

大孔树脂纯化蓝莓叶总黄酮的工艺研究

李颖畅^{1,2}, 孟宪军², 李小红²

1(渤海大学化学与化工学院, 辽宁锦州, 121000) 2(沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳, 110161)

摘要 比较了9种大孔树脂对蓝莓叶黄酮的吸附和解吸效果, 从中筛选出适合蓝莓叶黄酮分离纯化的树脂, 并对其吸附和解吸条件进行了探讨。结果表明: HPD-600大孔树脂是纯化蓝莓叶黄酮比较好的树脂, 蓝莓叶黄酮在HPD-600型树脂上的吸附平衡时间为4h, 解吸平衡时间为1.5h, 吸附的最适质量浓度为4.09 mg/mL, pH 5.0时吸附能力比较强, 解吸时宜选用体积分数60%乙醇溶液, 吸附温度为30℃, 解吸温度为60℃。该工艺生产的黄酮产品为黄色粉末, 回收率为81.90%, 纯度为78.04%。

关键词 蓝莓叶, 黄酮, 大孔树脂, 纯化

蓝莓(blueberry), 又称越橘、属杜鹃花科(*Ericaceae*) 越橘属(*Vaccinium. spp*)多年生落叶或常绿灌木。蓝莓作为一种药用植物, 以叶入药, 性温、味苦, 有利尿、消炎、解毒之功效, 并可用于风湿、痛风^[1]。蓝莓叶中含有丰富的黄酮类化合物, 研究表明黄酮类化合物是一类具有广泛生物活性的物质, 具有抗氧化、抗肿瘤、抗病毒, 防治心血管疾病及增强人体免疫能力等多种生物活性^[2,3]。国内外的研究主要集中在蓝莓叶中活性物质的提取、黑色素的稳定性及其生理功能^[4~7], 但对大孔树脂纯化蓝莓叶黄酮的研究未见报道。大孔吸附树脂是近10年来发展起来的一类有机高分子聚合物吸附剂, 具有吸附容量大、吸附速度快、选择性好、再生简便等优点, 因而被广泛用于天然产物的分离纯化^[8]。本文选用9种不同类型吸附树脂对蓝莓叶中黄酮粗提物进行吸附解吸, 从中筛选出较为适合蓝莓叶黄酮分离纯化的树脂, 并对其吸附和解吸性能进行研究, 优化大孔树脂分离纯化蓝莓叶黄酮的工艺, 为蓝莓叶黄酮的大规模生产及蓝莓叶的综合利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

蓝莓叶: 沈阳农业科技开发院蓝莓种植基地, 10月中旬采收。

1.1.2 试剂

芦丁[生化试剂(BR), 中国药品生物制品检定所], 乙醇、HCl、NaOH、柠檬酸、柠檬酸钠、石油醚、

NaNO₂、Al(NO₃)₃ (均为分析纯试剂), 树脂 X-5、S-8(天津南开大学化工厂), HPD-100、HPD-450、HPD-600、HPD-700(河北沧州宝恩化工有限公司), 树脂 AB-8、DA-201、DM-301(天津海光有限公司)。

1.1.3 仪器

7200型可见分光光度计(上海尤尼柯有限公司), UV-1600型紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司), 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), pH-25型酸度计(上海理达仪器厂), 电热恒温水浴锅(常州国华电器有限公司), RE-52型旋转蒸发器(上海博通经贸有限公司), SHZ-III B型循环水真空泵(上海华琦科学仪器有限公司), HZQ-F全温振荡培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司), DZF-6050型真空干燥箱(上海精宏仪器设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 蓝莓叶黄酮粗提物的制备

取一定量蓝莓叶50℃烘干, 粉碎后用体积分数80%乙醇溶液按1g:20mL的比例混合均匀, 于50℃下浸提2h后抽滤, 收集滤液, 50℃减压浓缩, 经石油醚脱脂, 并除去部分色素。

1.2.2 工作曲线回归方程的建立

精确称取芦丁对照品200mg, 用体积分数70%乙醇溶解, 定容至100mL容量瓶中。精确移取12.5mL芦丁液于50mL容量瓶中, 用去离子水定容, 得到0.5mg/mL标准溶液。精密吸取标准溶液0.0、0.8、1.6、2.4、3.2、4.0mL, 分别置于25mL容量瓶中, 加质量分数5%NaNO₂1mL, 放置6min后, 加质量分数10%Al(NO₃)₃1mL, 放置6min, 再加质量分数4%NaOH10mL, 加去离子水至刻度, 摇匀, 放

第一作者: 博士, 讲师(孟宪军为通讯作者)。

收稿日期: 2007-09-13, 改回日期: 2007-12-19

置 15 min, 进行全波长扫描, 在 500 nm 处有最大吸收。以测定结果得芦丁浓度与吸光度的标准曲线: $Y = 10.95X - 0.004$ (X : 浓度, mg/mL; Y : 吸光值), $R = 0.9993$ 。

1.2.3 最佳树脂类型的筛选

(1) 树脂预处理: 9 种大孔树脂分别用无水乙醇浸泡 24 h, 充分溶胀, 用无水乙醇淋洗直至洗出液加适量水无白色浑浊现象为止, 再用去离子水洗至无醇, 吸干树脂中水分。

(2) 树脂吸附率和解吸率的测定: 准确称取预处理大孔树脂 2 g, 置于 100 mL 三角瓶中, 加入 50 mL 一定浓度黄酮溶液, 置振荡器上 30℃、110 r/min 振荡吸附 24 h 后, 测定黄酮溶液的浓度。用去离子水洗去残余黄酮后吸干水分, 然后加入体积分数 60% 乙醇 25 mL, 置振荡器上 30℃、110 r/min 振荡 24 h, 充分解吸后过滤, 测定滤液黄酮浓度。

$$\alpha/\% = [(C_0 - C_1)/C_0] \times 100$$

$$Q_a = (C_0 - C_1)V_a/W \quad Q_d = C_d \times V_d/W$$

$$\beta/\% = [(C_d \times V_d)/(C_0 - C_1)V_a] \times 100$$

式中: α , 吸附率(%); C_0 , 黄酮溶液初始浓度(mg/mL); C_1 , 吸附平衡后黄酮溶液浓度(mg/mL); Q_a , 吸附量(mg/g); V_a , 黄酮溶液体积(mL); W , 树脂质量(g); Q_d , 解吸量(mg/g); C_d , 解吸液浓度(mg/mL); V_d , 解吸液体积(mL); β , 解吸率(%)。

1.2.4 蓝莓叶黄酮在 HPD-600 树脂上吸附平衡时间的测定

准确称取预处理的大孔树脂 2.00 g, 置于 100 mL 三角瓶中, 加入 50 mL 黄酮溶液, 置振荡器上以 30℃、110 r/min 振荡, 每隔 30 min 测定 1 次吸附量, 绘制树脂对蓝莓叶黄酮吸附量与时间关系曲线。

1.2.5 蓝莓叶黄酮在 HPD-600 树脂上解吸平衡时间的测定

称取吸附蓝莓叶黄酮饱和树脂 2g, 加入体积分数 60% 乙醇溶液 25 mL, 置振荡器上以 30℃、110 r/min 振荡, 每 30 min 测定一次解吸量, 绘制树脂对蓝莓叶黄酮解吸量与时间关系曲线。

1.2.6 蓝莓叶黄酮浓度对 HPD-600 树脂吸附的影响

准确称取预处理的大孔树脂若干份, 每份 2 g, 置于 100 mL 三角瓶中, 加入不同质量浓度的黄酮溶液各 50 mL, 置振荡器上 30℃、110 r/min 振荡 4 h, 待吸附平衡后测定溶液的平衡质量浓度, 计算吸附率, 吸附量。

1.2.7 蓝莓叶黄酮溶液 pH 值对 HPD-600 树脂吸附的影响

将一定量的黄酮粗提物用缓冲溶液配制成一定浓度不同 pH 值的黄酮溶液, 测定浓度 C_0 , 取 50 mL 配制后的黄酮溶液放入盛有 2 g 树脂 100 mL 三角瓶中, 置振荡器上 30℃、110 r/min 振荡 4h, 然后测定上清液的浓度 C_1 , 计算吸附量。

1.2.8 乙醇浓度对 HPD-600 树脂解吸的影响

取吸附蓝莓叶黄酮饱和树脂 2 g 若干份, 分别加入体积分数 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇溶液 25 mL, 30℃、110 r/min 振荡 1.5 h, 测定洗脱液中黄酮溶液浓度, 计算解吸量。

1.2.9 温度对 HPD-600 树脂吸附和解吸的影响

将一定量的黄酮粗提物用去离子水稀释, 测定溶液的浓度 C_0 , 取 50 mL 稀释后的黄酮液放入 100 mL 三角瓶中, 加入预处理的树脂 2 g, 不同温度下以 110 r/min 振荡 4h, 然后测定上清液的浓度 C_1 , 计算吸附量。分别称取吸附黄酮饱和的树脂 2 g, 加入体积分数 60% 乙醇 25 mL, 在不同温度下以 110 r/min 振荡 1.5 h, 计算解吸量。

1.2.10 蓝莓叶黄酮回收率和纯度测定

将一定浓度的 50 mL 粗提液注入盛有 2 g 树脂的三角瓶中, 置振荡器 110 r/min 下振荡 4 h, 滤去上清液, 用去离子水洗树脂至流出液基本无色, 吸干水分, 然后加入 25 mL 的洗脱剂, 收集洗脱液, 检测其浓度, 然后将洗脱液经旋转蒸发浓缩, 真空干燥, 称量质量, 计算后可得黄酮纯度与回收率。

$$\text{纯度}/\% = [(X \times V/G)] \times 100$$

$$\text{回收率}/\% = (X \times V)/(X_0 \times V_0) \times 100$$

式中: X 为洗脱液中黄酮浓度(mg/mL); V 为洗脱液体积(mL); X_0 为黄酮液初始浓度(mg/mL); V_0 为加入的黄酮液体积(mL); G 为洗脱液浓缩烘干后的固形物重量(mg)^[10]。

试验均重复 3 次, 取平均值, 采用 DPS 统计软件进行数据分析。

2 结果分析

2.1 大孔树脂对蓝莓液黄酮吸附和解吸特性比较

从表 1 可以看出, 不同类型树脂对黄酮的吸附程度不同, 吸附率比较高的是极性 S-8、HPD-600、非极性 HPD-100、HPD-700 和弱极性的 AB-8, 而解吸率比较好的 HPD-450、HPD-600、DA-201, 综合吸附率和解吸率 2 个参数, 认为 HPD-600 类

型树脂是比较好的吸附树脂,故以下试验重点考察 吸效果。

HPD-600 类型大孔树脂对蓝莓叶黄酮的吸附与解

表 1 不同大孔树脂对蓝莓叶黄酮静态吸附和解吸性能

树脂类型	吸附率/%	吸附量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	解吸率/%	解吸量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
HPD-100	$68.56 \pm 0.63 \text{ b}$	$65.91 \pm 0.60 \text{ b}$	$72.49 \pm 1.58 \text{ d}$	$47.78 \pm 1.18 \text{ b}$
HPD-450	$58.57 \pm 0.64 \text{ f}$	$56.49 \pm 0.61 \text{ e}$	$80.15 \pm 1.25 \text{ a}$	$45.28 \pm 1.07 \text{ cd}$
HPD-600	$66.96 \pm 0.88 \text{ bc}$	$64.58 \pm 0.85 \text{ b}$	$79.44 \pm 0.66 \text{ a}$	$51.31 \pm 0.58 \text{ a}$
HPD-700	$65.06 \pm 0.82 \text{ cd}$	$62.54 \pm 0.78 \text{ c}$	$74.96 \pm 1.58 \text{ bcd}$	$46.87 \pm 0.77 \text{ bc}$
AB-8	$63.34 \pm 1.56 \text{ de}$	$60.88 \pm 1.50 \text{ cd}$	$75.82 \pm 3.27 \text{ bc}$	$46.13 \pm 1.11 \text{ bc}$
S-8	$91.58 \pm 1.26 \text{ a}$	$88.04 \pm 1.22 \text{ a}$	$17.87 \pm 0.95 \text{ e}$	$15.73 \pm 0.82 \text{ e}$
X-5	$59.00 \pm 1.19 \text{ f}$	$56.89 \pm 0.91 \text{ e}$	$75.85 \pm 1.26 \text{ bc}$	$43.66 \pm 1.68 \text{ d}$
DA-201	$58.52 \pm 1.08 \text{ f}$	$56.25 \pm 1.04 \text{ e}$	$77.49 \pm 1.07 \text{ ab}$	$43.59 \pm 1.04 \text{ d}$
DM-301	$62.96 \pm 1.68 \text{ e}$	$60.52 \pm 1.62 \text{ d}$	$74.14 \pm 2.01 \text{ cd}$	$44.87 \pm 1.73 \text{ cd}$

注:新复极差法的多重比较,不同小写字母表示 0.05 水平的差异显著,相同字母差异不显著, $n=3$ 。

2.2 蓝莓叶黄酮在 HPD-600 大孔树脂上的吸附动力学曲线

从图 1 可以看出,在开始的一段时间内,HPD-600 树脂的吸附率在逐渐增加,随着时间的延长,吸附量逐渐达到饱和。当吸附时间达到 4h 以后,HPD-600 树脂对黄酮的吸附量与 4h 时的吸附量差异不显著,黄酮吸附量增加很少,吸附基本达到平衡,因此 HPD-600 大孔树脂对蓝莓叶黄酮的吸附时间为 4 h。

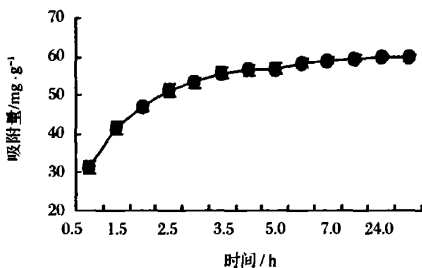


图 1 HPD-600 大孔树脂对黄酮静态吸附动力学曲线

2.3 蓝莓叶黄酮在 HPD-600 大孔树脂上的解吸动力学曲线

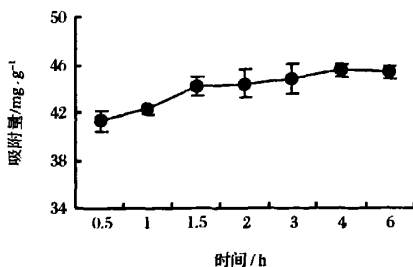


图 2 HPD-600 大孔树脂对黄酮静态解吸动力学曲线

从图 2 可以看出,在开始的一段时间内,蓝莓叶黄酮的解吸量在逐渐增加;当解吸时间达到 1.5 h 时,解吸基本达到平衡,1.5 h 以后 HPD-600 树脂

对黄酮的解吸量与 1.5 h 时的解吸量无显著差异,因此 HPD-600 大孔树脂对蓝莓叶黄酮的解吸时间为 1.5 h。

2.4 蓝莓叶黄酮浓度对 HPD-600 大孔树脂吸附的影响

从图 3 可以得知,随着溶液质量浓度的增加,大孔吸附树脂对黄酮的吸附率降低,吸附量逐渐增加。不同浓度的黄酮吸附率差异显著。浓度为 8.43 mg/mL 和 10.41 mg/mL 黄酮的吸附量差异不显著,说明黄酮溶液浓度为 8.43 mg/mL 时,黄酮吸附量已接近饱和。浓度为 4.09 mg/mL 的黄酮溶液,黄酮吸附量的增加率最大,从节约树脂和黄酮溶液二者考虑,最适的质量浓度为 4.09 mg/mL。

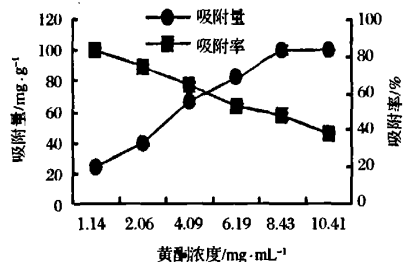


图 3 蓝莓叶黄酮浓度对树脂吸附的影响

2.5 蓝莓叶黄酮溶液的 pH 值对 HPD-600 大孔树脂吸附的影响

从图 4 可以看出,在 pH 值较小的情况下,大孔树脂对黄酮的吸附量较低,随着 pH 的升高,树脂的吸附量逐渐增加,当 pH 为 5.0 时,树脂的吸附量达到最大值,而随着 pH 的进一步增大,树脂的吸附量反而呈现下降的趋势。造成这种情况的原因是黄酮类物质为多羟基化合物,呈现一定的酸性,所以在微酸性条件下容易被树脂吸附,而在碱性条件下的吸附

量则降低。通过测定原液的 pH 值为 4.96, 与最适 pH 5.0 很接近, 因此蓝莓叶黄酮在用树脂吸附前 pH 值不需再调整。

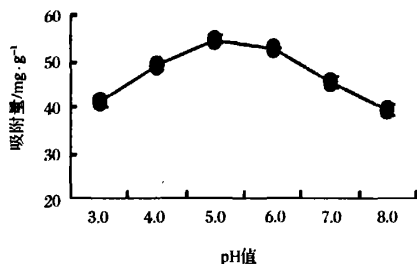


图4 黄酮溶液 pH 值对树脂吸附的影响

2.6 乙醇体积分数对 HPD-600 大孔树脂解吸的影响

洗脱剂具有使大孔树脂溶胀, 减弱被吸附物质与树脂之间吸附力的作用, 并可溶解被吸附物质。常用的洗脱剂是甲醇、乙醇、丙酮等, 考虑食品生产安全性等方面的要求, 本试验使用乙醇作为洗脱剂。由图 5 可知, 随着乙醇浓度的增加, 蓝莓叶黄酮解吸量增加。乙醇体积分数为 10%、30%、50% 解吸量相对较低, 不能将吸附的黄酮完全解吸。乙醇体积分数为 60%、70%、80% 时黄酮解吸量比较高, 三者之间无显著差异, 乙醇体积分数为 90% 时黄酮解吸量略有降低。从黄酮的解吸量和节约试剂用量考虑, 选用体积分数 60% 乙醇溶液作为解吸液。

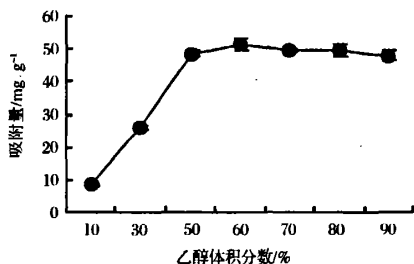


图5 乙醇浓度对树脂解吸的影响

2.7 温度对 HPD-600 大孔树脂吸附和解吸的影响

从图 6 可以看出, 在 30~50℃ 黄酮吸附量差异不显著, 50℃ 以上随温度升高, 黄酮吸附量下降。随温度的升高黄酮解吸量增加, 但 70℃ 略有降低, 可能在 70℃ 时黄酮有少量分解。说明温度低有利于黄酮的吸附, 温度高有利于黄酮的解吸, 因此吸附温度选择 30℃, 解吸温度 60℃。

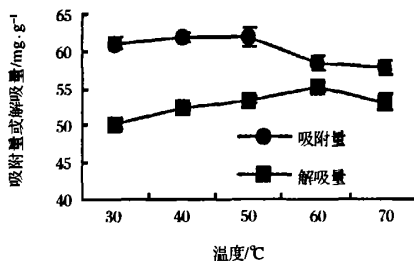


图6 温度对树脂吸附和解吸的影响

2.8 蓝莓叶黄酮回收率和纯度的测定

纯化后的蓝莓黄酮为黄色粉末, 由表 2 可知, 其回收率为 81.90%, 纯度为 78.04%。

表2 蓝莓叶黄酮回收率和纯度

回收率 / %	纯度 / %
81.90 ± 1.85	78.04 ± 1.41

3 结 论

(1) 通过对 9 种大孔树脂的静态吸附研究, 发现 HPD-600 型大孔树脂是一种比较理想的树脂, 吸附率大, 解吸率高, 较适合蓝莓叶中黄酮类成分的纯化。

(2) HPD-600 大孔树脂对蓝莓叶黄酮的吸附平衡时间为 4h, 解吸平衡时间为 1.5 h, 吸附最适质量浓度为 4.09 mg/mL, pH 5.0 时吸附能力比较强, 用体积分数 60% 乙醇溶液作为解吸液, 吸附温度为 30℃, 解吸温度为 60℃。

(3) 经纯化后的蓝莓叶黄酮为黄色粉末, 回收率为 81.90%, 纯度为 78.04%。

参 考 文 献

- 马田田. 笃斯越桔叶营养成分分析[J]. 特产研究, 2001, (1), 19~21
- 曹伟国, 刘志勤, 邵云, 等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 西北植物学报, 2003, 23(12): 2 241~2 247
- Chung H S, Chang L C, Lee S K, et al. Flavonoid constituents of chorizanthe diffusa with potential cancer chemopreventive activity[J]. Agric Food Chem, 1999, 47(1): 36~41
- Nacz S, Grant R, Barre E. Protein precipitating capacity of phenolics of wild blueberry leaves and fruits[J]. Food Chemistry, 2006, 96(4): 640~647
- Katarzyna Skupien, Jan Oszmianski, Dorota Kostrzewa-Nowak, et al. Invitro antileukaemic activity of extracts from berry leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells[J]. Cancer Letters, 2006, 236(2): 281~291
- 魏国华, 刘钟栋, 许新德, 等. 乌饭树叶提取物的抗氧化能力探讨[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(12): 57~59
- 王作昭, 刘静波, 林松毅, 等. 笃斯越桔黄酮类化合物提取技术的试验研究[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 391~394
- 李剑君, 李稳宏. 葛根总黄酮中葛根素的分离研究[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2001, 34(4): 311~314
- 刘斌, 石任兵. 应用大孔树脂吸附分离技术制备蒲黄总

Purification Process of Total Flavonoids from Blueberry Leaves with Macroporous Resins

Li Yingchang, Meng Xianjun, Li Xiaohong

1(College of Chemistry and Chemical Engineering, Bohai University, Jinzhou 121000, China)

2(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

ABSTRACT The characteristic of absorption and adsorption of nine kinds of macroporous resins to extract flavonoids of blueberry leaves was studied. Suitable resin for purification of flavonoids was screened from nine resins, and its characteristic of absorption and adsorption was investigated. The results indicated that HPD-600 macroporous resins had better absorption and adsorption property for purification of flavonoids from blueberry leaves, the time of absorption equilibrium was 4 h, the time of adsorption equilibrium was 1.5 h, concentration of flavonoids was 4.09 mg/mL. HPD-600 macroporous resins has a high adsorption ability for flavonoids of blueberry leaves when pH value was 5.0. The optimum solution for the adsorption was 60% ethanol. The temperature of absorption was 30°C and temperature of adsorption was 60°C. The flavonoids produced by this technological process was yellow powder, recovery rate was 81.90%, the purity of flavonoids was 78.04%.

Key words blueberry leaves, flavonoids, macroporous resins, purification

(上接第 132 页)

Studies on Concentration of *Ganoderma lucidum* Aqueous Extract by Membrane Integrating Process

Cai Bangxiao¹, Gao Yuqiong²

1(Institute of Membrane Science and Engineering, College of Food, Biological and
Environmental Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China)

2(Guizhou Institute of Biotechnology Research and Development, Guiyang 550002, China)

ABSTRACT The highly effective and energy-saving membrane integrating technique has been applied to extraction and separation of effective constituents from plants. Aiming at identifying the characteristics of *Ganoderma lucidum* aqueous extract and the performance of selection and separation of microfiltration(MF), ultra-filtration(UF), nanofiltration(NF) for special substances, we designed an innovative technique, which included the processes of impurity removal by the sieve and the filter paper and MF treatment, purification and concentration *Ganoderma lucidum* aqueous extract. This technique utilizes two-stage UF with different molecular weight cut-off(MWCO) membranes, followed by NF. Technological parameters, such as Operating pressure, temperature, flow rate on membrane surface etc., all have remarkable influences on purification and concentration of *Ganoderma lucidum* aqueous extract. The batch-treatment of *Ganoderma lucidum* aqueous extract by UF was carried through, early or late, polyacrylonitrile(PAN) membrane with 50,000 MWCO and cellulose acetate(CA) membrane with 10 000 MWCO under the conditions of operating pressure ≤ 0.20 MPa, high membrane surface flow rate of 15 m/s with the constant flux operation mode. The UF permeate was further concentrated by NF through DK(standard) type polyamide(PA) membrane with 150-300 MWCO. When extract was concentrated six times with NF, the permeate flux was within 0.92~0.33 mL/(cm²·h). The results showed that, for the operation of dry product i.e., dry extract of *Ganoderma lucidum*'s effective constituent, the new membrane integrating process is easy to operate, with water consumption of 5.24 L/g, power consumption of 9.86 kW·h/g, and the yield was as high as 95.69%.

Key words *Ganoderma lucidum*, aqueous extract, membrane, integrating technique, concentration, dry extract