

大孔树脂纯化芦笋黄酮工艺的研究

张素华, 王正云

(扬州大学食品科学与工程学院, 江苏 扬州 225001)

摘 要: 选择 6 种大孔吸附树脂, 分别测定了它们对芦笋中黄酮的吸附率和解吸率, 筛选出较优的芦笋黄酮吸附剂, 并对其动态吸附性能进行了考察, 结果表明: AB-8 树脂对芦笋黄酮有较好的吸附和解吸效果。

关键词: 芦笋; 黄酮; 大孔吸附树脂; 静态吸附; 动态吸附

Study on Adsorption and Separation by Macroporous Resin for Asparagus Flavonoids

ZAHNG Su-hua, WANG Zheng-yun

(College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Through the comparison among the six types of macroporous resin's adsorption and desorption capacity of rutin in asparagus, the optimal absorbent material for flavonoids in asparagus was decided and its dynamic absorbing behavior was studied. Experimental results show that AB-8 resin possesses higher absorption and desorption capacity. It is a better adsorbent for asparagus flavonoids.

Key words asparagus flavonoids; macroporous resin; static absorbent; dynamic absorbent

中图分类号: S636.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0182-05

芦笋(*Asparagus officinalis* L)又名石刁柏、龙须菜, 系百合科天门冬属多年生宿根性草本植物。世界芦笋罐头年产量达 20 余万吨, 仅次于西红柿、青刀豆、甜玉米、蘑菇而居蔬菜罐藏产量的第 5 位, 在加工罐头和鲜笋处理过程中, 将由 30% 左右的老茎和笋皮作为垃圾处理, 以至收获季节后有大量的老根、茎无法利用。据报道, 在芦笋下脚料中含有丰富的黄酮类化合物, 主要是芦丁。芦丁又称芸香苷, 是 VP 重要组成部分, 具有维持血管正常渗透压, 降低血管脆性的作用, 在临床上主要用于动脉硬化, 高血压的辅助治疗^[1]。大孔吸附树脂由于它具有物理化学稳定性高, 吸附选择性强, 富集效果好, 解吸条件温和, 再生简便, 使用周期长等优点, 因此, 近些年来, 树脂吸附法得到了长足的发展, 广泛应用于天然产物的分离纯化。本文选择 6 种树脂, 通过对芦笋黄酮的吸附分离研究, 发现 AB-8 吸附树脂是一种对芦笋黄酮具有优良吸附性能的吸附剂。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

芦笋 丰县产鲜销绿芦笋及速冻品下脚料。

试剂: 标准品芦丁 上海生化试剂二厂; 其他试剂均为分析纯。

HZ 系列大孔树脂 华东理工大学; NKA-2, NKA-9, AB-8 天津南开大学化工厂。

1.1.2 仪器

H. H. S1 电热数字显示恒温水浴锅; VIS-7220G 型可见分光光度计; RE-52C 旋转蒸发仪; SHZ-III B 型循环水真空泵; SBS 数控计滴自动部分收集器; HL-1 型恒流泵。

1.2 树脂的预处理

将新树脂先用乙醇浸泡充分溶胀, 然后用乙醇洗至洗出液加适量水无白色浑浊现象, 再用蒸馏水洗尽醇, 最后转入酸碱处理。即用 4BV 的 5% HCl 溶液, 以 5BV/h 的流速通过树脂层, 并浸泡 3h, 而后用蒸馏水以同样流速洗至出水 pH 值为中性; 用 4BV 的 5% NaOH 溶液, 以 5BV/h 的流速通过树脂层, 并浸泡 3h, 而后用蒸馏水以同样流速洗至出水 pH 值中性^[2]。

1.3 吸附树脂的物理性能

树脂吸附性能的优劣是由其化学和物理结构所决定的, 表 1 列出了各树脂的结构性能。

1.4 实验方法

收稿日期: 2005-04-11

作者简介: 张素华(1951-), 女, 副教授, 主要从事抗癌蔬菜活性成分的研究。

表1 吸附树脂的物理性能
Table 1 The physical performance of macroporous resin

| 树脂 | 极性 | 粒径范围(nm) | 比表面积(m ² .g) | 平均孔径(nm) | 孔隙率(%) | 孔容(ml/g) |
|--------|------|----------|-------------------------|----------|--------|-----------|
| HZ-802 | 非极性 | 0.3~1.2 | 450~550 | ~100 | — | 1.2~1.3 |
| HZ-803 | 非极性 | 0.3~1.2 | 550~600 | ~60 | — | 0.85~0.95 |
| HZ-806 | 中等极性 | 0.3~1.2 | 400~600 | ~100 | — | 0.77~0.87 |
| AB-8 | 弱极性 | 0.3~1.25 | 480~520 | 130~140 | 42~46 | 0.73~0.77 |
| NKA-II | 极性 | 0.3~1.25 | 160~200 | 145~155 | — | 0.62~0.66 |
| NKA-9 | 极性 | 0.3~1.25 | 250~290 | 155~165 | 46~50 | — |

1.4.1 供试液的制备

称取适量经干燥粉碎的芦笋下脚料粉末,用体积分数90%乙醇以料液比1:10,在70℃下浸提3h,过滤,浓缩至无醇味,用石油醚萃取出其中的叶绿素及脂类物质,加适量蒸馏水稀释备用

1.4.2 检测方法

称取芦丁标准品10mg,用30%乙醇溶解并定容于100ml容量瓶中,摇匀得浓度为0.1mg/ml的芦丁标准溶液,备用。分别精取0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、14.0、16.0ml于9只50ml容量瓶中,各加入NaNO₂溶液1.5ml,混匀,放置6min后加入10% Al(NO₃)₃溶液1.5ml,摇匀,放置6min,加入4% NaOH溶液10ml,用30%乙醇稀释至刻度,10min于波长510nm处比色测定^[1],试剂为空白参比。其结果见表2。

表2 标准芦丁浓度-吸光度值
Table 2 The concentration and absorbency of rutin

| 芦丁标准 液浓度(g/L) | 0.004 | 0.008 | 0.012 | 0.016 | 0.020 | 0.024 | 0.028 | 0.032 |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 吸光度A | 0.032 | 0.069 | 0.095 | 0.129 | 0.155 | 0.185 | 0.225 | 0.251 |

数据用最小二乘法进行线性回归,得芦丁溶液Y与吸光度值X的关系曲线的回归方程式:Y=0.1285X-0.0003, r=0.9993。用同种方法,相同条件下测定各样品的吸光度,由对应的吸光度标准曲线查出相应浓度,并计算样品黄酮含量。

1.5 大孔吸附树脂对芦笋黄酮的静态吸附试验

树脂有很多种类,通常为非极性和中性两大类。不同的树脂对不同植物的黄酮类成分吸附作用强弱不同。一般来说,中性树脂对极性分子的吸附力强,非极性分子在非极性树脂中的吸附力强,分子能与树脂结合形成氢键成分,具有较强的吸附性。在选择吸附剂时,要求吸附剂具备下列特性:对分离物质具有很强的吸附能力,即平衡吸附量大;有较高选择性;有一定的机械强度,再生容易;性能稳定;价廉易得^[4]。

1.5.1 大孔吸附树脂的吸附率测定^[3]

选择6种树脂进行吸附率的比较测定。测定方法为:准确称取经预处理的树脂各400mg(干),装入250ml具塞磨口三角瓶中,精密加入样品水溶液30ml,(黄酮

浓度为0.3mg/ml)置电动振荡机上振荡24h,充分吸附后,过滤,测定滤液中剩余黄酮浓度,按下式计算各树脂室温下的吸附量(mg/g)。

$$Q = (C_0 - C_r) \times V / W$$

式中:Q为吸附量(mg/g),C₀为起始浓度(mg/ml),C_r为剩余浓度(mg/ml),V为溶液体积(ml),W为树脂重量(g)。

1.5.2 大孔吸附树脂的解吸率测定

按1.5.1方法取充分吸附后的树脂,分别精密加入60ml,体积分数为95%的乙醇,置电动振荡机上振荡24h,过滤,测定滤液中黄酮浓度,并根据吸附量计算室温下的解吸率(%)。

$$\text{树脂解吸率}(\%) = [C_2 / (C_0 - C_1)] \times 100$$

1.5.3 大孔吸附树脂的静态吸附动力学特性测定

树脂的吸附动力学特性与吸附操作的生产率密切相关。在有充分时间吸附的情况下,有些树脂可能具有相近的饱和吸附量,但是由于各树脂化学和物理结构的差别,其吸附动力学过程是有差异的。因此,根据吸附率和解吸率的测定比较,选择较理想的树脂比较各树脂的吸附动力学过程。并测定各树脂的吸附速率。

取大孔吸附树脂400mg(干),装入250ml具塞磨口三角瓶中,精密加入样品水溶液60ml(黄酮浓度为0.3mg/ml),置电动振荡机上振荡,在10h内,每小时各取0.5ml,测定其黄酮含量,绘制静态吸附动力学曲线。

1.6 大孔吸附树脂对芦笋黄酮的动态吸附试验

通过静态吸附试验,对筛选出的一种理想树脂,进行洗脱流速、上样液的pH值、浓度、吸附透过曲线、解吸曲线以及洗脱剂的浓度、用量等进行动态吸附试验,将预处理好的树脂装入(1.8×60)cm玻璃层析柱中,将芦笋黄酮初提液上柱,控制一定流速,分步收集(5ml/管),当流出液吸光度达泄漏点即上样液的1/10时,认为芦丁已透过,停止上样,计算吸附量。

$$\text{吸附量} = \text{上样液浓度}(\text{mg/ml}) \times \text{流出液体积}(\text{ml})$$

2 结果与分析

2.1 大孔吸附树脂的静态吸附试验结果

为了探讨适合芦笋黄酮的最适树脂,本实验进行了

HZ-802, HZ-803, HZ-806, AB-8, NKA- II, NKA-9 六种树脂对芦笋黄酮粗提液进行处理, 在初始浓度为 0.3mg/ml 的条件下, 测其吸附后平衡浓度(即树脂充分吸附后, 吸附液的剩余浓度), 可得到不同树脂对黄酮的吸附率, 见表 3。

表 3 树脂对芦笋黄酮的吸附率
Table 3 The rates of adsorption of resin for flavonoids

| 树脂种类 | HZ-802 | HZ-803 | HZ-806 | AB-8 | NKA- II | NKA-9 |
|--------------|--------|--------|--------|-------|---------|-------|
| 平衡浓度 (mg/ml) | 0.243 | 0.221 | 0.141 | 0.015 | 0.010 | 0.122 |
| 吸附率 (mg/g) | 4.28 | 5.93 | 11.93 | 21.88 | 21.75 | 13.35 |

由表 3 可以看出, AB-8、NKA- II 具有较大的吸附率。

再利用体积分数 95% 乙醇, 在 $V=60\text{ml}$, 室温下进行解吸, 各种树脂的解吸率测定结果如表 4 所示。

表 4 95% 乙醇对芦笋黄酮的解吸率
Table 4 The rates of desorption of resin for flavonoids

| 树脂种类 | HZ-802 | HZ-803 | HZ-806 | AB-8 | NKA- II | NKA-9 |
|---------------|--------|--------|--------|-------|---------|-------|
| 解吸前吸附黄酮量 (mg) | 8.56 | 11.86 | 23.86 | 42.76 | 43.50 | 26.70 |
| 解吸液浓度 (mg/ml) | 0.042 | 0.054 | 0.056 | 0.199 | 0.195 | 0.097 |
| 解吸率 (%) | 73.60 | 65.76 | 35.21 | 69.8 | 67.24 | 54.49 |

由表 4 可知 HZ-802, AB-8, NKA- II 具有较大的解吸率, 但 HZ-802 的吸附率太低, 而 AB-8 和 NKA- II 不仅具有较大的吸附率, 而且具有较高的解吸率。由于树脂极性、孔径、比表面积不同, 对芦丁吸附作用力强弱不同, 解吸难易也有别。

选择较为合适的 AB-8、NKA- II 两种树脂各 400mg (用滤纸吸干) 装入具塞磨口三角瓶中, 精密加入芦丁粗提液 60ml, 置电热振荡器上震荡, 在 10h 内, 每小时各取 0.5ml, 测其芦笋黄酮含量, 绘制静态吸附动力学曲线。

图 1 为 2 种树脂的静态吸附动力学曲线。

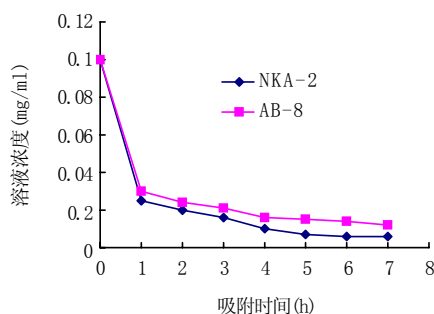


图 1 两种树脂的静态吸附动力学曲线

Fig.1 The kinetics curve of static state of two resin

从图 1 静态吸附动力学曲线可以看到, 2 种树脂对

芦笋中类黄酮的吸附为快速平衡型, 在 4h 内基本接近达到平衡, 起始阶段吸附量都较大, 但从总体上来看, AB-8 的吸附率始终优于 NKA-2。

综合以上分析可知, AB-8 树脂对芦笋黄酮具有良好的静态吸附动力学特性, 较适宜于芦笋黄酮的分离。

2.2 大孔吸附树脂 (AB-8) 对芦笋黄酮的动态吸附结果

2.2.1 流速的影响

通过调节恒流泵的流速对上柱样液进行吸附流速的选择, 应以泄漏点最迟出现的吸附流速为宜。因此在样液浓度均为 0.127mg/ml, 样液体积均为 100ml 的条件下, 控制流速分别 1、2、3ml/min 进行动态吸附。三种吸附流速下的泄漏情况如图 2 所示。

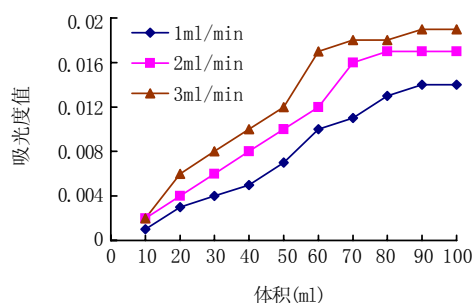


图 2 吸附流速与吸光度关系图

Fig.2 The relative chart about velocity and absorbcy

通过计算可知, 若流速为 1ml/min 时, 泄漏点出现在 70ml 附近, 若流速为 2ml/min 时, 泄漏点出现在 60ml 附近, 若流速为 3ml/min 时, 泄漏点出现在 50ml 附近。流速为 1ml/min 时, 虽然泄漏点出现的最迟, 但导致循环周期延长。另对吸附树脂而言, 不仅要求其吸附性能良好, 还要追求其良好的洗脱性能, 单一吸附泄漏点的后移, 并不代表洗脱的效果也很好, 洗脱效果是决定最佳吸附条件的另一关键。

2.2.2 pH 值的影响

在样液体积均为 100ml 的条件下, 用酸或碱将芦笋黄酮初提液调成不同的 pH 值^{[6][9][12]}, 在吸附流速为 3ml/min 时, 分别对其泄漏情况进行比较, 得出结果如图 3 所示。

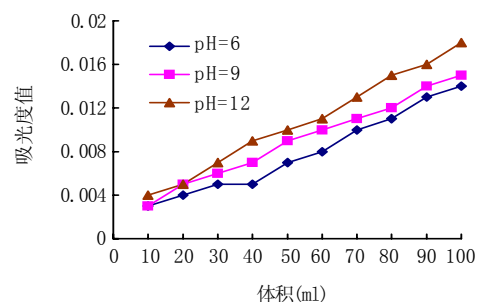


图 3 不同 pH 值与吸光度关系图

Fig.3 The relative chart about pH and absorbcy

通过计算可知,三种条件下的泄漏点分别为80、70、60ml。可见,AB-8对提取原液有较大的吸附量。从吸附量上考虑,pH=6的条件下进行吸附比较适宜。

这是由于类黄酮化合物为多羟基酚类,呈弱酸性,因而,要达到较好的吸附效果,必须在弱酸性条件下吸附。

2.2.3 动态吸附透过曲线^[4]

选择芦笋黄酮粗提液,配成0.3mg/ml,pH=5.28,以V=3ml/min的流速流过玻璃层析柱,收集流出液(5ml/min),按上述方法绘制出吸附透过曲线(见图4)。

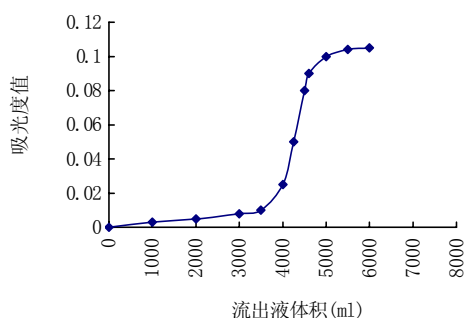


图4 动态吸附透过曲线

Fig.4 The dynamic curve of adsorption

由图4可知,芦笋黄酮粗提液的动力学吸附透过曲线为理想的S形曲线,当吸附液体积大于5000ml时吸光度值达到最大值,基本不再发生变化,由此可知AB-8树脂对芦笋黄酮有较强的吸附,可通过5000ml即60倍柱床体积的芦笋黄酮溶液而无穿透现象。

2.2.4 不同体积分数解吸剂的洗脱效果

吸附层析法是根据被分离物质与树脂之间吸附力强弱来选择不同的洗脱剂和相应的洗脱剂浓度。对于极性不大的大孔树脂和被分离物来说,洗脱剂极性越小,洗脱能力就越强;对于极性较大的大孔树脂和被分离物而言,则用极性较大的溶剂较为合适^[2]。由于乙醇极性大,毒性低,易浓缩回收,较适合作为解吸剂。

本试验取适量AB-8树脂,以100ml吸附液进行吸附,控制吸附流速为3ml/min,待吸附达到泄漏点后再分别取200ml 30%、50%、70%、95%的乙醇溶剂进行洗脱,解吸流速控制为1.5ml/min,分别将各次洗脱的浓组分合并,然后测定它们的吸光度值^[5],结果见表5。

表5 不同体积分数乙醇的洗脱效果

Table 5 The effect of desorption about ethanol of different concentration

| 洗脱剂 | 浓组分体积(ml) | 浓组分吸光度值(5ml) | 浓组分总吸光度值 |
|--------|-----------|--------------|----------|
| 30% 乙醇 | 17 | 0.166 | 0.564 |
| 50% 乙醇 | 22 | 0.295 | 1.298 |
| 70% 乙醇 | 24 | 0.379 | 1.819 |
| 95% 乙醇 | 30 | 0.402 | 2.412 |

从表5可以看出,体积分数70%以上的乙醇水溶液解吸出来的浓组分吸光度值较高,且浓组分体积也较其它低浓度乙醇洗脱出的浓组分体积数多。因此,体积分数70%以上的乙醇水溶液解吸效果较好。

2.2.5 不同用量解吸剂的洗脱效果

在确定洗脱剂洗脱的最佳浓度后,还需要对洗脱剂的最佳用量进行确定,其原则是在充分洗脱下所吸附的物质的前提下,尽量节省洗脱剂的用量。以100ml吸附液进行吸附,控制吸附流速为3ml/min,待吸附达到泄漏点后再分别取100、150、200、250ml的95%乙醇溶剂进行洗脱,解吸流速控制为1.5ml/min,分别将各次洗脱的浓组分合并,然后测定它们的吸光度值,结果见表6。

表6 不同用量95%乙醇的洗脱效果

Table 6 The effect of desorption about 95% ethanol of different volume

| 95% 乙醇用量 (ml) | 浓组分体积 (ml) | 浓组分吸光度值 (5ml) | 浓组分总吸光度值 |
|------------------|---------------|------------------|----------|
| 100 | 20 | 0.298 | 1.192 |
| 150 | 28 | 0.241 | 1.350 |
| 200 | 38 | 0.228 | 1.733 |
| 250 | 40 | 0.225 | 1.800 |

由表6可知当洗脱液体积从100ml增加至150、200ml时,洗脱出的浓组分总吸光度值增加为100ml时113%、145%,而洗脱液体积从100ml增加至250ml时,浓组分吸光度值增加为100ml时的151%,与洗脱体积为200ml时相差不大,考虑到成本以及生产周期的问题,洗脱剂用量选择200ml比较合适。

2.2.6 动态解吸曲线

以100ml吸附液进行吸附,控制吸附流速为3ml/min,当吸附完全后,采用70%乙醇进行柱上洗脱,流速为1.5ml/min,收集流出液(5ml/min),分别测定它们的吸光度值,结果见图5。

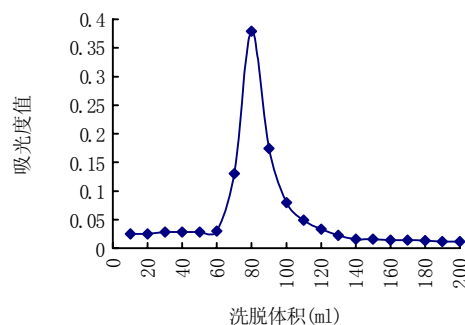


图5 动态解吸曲线

Fig.5 The desorption curve of dynamic state

由图6可以看出,采用体积分数70%乙醇进行解吸时,洗脱峰集中,对称,无明显拖尾现象,采用200ml

黑曲霉电解法制备甲壳素的研究

曹 健¹, 代养勇², 李 浪¹, 王中泰¹

(1. 河南工业大学生物工程学院, 河南 郑州 450052

2. 山东农业大学食品学院, 山东 泰安 271018)

摘 要: 本试验以实验室发酵的黑曲霉菌丝体为原料, 采用电解法从中提取甲壳素, 再将甲壳素碱法脱乙酰转化为壳聚糖。通过单因素试验和正交试验分析了电解时间、电压、碱浓度及料液比对壳聚糖的脱乙酰度、得率、粘均分子量等指标的影响, 以此间接反映电解法各因素对甲壳素产品的影响。黑曲霉电解法制备甲壳素的最优条件为: 电解时间 1.25h, NaOH 浓度 3%, 电压 8V, 液料比 12:1。试验证明, 利用电解法从黑曲霉中提取甲壳素实践上是可行的。

关键词: 黑曲霉; 电解; 甲壳素; 壳聚糖

Study on Producing Chitin From *Aspergillus niger* by Electrolysis

CAO Jian¹, DAI Yang-yong², LI Lang¹, WANG Zhong-tai¹

(1. School of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China

2. Food College, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: Chitin was prepared by electrolysis from mycelia through small-scale fermentation of *Aspergillus niger* in this paper, while the obtained chitin was further deacetylated into chitosan by alkaline. Through single-factor experiments and orthogonal experiment, the effects of some factors on the degree of deacetylation, yield and molecular weight of the chitosan product were studied. The optimized conditions for preparing chitin product from *A. niger* mycelia by electrolysis were as follows: time of electrolysis 1.25h, concentration of NaOH 3%, voltage 8V and ratio of solvent to meal 12:1. It is found that preparing chitin from the *A. niger* by electrolysis is practically feasible.

Key words *Aspergillus niger*; electrolysis; chitin; chitosan

中图分类号: TS245.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0186-07

收稿日期: 2005-04-25

基金项目: 河南省教育厅科技攻关计划项目(2003180058)

作者简介: 曹健(1969-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。

70% 乙醇基本上可以将芦笋黄酮完全洗脱下来。

3 结 论

3.1 AB-8 树脂对芦笋黄酮吸附量大, 易解吸, 是一种理想的芦笋黄酮吸附剂, 比较适合于对芦笋黄酮的提取分离。

3.2 当芦笋黄酮初提液 pH6, 吸附流速为 3ml/min 时, AB-8 对芦笋黄酮的吸附量较大。

3.3 当用 200ml 体积分数大于 70% 的乙醇水溶液作为芦

笋黄酮的洗脱剂时, 能将芦笋黄酮基本解吸出来, 洗脱峰集中, 对称性好, 无明显拖尾现象。

参考文献:

- [1] 刘树兴, 齐香君, 庞振, 等. 芦笋中芦丁的提取及其鉴定[J]. 食品工业科技, 2001, 22(4): 39-41.
- [2] 杨红. 中药化学实用技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [3] 潘廖明, 姚开, 贾冬英. 大孔树脂吸附大豆异黄酮特性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(5): 15-18
- [4] 冯涛. 竹叶黄酮提取纯化研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2003.