

文章编号:2095-7386(2016)04-0037-06

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2016.04.007

大孔树脂纯化竹干黄酮类化合物的工艺研究

秦振华, 范爽, 李建芬, 郝义龙, 丁捷枫

(武汉轻工大学 化学与环境工程学院, 湖北 武汉 430023)

摘要: 黄酮类物质具有优良的防腐抗菌效果,但从植物中提取和纯化技术尚不成熟,为此探讨了油竹干黄酮提取液的大孔树脂纯化工艺。通过7种不同型号大孔树脂对黄酮粗提液的吸附与解吸实验,优选出AB-8型大孔树脂;并得出油竹干黄酮提取液的最佳纯化条件为:1.0 mg/mL黄酮水溶液,上样液pH为6.0,上样速度为1.0 mL/min,最大上样量为170 mL;采用浓度为60%的乙醇进行洗脱,洗脱速度为1.5 mL/min,其用量为120 mL。此条件下纯化效果最佳,竹干黄酮样品纯度由21.3%提高到50.85%。

关键词: 油竹;黄酮类物质;大孔树脂;纯化

中图分类号: O 652.6

文献标识码: A

Separation and purification of total flavonoids from *Bambusa surrecta* by macroporous resin

QIN Zhen-hua, FAN Shuang, LI Jian-fen, HAO Yi-long, DING Jie-feng

(School of Chemistry and Environmental Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: Flavonoids have excellent antiseptic and antibacterial effect, but the relevant abstraction and purification technology is not mature yet, so this study investigated the purification process of total flavonoids from the extracting solution of *Bambusa surrecta* by macroporous resin. AB-8 macroporous resin was selected to isolate and purify crude flavonoids extract from seven macroporous resin via adsorption and desorption experiments, and the optimal parameters are as follows: 1.0 mg/mL crude flavonoids solution with pH value of 6.0, the flow rate is 1.0 mL/min and the maximal sample volume is 170 mL, then the sample was eluted with 120 mL ethanol eluent(60%) at the rate of 1.5 mL/min. After the purification process with AB-8 resin, the purity of flavonoids from bamboo stem was increased from 21.3% to 50.85%.

Key words: *Bambusa surrecta*; total flavonoids; macroporous resin; purification

1 引言

中国素有“竹子王国”之称,拥有极为丰富的竹

类资源,现有竹类植物48个属500余种,竹类植物面积、蓄积量及年产竹材量均占世界1/3左右。竹沥是竹干经加工后提取的汁液,鲜竹沥富含多种人

收稿日期:2016-05-18.

作者简介:秦振华(1985-),男,讲师,E-mail: whpuchem@126.com.

通信作者:李建芬(1968-),男,教授,E-mail: lijfen@163.com.

基金项目:武汉市科技人才培育计划创新团队项目(2015070504020222).

体必需氨基酸、黄酮及微量元素。竹沥制品在医疗上可用于缓解痰热咳嗽、痰黄气促、中风痰盛、惊风、破伤风等症状。其中,竹沥中的黄酮类物质具有优良的抗自由基、抗氧化和抗菌等生物学功效^[1-3],在食品添加剂、天然药物和化妆品开发等领域具有广阔前景,但是竹沥存在获取困难以及不易保存和运输等问题。文献表明目前对竹子的利用多局限于竹沥和竹叶黄酮的提取,对竹干黄酮的分离纯化研究鲜见报道^[4-6]。

大孔吸附树脂是一类不含交换基团且有较大孔结构的高分子吸附树脂,在分离应用上具有选择性好、适用范围广的特点^[7-10]。为提高竹干(*Bambusa surrecta*)黄酮的分离纯化效果,本实验考察了树脂类型、上样浓度、上样速度、上样液 pH 值、上样量、洗脱剂浓度、洗脱速率、洗脱液用量等因素对纯化效果的影响,优选出利用 AB-8 吸附树脂进行分离纯化竹干黄酮的工艺条件,为竹干黄酮的开发利用提供实验基础。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

试剂与材料:油竹竹干采集于恩施州地区,洗净后放入 40 ℃ 恒温干燥箱中烘干后粉碎,装入密封袋中备用。芦丁对照品购自中国药品生物制品检定所;大孔吸附树脂 NKA-II、D101、AB-8、H103、DM130、HZ816 和 S-8 均购自沧州宝恩化工有限公司;无水乙醇、氢氧化钠、硝酸铝、亚硝酸钠均为分析纯。

仪器及设备:721 型分光光度计(上海光学仪器厂);玻璃层析柱;万分之一电子分析天平(Sartorius BS224S);旋转蒸发仪(上海亚荣,RE-52AA);集热式水浴锅(常州国华 HJ-8);FW100 型植物粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司);酸度计(上海雷磁 PHS-3C)。

2.2 实验方法

2.2.1 油竹竹干黄酮的提取与粗提液的处理

将油竹粉末置于圆底烧瓶中,60% 乙醇作为提取剂,料液比为 1:20,80 ℃ 水浴下回流 2 h,过滤,得到竹干黄酮粗提物的醇溶液。将粗提液经过除杂后,浓缩除去乙醇,干燥备用。

2.2.2 竹干总黄酮的测定

准确称取于 120 ℃ 减压干燥至恒重的芦丁标准品 200 mg,置于 100 mL 容量瓶中,加甲醇 70 mL,置水浴上微热使溶解,冷却,加甲醇至刻度,摇匀。吸

取 10 mL 置 100 mL 容量瓶中,加水至刻度,摇匀备用(每 1 mL 中含无水芦丁 0.2 mg)。准确量取 0.2 mg/mL 的芦丁标准溶液 0 mL、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL 和 5.0 mL 分别置 10 mL 容量瓶中,各加水至 5 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 0.4 mL 混匀,放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 0.4 mL 摇匀,放置 6 min,加入 4% 氢氧化钠溶液 4 mL,再加水至刻度,摇匀,放置 15 min,在 510 nm 波长处比色测定吸光度。以吸光度为纵坐标,芦丁浓度为横坐标,绘制标准曲线,所得标准曲线方程为 $Y = 9.9599C - 0.0082$, $R^2 = 0.9990$,线性关系良好。

2.2.3 大孔吸附树脂的预处理

大孔树脂先用 95% 乙醇浸泡 24 h 除去其中含有的杂质,接着乙醇湿法装柱。用 90% 的乙醇淋洗,直至流出液加水不呈现白色浑浊,用蒸馏水洗净乙醇。加入 2 倍柱体积的 5% 盐酸溶液和 2% 氢氧化钠溶液分别浸泡并洗至中性,留存备用。

2.2.4 大孔吸附树脂吸附能力与解吸能力的测定

(1)树脂吸附量与吸附率的测定:将待筛选的七种大孔树脂预处理好后,分别称取 1.0 g,用滤纸吸干后分别装入三角瓶中,加入 50 mL 浓度为 0.682 mg/mL 的样品溶液,在恒温振荡器中振摇,水浴温度控制在 25 ℃,8 h 后过滤,测定此时滤液中总黄酮的浓度,计算吸附率(%)与吸附量(mg/g)。

$$F = \frac{(c_0 - c_1)}{c_0} \times 100\%.$$

$$Q = (c_0 - c_1) \times V/W.$$

其中, F 代表吸附率, Q 为吸附量(mg/g), c_0 和 c_1 分别代表竹干总黄酮的初始浓度和吸附平衡浓度(mg/mL), V 表示样品溶液的体积(mL), W 表示树脂干重(g)。

(2)树脂解吸率的测定:经过上述处理的树脂已经吸附了足量的黄酮,放入 250 mL 具塞三角瓶中,加入 50 mL 90% 乙醇,在水浴恒温振荡器中振荡,水浴温度控制在 25 ℃。24 h 后过滤,测定其中总黄酮的浓度,计算树脂在 25 ℃ 的解吸率(%):

$$R = \frac{c_r}{c_0 - c_1} \times 100\%.$$

其中, R 代表解吸率, c_0 和 c_1 分别代表竹干总黄酮的初始浓度和吸附平衡浓度(mg/mL), c_r 表示解吸液中总黄酮浓度(mg/mL)。

2.2.5 大孔吸附树脂吸附动力学曲线的制作

通过比较 2.2.4 中测定的七种大孔吸附树脂的吸附率和解吸率,选取其中性能效果较好的三种树

脂进行动力学研究。方法如下:将 1.0 g 干燥的大孔吸附树脂放到为 250 mL 具塞三角瓶中,加入浓度为 0.682 mg/mL 的竹干总黄酮水溶液 50 mL,将三角瓶放置水浴恒温振荡器中,设置水温 25℃,每小时各取 1.0 mL 溶液,取 8 h 内的溶液测定其总黄酮含量,计算单位吸附量和吸附率,绘制相应树脂的吸附动力学曲线。筛选出 AB-8 树脂更加适宜对竹干黄酮进行纯化。

2.2.6 AB-8 大孔吸附树脂的动态吸附研究

通过研究优选出效果最佳的大孔树脂为 AB-8。因此我们选用它进行动态吸附竹干黄酮的研究。在动态吸附过程中,树脂对黄酮的吸附能力主要与上样浓度、上样速度、上样液 pH 值以及上样量这四个因素有关,故主要对这四个因素进行考察。通过上样前后溶液中总黄酮的含量,计算其吸附量和吸附率。动态解吸过程中,树脂解吸能力的大小与洗脱剂的浓度、洗脱速率和洗脱剂的用量有关。因此,实验将对这三个因素进行研究。

(1)上样浓度的影响:将预处理好的 AB-8 树脂装入层析柱中。取样品溶液,配制黄酮浓度为 0.3 mg/mL、0.6 mg/mL、1.0 mg/mL、1.5 mg/mL、2.0 mg/mL 的溶液,每份 60 mL,分别上样,控制上样流速为 1 mL/min,计算吸附率,绘制曲线。

(2)上样速度的影响:将预处理好的 AB-8 树脂装入层析柱中,配制 0.682 mg/mL 的竹干黄酮溶液,上样量为 60 mL,分别控制上样速度为 0.5 mL/min、1 mL/min、1.5 mL/min、2 mL/min、3 mL/min,计算吸附率,绘制曲线,

(3)上样液 pH 的影响:将 AB-8 树脂装入层析柱中,把浓度为 0.682 mg/mL 竹干黄酮提取液分成 6 份,分别调节 pH 为 3,4,5,6,7,8 后分别进行吸附实验,控制上样速度为 1 mL/min,测定各个 pH 下的黄酮浓度,计算吸附率,绘制曲线。

(4)上样量的影响:动态吸附时,流出液的浓度会随着体积的增加而增加,当达到某一段浓度保持不变时,此时吸附量就达到了饱和状态,树脂对物质的吸附会减弱甚至消失。这时,化学成分就开始泄漏,达到了泄漏点(规定为流出液浓度达到初始浓度的 10%),即为最佳上样量。

准确称一定量 AB-8 大孔树脂,装入层析柱中,将 0.682 mg/mL 竹干黄酮溶液以 1.0 mL/min 的流速上样,定量收集流出液,测定每一分中总黄酮的浓度,绘制 AB-8 型树脂吸附竹干黄酮水溶液的动态吸附泄漏曲线。

(5)洗脱剂浓度的影响:将 AB-8 树脂装入层析柱中,将 0.682 mg/mL 竹干黄酮溶液以 1 mL/min 的流速上样,上样量不超过 170 mL,吸附完全后,再分别用 40%、50%、60%、70%、80% 浓度的乙醇洗脱,洗脱速度为 1.5 mL/min,测定各浓度洗脱液中的黄酮含量,计算解吸率,绘制曲线。

(6)洗脱速率的影响:将预处理好的 AB-8 的树脂装入层析柱中,将 0.682 mg/mL 的竹干黄酮溶液以 1 mL/min 的速度上样,上样量不超过 170 mL,待吸附完全后,用 60% 的乙醇溶液洗脱,上样浓度选择 1 mg/mL,上样速度为 1 mL/min,洗脱速率分别选择 0.5 mL/min、1 mL/min、1.5 mL/min、2 mL/min、3 mL/min,计算洗脱率,绘制曲线。

(7)洗脱剂用量的影响:将预处理好的 AB-8 树脂装入层析柱中,取样品溶液,浓度为 0.682 mg/mL 竹干黄酮溶液以 1 mL/min 的流速上样,上样量不超过 170 mL,吸附完全后,再分别用体积为 60 mL、80 mL、100 mL、120 mL、140 mL、160 mL、180 mL 的 60% 乙醇溶液进行洗脱,洗脱速率 1.5 mL/min,计算解吸率。

2.2.7 竹干黄酮纯化效果评价

AB-8 树脂纯化后产品中总黄酮的纯度计算:

$$\text{产品纯度} = \frac{\text{产品中总黄酮质量}}{\text{产品总质量}} \times 100\%$$

上柱前样液中总黄酮的纯度计算:

$$\text{样品纯度} = \frac{\text{上柱前样品总黄酮质量}}{\text{上柱前样品固体质量}} \times 100\%$$

产品精制倍数的计算

$$\text{精制倍数} = \frac{\text{产品纯度}}{\text{样品纯度}}$$

3 结果与分析

3.1 大孔吸附树脂吸附能力与解吸能力的测定

3.1.1 大孔树脂吸附量与吸附率的测定

筛选树脂应根据树脂对竹干黄酮的吸附量作为考核树脂的优劣的指标之一。根据 2.2.4 中的方法步骤进行实验,结果如表 1 所示。

通过比较表 1 中的数据,我们可以将吸附率和吸附量从大到小将这 7 种树脂排序: H103 > AB-8 > S-8 > D101 > NKA-II > HZ816 > DM130。

3.1.2 大孔树脂解吸率的测定

表 2 为大孔吸附树脂在静态解吸附过程中解吸率的测定结果,可以看出 AB-8、S-8 及 D101 的解吸率相对较大。

表 1 不同大孔吸附树脂对竹干黄酮吸附性能测定

树脂型号	吸附平衡浓度 /(mg/mL)	吸附量 /(mg/g)	吸附率 /%
NKA-II	0.354	16.4	48.09
D101	0.332	17.5	51.32
AB-8	0.317	18.25	53.52
H103	0.284	19.9	58.34
DM130	0.493	9.45	27.71
HZ816	0.398	14.2	41.64
S-8	0.326	17.8	52.20

表 2 不同大孔吸附树脂对竹干黄酮解吸率的测定

树脂型号	解吸平衡浓度/(mg/mL)	解吸率/%
NKA-II	0.111	33.84
D101	0.255	72.86
AB-8	0.295	80.82
H103	0.200	50.25
DM130	0.133	70.37
HZ816	0.086	30.28
S-8	0.281	78.93

综合比较实验用树脂的吸附率与解吸率,可以发现 AB-8、S-8 以及 H103 吸附性能较好,这可能是由于竹干黄酮中含有极性和亲水性的基团,有利于相似极性的树脂进行吸附,同时,研究表明在一定条件下,比表面积越大的树脂,其吸附能力越强。从表 1 中可知,具有最大比表面积的 H103 吸附率最大,但是它解吸困难,解吸率相对较低。我们从中选择 AB-8、S-8 和 H103 进行进一步实验,从中选出性能最佳的树脂。

3.2 大孔吸附树脂吸附动力学曲线的制作

选取 AB-8、H103 和 S-8 3 种型号的大孔吸附树脂,根据 2.2.5 的方法进行静态吸附动力学测定,结果如图 1 所示。

从图 1 可知,3 种树脂的吸附速率虽有一定差异,但均在 5 h 左右均达到了平衡。总体上,AB-8 比其他 2 种树脂到达平衡的时间要短。由此,归纳以上所述,AB-8 树脂对竹干黄酮具备良好的吸附动力学特性,更加适宜对竹干黄酮进行纯化。

3.3 AB-8 大孔树脂的动态吸附性能研究

3.3.1 上样浓度的影响

从图 2 中可知,在浓度较低时,树脂的吸附率较小,当浓度为 1 mg/mL 时,吸附率有最大值,此后上样浓度增大,吸附率反而变小。因此,上样液的浓度选择 1mg/mL 最好。

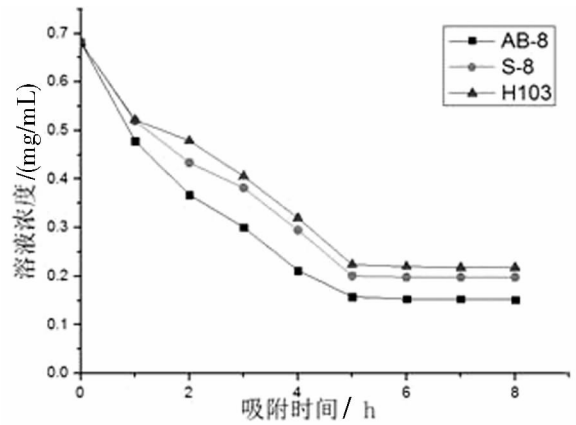


图 1 三种树脂的静态吸附动力学曲线

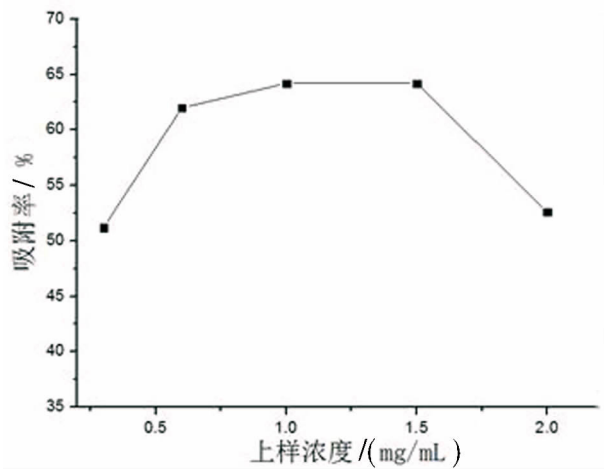


图 2 上样浓度对吸附率的影响

3.3.2 上样速度的影响

从图 3 中可知,上样速度对树脂的吸附率的影响较大,在流速较低时,吸附率较高,流速增大,吸附率越来越小。这是因为当上样速度太快时,溶液在树脂柱中的停留时间较短,有的样品还没有被树脂吸附,而上样速度较低时,溶液中粒子扩散比较充分。但是流速太慢会耗时太久,也不合适。因此,综合考虑,选择 1.0 mL/min。

3.3.3 上样液 pH 的影响

从图 4 中可知,pH 的增大过程中,树脂的吸附率并不是一直增大,在 pH 为 6.0 时,就已经达最大值。这可能是因为溶液的酸碱性会使得黄酮分子的结构发生改变,从而使其溶解度同步的变化;同时溶液 pH 不同,其极性也会相应的有所变化,导致树脂与所需物质之间作用力也会不同。实验中,竹干黄酮溶液的初始 pH 在 5.7 附近,因此可以直接将配制的黄酮溶液进行上样。

3.3.4 上样量的影响

从图 5 中可知,初始阶段流出液的黄酮浓度较

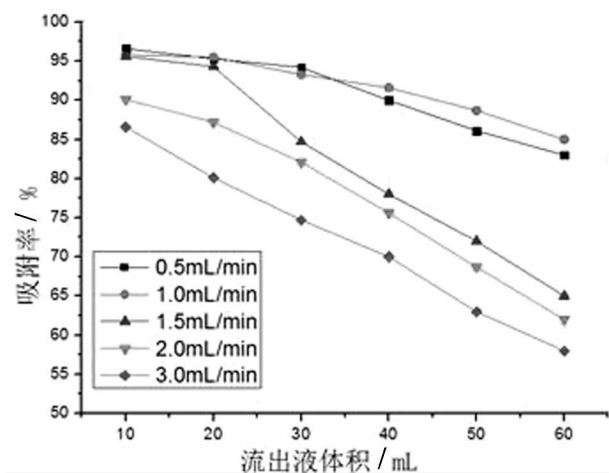


图3 上样速度对吸附率的影响

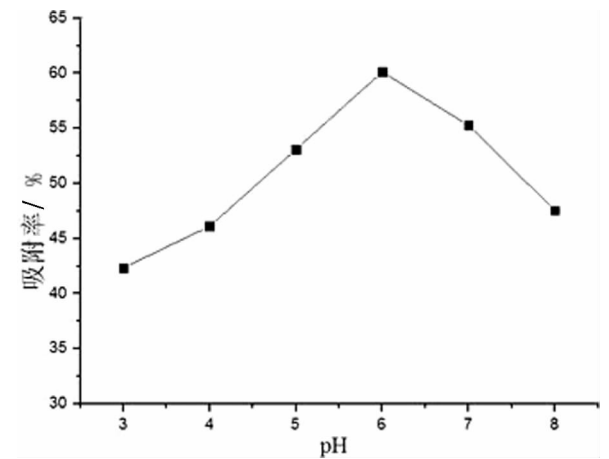


图4 上样溶液 pH 对吸附率的影响

低,流出液体积在 170 mL 时,黄酮浓度突然增大,说明此时总黄酮开始泄漏。因此可知泄漏点为 170 mL,即为最大上样量。

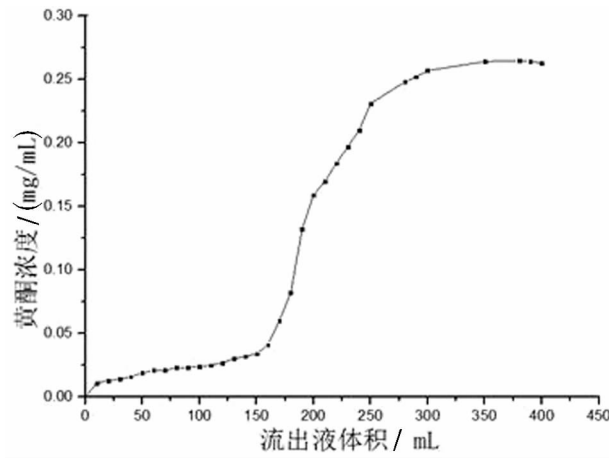


图5 AB-8 树脂动态吸附曲线

3.3.5 洗脱剂浓度的影响

从图 6 中我们可以看出,乙醇的浓度对洗脱效

果有较大的影响,随着乙醇浓度的增大,解吸率也在增大,浓度为 20% 时,解吸率只有 19%,浓度上升到 60% 时,解吸率达到了 80%,但当乙醇浓度超过了 60% 后,解吸率不增反降。因此,选择 60% 的乙醇为宜。

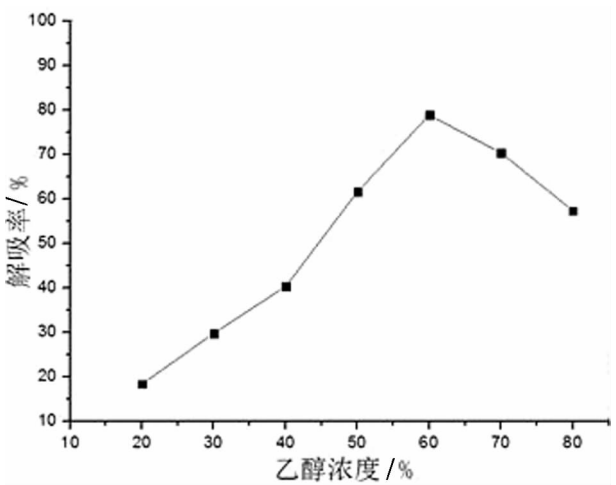


图6 洗脱剂浓度对解吸率的影响

3.3.6 洗脱速率的影响

洗脱速率对解吸率的影响如图 7 所示,在动态解吸的过程中,过高和过低的洗脱速率都使解吸率偏低,可能是在低流速下,冲洗的效果不好,不能完全洗脱黄酮;流速过快时,黄酮无法及时从树脂上被洗脱。因此,选择 1.5 mL/min 的洗脱速率最佳。

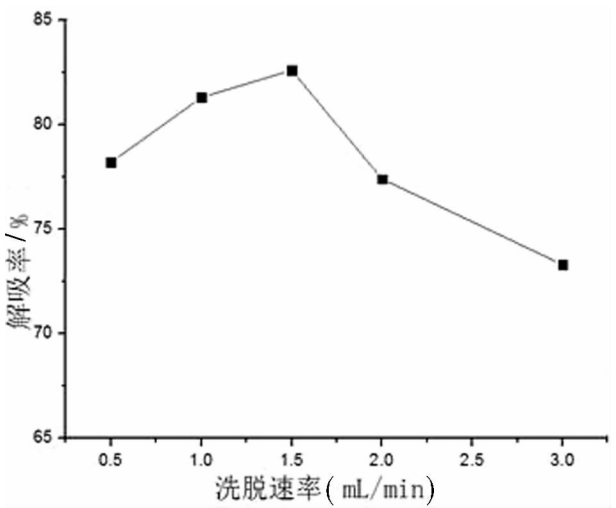


图7 洗脱速率对解吸率的影响

3.3.7 洗脱剂用量的影响

选择 60% 的乙醇对树脂中的黄酮进行洗脱,洗脱剂的用量分别为 60 mL、80 mL、100 mL、120 mL、140 mL、160 mL、180 mL,结果如图 8 所示。从图 8

中可看出,在其他条件都一定的情况下,洗脱剂用量越多,洗脱率越大,但是在120 mL以后,洗脱率不再增加,这是因为黄酮已经基本被洗脱完全,因此选择120 mL的洗脱剂即可。

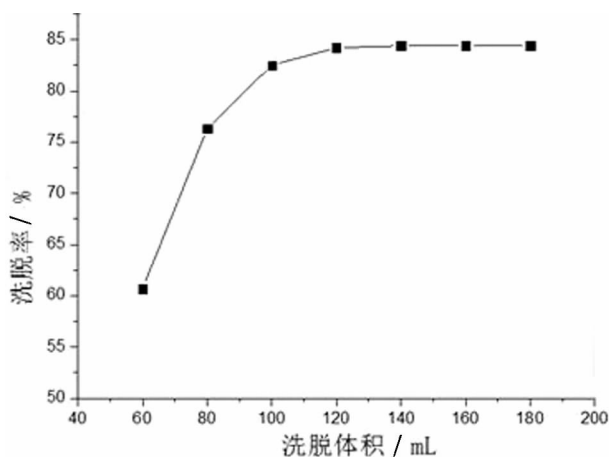


图8 洗脱剂用量对解吸率的影响

3.4 验证实验及其纯化效果

通过以上实验,确定了各个因素中的最佳条件,在最佳工艺条件下进行实验:

上样浓度为1.0 mg/mL,自然pH上样,上样速度为1.0 mL/min,湿法装柱,用120 mL浓度为60%的乙醇进行洗脱,洗脱速度为1.5 mL/min。纯化过程在室温下进行,计算总黄酮的纯度及精制倍数。

3.4.1 产品总黄酮纯度

解吸液中黄酮的质量: $0.853 \text{ mg/mL} \times 120 \text{ mL} = 102.36 \text{ mg}$ 。

解吸液干燥后总质量:201.3 mg。

产品总黄酮纯度: $102.36 \text{ mg} / 201.3 \text{ mg} \times 100\% = 50.85\%$ 。

3.4.2 样品总黄酮纯度

上柱前样液中黄酮质量: $1.0 \text{ mg/mL} \times 170 \text{ mL} = 170.0 \text{ mg}$ 。

上柱前固体物质的质量:798.1 mg。

样品总黄酮纯度: $170.0 \text{ mg} / 798.1 \text{ mg} \times 100\% = 21.3\%$ 。

3.4.3 产品精制倍数

产品精制倍数为: $50.85\% / 21.3\% = 2.4$ 。

4 结论

实验中通过对竹干黄酮的吸脱附实验,考察了7种大孔吸附树脂用于纯化竹干总黄酮的效果,确定AB-8型大孔树脂适合对竹干黄酮进行纯化分离,最佳条件为:1.0 mg/mL的黄酮水溶液,上样液

pH为6.0,上样的速度为1.0 mL/min,上样量不超过170 mL,采用60%的乙醇进行洗脱,其用量在120 mL时最佳,洗脱速度为1.5 mL/min。按照上述步骤经过分离纯化后,竹干提取物中黄酮类物质含量由21.3%上升到50.85%,样品的精制倍数为2.4,有较好的效果,在竹干黄酮纯化工艺中有一定的推广应用价值。

参考文献:

- [1] 李红,蒋孟良,金晓飞. 采用GC-MS法研究干馏时间对竹沥中化学成分的影响[J]. 中草药,2013,36(9):1408-1411.
- [2] 李红,蒋孟良,刘党生,等. 紫外法测定竹沥中总酚含量[J]. 中国现代中药,2008,10(8):16-17.
- [3] 金晓飞,李红,蒋孟良. 不同种竹沥的化学组分分析及其药效研究[J]. 中医药导报,2014,20(5):82-85.
- [4] Gao Yani, Tian Chengrui, Zhao Lili. Extraction, purification and antioxidant activity of polysaccharides from bamboo leaves[J]. Journal of Forestry Research, 2012, 23(1): 139-143.
- [5] Lv Zhaolin, Lin Xi, Miao Zhihui, et al. Antioxidant activity of bamboo-leaf extracts from the species Dendrocalamopsis oldhami[J]. Scientific Research and Essays, 2012, 7(44): 3789-3796.
- [6] 潘进权,张世英,何敏婷,等. 竹叶总黄酮提取工艺及抗氧化特性的研究[J]. 中国食品学报,2012,12(3):39-44.
- [7] 冯进,李敏,曾晓雄,等. 大孔树脂纯化蓝莓叶多酚及其组成分析[J]. 食品科学,2013,34(10):86-91.
- [8] 王国军,唐辉,张淑兰,等. 大孔树脂纯化核桃隔膜总黄酮的工艺研究[J]. 中草药,2013,44(19):2688-2692.
- [9] 胡志军,沈玲玲,王南溪,等. 大孔吸附树脂分离纯化金银花中黄酮类物质的研究[J]. 离子交换与吸附,2011,27(3):229-237.
- [10] 易海燕,何桂霞,欧阳文,等. 大孔吸附树脂分离纯化藤茶总黄酮的研究[J]. 中草药,2011,42(1):74-77.