

大孔吸附树脂 分离纯化油菜蜂花粉总黄酮的研究

王小艳^{1,2}, 王洪伦¹, 刘永军¹, 索有瑞^{1,*}

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001;

2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 利用 7 种大孔吸附树脂对油菜蜂花粉总黄酮进行了分离纯化研究, 结果筛选出 AB-8 型树脂的吸附量大, 易于洗脱, 纯化分离效果好。通过对 AB-8 型树脂的动态吸附研究, 得出的最佳分离纯化工艺参数为: 上样溶液浓度 0.9 mg/mL, pH 为 5, 吸附流速 2.5 mL/min, 洗脱采用 50% 的乙醇以 1 mL/min 的流速洗脱 3BV。

关键词: 大孔吸附树脂, 油菜蜂花粉, 总黄酮, 分离纯化

Separation and purification of total flavones from rape bee - pollen by macroporous resin

WANG Xiao - yan^{1,2}, WANG Hong - lun¹, LIU Yong - jun¹, SUO You - rui^{1,*}

(1 Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Science, Xining 810001, China;

2 Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: Purified the flavonoids from rape bee - pollen by 7 kinds of macroporous resins. AB-8 resin had much higher adsorption capacity and desorption rate than other resins. Then dynamic adsorption and desorption on the selected AB-8 resin were carried out, and the optimum parameters for separation were as follows: concentration 0.9 mg/mL, pH 5, flow rate 2.5 mL/min, the optimal eluant 50% ethanol with 3BV at the flow rate of 1 mL/min.

Key words: macroporous resins; rape bee - pollen; total flavones; separation and purification

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2008)02-0113-04

大孔吸附树脂是一种具有三维空间立体多孔结构的聚合物吸附剂, 这种吸附剂由于具有物理化学稳定性高、比表面积大、吸附容量大、选择性好、吸附速度快、解吸条件温和、抗有机污染、再生处理方便、使用周期长、宜于构成闭路循环、节省费用等诸多优点, 在天然药物及食品精制等领域得到了广泛的应用^[1-3]。大孔树脂的吸附能力不仅与其化学结构和物理性能有关, 而且与溶质及溶液的性质有关, 因此需根据纯化溶质的性质选择合适的大孔树脂。实验证明, 油菜蜂花粉具有抗动脉硬化、降低胆固醇等多种生理活性作用, 其主要有效成分为黄酮类化合物^[4]。本实验室前期已采用正交实验筛选出青海油菜蜂花粉总黄酮的最佳提取工艺, 经测定其总黄酮含量相当丰富, 具有较大的应用开发价值。为充分保留有效成分, 去除杂质, 本实验以大孔吸附树脂纯化富集青海油菜蜂花粉总黄酮, 并优化其分离纯化工艺, 以期对青藏高原丰富的油菜蜂花粉资源深度

开发及利用提供一定的实用技术。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

油菜蜂花粉 由青海友林科技发展有限公司提供, 原产自青海省海北州门源县; 芦丁标准品 江西本草天工生物公司; 树脂 X-5、NKA-、D101、S-8、NKA-9 南开大学化工厂; 树脂 AB-8、HPD-600 沧州宝恩化工有限公司; 其他试剂 均为分析纯。

CRA Y300B 紫外可见分光光度计 美国 Varian 公司; R2002 K 型旋转蒸发器 无锡星海王生化设备有限公司; JA1003 电子天平 上海天平仪器厂; RE52-98 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; 高速万能粉碎机 FW100 型 天津泰斯特仪器厂; 恒温水浴锅, 电热鼓风干燥机等。

1.2 树脂的预处理

将大孔吸附树脂以适量的 95% 乙醇充分浸泡 24h 后, 用 95% 乙醇冲洗至流出液加水 (1:5) 不呈浑浊, 然后用蒸馏水洗至无醇味。再依次用 2% NaOH 溶液、蒸馏水、5% HCl 溶液冲洗, 最后用蒸馏水冲洗至中性。

1.3 吸附原液的制备

收稿日期: 2007-09-17 * 通讯联系人

作者简介: 王小艳 (1981-), 女, 博士生, 从事天然产物化学和特色药用资源开发利用研究。

基金项目: 中科院“百人计划”项目; 中科院院长奖学金资助项目。

称取一定量粉碎并干燥后油菜蜂花粉,按料液比 1:12 加入 65%乙醇,于 80℃ 下水浴回流提取。由于粗提液中所含有的脂类、多糖等其它大分子杂质易吸附在树脂上,造成树脂的污染及堵塞。因此先对粗提液进行预处理,即将粗提液浓缩至红棕色后,用石油醚按 1/2 体积比萃取多次,脱脂,取下层液体再浓缩近干后加入 95%乙醇静置过夜以除去糖类、蛋白质、色素等。然后取上清液于 40℃ 减压回收至无醇味,浓缩物再加入热的蒸馏水溶解,调节至不同浓度的样品溶液,备用。

1.4 标准曲线的绘制及样品浓度的测定

精密称取干燥至恒重的芦丁对照品 10mg,用 75%乙醇溶解定容至 50mL,使贮备液浓度为 0.2mg/mL。准确吸取该溶液 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0mL,分别置于 10mL 容量瓶中,加 75%乙醇定容摇匀,按照紫外分光光度法于 360nm 下测定吸光值 (A),75%乙醇做空白参比^[5]。以吸光值 (A)对浓度 (C)进行线性回归得曲线方程: $A = 0.06416 + 26.7966C$, $r = 0.9999$,线性范围为 2~80 μ g/mL。

分别吸取样品溶液 1mL,用 75%乙醇定容至 25mL,按标准曲线的方法测定吸光值并计算各样品溶液浓度。

1.5 大孔吸附树脂对油菜蜂花粉总黄酮的静态吸附实验

1.5.1 大孔吸附树脂的静态吸附容量测定 准确称取预处理好的 7 种大孔吸附树脂各 2.0g (用滤纸吸干后称重)装入具塞锥形瓶中,精密加入 40mL 浓度为 0.865mg/mL 的样品溶液,于 25℃ 恒温水浴振摇 24h,过滤,取滤液 1mL 于 25mL 容量瓶中,照标准曲线的方法测定吸光度 (A),代入标准曲线方程计算吸附平衡后溶液中总黄酮的浓度,按下式计算吸附容量 E (mg/g)。

$$\text{吸附容量} = \frac{\text{吸附液初始浓度} - \text{吸附液平衡后浓度}}{\text{树脂干重}} \times \text{吸附液体积}$$

吸附液体积

1.5.2 大孔吸附树脂的解吸率测定 将上述吸附饱和的大孔树脂用蒸馏水洗至流出液无色,精密加入 95%乙醇 50mL,置于 25℃ 恒温水浴振摇 24h,过滤;取滤液 1mL 于 25mL 容量瓶中,照标准曲线的方法测定吸光度 (A),代入标准曲线方程计算洗脱液中总黄酮的浓度,并按下式计算解吸率 (%)。

$$\text{解吸率} = \frac{\text{洗脱液体积} \times \text{洗脱液浓度}}{\text{树脂干重} \times \text{吸附容量}} \times 100\%$$

1.5.3 大孔吸附树脂的静态吸附动力学特性测定 根据吸附容量和解吸率的测定与比较,选择出 3 种

表 1 7 种树脂的物理性能及对油菜蜂花粉总黄酮的吸附容量、解吸率

树脂型号	X-5	D101	HPD-600	AB-8	NKA-	S-8	NKA-9
树脂极性	非极性	非极性	弱极性	弱极性	强极性	强极性	强极性
比表面积 (m^2/g)	500-600	500-550	550-600	480-520	160-200	100-120	250-290
平均孔径 (Å)	290-300	90-100	80	130-140	145-155	280-300	155-165
平衡浓度 (mg/mL)	0.2975	0.2725	0.2715	0.2825	0.6025	0.7050	0.5100
吸附容量 (mg/g)	11.35	11.85	11.87	11.65	5.25	3.2	7.1
解吸浓度 (mg/mL)	0.3625	0.37	0.3504	0.4625	0.0525	0.0724	0.1525
解吸率 (%)	79.85	78.10	73.8	99.25	25	56.6	53.7

较为理想的树脂做静态吸附动力学实验。分别取吸干后树脂各 2.0g 装入具塞锥形瓶中,精密加入 70mL 浓度为 0.7222mg/mL 的样品溶液,于 25℃ 恒温水浴振摇,在 12h 内每隔 1h 吸取 1mL,定容于 25mL 容量瓶中,照标准曲线的方法测定吸光度 (A),计算总黄酮浓度,然后以静态吸附容量 (E)对时间 (t)作图,绘制静态吸附动力学曲线。

1.6 大孔吸附树脂对油菜蜂花粉总黄酮的动态吸附实验

为获得满意的纯化富集效果,除选用性能优良的大孔吸附树脂外,还需筛选出其最佳的动态条件。通过上述静态吸附实验,对筛选出的一种理想树脂进行上样液浓度、pH、流速、洗脱剂浓度等动态吸附实验。称取 20g 预处理好的树脂湿法装于 (1×40)cm 的层析柱中 (柱床体积为 7mL),将样品溶液上柱,以一定的流速分步收集 (5mL/管),当流出液吸光值为上样液的 1/10 时认为已达泄漏点,停止上样,按下式计算动态吸附量 (mg)。然后用约 2BV 的蒸馏水洗脱除去水溶性成分和树脂间未吸附的黄酮。

2 结果与讨论

2.1 大孔吸附树脂的筛选

大孔吸附树脂的纯化富集效果是由其极性、孔径、比表面积等综合性能决定的,对其性能的评价要从吸附、解吸、吸附动力学等因素综合考虑^[6]。

2.1.1 不同类型大孔树脂对油菜蜂花粉总黄酮的吸附、解吸效果 大孔树脂的吸附性能主要取决于吸附剂的表面性质,即树脂的极性和空间结构 (孔径、比表面积等)。本实验 7 种树脂的表面性质均不同,故对样品目标成分的吸附强弱、解吸难易均有差别。用该 7 种树脂对样品溶液进行吸附处理后,计算出吸附容量;再分别进行解吸,计算出解吸率,结果见表 1。

由表 1 可知,以上 7 种大孔树脂中,HPD-600、D101、AB-8 有较好的吸附容量;AB-8、X-5、D101 有较好的解吸率,其中 AB-8 型的解吸率最高,在 99% 以上。而 3 种强极性树脂的吸附容量和解吸率均较低。综合吸附性能及解吸效果,筛选出树脂 AB-8、D101 和 HPD-600 进行静态吸附动力学实验,以全面评价这 3 种树脂的性能优劣。并且,从筛选结果可知,所选的 3 种树脂均具有孔径较小,比表面积较大,极性较弱或无等特点。由于大孔树脂本身为一种分子筛,可根据不同孔径树脂对目标成分吸附量的大小差异,粗略推测目标成分的分子量。由此推

测:孔径介于 80~140Å的大孔树脂较适于油菜蜂花粉黄酮类物质的分离纯化。同时,黄酮类物质一般呈现弱极性,根据相似相吸原理推测,对样品目标成分吸附能力较强的应该是弱极性树脂,而表 1 的结果恰好证实了这一点。此外,由筛选结果推测:树脂的比表面积越大,对油菜蜂花粉总黄酮的吸附量越大。

2.1.2 大孔吸附树脂的静态吸附动力学特征 3种大孔吸附树脂对油菜蜂花粉总黄酮的静态吸附动力学曲线见图 1;其吸附容量与时间的关系见图 2。由图 1、图 2可知,3种树脂对样品中总黄酮的吸附均为快速平衡型,吸附速率有所差异,其中 AB-8 和 HPD-600 吸附达到饱和所需的时间较短,约 3h 即达平衡,并且 AB-8 的吸附容量最大。综合以上分析可知,AB-8 对油菜蜂花粉总黄酮有良好的静态吸附动力学特性,较其他种类的树脂更适宜于工业化生产;且 AB-8 树脂为弱极性,黄酮类具有多酚结构和糖甙链,具有一定的极性和亲水性,生成氢键的能力较强,有利于弱极性树脂的吸附,因此本法最终选定 AB-8 型大孔树脂作为纯化富集油菜蜂花粉总黄酮的材料。

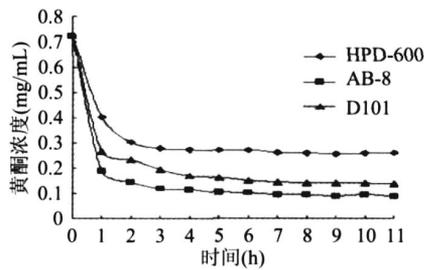


图 1 三种树脂的静态吸附动力学曲线

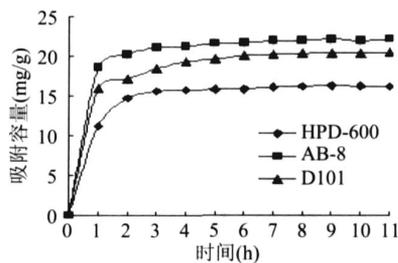


图 2 三种树脂对黄酮的吸附容量与时间的关系

2.2 AB-8 型大孔树脂对油菜蜂花粉总黄酮的动态吸附实验结果

2.2.1 吸附流速的影响 样品溶液通过树脂床的流速对工作效率及目标成分的吸附量均有较大影响。本实验中,吸附流速分别控制为 1.0、2.5、4.0、6.5 mL/min,结果见图 3。

如图 3 所示,随着流速的增加,吸附量逐渐下降,当流速到 4.0 mL/min 以后,吸附量下降明显。可能由于流速过快时,目标成分与树脂的接触时间较短,导致目标成分分子来不及扩散并吸附到树脂内表面就已流出。而流速为 1.0 mL/min 时吸附量最大,但吸附时间较长,在实际应用中,会导致循环周期延长而工作效率降低。因此,实验选定吸附流速为 2.5 mL/min。

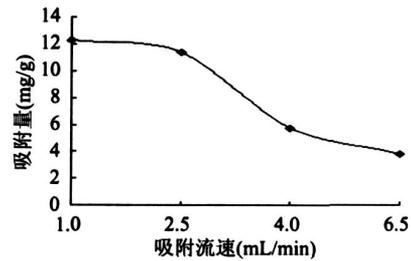


图 3 不同吸附流速对吸附量的影响

2.2.2 上样 pH 的影响 上样溶液 pH 的变化,可以改变目标成分在溶液中存在的形式,影响其溶解度;并改变溶液极性,影响目标成分与大孔吸附树脂的分子间作用力^[7]。通常,在不同 pH 的溶液中,目标成分的溶解度越大,则树脂对该成分的吸附力越小,其吸附量就小。本实验用 1 mol/L NaOH 和 5% HCl 将样品溶液(浓度为 0.7222 mg/mL)调节至不同的 pH (3.0、4.0、5.0、6.0、7.0),分别上样进行吸附实验,结果如图 4 所示。

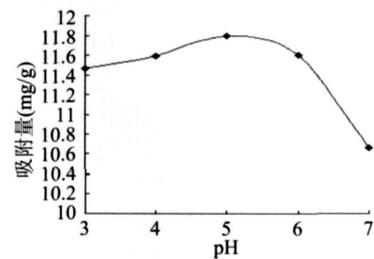


图 4 不同上样 pH 对吸附量的影响

当 pH = 5 时吸附量最大;大于或小于此值,吸附量均较小,可能由于黄酮类物质为多酚类化合物,其酚羟基与树脂以氢键的形式结合。当 pH 等于 5 时,羟基易电离出 H 质子,使黄酮类物质的水溶液呈弱酸性,因而在弱酸条件下有较好的吸附效果;当 pH 高于 5 时,碱性增大,则 H 质子易于被强碱俘获,使酚羟基上的氢解离形成酸根离子,与树脂的结合减弱从而吸附量降低;当 pH 低于 5 时,则抑制羟基上 H 质子的电离,也造成吸附能力降低。因此本实验选定上样 pH = 5。

2.2.3 上样浓度的影响 若上样液浓度低,则粘度较小,在一定的上样流速下溶液通过柱床时,流速较快,大于黄酮向树脂内部扩散的传质速度,传质未进行彻底就可能泄漏,而且吸附处理时间延长,效率降低,不利于实际工业生产;若上样液太浓,则粘度较大,传质速度变慢,且树脂周围的黄酮分子过多,使得部分黄酮来不及被吸附就流出来,且泄漏早,处理量小^[8]。两种情况均不能使黄酮达到最大吸附量,因此实验需要选择适中的上样浓度,结果见图 5。

如图 5 所示,在上样液浓度较低的情况下,随着浓度的增大,树脂对黄酮的吸附量也增大,但当浓度增加到一定值后,吸附量增加不再显著。因此,上样浓度确定为 0.91 mg/mL。

2.2.4 洗脱剂浓度的选择 洗脱剂需对目标成分具有良好的溶解作用,当目标成分在洗脱剂中的溶解作用大于其与树脂间的吸附作用时,洗脱剂才能顺利进行。黄酮类化合物易溶于甲醇、乙醇、醋酸乙

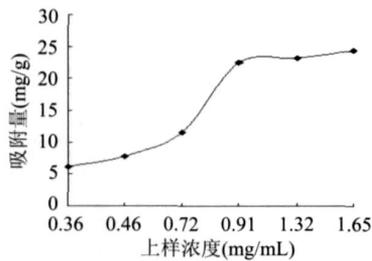


图5 不同上样浓度对吸附量的影响

酯、乙醚等。本实验选用乙醇为洗脱剂,其安全、无毒、无残留、价廉、易回收等优点,更适用于天然药物及健康食品的工业化制备。

由于乙醇浓度不同,则极性不同,黄酮与树脂的分子间作用力及黄酮的溶解度不同,从而洗脱效果也有差别。实验称取一定量已吸附饱和的树脂装入层析柱,控制流速 1 mL/min (约为吸附流速的 1/3),用 25%、50%、75%、95% 的乙醇进行梯度洗脱。分别洗至流出液近无色,然后分别收集流出液,浓缩并定容至 250 mL 后,用 TLC 法做定性检验,即分别将芦丁标品溶液和各浓度流出液点于同一硅胶 G 薄层板上,以氯仿-甲醇 (5:5) 为展开剂展开,取出晾干,喷以 10% 硫酸乙醇显色,热风吹烤至斑点清晰,置紫外灯下观察荧光斑点。TLC 结果显示,25%、50%、75%、95% 的乙醇洗脱液中均含有黄酮。因此,测定各浓度洗脱液中的黄酮含量,结果如图 6 所示:25% 乙醇洗脱出少量黄酮;75% 及 95% 乙醇洗脱出的量也相对较少;而 50% 乙醇洗脱时,大部分黄酮被洗脱且洗脱效率较高。同时考虑到乙醇浓度过高,挥发性大,会增加生产成本及操作条件的控制难度。因

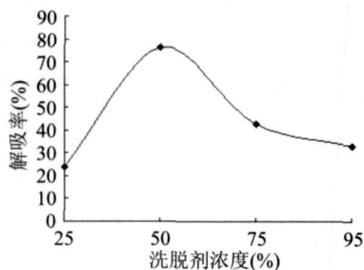


图6 洗脱剂浓度对解吸率的影响

(上接第 112 页)

到约 2% (g/v) 的滤泥,滤泥中含有大量无机物和蛋白质等有机成分。由于麦饭石、壳聚糖均为天然产物,属环境友好材料,故这部分滤泥无毒无害,不会污染环境。对于滤泥的综合利用可以考虑作为动物饲料添加剂。

3 结论

3.1 将 80 目麦饭石与 90% 脱乙酰度壳聚糖的 0.5% 醋酸溶液按 1:1.2 的质量比混合制成壳聚糖-麦饭石澄清剂,清除水蜜桃汁中浑浊物、沉淀物。最佳工艺参数是:水蜜桃汁中壳聚糖-麦饭石添加量为 10 g/L、作用时间 4 min、作用温度为 30 左右,水蜜桃汁的透光率达 80% 以上,澄清效果较好。

3.2 壳聚糖-麦饭石澄清剂无毒、无害,生产过程产

生的滤泥可做动物饲料添加剂,对环境无污染。

此,实验确定 50% 乙醇作为洗脱剂,用量以 3BV 最佳。

2.2.5 树脂再生性能 大孔吸附树脂使用后,用 95% 乙醇洗至无色,即已再生;再用蒸馏水洗去乙醇,即可进行下一次分离。若经反复使用后,树脂颜色变深,可采用 NaOH 浸泡洗涤,当其吸附容量下降 30% 以上时,则不宜再使用。

3 小结

采用静态吸附实验,考察了大孔吸附树脂的吸附容量、解吸率及静态吸附动力学特征,对 7 种大孔树脂的性能做了全面比较,并筛选出 AB-8 型作为一种理想的树脂,对油菜花粉总黄酮进行初步的纯化富集。

采用动态吸附实验,对 AB-8 型大孔吸附树脂纯化油菜花粉总黄酮的工艺参数进行了初步研究,确定了其纯化工艺条件:上样溶液浓度 0.91 mg/mL, pH 调至 5,以 2.5 mL/min 的吸附流速上样,再以 50% 乙醇对吸附后的树脂进行洗脱,洗脱剂用量 3BV。该工艺简单,成本低,易于工业化生产。

参考文献:

- [1] 王立,姚惠源. 大孔吸附树脂纯化乌饭树叶黑色素的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 20~24.
- [2] 何伟,李伟. 大孔树脂在中药成分分离中的应用 [J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(2): 134~136.
- [3] 赵瑜,陈波,等. 大孔吸附树脂分离纯化人参二醇类和三醇类皂甙 [J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(3): 235~238.
- [4] 王开发. 蜂花粉的功能与应用 [M]. 北京:化学工业出版社, 2004.
- [5] 孙丽萍,田文礼,等. 蜂花粉总黄酮检测方法的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(1): 262~265.
- [6] 何炳林,黄文强. 离子交换与吸附树脂 [M]. 上海:上海科技教育出版社, 1995.
- [7] 刘瑞源,钟平,等. 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): 15~16.
- [8] 黄建明,郭济贤,陈万生,等. 大孔树脂对草乌生物碱的吸附性能及提纯工艺 [J]. 复旦学报(医学版), 2003, 30(3): 267.

参考文献:

- [1] 夏文水,王璋. 壳聚糖澄清果汁作用的研究 [J]. 无锡轻工业学院学报, 1993, 12(2): 111~114.
- [2] 许晖,孙兰萍. 壳聚糖对水蜜桃汁的澄清效果初报 [J]. 中国农学通报, 2006, 22(9): 97~99.
- [3] 李小满,赵晋府. 麦饭石的营养价值及其在食品工业中的应用 [J]. 饮料工业, 2000, 3(2): 16~18.
- [4] 李增新,段春生,黄婕,等. 沸石-壳聚糖吸附剂对保健食品醋的澄清作用 [J]. 食品工业科技, 2006, 27(12): 132~134.
- [5] 王伟坤. 食品检验与分析 [M]. 北京:中国轻工业出版社, 1989.