

大孔吸附树脂纯化薄荷总黄酮工艺优选

Optimization of purification technology for total flavonoids from *Mentha haplocalyx* by macroporous resin

刘雪辉^{1,2} 张 思^{1,2} 张志旭^{1,2} 康信聪^{1,2}
LIU Xue-hui^{1,2} ZHANG Si^{1,2} ZHANG Zhi-xu^{1,2} KANG Xin-cong^{1,2}
李 坚² 谢红旗^{1,2,3,4} 刘东波^{1,2,3,4}
LI Jian² XIE Hong-qi^{1,2,3,4} LIU Dong-bo^{1,2,3,4}

(1. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2. 国家中医药管理局亚健康干预技术实验室, 湖南 长沙 410128;
3. 湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室, 湖南 长沙 410128;
4. 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128)

(1. College of Horticulture and Landscape, Hunan agricultural university, Changsha, Hunan 410128, China; 2. State Key Laboratory of Subhealth Intervention Technology, Changsha, Hunan 410128, China; 3. Hunan Provincial Key Laboratory of Crop Germplasm Innovation and Utilization, Changsha, Hunan 410128, China; 4. National research Center of Engineering Technology For Utilization of Functional Ingredients From Botanicals, Changsha, Hunan 410128, China)

摘要:以吸附—解吸率和总黄酮含量为考察指标,采用静态和动态吸附两种方法,进行大孔吸附树脂纯化薄荷总黄酮工艺优选。试验考察 ADS-7、ADS-17、NKA-9、AB-8、D101、HPD-100 六种大孔吸附树脂对薄荷总黄酮的纯化能力。结果表明:AB-8 对薄荷总黄酮吸附与分离性能最佳,确定纯化薄荷总黄酮的最佳工艺条件为:流速 1 mL/min,上样液中薄荷总黄酮质量浓度为 2.56 mg/mL,上样量 3 BV,解析液为 4 BV 30%乙醇,最终得到含量 90.35%的薄荷总黄酮。上述工艺对薄荷总黄酮的分离高效、稳定、可靠,为薄荷资源的综合利用提供理论依据。

关键词:薄荷;黄酮;分离;吸附;解析

Abstract: Based on the adsorption-desorption rate and the content of total flavonoids, static and dynamic adsorption methods were adopted to evaluate the purification ability of 6 macroporous resins, including ADS-7, ADS-17, NKA-9, AB-8, D101, and HPD-100, for purifying total flavonoids from *Mentha haplocalyx*. The results showed that AB-8 was adsorbed best among all the candidates. The optimum purification condition was as follows. The flow rate was 1 mL/min, and the loading volume of sample was 3 BV containing flavonoids 2.56 mg/mL in it, desorbed by 4 BV 30% ethanol. Finally, 90.35%

基金项目:国家国际科技合作专项项目(编号:2013DFA31790)

作者简介:刘雪辉,女,湖南农业大学在读硕士研究生。

通讯作者:刘东波(1970—),男,湖南农业大学教授,博士。

E-mail:chinasaga@163.com

收稿日期:2015—10—22

total flavonoids from *Mentha haplocalyx* were obtained. The method above is characteristic of high separation efficiency, convenient operation and reliable stability. This study could provide theory support for the comprehensive utilization of *Mentha haplocalyx*.

Keywords: *Mentha haplocalyx*; flavonoids; separation; adsorption; desorption

薄荷(*Mentha haplocalyx* Briq.)又称“银丹草”、“鱼香草”,为唇形科(Lamiaceae)薄荷属(Genus *Mentha*)多年生药食两用草本植物^[1]。

现代研究发现,薄荷含有机酸、黄酮、挥发油、萜类等化学成分,对消化、呼吸、神经中枢等生理系统的药理作用显著^[2],其中的黄酮类物质具有较强的抗菌^[3]、抗氧化^[4-5]及抗肿瘤^[6]能力,故被广泛应用于医药、食品、化妆品等行业^[7-8]。薄荷总黄酮显著的生理活性催生了极大的市场需求,也对其产业化研究提出了更高的要求。传统的硅胶柱分离以及溶剂萃取方式存在有机溶剂用量大、溶剂残留等缺点,而制备色谱、高速逆流等分离方法也受到有机溶剂残留以及无法大规模产业化生产等弊端的限制^[9-10],而现有的关于薄荷总黄酮产业化分离纯化方面的研究不多。钟昆芮等^[11]采用聚酰胺树脂分离纯化了薄荷总黄酮,其方法虽然操作简单、重复性好,但所得薄荷总黄酮纯度仅达 50%,在分离效果效率以及经济成本等方面稍有不足,无法满足其后续针对性的药理药效研究和市场推广的需求,制约了薄荷资源

的综合开发利用。大孔吸附树脂是一种可重复利用的新型分离材料,具有对目标组分针对性吸附能力强、分离方法简单、高效,溶剂无毒副作用等优点,常用于药用植物中活性化合物的分离^[12],本研究拟通过对不同极性的树脂进行筛查,并结合工厂大生产设备条件,对薄荷总黄酮纯化工艺进行优化,旨在探索出绿色、高效、稳定、经济的适用于产业化大生产的工艺路线。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

薄荷干燥茎叶:北京同仁堂药材公司;
芦丁标准品:含量>98%,中国药品生物制品检定所;
ADS-7 树脂、ADS-17 树脂、NKA-9 树脂、AB-8 树脂、D101 树脂、HPD-100 树脂:沧州宝恩吸附材料科技有限公司;

氢氧化钠、无水乙醇、硝酸铝:分析纯,国药集团上海化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器设备

紫外可见分光光度计:UV-1800 型,岛津仪器(苏州)有限公司;

电子分析天平:Mettler Toledo XS205 型,上海梅特勒—托利多仪器有限公司;

恒温培养振荡器:ZHWHY-2102C 型,上海合恒仪器设备有限公司;

旋转蒸发仪:RE-52 型,上海雅荣生化仪器设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 上样液制备 称取薄荷干燥茎叶 500 g,加入 60%乙醇置 80 ℃恒温水浴锅中回流提取 1.0 h,料液比分别为 1:10 和 1:8(g/mL)提取 2 次,合并提取液,60 ℃真空浓缩回收乙醇至无醇味,加水分散溶解,定容至 2 000 mL,采用亚硝酸钠—硝酸铝—氢氧化钠显色法测定提取液中黄酮含量^[13],作为上样液备用。

1.3.2 静态吸附与解析试验 准确称取预处理好的 ADS-7、ADS-17、NKA-9、AB-8、D101、HPD-100 树脂各 1.0 g,装入 50 mL 锥形瓶中,分别加入上样液 25 mL,置恒温振荡摇床上(温度 30 ℃,转速 100 r/min)振荡吸附,每隔 1 h 吸取上层清液 1 mL 进行黄酮含量测定,按式(1)计算吸附量,选出最佳吸附树脂。

$$X = \frac{(a - b) v}{m}, \tag{1}$$

式中:
X——吸附量,mg/g;
a——上样液中总黄酮浓度,mg/mL;
b——吸附后溶液中总黄酮浓度,mg/mL;
v——上样液体积,mL;
m——树脂质量,g。

将充分吸附薄荷总黄酮的大孔树脂过滤后分别加入 25 mL 80%乙醇,置恒温振荡摇床上(温度 30 ℃,转速

100 r/min)振荡解吸 24 h,充分解吸后取 1 mL 上层清液测定总黄酮含量,按式(2)、(3)计算解吸量和解吸率,并综合吸附率与解析率优选出最佳树脂型号进行动态吸附试验。

$$Y = \frac{cV}{m}, \tag{2}$$

$$Z = \frac{c}{a - b} \times 100\%, \tag{3}$$

式中:
a——上样液中总黄酮浓度,mg/mL;
b——吸附后溶液中总黄酮浓度,mg/mL;
Y——解吸量,mg/g;
Z——解吸率,%;
c——解吸液中总黄酮浓度,mg/mL;
V——解吸液体积,mL;

1.3.3 上样液浓度及上样量的筛选 准确量取已预处理好的 AB-8 型大孔吸附树脂各 30 mL 湿法装柱,取一系列质量浓度(1.53,1.92,2.56,3.84 mg/mL)的上样液分别上柱,以流出液中黄酮浓度达到上样液中黄酮浓度的 10%作为泄漏点,测定不同上样浓度下树脂的饱和和吸附量,从而优先出最佳上样浓度及上样量。

1.3.4 洗脱溶剂的筛选 按上述确定的最佳吸附条件进行上样,先水洗至流出液无色,然后依次用 10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,100%的乙醇各 1 BV 进行解析,流速 1 mL/min,分别收集各段解析液进行黄酮含量检测,绘制洗脱曲线并优选出最佳洗脱溶剂。

1.3.5 洗脱量的筛选 选用上述确定好的洗脱溶剂,流速 1 mL/min,分别用 1,2,3,4,5,6 BV 的溶剂进行解析,计算解析量,并绘制解析曲线并优选出最佳解析体积。

2 结果与分析

2.1 不同树脂对薄荷黄酮的静态吸附量与解析率

ADS-7、ADS-17、NKA-9、AB-8、D101、HPD-100 六种吸附材料对薄荷黄酮的静态吸附量与解析量见表 1,ADS-7 树脂对薄荷黄酮的吸附量最大,AB-8 树脂次之,但在静态解析试验中,AB-8 树脂的解析率最高,达到 63.57%,具有较好的吸附解析效果,而同样条件下 ADS-7 树脂对薄荷黄酮的死吸附较多以致解析率只有 15.8%,推测可能是薄荷黄酮类化合物极性较强,根据“相似相吸引”原则,ADS-7 树脂作为强极性树脂,与薄荷黄酮极性相似度较高,具有较强的吸附效应,从而形成了死吸附。而 AB-8 树脂相对极性较弱,在针对薄荷黄酮类化合物时能够达到一种较佳的吸附—解析效应,因此综合吸附量与解析率两个因素,最终选择 AB-8 树脂作为薄荷总黄酮的纯化填料。

2.2 不同上样液浓度下树脂对薄荷总黄酮的吸附量

将薄荷提取浓缩液稀释至黄酮含量分别为 3.84,2.56,1.92,1.53 mg/mL,以泄露点为终点进行最大吸附量测定,结果见图 1。当薄荷黄酮浓度为 2.56 mg/mL 时,树脂对薄荷总黄酮的吸附量最大,随着浓度的减少,吸附量逐渐降低,而浓度增大也会导致泄露点提前而吸附量减少,且树脂容易堵塞。因此选择浓度为 2.56 mg/mL 的上样液进行上柱试验。

表 1 不同树脂对薄荷黄酮的静态吸附量与解析率

Table 1 Static adsorption capacities and desorption rates of total flavonoids in *Mentha haplocalyx* by various macroporous adsorption resins

树脂名称	极性	吸附量/mg	解析量/mg	解析率/%
ADS-7	强极性	67.62	10.68	15.80
ADS-17	中极性	41.84	19.47	46.54
NKA-9	极性	47.30	24.36	51.53
AB-8	弱极性	48.58	30.88	63.57
D101	非极性	47.26	25.03	52.96
HPD-100	非极性	48.03	28.45	59.22

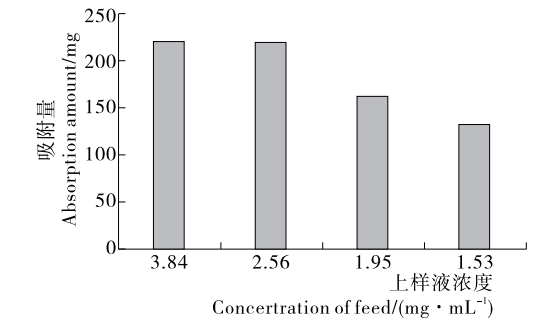


图 1 不同上样液浓度下树脂对薄荷总黄酮的吸附量

Figure 1 The adsorption capacity of total flavonoids in various concentration

2.3 上样量的确定

按上述确定好的上样浓度进行上柱,分别接收各段上样流出液,检测其中黄酮含量,见图 2,当上样量达到 3 BV 时,流出液中薄荷总黄酮浓度达到上样液浓度的 10%,并且泄露量逐渐增大,参考前人^[14]研究结果并综合薄荷原料价格、薄荷总黄酮产业化生产成本、品价格等经济因素,最终选择上样体积为 3 BV。

2.4 不同浓度的乙醇对薄荷总黄酮的解析率

如图 3 所示,随着醇浓度的增大,洗脱液中薄荷总黄酮的洗脱率也依次增大,当洗脱剂醇浓度达 30%时,洗脱率达到了 60%,继续增加乙醇浓度,洗脱率增加趋势减缓,且部分醇溶性杂质被洗脱下来而导致黄酮纯度降低(图 4)。因此综合经济、效率等因素最终选择先用水洗除去多糖、蛋白质等杂质,再用体积分数为 30%的乙醇作为洗脱剂,并考虑通过增加洗脱量来提高洗脱率。

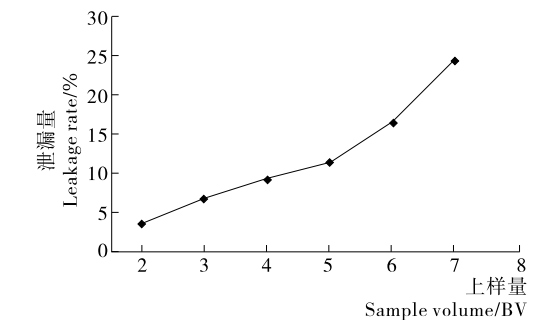


图 2 泄漏曲线

Figure 2 Leakage curve

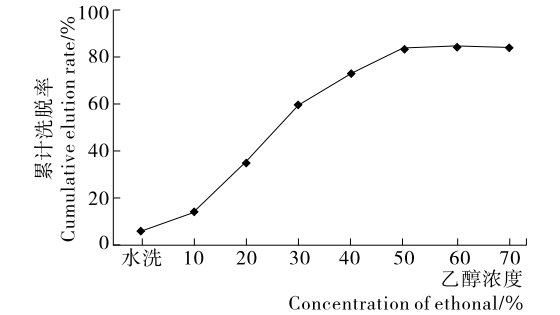


图 3 乙醇梯度洗脱曲线

Figure 3 Elution curve with different concentrations of ethanol

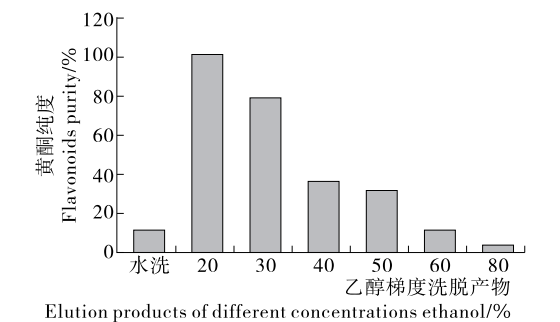


图 4 乙醇梯度解析液中黄酮纯度

Figure 4 Flavonoids purity in various concentrations of ethanol

2.5 洗脱溶剂用量的筛选

选择 30%的乙醇作为洗脱溶剂,依次增加洗脱剂的用量,并分别接收每个 BV 的解析液,进行黄酮含量检测。由图 5 可知,当洗脱剂用量达到 4 BV 时,绝大部分黄酮已经被洗脱下来,因此选择 4 BV 的洗脱剂用量。

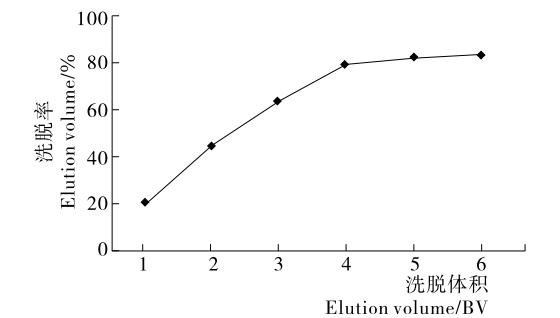


图 5 洗脱剂用量与洗脱率的关系

Figure 5 Relationship between the ethanol volume and the desorption efficiency

3 结论

本试验通过静态吸附及解吸试验进行树脂型号的筛选,确定 AB-8 型树脂对薄荷总黄酮的吸附量较大且解析率最高,且 AB-8 树脂再生工艺简单、重复利用批次可达数百次,因此选择 AB-8 型树脂做后续动态吸附试验并优化其工艺参数,筛选出的最佳工艺条件为:上样浓度 2.56 mg/mL,上样体积 3 BV,水洗至流出液澄清透亮,再用 4 BV 30%的乙醇

(下转第 177 页)

明交互作用对响应值影响不大,若非常陡,则表明交互作用对响应值影响显著。等高线图呈椭圆形且排列致密说明交互作用项对响应值影响显著,若呈圆形则此时交互效应可忽略^[9]。由图 1 可知,交互作用项 $X_1 X_2$ 和 $X_1 X_3$ 对响应值影响较弱,而交互项 $X_2 X_3$ 影响则较强。

2.4.4 模型最优解及验证实验 响应变量分别对各自变量求偏导并令结果为零,联立得到三元一次方程组,解逆矩阵得到响应面函数驻点(最优解),即 $X_1 = 0.085\ 8\ \text{mol/L}$, $X_2 = 78.8\ \text{目}$, $X_3 = 1 : 13.32(\text{g/mL})$ 。为操作方便,将结果修约为碱液浓度 $0.09\ \text{mol/L}$,粳碎米粒度 80 目,固液比为 $1 : 13.5(\text{g/mL})$,优化条件下大米蛋白质提取率为 $(82.25 \pm 2.53)\%$ ($n = 3$),比表 7 中第 2 组试验结果稍低,可能是试验误差造成的,比模型预测值 $84.655\ 1\%$ 稍低,偏差为 -0.48% 。制备得到的大米蛋白纯度为 $(91.68 \pm 1.26)\%$ ($n = 3$)。

3 结论

因大米蛋白碱提效率受碱液浓度、碱提温度、碱提时间、粳碎米粒度和固液比等多因素综合影响,是一个复杂的灰色体系,为解析各因素的影响规律,本试验在析因设计和爬陡坡试验的基础上应用二次旋转中心组合响应面优化方法研究了碱液浓度、粳碎米粒度和固液比的影响规律并获得优化条件,即碱液浓度 $0.09\ \text{mol/L}$,粳碎米粒度 80 目,固液比 $1 : 13.5(\text{g/mL})$,碱提温度 $50\ ^\circ\text{C}$,碱提时间 120 min。优化条件下大米蛋白质提取率和纯度分别为 82.25% 和 91.68% 。结果表明,析因设计与响应面优化技术联用可很好用于粳碎米蛋白质碱法提取工艺的优化分析。

参考文献

[1] 滕蔚蔚. 碎米资源及其综合利用概述[J]. 轻工科技, 2013(1): 13-14.
[2] 张玉荣, 王云光, 周显青, 等. 发酵碎米理化性质的变化及与米粉品质的关联性[J]. 粮食与饲料工业, 2013(11): 20-24.
[3] WANG Hong-bin, WANG Jing, ZHANG Jia-Lv, et al.

Preparing oligopeptides from broken rice protein by ultrafiltration-coupled enzymatic hydrolysis[J]. European Food Research and Technology, 2013, 236(3): 419-424
[4] 银波, 李亦蔚, 汪霞丽, 等. 大米蛋白改性技术的研究进展[J]. 食品与机械, 2011, 27(3): 147-151.
[5] 王申, 周佳, 徐晶, 等. 超声、微波联合预处理大米蛋白制备 ACE 抑制肽工艺优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(3): 159-161.
[6] ROMERO A, BEAUMAL V, DAVID-BRIANDE E, et al. Interfacial and emulsifying behaviour of rice protein concentrate[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 29(1): 1-8.
[7] 顾林, 姜军, 孙婧. 碎米提取大米蛋白工艺及功能特性研究[J]. 粮食与饲料工业, 2007(12): 5-7.
[8] 孙庆杰, 田正文. 碱法提取浓缩大米蛋白工艺条件的研究[J]. 食品工业科技, 2003(9): 38-42.
[9] 万娟, 陈嘉东, 钟国才, 等. 碱法提取粳碎米中大米蛋白工艺的研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(9): 1 073-1 075.
[10] 王威, 张月天, 曾凡骏. 响应面优化碱法提取大米蛋白工艺[J]. 粮食与饲料工业, 2007(9): 20-21, 25.
[11] 蒋之坝, 黄仲青. 关于二次正交旋转组合设计试验数据的中心点处理法[J]. 安徽农业大学学报, 1989(4): 290-295.
[12] 肖怀秋, 李玉珍, 赵谋明, 等. 二次旋转中心组合响应面法优化冷榨花生粕脱脂工艺[J]. 粮油食品科技, 2014(6): 33-38.
[13] 郭梅, 郭伟, 王娜, 等. 碱法提取大米蛋白的研究[J]. 粮食加工, 2011, 36(2): 42-44.
[14] 杨月欣. 实用食品营养成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 36-85, 162-163.
[15] SUHAIL A H, ISMAIL N, WONG S, et al. Response surface methodology[J]. J. Appl Sci., 2011, 11: 308-315.
[16] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248-254.
[17] 徐向英, 王岸娜, 林伟静, 等. 响应面法优化燕麦全粉中蛋白质提取工艺[J]. 食品与机械, 2011, 27(5): 96-99.
[18] 肖怀秋, 李玉珍, 林亲录, 等. 响应面优化冷榨花生粕酶法制备多肽工艺的研究[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(9): 50-55.

(上接第 158 页)

进行洗脱,洗脱率为 79.49% ,将解析液浓缩冷冻干燥,测得干粉中黄酮含量为 90.35% 。本试验建立的 AB-8 型大孔吸附树脂分离纯化薄荷总黄酮的工艺,具有绿色环保、操作简便、稳定可靠、高效经济等优点,适合大规模产业化生产。

参考文献

[1] 中国药典编委会. 中国药典[S]. 2015 版. 北京: 化学工业出版社, 2015: 377.
[2] 徐凌玉, 李振麟, 蔡芷辰, 等. 薄荷化学成分的研究[J]. 中草药, 2013, 44(20): 2 798-2 802.
[3] 吕爽, 田呈瑞, 韩莎莎. 薄荷属植物精油和多酚类的抑菌性及抗氧化性研究[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(6): 827-831.
[4] SHE Gai-mei, XU Chao, LIU Bin, et al. Antioxidant activity of volatile oil from leaves of mentha haplocalyx briq[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(4): 359-362.
[5] DONG Wen-jiang, NI Yong-nian, KOKOT S. A novel near-infrared spectroscopy and chemometrics method for rapid analysis of several chemical components and antioxidant activity of mint (Mentha haplo-

calyx Briq.) samples[J]. Appl Spectrosc, 2014, 68(2): 245-254.
[6] 黄华艺, 查锡良. 黄酮类化合物抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2002, 21(7): 428-433.
[7] 吕燕柏, 王锡宁, 季萍. 保健食品中薄荷脑和冰片含量的测定方法研究[J]. 预防医学文献信息, 2003, 9(6): 677-679.
[8] 朱卫红, 许时婴, 江波. 微胶囊化薄荷油的制备及其热稳定性研究[J]. 食品与机械, 2006, 22(5): 32-39.
[9] 屠鹏飞, 贾存勤, 张洪全. 大孔吸附树脂在中药新药研究和生产中的应用[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2004, 6(3): 22-28.
[10] 黎海彬, 李小梅. 大孔吸附树脂及其在天然产物研究中的应用[J]. 广东化工, 2005, 32(3): 22-25.
[11] 钟昆芮, 张凡, 姜艳艳, 等. 薄荷总黄酮的纯化工艺优选[J]. 中国试验方剂学杂志, 2013, 19(6): 11-14.
[12] 于智峰, 王敏. 大孔吸附树脂在黄酮类化合物分离中的应用[J]. 中草药, 2006, 29(12): 1 380-1 383.
[13] 杜若源, 谢晶, 王婷, 等. 超声波辅助提取银杏叶中总黄酮的工艺优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(1): 167-170.
[14] 方贺, 宋旺弟, 陈文. 大孔吸附树脂纯化黄花柳花总黄酮工艺研究[J]. 北方园艺, 2016(6): 120-124.