

大孔吸附树脂法纯化木薯叶黄酮的初步研究

陶海腾¹, 陈晓明¹, 吕飞杰^{2,*}, 台建祥², 付勤², 李开绵³

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

2. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081;

3. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南儋州 571737)

摘要: 研究大孔吸附树脂纯化木薯叶黄酮的工艺条件, 比较大孔树脂 HPD100、D151、001 × 1.1、NKA-9、H103 和 D101 对木薯叶黄酮的吸附性能, 并对影响树脂解吸的各种因素进行了研究。在考察的 6 种树脂中, 树脂 HPD100 最适于木薯叶黄酮的分离纯化, 具有较高的吸附性, 达 208mg/g(干重), 同时具有良好解吸性能, 用 7 倍树脂体积的 70% 乙醇洗脱, 解吸率可达 96.78%。

关键词: 木薯叶黄酮, 大孔吸附树脂, 纯化

Primary study on macroporous resin for purification of flavonoids in cassava leaves

TAO Hai-teng¹, CHEN Xiao-ming¹, LV Fei-jie^{2,*}, TAI Jian-xiang², FU Qin², LI Kai-mian³

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

3. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

Abstract: The purified condition of macroporous resin was optimized, and the technological parameters of purifying flavonoids in cassava leaves were established. The adsorption and desorption performance of macroporous resins (HPD100、D151、001 × 1.1、NKA-9、H103 and D101) on flavonoids in cassava leaves were studied, and correlative technical parameters were investigated. Among these six macroporous resins, the optimum macroporous resin HPD100 was screened out, with high desorption (208mg/g dry weight) and desorption rate (96.78%). 70% ethanol:macroporous resin (7:1, v:v) could accomplish desorption completely.

Key words: cassava leaves flavonoids; macroporous resin; purification

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)08-0192-03

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 又叫树薯、木番薯, 地下部结薯, 属于大戟科木薯属植物, 原产南美洲巴西, 约有 4000 年的栽培历史, 分布到世界南北纬 30 度以内的地带, 是世界三大薯类 (马铃薯、番薯、木薯) 作物之一^[1]。19 世纪 20 年代以前传入中国, 分布于淮河、秦岭一带和长江流域以南, 以广西的栽培面积最大^[2]。目前, 种植木薯主要是为了获取其富含淀粉的块根, 而同时产生的大量木薯叶没有得到充分的利用。木薯叶富含蛋白质和功能活性成分, 具有很高的营养保健功效^[3-5]。秘鲁与巴西一带的亚马孙丛林中, 土著印第安人千百年来均有食用

木薯叶的习惯, 并将其作为传统草药食疗配方^[6]。据报道^[7], 马达加斯加科研人员发现捣碎的木薯叶煮熟后可治疗膀胱炎 (CYSTICERCOSE)。木薯叶的保健功能可能与木薯叶中含有丰富的黄酮类化合物有关。Isao Kubo 等^[8]研究了巴西的木薯品种 maniva 的叶片, 发现含有槲皮素、山奈酚和芦丁等黄酮类化合物, 并对其抗氧化性进行了实验, 效果显著。大孔吸附树脂是一类有机高聚物吸附剂, 由聚合单体和交联剂、致孔剂、分散剂等添加剂经聚合反应制备而成, 目前已被广泛应用于多种植物黄酮类化合物的分离提纯中^[9]。本实验比较了 HPD100 等几种大孔吸附树脂分离纯化木薯叶黄酮的性能, 并对最佳工艺参数进行了研究, 对木薯叶资源的进一步开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

收稿日期: 2008-11-13 * 通讯联系人

作者简介: 陶海腾 (1979-), 男, 博士生, 主要从事天然产物提取和功能成分的开发利用研究。

基金项目: 农业部“国家公益性行业 (农业) 科研专项经费”项目 (nyhyzx07-013)。

木薯叶黄酮的粗提液 50% 浓度乙醇按料液比 1:20 将木薯叶粉 60℃ 浸提 2h, 采用超声波辅助提取 1h, 连续提取 3 次; 大孔吸附树脂 HPD100 河北沧州宝恩化工有限公司; D151、001 × 1.1、NKA-9、H103、D101 天津南开大学化工厂; 芦丁标准品 北京药品检验所, 纯度 > 98%; 其他试剂 均为分析纯。

超声萃取器 美国 BRANSON 公司; H.H.S 电热恒温水浴锅 上海医疗器械三厂; 真空旋转蒸发仪 瑞士 BüCHI 公司; 752 型紫外分光光度计 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 树脂预处理 用 95% 乙醇浸泡 24h, 充分溶胀, 经漂浮法筛选后再用 95% 乙醇洗脱, 至洗出液加入适量蒸馏水 (1:5) 无白色浑浊现象, 再用蒸馏水洗至无醇味。用体积分数 5% 的 HCl 溶液浸泡 3h, 蒸馏水洗至中性; 用 5% 的 NaOH 溶液浸泡 3h, 蒸馏水洗至中性, 蒸馏水浸泡, 备用。

1.2.2 上样液的制备 粗提液用真空旋转蒸发仪减压, 在 50~55℃ 下浓缩至适量, 浓缩液在 60℃ 蒸干, 然后加水复溶成悬浊液, 4000r/min 离心 10min 去沉淀, 上清液为树脂上样液。

1.2.3 标准曲线的绘制及样品浓度的测定 采用分光光度法 (亚硝酸钠-硝酸铝比色法) 测定样品中总黄酮含量、粗黄酮粉中黄酮含量和粗黄酮提取液中黄酮含量, 其原理是利用黄酮类化合物与铝盐反应生成红色络合物, 以芦丁为标准品在 510nm 处测吸光度。

精确称取 180mg 芦丁标准品, 用 70% 乙醇定容至 100mL 为标准液。精确吸取芦丁标准液 1、2、3、4、5、6mL, 分别置于 6 个 25mL 容量瓶中, 各补水至 6mL, 加 5% NaNO₂ 溶液 1mL, 摇匀, 放置 6min 后, 加 10% Al(NO₃)₃ 溶液 1mL, 摇匀, 放置 6min 后, 再加 4.3% NaOH 溶液 10mL, 加水定容至 25mL, 摇匀, 放置 15min 后, 在 510nm 处测吸光值, 作吸光度与芦丁浓度的关系曲线, 得回归方程为 $y = 0.0026x + 0.0008$, $R^2 = 0.998$ 。

将各种样品配制成一定浓度的溶液, 按照标准曲线制作相同的方法测定出吸光度, 再由回归方程计算出黄酮含量。

1.2.4 树脂静态吸附实验 称取一定量处理后的各种型号大孔树脂在 103℃ 烘箱中烘干至恒重, 测定其水分含量。取 1g (湿重) 大孔树脂, 加入 20mL 黄酮溶液, 室温下每半小时剧烈摇动一次, 充分吸附 12h, 测定溶液吸附前后的浓度, 按照下述公式计算各树脂的静态吸附量。

$$\text{吸附量} = (C_0 - C_1) \times V / M$$

式中: C_0 、 C_1 分别为吸附前、后溶液中黄酮溶液的浓度; V 为吸附溶液体积; M 为树脂干重。

1.2.5 树脂的解吸实验 根据静态吸附实验结果, 称取吸附性能好、等重 (湿重) 的几种大孔树脂, 加黄酮溶液, 吸附后, 以去离子水洗涤, 然后用 10%、30%、50%、70%、90% 乙醇分别解吸。分别测定吸

附前、吸附后以及解吸液中的黄酮溶液浓度, 按照下述公式计算各树脂的解吸率。

$$\text{解吸率} = C_2 \times V_1 / \text{吸附量}$$

式中: C_2 为解吸液中黄酮溶液的浓度; V_1 为吸附溶液体积。

称取优化的树脂 5 等份, 加入黄酮溶液, 吸附后分别用 10%、30%、50%、70%、90% 乙醇洗脱, 分别测定吸附前、吸附后以及解吸液中的黄酮溶液浓度, 计算不同浓度乙醇洗脱的解吸率。

优化的树脂装柱 10mL, 取一定量的黄酮溶液上样, 然后依次用去离子水洗涤, 然后用上面所优化的解吸液 100mL 进行解吸, 收集解吸液, 10mL/份, 测定黄酮的含量。

1.2.6 树脂的等温吸附曲线 称取 6 份优化的树脂各 1g (湿重), 分别加入一系列不同浓度 (六个梯度) 的黄酮溶液 20mL, 吸附时间为 5h, 测定吸附前后浓度的变化, 绘制等温吸附曲线。

2 结果与分析

2.1 树脂静态吸附实验结果

根据树脂的含水量 (见表 1) 计算出各干树脂的静态吸附量, 结果如图 1 所示。可以看出, 不同类型的大孔树脂对木薯叶黄酮的静态吸附量有很大的差异。6 种树脂中以 HPD100 树脂的吸附量为最高, 可达到 208mg/g 干树脂, D101 和 NKA-9 树脂的吸附效果也比较高。

表 1 各种类型树脂的含水量

树脂类型	湿重(g)	干重(g)	含水量 (%)
D151	1.41	0.21	85.11
001 × 1.1	1.33	1.11	16.54
NKA-9	1.20	0.21	82.50
HPD100	0.58	0.10	82.76
H103	1.04	0.34	67.31
D101	1.47	0.28	80.95

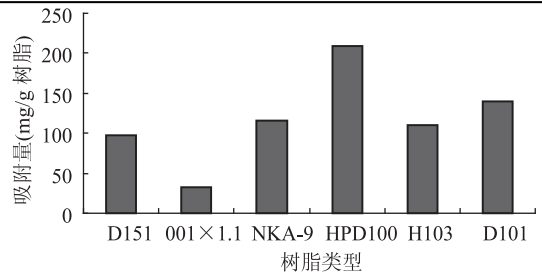


图 1 不同树脂对木薯叶黄酮的静态吸附比较

2.2 树脂解吸率的考察

根据树脂静态吸附结果, 选择吸附效果较好的 HPD100、D101 和 NKA-9 进行考察解吸效果, 从图 2 可以看出, 不同浓度的乙醇对树脂都有解吸作用, 当浓度提高到 30% 时三种树脂的解吸量都很大。由表 2 可以看出, HPD100 和 NKA-9 的解吸率较高。由于 HPD100 的吸附量最大, 因此后面的实验主要考察 HPD100 纯化黄酮的工艺。

从图 3 可以看出, 乙醇浓度越高, 解吸率随之升高。当浓度达到 70% 以后, 解吸率变化不大, 此时树脂所吸附的黄酮类化合物已经基本上全部解吸出来。因此以后的实验中选择 70% 的乙醇作为解吸液。

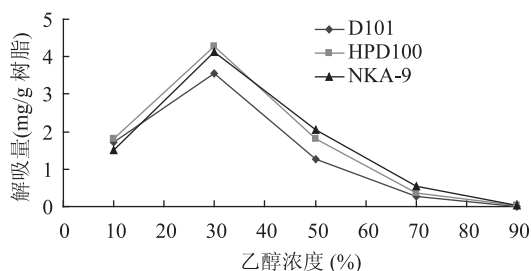


图2 几种树脂对木薯叶黄酮的解吸曲线

表2 几种树脂的解吸率

树脂类型	吸附量 (mg/g)	解吸量 (mg/g)	解吸率 (%)
D101	7.55	6.82	90.38
HPD100	8.56	8.29	96.78
NKA-9	8.40	8.24	98.14

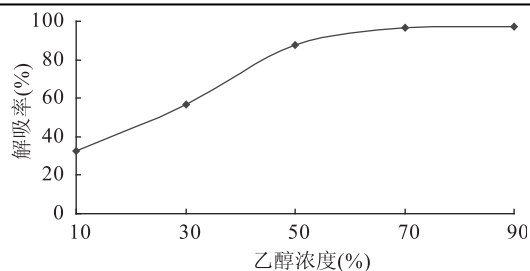


图3 不同浓度乙醇对树脂的解吸效果

将吸附一定量黄酮的 HPD100 树脂用 70% 乙醇解吸液洗脱,得到解吸曲线如图 4 所示,在 2 倍体积的洗脱液中黄酮含量最高,随后解吸液体积增加,解吸量逐渐降低,解吸液用量达到 7 体积后,便不再有黄酮解吸下来了。

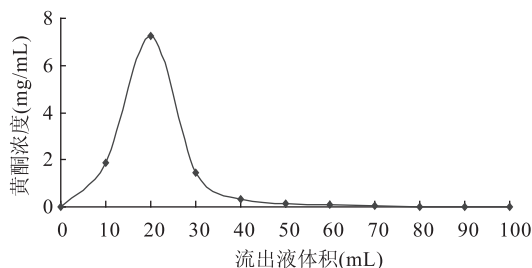


图4 70%乙醇对树脂 HPD100 的解吸曲线

2.3 树脂的等温吸附线

树脂 HPD100 的吸附等温吸附曲线如图 5 所示,随着黄酮浓度的增加,树脂的吸附量也随着增加。等温线按照 Langmuir 方程进行拟合,相关系数为 0.9565,吻合较好,可以推测出该吸附过程是以物理吸附

为主。

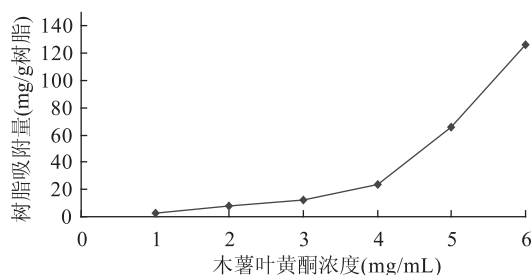


图5 树脂 HPD100 的等温吸附线

3 结论

大孔吸附树脂 HPD100 对黄酮具有较高的吸附性,达 208mg/g(干重)。同时,HPD100 具有良好解吸性能,解吸率达 96.78%,70% 乙醇对树脂的解吸有很好的效果,用 7 倍体积的 70% 乙醇可以把吸附的黄酮基本上都洗脱下来。HPD100 对黄酮的吸附属于物理吸附,不会改变黄酮的性质。因此,HPD100 对木薯叶黄酮具有较好的纯化效果。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志(第二分册)[M].北京:科学出版社出版,1996.172~174.
- [2] 黄洁,李开绵,叶剑秋,等.中国木薯产业化发展研究与对策[J].中国农学通报,2006,22(5):421~426.
- [3] P A Lancaster, J E Brooks. Cassava leaves as human food [J]. Economic Botany, 1983, 37(3): 331~348.
- [4] Aduni Ufuan Achidi, Olufunmike A Ajayi, Mpoko Bokanga, et al. The use of cassava leaves as food in Africa [J]. Ecology Food and Nutrition, 2005, 44: 423~435.
- [5] H H Yeoh, M Y Chew. Protein content and amino acid composition of cassava leaf [J]. Phytochemistry, 1976, 15: 1597~1599.
- [6] 姜山.木薯叶的抗癌作用[N].环球时报·生命周刊, 2003/09/16.
- [7] 戴汉武.熟木薯叶治疗膀胱炎[EB].新华社塔那那那佛分社, 2004/11/24.
- [8] Isao Kubo, Noriyoshi Masuoka, Ken-ichi Nihei, et al. Maniçoba, a quercetin-rich Amazonian dish [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2006, 19: 579~588.
- [9] 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].中药材, 2006, 29(12): 1380~1384.

(上接第 191 页)

- [3] 陈福玉,叶永铭,李沐森.野生树莓汁饮料的研制[J].特产研究, 2006(4): 34~38.
- [4] 翟明昌,吴枫楠,高美卉.草莓枸杞保健饮料的研制[J].江苏调味副食品, 2007, 24(3): 21~23.
- [5] 田颖.五味子保健饮料配方优选研究[J].饮料工业, 2007, 10(10): 12~14.
- [6] 麻成金,黄群,阳乐,等.沙田柚果汁饮料生产工艺及其稳定性研究[J].食品工业科技, 2007, 28(1): 137~139.
- [7] 李安平,谢碧霞,黄亮,等.金桔果汁饮料的加工工艺[J].

中南林学院学报, 2006, 26(4): 80~85.

- [8] 徐凤.枸杞果汁饮料的研制[J].吉林农业科技学院学报, 2006, 15(4): 4~5.
- [9] 黄高明.番茄保健饮料的研制[J].饮料工业, 2006(11): 18~20.
- [10] 陈蓓莉,刘珊珊.蓝莓果汁乳饮料稳定性的研究[J].东北农业大学学报, 2006, 37(6): 779~782.
- [11] 郝利平.食品添加剂[M].中国农业出版社, 2004, 6: 144~170.