

湖南香柚中黄酮类化合物的分离纯化工艺研究

Reserch on separation and purification of flavonoids in Hunan pomelo

彭程程¹

邓放明²

PENG Cheng-cheng¹ DENG Fang-ming²

(1. 湖南省产商品质量监督检验研究院, 湖南长沙 410007; 2. 湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410128)

(1. Hunan Province Institute of Products Quality Supervision and Inspection, Changsha, Hunan 410007, China;
2. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

摘要:以湖南香柚落果为原料,采用乙醇超声提取香柚黄酮类化合物,以吸附量、回收率、纯度和吸附率等为考察指标,综合比较 AB-8、NKA-9、D110 和 ADS-17 4 类大孔树脂分离纯化香柚黄酮类化合物的效果,并对筛选出的最适树脂的分离纯化工艺进行优化。结果表明:AB-8 大孔树脂对湖南香柚总黄酮的吸附量最高,达 0.70 mg/mL;AB-8 大孔树脂适于分离湖南香柚中黄酮的物质,其分离优化条件为:径高比 1:10;吸附流速 1.5 BV/h,淋洗液 pH 值 4.0,洗脱剂为 70% 的乙醇,洗脱剂用量 4 BV,解析流速 2 BV/h,树脂重复使用 3 次。

关键词:香柚;黄酮;分离;纯化;大孔树脂

Abstract: Taking Hunan pomelo fruit drop as raw materials, ethanol ultrasonic extraction of flavonoids pomelo, Research AB-8, NKA-9, D110 and ADS-17 four types of macroporous resin separation and purification process optimization pomelo flavonoids. The results showed that: AB-8 macroporous highest amount of total flavonoids Hunan pomelo, reaching 0.70 mg/mL; integrated adsorption, recovery, purity and absorption rate and other indicators, AB-8 macroporous resin separation and purification of the Hunan Xiang optimal conditions grapefruit flavonoids was: 1:10 aspect ratio; the adsorption velocity 1.5 BV/h, the eluent pH value 4.0, eluent 70% ethanol eluted dosage 4 BV, analytical flow rate 2 BV/h, the resin was repeated 3 times.

Keywords: pomelo; flavonoids; separation; purification; macroporous resin

柚 [*Citrus grandis* (L.)] 又名文旦、抛等,是芸香科柑桔属植物^[1]。湖南香柚是湖南省从柚中选育出的变种之一,属于白肉甜柚类,是湖南省的一大特色水果,以湖南省江永县栽培较多。江永香柚落果每年约有 2 万 t。江永香柚含有丰

富的黄酮类物质^[2],其传统处理方式是直接丢弃,造成了极大浪费。如果能变废为宝,将其作为保健食品、抗氧化剂等开发利用,必将有很好的发展前景,因此充分开发利用香柚落果中含有的黄酮类化合物具有重要的现实意义。目前中国对柚中果胶以及芳香油的提取和应用^[3],柚中黄酮的提取工艺有研究报道^[4],但对香柚落果中黄酮的分离纯化的研究未见报道。分离纯化是天然产物生产中一个不可或缺的环节。目前常用于分离纯化黄酮类化合物的方法主要有大孔树脂法、高效液相色谱法、重结晶法、薄层色谱法等,其中大孔树脂法具有再生简便、选择性好、吸附速度快、吸附容量大等优点,因而被广泛应用于天然产物的分离纯化^[5]。本研究拟对 AB-8、NKA-9、D110 和 ADS-17 4 类大孔树脂分离纯化香柚黄酮类化合物的效果进行比较,并对香柚落果中黄酮分离纯化的优化工艺进行探讨,旨在为高纯度柚黄酮的规模化生产以及香柚落果的综合利用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

芦丁标准样品:南京泽朗医药科技有限公司;

大孔吸附树脂:AB-8、NKA-9、D110、ADS-17 型,天津农药股份有限公司;

无水乙醇、浓盐酸、浓硫酸、NaNO₂、Al(NO₂)₃、NaOH、FeCl₃:分析纯,中国国药(集团)上海化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

可见分光光度计:WFJ7200 型,上海龙尼柯仪器有限公司;

高速中药粉碎机:ZN-400A 型,长沙市岳麓区中南制药机械厂;

旋转蒸发器:RE52-3 型,上海沪西分析仪器有限公司;

循环水式多用真空泵:SHB-III T 型,郑州长城科工贸易有限公司;

电子分析天平:AUY220 型,日本 SHMADZV 公司;

电热鼓风干燥箱:101-2AB 型,天津市泰斯特仪器有限公司。

作者简介:彭程程(1985—),女,湖南省产商品质量监督检验研究院工程师,硕士。E-mail:234384848@qq.com

通讯作者:邓放明

收稿日期:2015-07-25

1.3 试验方法

1.3.1 香柚黄酮提取物的制备

原料→清洗除杂→切片→干燥→粉碎→脱脂→抽滤→滤渣干燥→乙醇超声提取→提取液抽滤→蒸发浓缩→冷冻干燥→香柚黄酮粗提物→定容→待上柱样品液

1.3.2 大孔树脂预处理及再生

(1) 将 AB-8、NKA-9、D110、ADS-17 4 种型号的大孔树脂依次用 2 倍体积 3%~5% 盐酸溶液浸泡至充分溶胀, 1 倍体积蒸馏水, 2 倍体积 3%~5% 的盐酸洗涤, 最后用蒸馏水洗至溶液呈中性。之后用乙醇湿法装柱, 用 95% 乙醇流动淋洗, 直至乙醇溶液与水混合(1:4) 不产生白色浑浊为止, 用大量蒸馏水洗脱到流出液无醇味^[6]。

(2) 大孔树脂使用一定的周期后, 当它的吸附能力降低或者受到严重污染时需要强化再生, 先用 3%~5% 盐酸溶液浸泡大孔树脂 2~4 h, 之后淋洗通柱, 再用 3~4 倍树脂体积 3%~5% 的盐酸溶液淋洗通柱, 然后用蒸馏水洗至中性, 再用 3%~5% 的氢氧化钠溶液浸泡大孔树脂 2~4 h, 之后淋洗通柱, 用 3%~5% 的 3~4 倍树脂体积的氢氧化钠溶液淋洗通柱, 用蒸馏水洗至中性即可使用。

1.3.3 大孔树脂的筛选试验 将浓度为 2.0 mg/mL 的香柚提取物水溶液以 1.5 BV/h 的流速分别通过 4 种不同型号已预处理好的树脂柱, 进行动态吸附试验, 待吸附达到泄漏点(该处流出液中黄酮的浓度值为上柱前试液中黄酮浓度值的 1/10) 之后停止上样, 记录上柱量, 并计算总黄酮的吸附值。上样后的大孔树脂柱先用 pH 值为 4 的水淋洗通柱至无色并用浓硫酸检测至无糖反应, 再用 4 BV 70% 的乙醇溶液对柱子进行洗脱, 洗脱速度为 2 BV/h。将洗脱液蒸干、称重, 测定黄酮总量, 并计算回收率。

1.3.4 大孔树脂动态吸附试验

(1) 径高比对大孔树脂吸附效果的影响: 在大孔树脂体积一定的情况下, 通过调整填充柱的直径来改变树脂的径高比, 以此观察对泄漏点的影响, 这也是影响大孔树脂吸附量的一个重要因素。取浓度为 2.0 mg/mL 的香柚黄酮提取液 100 mL, 在上样流速为 1.5 BV/h 的条件下, 每 10 mL 收集一次黄酮残液, 测定其中黄酮的浓度, 分别研究径高比为 1:5, 1:7.5, 1:10 条件下的泄漏情况。

(2) 上样流速对大孔树脂吸附效果的影响: 取浓度为 2.0 mg/mL 的香柚黄酮提取液 100 mL 通过大孔树脂, 间隔 10 mL 收集黄酮流出液, 测定其中总黄酮的浓度, 以泄漏点最迟出现的上样流速为最佳, 研究上样流速(1.5, 3.0, 4.5 BV/h) 对吸附效果的影响。

1.3.5 大孔树脂动态洗脱试验

(1) 淋洗液 pH 值对洗脱效果的影响: 取浓度为 2.0 mg/mL 的香柚黄酮提取液 100 mL 以 1.5 BV/h 的流速通过大孔树脂, 待吸附达到泄漏点之后, 用 pH 值分别为 2, 4, 6, 8 的水淋洗通柱至用浓硫酸检测至无糖反应为止, 然后用 4 BV 70% 乙醇溶液对柱子进行洗脱, 洗脱流速为 2 BV/h, 收集洗脱液, 测定其中总黄酮的含量及回收率。分别比较不同淋洗液的 pH 值对大孔树脂洗脱效果的影响。

(2) 不同浓度洗脱剂的洗脱效果: 取浓度为 2.0 mg/mL

的香柚黄酮提取液 100 mL 以 1.5 BV/h 的流速通过大孔树脂, 待吸附达到泄漏点之后, 先用大量 pH 值为 4 的水淋洗通柱至无色并用浓硫酸检测不出糖, 然后分别用 4 BV 浓度为 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 的乙醇溶液洗脱柱子, 洗脱流速为 2 BV/h, 收集洗脱液, 测定其中总黄酮的含量及回收率。比较不同浓度洗脱剂对大孔树脂洗脱效果的影响。

(3) 不同用量洗脱剂的洗脱效果: 在确定洗脱剂的最适宜浓度后, 还需对洗脱剂的最佳用量进行确定, 其原则是在充分洗脱下大孔树脂所吸附物质的前提下, 尽量减少洗脱剂用量。取浓度为 2.0 mg/mL 的香柚黄酮提取液 100 mL 以 1.5 BV/h 的流速通过大孔树脂(柱体积为 120 mL), 待吸附达到泄漏点后, 先用大量 pH 值为 4 的水淋洗通柱至无色并用浓硫酸检测不出糖, 然后用 70% 乙醇溶液对柱子进行洗脱, 解析流速为 2 BV/h, 洗脱液每 100 mL 收集 1 次, 一共收集 8 次, 分别测定其吸光值, 据此绘制出洗脱曲线, 比较不同用量洗脱剂对树脂洗脱效果的影响。

(4) 不同洗脱流速下的洗脱效果: 取浓度为 2.0 mg/mL 的香柚黄酮提取液 100 mL 以 1.5 BV/h 的流速通过大孔树脂, 待吸附达到泄漏点后, 先用大量 pH 值为 4 的水淋洗通柱至无色并用浓硫酸检测不出糖, 然后用 4 BV 70% 的乙醇溶液对树脂柱进行洗脱, 洗脱流速分别为 1.0, 1.5, 2.0 BV/h, 洗脱液每 10 mL 收集 1 次, 分别测定吸光度, 计算出流出液中总黄酮的浓度。比较不同洗脱流速对树脂洗脱效果的影响。

(5) 树脂重复使用次数的考察: 依照上述确定的吸附及洗脱条件, 取一定浓度的黄酮提取液进行上柱、吸附和洗脱的操作, 在同一根树脂柱上重复操作 4 次, 分别计算 4 次总黄酮的吸附率, 以此来考察树脂重复使用的效果。

1.3.6 总黄酮的吸附量、回收率、纯度和吸附率 分别按式(1)~(4)计算:

$$X = \frac{H}{V} \quad (1)$$

$$R = \frac{T}{S} \times 100\% \quad (2)$$

$$P = \frac{A}{B} \times 100\% \quad (3)$$

$$Q = \frac{D}{F} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

X——总黄酮吸附量, mg/mL;

H——被树脂吸附的黄酮总量, mg;

V——湿柱体积, mL;

R——总黄酮的回收率, %;

T——洗脱液中黄酮总量, mg;

S——上柱总黄酮量, mg;

P——黄酮纯度, %;

A——提取液(洗脱液)中总黄酮的质量, mg;

B——提取液(洗脱液)干燥后的质量, mg;

Q——总黄酮吸附率, %;

D——被吸附在树脂柱上的总黄酮量, mg;

F——上样总黄酮量, mg。

2 结果与分析

2.1 大孔树脂的筛选结果

大孔树脂的吸附分离效果因其理化性质的不同而有所差异。在所选的 4 种大孔树脂中,AB-8 为弱极性大孔树脂,NKA-9 为极性大孔树脂,D110 为弱酸性阳离子交换树脂,ADS-17 为中等极性大孔树脂。由表 1 可知,在相同的吸附条件下,AB-8 型大孔树脂分离纯化香柚中总黄酮的效果明显优于其他型号的树脂,其总黄酮的吸附量最高,达到 0.70 mg/mL,总黄酮回收率也比较高,达到 82.3%。这是由于黄酮是一种弱极性物质,在弱极性的大孔树脂柱上更易被吸附,而且吸附到柱上的物质也较易洗脱。故 AB-8 大孔树脂适合于分离纯化湖南香柚黄酮,与李春美^[7]、李维^[8]等的研究结果一致。

表 1 四类大孔树脂对柚黄酮的吸附分离性能比较

Table 1 Comparison of adsorbing and separating capability of four types of macroporous resin on shaddock flavonoids

树脂型号	纯化前总黄酮含量/%	纯化后总黄酮含量/%	总黄酮吸附量/(mg · mL ⁻¹)	总黄酮回收率/%
AB-8	2.85	16.46	0.70	82.3
NKA-9	2.85	16.84	0.45	84.7
D110	2.85	9.63	0.34	36.8
ADS-17	2.85	8.71	0.26	64.9

2.2 AB-8 大孔树脂动态吸附试验结果

2.2.1 径高比对大孔树脂吸附柚黄酮效果的影响 由图 1 可知,树脂柱径高比对其吸附柚黄酮效果有一定影响,树脂柱径高比为 1:5 和 1:7.5 时,其泄露点分别出现在 60 mL 和 70 mL 处,树脂柱径高比为 1:10 时,其泄露点出现在 80 mL 处。泄露点出现得越晚,树脂柱对黄酮的吸附量就越大,径高比如果太小,树脂柱吸附效应就会降低,以致上样液中分离物质未吸附就提早泄露。所以单从吸附量上考虑,AB-8 型大孔树脂分离纯化香柚中黄酮时其树脂柱径高比以 1:10 为宜。

2.2.2 上样液流速对大孔树脂吸附柚黄酮效果的影响 由图 2 可知,上样液流速对大孔树脂吸附柚黄酮的效果有明显影响,上样流速为 1.5 BV/h 时,泄露点出现得最晚,4.5 BV/h

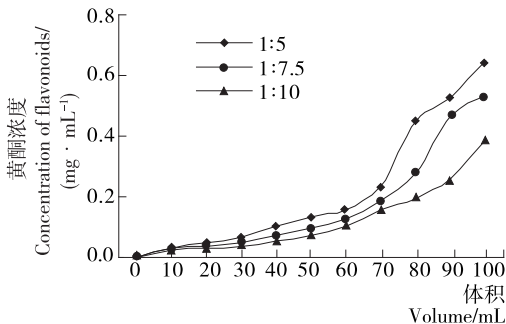


图 1 径高比对大孔树脂吸附柚黄酮效果的影响
Figure 1 The effect of different ratio of diameter to height on adsorption performance

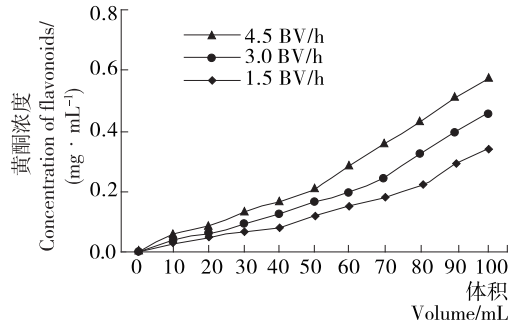


图 2 上样液流速对大孔树脂吸附柚黄酮效果的影响
Figure 2 The effect of different adsorption velocity on adsorption performance

时,泄漏点出现得最早。因为黄酮溶液越慢流过树脂柱,越能与树脂进行充分接触,从而提高吸附效果。如果黄酮溶液流速过快,使黄酮类物质未被树脂柱完全吸附便流出柱外,从而树脂吸附黄酮效率就会越低。因此,AB-8 型大孔树脂分离纯化香柚中黄酮时,上样液流速以 1.5 BV/h 为最佳。

2.3 AB-8 大孔树脂动态洗脱试验结果

2.3.1 淋洗液 pH 值对柚黄酮洗脱效果的影响 湖南香柚提取物中有大量的水溶性杂质,如可溶性糖、色素等,所以样品上柱后先用大量水淋洗以除去极性较大的可溶性糖和色素等。由图 3 可知,淋洗液的 pH 值对黄酮的纯化分离有一定的影响,当淋洗液的 pH 值从 2 增加到 4 时,黄酮的回收率增大;当 pH 值为 4 时黄酮的回收率最大;当 pH 值大于 4 时,回收率逐渐减小。因为,当 pH 值 < 4 时,淋洗液酸性太强,黄酮类化合物易转化为伴盐,不易被洗脱,因此,黄酮的回收率较低;当 pH 值为 4 时,淋洗液的酸度正好使黄酮类化合物保持分子形式,容易被洗脱下来,黄酮的回收率最大;当 pH 值 > 4 时,由于黄酮类物质为多羟基酚类化合物,具有一定的酸性,在微酸性条件下较容易被洗脱下来,在碱性条件下回收率降低。试验同时发现,酸性水溶液能够加速去除杂质及脱糖,这可能与提取物中糖的种类和性质有一定关系。

2.3.2 解吸剂浓度对柚黄酮洗脱效果的影响 考虑到黄酮一般应用在食品和医药行业中,本试验采用无毒性的乙醇作为解吸剂。由图 4 可知,乙醇浓度对大孔树脂吸附柚黄酮的洗脱效果有较大的影响,乙醇浓度从 60% 提高到 70%,黄酮的回收率随之增大,乙醇浓度为 70% 时,黄酮回收率达到 65%;之后随乙醇浓度的提高,黄酮回收率呈略微下降趋势,因此,解吸剂——乙醇浓度以 70% 为佳。

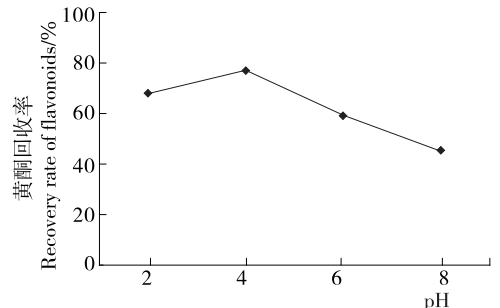


图 3 淋洗液 pH 值对柚黄酮洗脱效果的影响
Figure 3 The effect of pH value of water on desorption performance

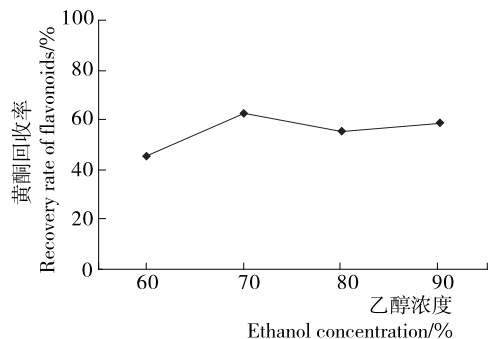


图4 乙醇浓度对柚黄酮洗脱效果的影响

Figure 4 The effect of ethanol concentration on desorption performance

2.3.3 洗脱剂用量对柚黄酮洗脱效果的影响 由图5可知,前5份洗脱液的吸光值都比较高,当收集到第3份时,吸光值达到峰值,从第6份洗脱液开始,吸光值已经显著减小,表明这部分洗脱液中总黄酮的含量已经非常低,绝大部分黄酮在前5份已被洗脱下来,从经济和效率的角度考虑,只用收集前5份洗脱液即可,即收集500 mL。故洗脱剂的用量定为4倍湿树脂体积。

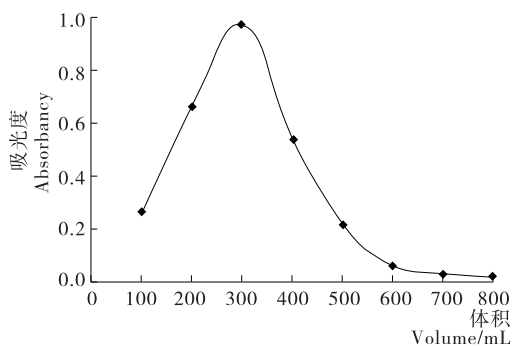


图5 AB-8大孔树脂洗脱曲线(70%乙醇为洗脱剂)

Figure 5 Eluent curve of macroporous resin

2.3.4 洗脱剂流速对柚黄酮洗脱效果的影响 由图6可知,洗脱剂流速对柚黄酮洗脱效果有明显的影响。洗脱速度为1.0 BV/h时,峰值低,峰形宽,并且拖尾现象非常严重;而洗脱速度为2.0 BV/h时,洗脱速度较快且峰值最高。洗脱流速一般要求较慢,这是因为若流速过快,会导致洗脱性能变差,洗脱带宽,拖尾严重,从而洗脱不完全,而流速过慢则会

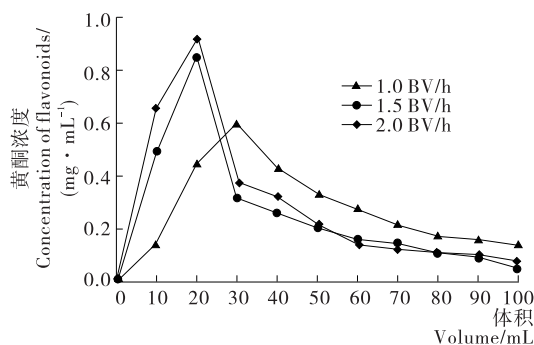


图6 洗脱剂流速对柚黄酮洗脱效果的影响

Figure 6 The effect of different eluent velocity on desorption performance

延长生产周期^[9]。因此,从峰值、峰形以及拖尾现象来看,2.0 BV/h是最适宜的洗脱流速。

2.3.5 树脂重复使用次数的考察结果 黄酮类化合物经大孔树脂吸附后,在表面或者内部还残存着许多非极性或非极性成分,这些杂质会堵塞大孔树脂的孔道,或者使某些官能团失去吸附性能,所以在下一次使用前要对大孔树脂进行再生。由图7可知,大孔树脂重复使用3次后,其对总黄酮的吸附效率显著下降,此时需要再生才可以继续使用,故AB-8大孔树脂只宜重复使用3次。

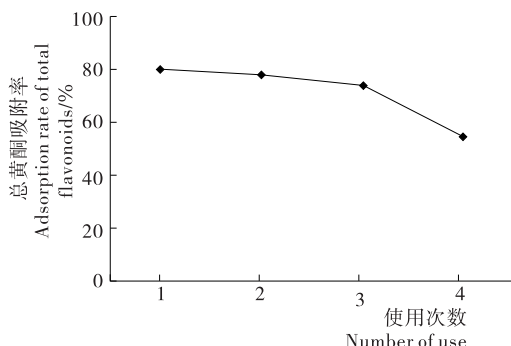


图7 AB-8大孔树脂使用次数的考察

Figure 7 Using times of AB-8 type macroporous resin

3 结论

(1) AB-8大孔树脂对湖南香柚中黄酮类物质具有良好的吸附作用,解吸率也比较高,用其纯化湖南香柚黄酮类物质是可行的。

(2) 通过动态吸附和动态洗脱试验得出,AB-8大孔树脂分离纯化湖南香柚中黄酮的最佳条件为:径高比1:10;吸附流速1.5 BV/h,淋洗液pH值4.0,洗脱剂为70%的乙醇,洗脱剂用量4 BV,解析流速2 BV/h,树脂重复使用3次。

(3) 本研究将AB-8大孔树脂应用于湖南香柚落果中黄酮的吸附分离,结果所得产物纯度高,工艺简单,可用于湖南香柚中有效成分的富集分离和工业生产。但放大生产仍需调整相关参数,以期在保证较高转移率的前提下进一步提高黄酮的纯度。

参考文献

- [1] 杨宇. 柚子全果综合利用及生物活性研究进展[J]. 广州化工, 2015, 43(5): 9-11.
- [2] 毛华荣. 柑橘生理落果有效成分复合提取工艺研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2009: 51-52.
- [3] 宋平, 吴厚玖, 沈海亮. 柚皮精油提取工艺与应用研究现状[J]. 保鲜与加工, 2012, 12(1): 51-54.
- [4] 焦士蓉, 郑贵菊. 柚皮黄酮类物质的微波辅助提取及其抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(1): 73-75.
- [5] 李琼, 陈恺, 陈燕勤, 等. 大孔吸附树脂分离纯化核桃青皮总多酚[J]. 食品与机械, 2015, 31(1): 175-180.
- [6] 罗文敏, 陈新美, 陈会明, 等. 大孔吸附树脂分离纯化柚皮总黄酮的研究[J]. 贵州科学, 2010, 28(4): 83-87.
- [7] 李春美, 钟朝辉, 窦宏亮, 等. 大孔树脂分离纯化柚皮黄酮的研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22(3): 153-157.
- [8] 李维, 钟世安, 乔蓉, 等. 大孔树脂吸附分离柚皮加工废液中的总黄酮[J]. 北京化工大学学报, 2007, 34(增刊II): 28-31.
- [9] 张蕾, 李梅香, 吴秀玲, 等. AB-8树脂分离纯化荷叶总黄酮的研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(10): 42-46.