

AB-8 大孔树脂对中华补血草根多酚的吸附洗脱特性*

李均, 陈炳华, 王晶晶, 周冰洁

(福建师范大学生命科学学院, 福建 福州, 350108)

摘 要 从 S-8、NKA-9、AB-8、NKA 和 D4020 大孔树脂中筛选出 AB-8 树脂, 研究了 AB-8 树脂对中华补血草根多酚的吸附洗脱特性。结果表明: AB-8 树脂对中华补血草根多酚的饱和吸附时间为 5 h, 吸附等温线符合 Langmuir 模型, 饱和吸附量为 55.30 mg/g, 提取液 pH 值对吸附过程影响不显著; 以质量浓度 1.99 mg/mL 的提取液上柱, 流速为 1 mL/min 时, 吸附泄漏点为 10 BV (柱床体积, 1BV = 30 mL), 饱和点为 32 BV, 因此, 采用串柱法有利于 AB-8 树脂吸附能力的发挥; 用体积分数 70% 乙醇作为洗脱剂, 以流速 1 mL/min 洗脱, 获得的多酚纯度为 58.29%。

关键词 中华补血草, 多酚, 大孔树脂, 吸附, 解吸

中华补血草 (*Limonium sinense* (Girard) Kuntze) 属白花丹科补血草属多年生草本, 分布于我国东南沿海的福建、江苏、台湾等地, 尤其在福建惠安、诏安等沿海沙滩湿地有一定的蕴藏量^[1]。笔者研究显示, 中华补血草根中富含多酚类物质, 含量达 7.61%, 且具有很强的自由基清除能力、脂质体过氧化抑制作用^[2]; 台湾学者研究发现, 中华补血草有抑制 HSV-1 (herpes simplex virus type-1) 病毒的复制等作用^[3]。目前, 对多酚类物质的纯化方法有溶剂萃取法^[4]、大孔树脂吸附法^[5]及 HPLC^[6]等, 在这些分离方法中, 大孔树脂吸附法因具有选择性好、吸附容量大、再生处理方便、吸附迅速及解吸容易等优点^[5], 在天然产物工业化提取分离中得到广泛应用。本研究从 5 种国产大孔树脂中筛选出对中华补血草根多酚具有良好吸附和解吸性能的树脂 AB-8, 考察该树脂对根多酚的吸附洗脱特性, 以期建立中华补血草根多酚初步纯化的适宜条件。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Ultrasp2100 pro 紫外可见分光光度计 (美国 Amersham Biosciences 公司), VC750 超声波破碎仪 (美国 Sonics & Materials 公司), CR21G II 高速冷冻离心机 (日本 HITACHI 公司), ALPHA2-4 冷冻干燥机 (德国 Christ 公司), QYC-200 全温空气摇床 (上海福玛实验设备有限公司), BSZ-100 自动部分收集器

(上海沪西分析仪器有限公司), HD-21-88 紫外检测仪和 BT1-100 恒流泵 (上海淇特分析仪器有限公司)。

大孔吸附树脂 S-8、NKA-9、AB-8、NKA 和 D4020, 系天津市南开大学化工厂产品 (树脂使用前参照文献^[7]进行预处理), Folin-Ciocalteu 试剂、单宁酸、乙醇等均为国产分析纯。

1.2 中华补血草根多酚的提取

中华补血草植株, 采自福建惠安崇武沿海沙滩地, 取其根, 80℃ 烘干, 粉碎 (过 60 目筛), 备用。称取 10 g 粉末置于三角瓶中, 加入体积分数 70% 乙醇溶液 200 mL, 室温静置 12 h 后, 超声处理 35 min, 离心 (5 000 r/min) 得上清液, 重复 2 次, 合并上清液, 减压回收溶剂得浓缩液, 备用。

1.3 多酚含量的测定

采用 Folin-Ciocalteu 试剂比色法^[8], 略有改进。在 760 nm 测定吸光值, 以单宁酸 (40 ~ 200 μg/mL) 作标准曲线, 回归方程: $A = 3.9605C + 0.0056$, R^2 为 0.9991 (A 为吸光值, C 为多酚浓度, mg/mL)。根据回归方程计算样液中多酚含量。

1.4 大孔树脂的筛选

称取 2 g 预处理的型号树脂于 100 mL 三角瓶中, 加入 50 mL 质量浓度为 1.91 mg/mL 的根多酚提取液, 摇床振荡 (25℃, 110 r/min) 12 h, 测上清液中多酚质量浓度, 计算各树脂的吸附量 Q 及吸附率 E ; 滤去提取液后树脂用蒸馏水洗至流出液无混浊, 再加入 50 mL 体积分数 70% 的乙醇, 于相同条件下解吸, 测定解吸液中多酚质量浓度, 计算各树脂的解吸率 D , 从中筛选出性能最佳的树脂进行后续实

第一作者: 硕士研究生 (陈炳华副教授为通讯作者)。

* 福建省自然科学基金资助项目 (C0540001)。

收稿日期: 2009-01-04, 改回日期: 2009-03-09

验^[7]。

$$Q = (\rho_0 - \rho_e) \times V_i / m \tag{1}$$

$$E/\% = [(\rho_0 - \rho_e) / \rho_0] \times 100 \tag{2}$$

$$D/\% = [\rho_d V_d / (\rho_0 - \rho_e) V_i] \times 100 \tag{3}$$

式中:Q,吸附量(mg/g);ρ₀,提取液中多酚质量浓度(mg/mL);ρ_e,吸附平衡时上清液中多酚质量浓度(mg/mL);V_i,提取液的体积(mL);m,树脂湿质量(g);E,吸附率(%);D,解吸率(%);ρ_d,解吸液中多酚质量浓度(mg/mL);V_d,解吸液的体积(mL)。

1.5 AB-8 树脂静态吸附试验

称取 2 g 树脂于 100 mL 三角瓶中,准确加入 50 mL 一定质量浓度的根多酚提取液,摇床振荡(25℃, 110 r/min)12 h,测定平衡时上清液质量浓度,计算树脂的吸附量。

1.6 AB-8 树脂动态吸附及解吸试验

1.6.1 吸附

称取 15 g 预处理的树脂,装入 1.0 cm × 40 cm 层析柱中,蒸馏水平衡,以 1.0 mL/min 的流速连续通过多酚提取液(初始质量浓度 1.99 mg/mL),以 10 mL/管分部收集流出液,检测多酚含量,绘制动态吸附曲线。

1.6.2 解吸

称取已吸附好根多酚的树脂 15 g,装入(1.0 × 40) cm 层析柱中,柱床体积(BV)为 30 mL,先用蒸馏水洗,跟踪检测杂质除尽后,再用相应的洗脱剂以一定流速洗脱,以 5 mL/管分部收集洗脱液,检测多酚含量,绘制动态解吸曲线。洗脱液经旋转蒸发浓缩,冷冻干燥,按下式计算多酚纯度。

$$\text{纯度}/\% = (m_1 / m_2) \times 100$$

式中:m₁,冻干后粉末中多酚质量(g);m₂,冻干后粉末质量(g)。

2 结果与分析

2.1 大孔树脂的筛选

树脂在分离天然有效成分时的应用是利用其吸附的可逆性,生产上要求选用的树脂不仅吸附量大,而且解吸率高,以保证有效成分最大限度的回收^[9]。因此,吸附量与解吸率的指标是树脂筛选试验的重要环节。本研究所用树脂有极性、弱极性和非极性 3 类共 5 种树脂。5 种树脂的物理性质及其对中华补血草根多酚的静态吸附与解吸特性见表 1。

由表 1 可知,S-8 树脂对中华补血草根多酚的吸附量最大,达 46.54 mg/g,NKA-9 树脂最低,仅为

24.90 mg/g,树脂对根多酚吸附量从大到小依次为 S-8 > AB-8 > NKA > D4020 > NKA-9,不同树脂间吸附量差异显著(P < 0.05);从解吸率看,AB-8 树脂的解吸效果最好,解吸率达 86.07%,而 S-8 树脂最低,仅为 8.09%,解吸率从高到低依次为 AB-8 > D4020 > NKA > NKA-9 > S-8,不同树脂间解吸率差异显著(P < 0.05)。

表 1 5 种树脂的物理性质及其静态吸附与解吸特性

| 树脂型号 | 极性 | 比表面积 /m ² · g ⁻¹ | 吸附量 /mg · g ⁻¹ | 解吸率 /% |
|-------|-----|---|------------------------------|---------------|
| S-8 | 强极性 | 400 ~ 420 | 46.54 ± 0.99a | 8.09 ± 0.43e |
| NKA-9 | 极性 | 250 ~ 290 | 24.90 ± 0.32e | 69.63 ± 0.91d |
| AB-8 | 弱极性 | 480 ~ 520 | 39.16 ± 0.66b | 86.07 ± 0.73a |
| NKA | 非极性 | 570 ~ 590 | 37.33 ± 1.33c | 72.54 ± 0.82c |
| D4020 | 非极性 | 540 ~ 580 | 34.78 ± 0.72d | 80.01 ± 1.12b |

注:同列不同字母表示在 P = 0.05 水平上 Duncan 氏新复极差检验差异显著(n = 3)

树脂的极性和比表面积是影响吸附效果的重要因素,树脂的极性与被吸附分子的极性相同或相近时吸附效果最好^[9],中华补血草根多酚由于含有酚羟基使其具有一定的极性,但极性不强。S-8 树脂属强极性树脂,吸附作用力强,与多酚结合紧密而解吸难,因而不适宜用作此类成分的分离;NKA-9 树脂极性低于 S-8 树脂,解吸率高于 S-8 树脂,但由于比表面积小,与溶质分子接触面少,使得吸附量偏低;AB-8 属弱极性树脂,与多酚的极性最为相近,同时具有较大的比表面积,因而对根多酚有着较高的吸附量和解吸率;NKA 和 D4020 均为非极性树脂,对多酚的吸附能力低于 AB-8。综合考虑,选取 AB-8 树脂用于中华补血草根多酚的吸附和解吸性能研究。

2.2 AB-8 树脂静态吸附试验

2.2.1 吸附动力学曲线

将初始浓度为 0.75、1.49、1.70 mg/mL 的根多酚提取液分别置于摇床上振荡,定时取样,观察树脂吸附量随时间的动态变化,吸附动力学曲线见图 1。

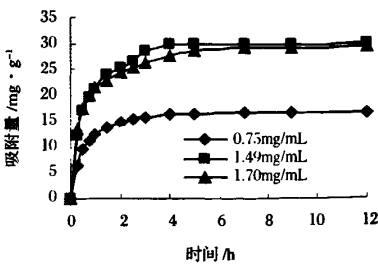


图 1 AB-8 树脂对中华补血草根多酚吸附动力学曲线

从图1可知,大约5 h时,在3种不同质量浓度下树脂对提取液中多酚的吸附均已达到吸附平衡,再延长吸附时间,吸附量变化不大,因此,选择5 h作为吸附时间。

2.2.2 吸附等温线

配制不同质量浓度 ρ_0 (0.76~5.39 mg/mL)的根多酚提取液,按1.4的方法吸附,计算吸附量 Q ,绘制25℃时的吸附等温线(见图2)。常见的吸附等温线模型有Langmuir和Freundlich,Langmuir等温方程假设发生在稀溶液当中的吸附过程为单分子层吸附, Freundlich等温方程所描述的是非理想吸附系统,主要适用于吸附剂表面不均一以及在吸附平衡时形成多分子层吸附的情况^[5]。利用origin 8.0 pro软件对图2的吸附等温线分别按Langmuir方程和Freundlich方程进行曲线拟合,结果见表2。

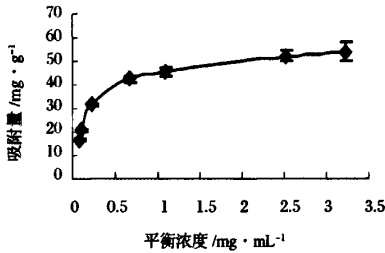


图2 AB-8树脂吸附中华补血草根多酚吸附等温线($n=3$)

表2 AB-8树脂吸附中华补血草根多酚的吸附等温线方程

| 吸附等温线模型 | 等温方程 | $Q_m/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ | R^2 |
|------------|--|-------------------------------------|---------|
| Langmuir | $Q = \frac{55.30 \times 5.29\rho_e}{1 + 5.29\rho_e}$ | 55.30 | 0.994 2 |
| Freundlich | $Q = 42.20 \times \rho_e^{0.31}$ | - | 0.925 7 |

由表2可知,通过比较2个方程的决定系数 R^2 ,采用Langmuir方程进行拟合的效果优于Freundlich方程,因此AB-8树脂对中华补血草根多酚的吸附属于单分子层吸附,饱和吸附量 Q_m 为55.30 mg/g(与实验测得的饱和吸附量53.84 mg/g接近,见图2)。同时,从图2还可看出,在较高浓度时,吸附量仍保持一定的增长,说明树脂在高浓度时的吸附并非理想的单分子层吸附,原因可能是根多酚中含有大量的酚羟基及苯环结构使其能够以氢键及疏水键发生分子缔合,导致树脂对其吸附量的增加^[10]。

2.2.3 提取液pH值对AB-8树脂吸附中华补血草根多酚的影响

中华补血草根多酚具有酚羟基结构,因而提取液

呈弱酸性。以初始浓度1.48 mg/mL的提取液(pH值为4.21)为对照,用0.1 mol/L HCl和NaOH调节提取液pH值,实验中考察了4种不同pH值(2.04、3.01、3.64和5.04)条件下树脂的吸附效果,其吸附量及吸附率见表3。

表3 中华补血草根多酚提取液pH值对AB-8树脂吸附能力的影响

| pH值 | 吸附量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ | 吸附率/% |
|----------|--------------------------------------|---------------------------|
| 4.21(CK) | $30.49 \pm 0.03\text{ab}$ | $82.26 \pm 0.08\text{ab}$ |
| 2.04 | $30.55 \pm 0.13\text{a}$ | $82.42 \pm 0.36\text{a}$ |
| 3.01 | $30.58 \pm 0.03\text{a}$ | $82.51 \pm 0.08\text{a}$ |
| 3.64 | $30.44 \pm 0.05\text{ab}$ | $82.14 \pm 0.12\text{ab}$ |
| 5.04 | $30.39 \pm 0.10\text{b}$ | $82.00 \pm 0.26\text{b}$ |

注:同列不同字母表示在 $P=0.05$ 水平上Duncan氏新复极差检验差异显著($n=3$)。

由表3可知,提取液的pH值调节后,与对照相比树脂吸附量及吸附率差异均不显著($P>0.05$)。可见,调节提取液的pH值对吸附过程影响不显著,此结果与Silva^[5]利用大孔树脂吸附印加豆(Inga edulis)叶多酚的研究一致。然而,亦有不少研究发现pH值对大孔树脂吸附多酚影响显著^[11],这可能是由于不同植物所含有的酚类成分差异所致。因此,在实际操作过程中,可不对提取液pH值进行调节。

2.3 AB-8树脂动态吸附及解吸试验

2.3.1 泄漏点和饱和点

图3为AB-8树脂吸附中华补血草根多酚动态吸附曲线图。图3表明,从第30管收集液(300 mL, 10 BV)开始检出多酚,说明多酚开始泄漏,泄漏点为10 BV;从第96管(960 mL, 32 BV)到第120管(1 200 mL, 40 BV),收集液的多酚含量基本不发生变化,说明饱和点为32 BV,泄漏点与饱和点有较大差距,要达到饱和,需要连续上样近32个柱床体积,而树脂只有达到完全饱和才能充分发挥其吸附性能,因此,生产上可考虑采用串柱法。

2.3.2 洗脱剂种类对动态解吸的影响

分别用体积分数70%乙醇、70%甲醇、酸化70%乙醇(含0.1% 0.1 mol/L HCl)作为洗脱剂,考察洗脱剂对根多酚动态洗脱的影响,结果见表4。

表4 不同洗脱剂对中华补血草根多酚动态洗脱的影响

| 洗脱剂 | 冻干后粉末质量/g | 多酚纯度/% |
|---------|---------------------------|--------------------------|
| 70%乙醇 | $0.698 \pm 0.011\text{a}$ | $58.29 \pm 0.87\text{a}$ |
| 70%甲醇 | $0.701 \pm 0.016\text{a}$ | $58.19 \pm 1.05\text{a}$ |
| 酸化70%乙醇 | $0.668 \pm 0.010\text{b}$ | $55.29 \pm 0.98\text{b}$ |

注:同列不同字母表示在 $P=0.05$ 水平上Duncan氏新复极差检验差异显著($n=3$)。

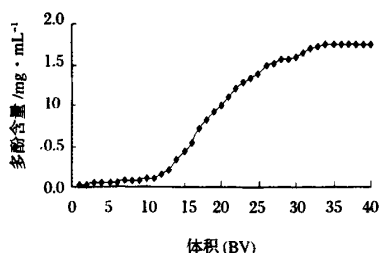


图3 AB-8树脂对中华补血草根多酚的动态吸附曲线

从表4可以看出,70%乙醇与70%甲醇洗脱获得的冻干粉末质量较大,且具有较高的纯度,约为60%,两者差异不显著($P > 0.05$),酸化乙醇所获得的冻干粉末质量和纯度都低于前两者,差异显著($P < 0.05$)。但考虑到甲醇的毒性较大(若回收不完全将会对人体造成较大的伤害),以及实际生产过程中的安全和成本问题。因此,本研究采用70%乙醇溶液作为洗脱剂。

2.3.3 乙醇体积分数对动态解吸的影响

分别用体积分数为50%、70%、90%乙醇溶液作为洗脱剂进行洗脱,洗脱曲线见图4。

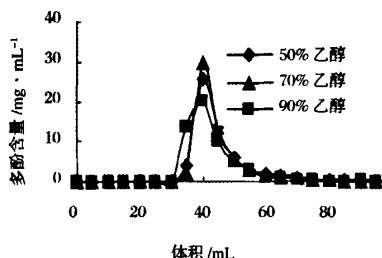


图4 乙醇体积分数对中华补血草根多酚洗脱曲线的影响

由图4可知,乙醇体积分数对洗脱曲线有较大影响,其中以70%乙醇洗脱峰最高,且峰形对称、集中(30~60 mL出峰),50%乙醇洗脱曲线虽然峰形对称,但洗脱峰低于70%乙醇。而90%乙醇洗脱峰明显低于前两者,且峰形不对称,有拖尾现象。此外,在试验过程中发现体积分数高乙醇(90%以上)洗脱物醇溶性杂质较多,多酚纯度低于体积分数低乙醇洗脱物。综合考虑,本研究采用70%乙醇溶液作为洗脱剂。

2.3.4 乙醇洗脱速率对动态解吸的影响

用体积分数70%乙醇分别以0.5、1.0、2.5 mL/min的流速洗脱,绘制洗脱曲线(图5)。选择合适的流速对于有效的将多酚从树脂上洗脱下来非常重要。从图5可以看出,低流速洗脱效果明显优于高流速,

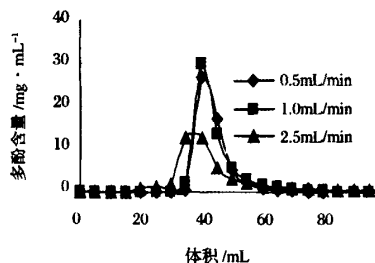


图5 流速对中华补血草根多酚洗脱曲线的影响

当以2.5 mL/min的流速洗脱时,洗脱峰宽,洗脱物纯度低(50.34%);而以较低流速(0.5、1.0 mL/min)洗脱时,多酚类物质相对集中出峰,洗脱物纯度高,分别为58.10%、58.29%。考虑到以0.5 mL/min流速洗脱时洗脱时间太长,而洗脱效果与流速1.0 mL/min相近,因此,实际操作中选择1.0 mL/min为洗脱流速。

3 结论与讨论

(1)通过对5种大孔树脂的静态吸附研究发现,AB-8树脂的吸附效果较好,吸附量大,解吸率高,适合于中华补血草根多酚的纯化。

(2)AB-8树脂对根多酚提取液的静态吸附饱和时间为5 h,吸附等温线符合Langmuir方程,饱和吸附量为55.30 mg/g,调节提取液的pH值对吸附过程影响不显著;动态吸附泄漏点为10 BV,饱和点为32 BV,采用串柱法有利于充分发挥树脂性能;动态洗脱用体积分数70%乙醇作为洗脱剂以流速1.0 mL/min洗脱时,洗脱物纯度达58.29%。

参考文献

- 福建省科学技术委员会《福建植物志》编写组. 福建植物志(第四卷)[M]. 福州:福建省科学技术出版社, 1990. 305~306
- 李均,陈炳华,苏安玲. 中华补血草根提取物抗氧化活性的初步研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2008, 24(3):72~78
- Lin LC, Kuo YC, Chou CJ. Anti-herpes simplex virus type-1 flavonoids and a new flavanone from the root of *Limonium sinense* [J]. *Planta Med*, 2000, 66:333~336
- Jia ZB, Tao F, Guo L, et al. Antioxidant properties of extracts from juemingzi (*Cassia tora* L.) evaluated *in vitro* [J]. *Lebensm Wiss Technol*, 2007, 40(6):1 072~1 077
- Silva EM, Pompeu DR, Larondelle Y, et al. Optimisation of the adsorption of polyphenols from *Inga edulis* leaves on macroporous resins using an experimental design methodology

- [J]. Separation Purification Technology, 2007, 53(3): 273 ~ 280
- 6 Amarowicz R, Naczek M, Shahidi F. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of Canola Hulls[J]. J Agri Food Chem 2000, 48(7): 2755 ~ 2759
 - 7 陈炳华, 李婷, 陈婧宇, 等. 大孔吸附树脂对海边月见草总黄酮的吸附及解吸特性[J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(2): 11 ~ 15
 - 8 Dewanto V, Wu X, Adom KK, et al. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity[J]. J Agri Food Chem, 2002, 50(10): 3010 ~ 3014
 - 9 李仁菊. 广西金花茶中多酚的提取和抗氧化性能研究[D]. 广西: 广西大学, 2007. 29 ~ 30
 - 10 石碧, 狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 138 ~ 139
 - 11 陈贤春, 吴清, 李冀湘. 大孔吸附树脂富集丹参总酚酸的工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(12): 115 ~ 116

Study on Adsorption and Desorption Properties of AB-8 Macroporous Resins for Polyphenols from *Limonium sinense* (Girard) Kuntze Root

Li Jun, Chen Binghua, Wang Jingjing, Zhou Bingjie

(College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China)

ABSTRACT Five kinds of macroporous resins including S-8, NKA-9, AB-8, NKA and D4020, AB-8 resin were selected as a suitable material to purify the polyphenols from the *Limonium sinense* (Girard) Kuntze root and the property of adsorption and desorption were researched. The static saturated adsorption capacity of AB-8 resin was 55.30 mg/g while the time for it to achieve saturation adsorption was 5 h. Besides, the adsorption isotherm data of AB-8 resin could better fit the Langmuir adsorption model. The pH value of the extract solution had no influence on the efficiency of adsorption. In the dynamic adsorption procedure, the feeding concentration was 1.99 mg/mL, appeared leaking and saturating point were 10 BV, 32 BV (Bed Volume, 1 BV = 30 mL), respectively. Therefore, the adsorbing capacities of resin could be fully utilized by arranging column in series. When the eluant was 70% (volume fraction) ethanol at flow velocity 1 mL/min, the purity of polyphenols obtained was 58.29%.

Key words *Limonium sinense* (Girard) Kuntze, polyphenols, macroporous resins, adsorption, desorption

(上接第 64 页)

Studies on the Isolation and Identification of Whole Peptidoglycan from *Bifidobacterium longum*

Ding Xishun^{1,2}, Deng Chengyuan², Feng Qian², Liu Yanmin², Jin Hai³

1 (College of Animal Science and Veterinary medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

2 (Inner Mongolia ShuangQi Pharmaceutical Co. Ltd, Hohhot 010010, China)

3 (Inner Mongolia Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Hohhot 010030, China)

ABSTRACT The cell wall WPG of *Bifidobacterium longum* NQ-1501 was extracted and purified as follows: (1) collecting bacteria by Centrifuge After three-level culture expansion. (2) Treating the bacteria cells with trichloroacetic acid in order to remove the wall teichoic acids as well as nucleic acid. (3) Delipoiding the residue with methanol and acetone. (4) Digesting the defatted residue with trypsin and neutral protease. (5) Cleaned by centrifugation and lyophilized. It has been proved by lysozyme and UV-visible absorption spectra that the extracts were peptidoglycan. The results of chemical analysis indicated that WPG was mainly composed of polypeptides and amino hexose. The transmission electronmicroscopic observation of WPG showed that WPG held the physically intact cell wall structure of the whole cells. In conclusion the peptidoglycan we obtained was whole peptidoglycan.

Key words *Bifidobacterium longum*, whole peptidoglycan, isolation, identification