吸附树脂各 2 g,装入 50 mL 的三角瓶中,准确加入一定量的吸附初始液,在振荡器上 150 r/min 室温振荡,每隔一定时间测定溶液中黄酮质量浓度,绘制吸附动力学曲线。

1.2.5 大孔吸附树脂柱层析动态吸附条件的研究

1) 吸附树脂动态吸附动力学曲线的绘制:根据上述实验结果,选取 HPD600 大孔吸附树脂进行芦壳黄酮的纯化。将黄酮质量浓度为 3.25 mg/mL 的浓缩液加入层析柱中,在流速为 2 BV/h 下上柱,至树脂吸附饱和为止。实验中,以 1 BV 为单位收集流出液,测定流出液中黄酮的质量浓度,绘制吸附动力学曲线。

2) 样液 pH 值对吸附效果的影响:量取 5 份黄酮浓缩液,分别调节浓缩液 pH 值为 2、3、4、5、6,上柱吸附,样液流速控制在 2 BV/h 左右,收集流出液,测定黄酮的质量浓度,计算黄酮吸附量。

3) 黄酮质量浓度对吸附效果的影响:配制不同浓度黄酮样液,分别调节 pH 为 3,上柱吸附,样液流速为 2 BV/h,收集流出液,测定其中黄酮的质量浓度,计算黄酮吸附量。

4) 样液流速对吸附效果的影响:量取 50 mL 黄酮浓缩液上柱吸附,分别取流速为 1、2、3、4 BV/h 作比较,收集流出液,定容至一定浓度,测定其中黄酮的质量浓度,按下式计算出泄漏率。

$$\text{泄漏率}(\%) = \frac{\text{流出液质量浓度} \times \text{流出液体积}}{\text{原液质量浓度} \times \text{原液体积}} \times 100$$

5) 洗脱剂的选择和洗脱工艺的研究:量取 4 份黄酮浓缩液,调节浓缩液 pH 值为 3,样液流速为 3 BV/h。吸附达到饱和后,先用 2 BV 的去离子水冲洗树脂柱,再分别用体积分数 10%、30%、50%、70%、95% 乙醇以 3 BV/h 流速进行洗脱,分段收集洗脱液,测定洗脱液中黄酮的质量浓度,考察洗脱剂对树脂洗脱性能的影响,确定出最佳的洗脱工艺。

2 结果与讨论

2.1 静态筛选大孔树脂的结果

2.1.1 树脂的静态筛选及吸附—解吸性能的比较
选择 5 种大孔吸附树脂进行静态吸附试验,测定黄酮吸附平衡质量浓度,得到各种大孔树脂对初始液中黄酮的吸附情况,利用体积分数 95% 乙醇对吸附饱和树脂进行的解吸能力的测定,结果见表 2。

表 2 树脂筛选实验结果

Tab. 2 Result of the resin in the screening experiment

树脂种类	吸附平衡质量浓度 $c_e / (\text{mg/mL})$	吸附量/ (mg/g)	吸附率/ $\%$	解吸液质量浓度 $c_1 / (\text{mg/mL})$	解吸率/ $\%$
HPD450	0.95	23.03	70.86	1.87	81.12
HPD600	0.63	26.16	80.49	2.29	87.63
HPD826	1.98	12.71	39.11	0.70	55.01
DA201	2.13	11.17	34.37	0.74	66.43
AB 8	1.56	16.89	51.97	0.89	52.96

树脂的吸附量和解吸率是设备设计的重要参数,从生产成本上考虑,不仅希望树脂吸附量大,还要求较高的解吸率,以保证有效成分最大限度地回收。因此,综合考虑吸附及解吸两方面因素,HPD450、HPD600 和 AB-8 树脂较理想,符合筛选的要求。因此选择这 3 种较为理想的树脂进行静态动力学实验。

2.1.2 静态吸附的动力学研究 单用树脂的静态吸附量和吸附率来评价其吸附性能不是很全面,因为合适的树脂除了具有较大的吸附容量和较高的解吸率外,同时应具有较快的吸附速度,所以需研究其静态吸附动力学特征。3 种树脂的静态动力学曲线见图 1。

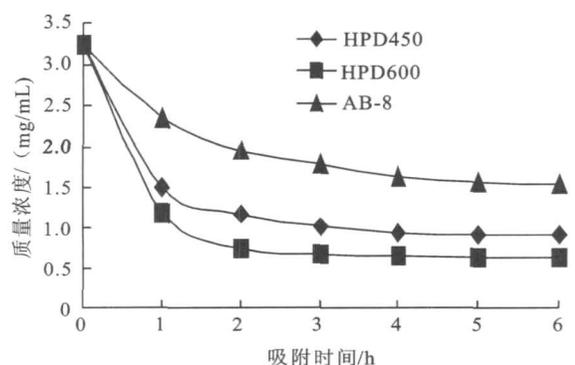


图 1 HPD450、HPD600 和 AB 8 3 种树脂的静态吸附动力学曲线

Fig. 1 Total flavonoid static absorption kinetics curve of three macroporous adsorption resin

由图1可看出,HPD600树脂对笋壳黄酮的吸附为快速平衡型,吸附起始阶段吸附量较大,3 h基本达到吸附平衡;HPD450树脂起始吸附量虽较大,但达到吸附平衡的时间较长,4 h才基本达到平衡;而AB-8树脂起始吸附量明显不如HPD450和HPD600树脂,并且达到吸附平衡的时间较长,需4 h后才基本达到平衡。综合以上分析,选用HPD600树脂作为笋壳黄酮的吸附剂,进一步研究其动态吸附特性。

2.2 HPD600树脂对笋壳黄酮的动态吸附试验

2.2.1 HPD600树脂对笋壳黄酮的动态吸附曲线

HPD600树脂对笋壳黄酮的动态吸附曲线见图2。

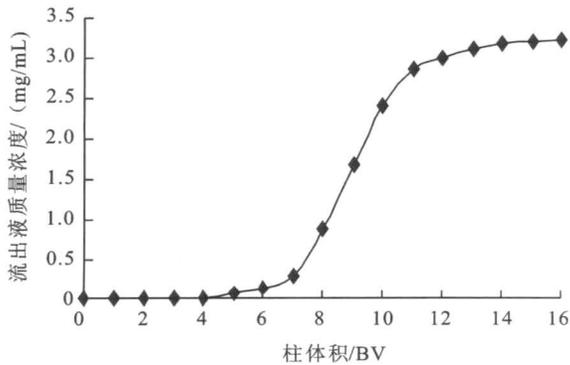


图2 HPD600树脂的动态吸附动力学曲线

Fig. 2 Total flavonoid dynamic absorption kinetics curve of macroporous absorption resin

结果表明,HPD600树脂可处理7 BV的样品溶液,50 mL的HPD600树脂可吸附1 036 mg的笋壳黄酮,即湿态HPD600树脂对黄酮的吸附量为20.72 mg/mL,处理量达到饱和时可处理12 BV的样品溶液,吸附量可达到36.24 mg/mL。

2.2.2 pH值对吸附量的影响 样品溶液的pH值对化合物的吸附作用亦很重要,根据化合物的结构特点改变溶液的pH值,可改变树脂对样品的吸附效果。吸附过程中吸附质以分子状态被吸附剂吸附,为了达到较好的效果,必须使吸附质保持分子状态,而不是离子状态。一般情况下,酸性化合物在适当酸性溶液中一般情况下,酸性化合物在适当酸性溶液中充分吸附,碱性化合物在碱性溶液中进行吸附较为合适,中性化合物可在近中性的情况下被吸附^[3]。

由图3可知:pH值在3左右有较高的吸附量。这是因为,黄酮为多羟基酚类,呈弱酸性,故在酸性或弱酸性条件下易被吸附,而酸性过强时黄酮分子易形成“伴盐”,偏碱性时黄酮分子羟基去离子化,黄酮化合物形成离子型结构,故都不易被吸附^[4]。

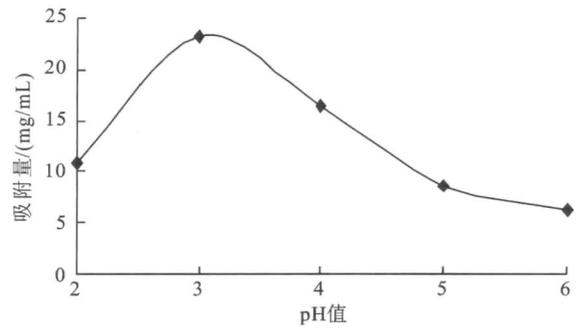


图3 pH值对吸附量的影响

Fig. 3 Effect of pH on the total flavonoid

2.2.3 样液质量浓度对吸附量的影响 树脂吸附目标产物时,存在着一个吸附平衡,该平衡和料液质量浓度有很大的关系。尤其是当树脂的吸附平衡是受液膜扩散控制时,料液质量浓度对树脂吸附平衡影响更大。由图4可知,上柱质量浓度较低时,树脂的吸附能力随着样液中黄酮质量浓度的增加而增加。当样液中黄酮质量浓度达到3.89 mg/mL后,树脂对黄酮的吸附能力随着浓缩液中黄酮质量浓度的增加而减小。

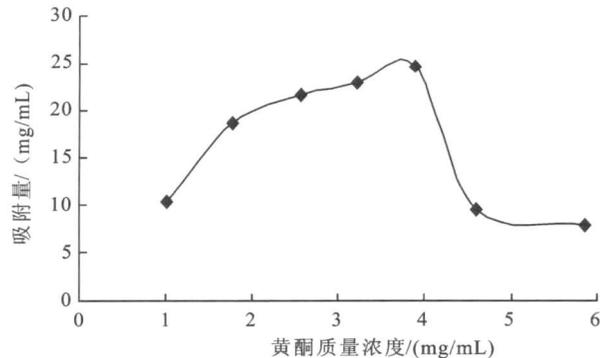


图4 黄酮质量浓度对吸附量的影响

Fig. 4 Effect of the concentration of flavonoid on the total flavonoid

2.2.4 流速对吸附效果的影响 由图5可知,上柱的样液随着吸附流速的加快,黄酮的泄露越严重。吸附流速为1 BV/h时,泄露率最小,但由于流速过慢,会延长生产周期,从而提高了生产成本;吸附流速为4 BV/h时的泄露率明显增大,显然此流速不适宜。综合考虑,由于2 BV/h和3 BV/h时泄露率较为相近,故而选择吸附流速3 BV/h为宜。

2.2.5 洗脱剂的选择和洗脱工艺的影响 由图6可看出,随着乙醇体积分数的升高,不同醇质量浓度对HPD600树脂上黄酮的解吸效果增大。70%乙醇的洗脱效果最好,其解吸率高,解吸曲线尖锐,洗脱峰集中,对称性较好。故试验采用6 BV的体积分数70%乙醇基本可将黄酮洗脱下来。

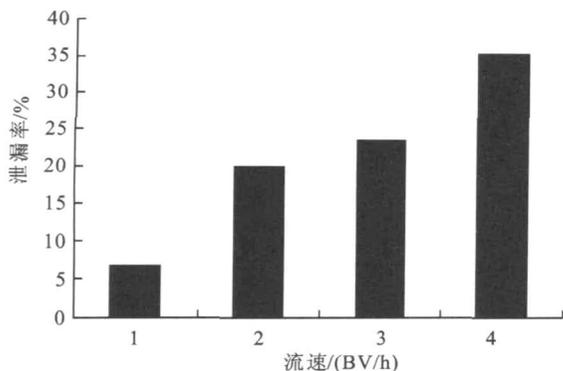


图5 流速对吸附的影响

Fig. 5 Effect of flow rate on the total flavonoid

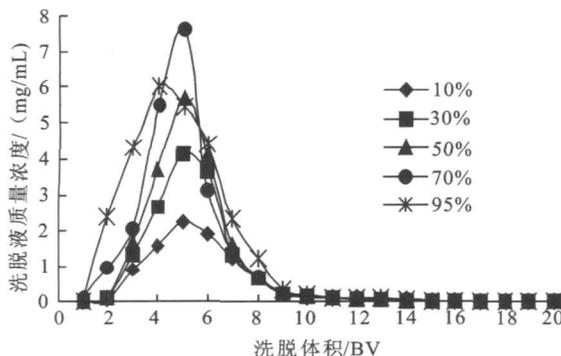


图6 洗脱剂体积分数对吸附的影响

Fig. 6 Effect of eluent concentration on the total flavonoid

2.3 最佳吸附—洗脱条件下的验证试验

将经过前处理的 HPD600 树脂 50 mL 装入 $\Phi 20 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$ 的树脂柱中。配制一定量的 3.89 mg/mL 的样液, 调节 pH 至 3, 以流速 3 BV/h 上样, 使其达到吸附饱和, 然后用 6 BV 的体积分数 40% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 减压浓缩, 50 °C 真空干燥, 可得总黄酮质量分数为 35.12% 的笋壳提取物粉末。

2.4 树脂的重复利用性能及再生

一般情况下, 大孔树脂在重复使用多次后, 流动相中的杂质会引起树脂中毒。取 HPD600 树脂, 湿法装柱, 柱体积为 250 mL, 采用最佳工艺条件进

行重复吸附, 测定树脂的重复使用性能。

由图7看出, 树脂在重复利用6次后, 吸附率无明显变化, 说明此工艺树脂中毒现象较轻, 适合于笋壳黄酮的重复分离, 可大规模扩大生产。

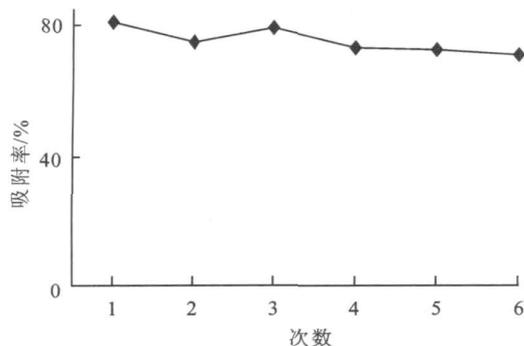


图7 树脂的重复使用性能

Fig. 7 Repetition capability of resin HPD600

3 结语

3.1 笋壳黄酮分离纯化的最佳工艺条件

本实验选用大孔吸附树脂对笋壳总黄酮进行进一步分离纯化。通过静态吸附—解吸试验, 从5种大孔吸附树脂中筛选出 HPD450、HPD600 和 AB-8 共3种较佳的树脂, 对其进行了吸附动力学研究, 从中确定出 HPD600 树脂最适合笋壳黄酮的分离富集。结果表明, HPD600 树脂吸附分离笋壳黄酮的工艺条件为: 上样质量浓度为 3.89 mg/mL, pH 3.0, 上样量为 7 BV, 流速 3 BV/h; 用 6 BV 的体积分数 40% 乙醇洗脱, 解吸效果最佳, 可得总黄酮质量分数为 35.12% 的笋壳提取物粉末。

3.2 工艺特性

该纯化方法简单易行, 通过验证, 发现该工艺稳定可靠。树脂重复利用6次, 吸附效果仍然很好, 说明该工艺重复利用性能良好, 适合工业化生产。采用该工艺得到纯化产品总黄酮质量分数为 35.12%、说明该工艺切实可行, 可以推广。

参考文献(References):

- [1] 姜泓, 孟舒, 陈再兴等. 紫穗槐中黄酮类化学成分的体外抗癌活性研究[J]. 中药材, 2008, 31(5): 736-738.
JIANG Hong, MENG Shu, CHEN Zai xing, et al. The research on anti cancer bioactivity in vitro of flavonoid active ingredients in *Amorpha fruticosa*[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2008, 31(5): 736-738. (in Chinese)
- [2] 陈红红, 李助乐, 章健等. 山核桃叶总黄酮抗衰老作用的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(5): 892-895.
CHEN HONG hong, LI Zhur le, ZHANG Jian, et al. Study on the anti aging effect of flavonoids in hickory leaf[J]. *Natural Product Research and Development*, 2008, 20(5): 892-895. (in Chinese)
- [3] 莫开菊, 柳圣, 程超等. 生姜黄酮的抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2006, 27(9): 110-114.
MO Kai ju, LIU Sheng, CHENG Chao. Study on antioxidant activity of the ginger flavonoid[J]. *Food Science*, 2006, 27

- (9): 110– 114. (in Chinese)
- [4] 张文平, 陈惠群, 张文书, 等. 千里光总黄酮的抗炎作用研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 605– 607.
ZHANG Wen ping, CHEN Hui qun, ZHAN Wen shu, et al. Study of the antiinflammatory effect of total flavonoids from *senecio scandens buclr ham*[J]. **Lishizhen Medicine And Materia Medica Research**, 2008, 19(3): 605– 607. (in Chinese)
- [5] 尤翠兰, 苏佩清. 黄酮类化合物降血压及其作用机制研究现状[J]. 河北中医药学报, 2007, 22(1): 496– 500.
YOU Cui lan, SU Pei qing. The research of blood pressure lowering and its mechanisms of flavonoid active ingredients [J]. **Journal of Hebei Traditional Chinese Medicine and Pharmacology**, 2007, 22(1): 496– 500. (in Chinese)
- [6] 韩淑英, 喇万英, 朱莉莎, 等. 荞麦种子总黄酮降血脂、血糖及抗脂质过氧化作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2001, 17(6): 694– 696.
HAN Shu ying , L Hua, ZHU Li sha, et al. Effect of total flavones of buckwheat seed on lowering serum lipid, glucose and anti lipid peroxidation[J]. **Chinese Pharmacological Bulletin**, 2001, 17(6): 694– 696. (in Chinese)
- [7] 高荫榆, 罗丽萍, 王应想, 等. 薯蓣黄酮降血糖作用研究[J]. 食品科学, 2005, 26(3): 218– 220.
GAO Yin yu, LUO Li ping, WANG Ying xiang, et al. Blood glucose lowering effects of flavonoids extracted from sweet potato vines[J]. **Food Science**, 2005, 26(3): 218– 220. (in Chinese)
- [8] 王建红, 欧阳栋. 菟丝子黄酮对心理应激雌性大鼠下丘脑 β EP 与腺垂体 FSH、LH 的影响[J]. 中药材, 2002, 25(12): 886– 888.
WANG Jian hong, OUYANG Dong. The effects on hypothalamic β EP and hypophysis FSH and LH of flavonoids from *cuscutae* in rats[J]. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, 2002, 25(12): 886– 888. (in Chinese)
- [9] 白风梅, 蔡同一. 类黄酮的生物活性及其机理的研究进展[J]. 食品科学, 1999, 20(8): 11– 13.
BAI Feng mei , CAI Tong yi. Research progress on bioactivity and mechanism of flavonoid [J]. **Food Science**, 1999, 20(8): 11– 13. (in Chinese)
- [10] 郭丽冰, 王蕾. 常见大孔树脂的主要参数和应用情况[J]. 中国现代中药, 2006, 8(4): 26– 32.
GUO Li bing, WANG Lei. Principal parameters and application of common macroporous resin[J]. **Journal of Modern Chinese Medicinal**, 2006, 8(4): 26– 32. (in Chinese)
- [11] 朱慧, 马瑞君, 吴双桃等. 三裂薹菊茎总黄酮含量的提取及其抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(6): 52– 56.
ZHU Hui, MA Rui jun, WU Shuang tao, et al. Extraction and antioxidant activity of total flavonoids from stem of *Wedelia trilobata* L[J]. **Food Science**, 2009, 30(6): 52– 56. (in Chinese)
- [12] 李颖畅, 郑凤娥, 孟宪军. 大孔树脂纯化蓝莓果中花色苷的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(4): 496– 500.
LI Ying chang , ZHENG Feng e , MENG Xi an jun. Studies on purification of anthocyanins from blueberry fruits by macroporous resins[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(4): 496– 500. (in Chinese)
- [13] Wu H, Li W H, Wu D C, et al. Determinative way's comparison of chlorogenic acid from the leaf of *Eucommia ulmoides* Oliv[J]. **J Fourth Mil Med Univ**, 1993, 21(2): 21– 23.
- [14] 朱燕超. 荷叶黄酮苷与苷元的制备及其降血糖初步研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.