

大孔树脂吸附分离柚皮加工废液中的总黄酮

李 维¹ 钟世安¹ 乔 蓉¹ 袁周率¹ 杜建平²

(1. 中南大学化学化工学院, 湖南 长沙 410083; 2. 湖南湘乡东山学校, 湖南 湘乡 411400)

摘 要: 工业化生产加工柚皮过程中, 采用树脂法吸附分离酸提果胶后的超滤膜透过液得柚黄酮柚皮苷。通过考察直接醇提液和超滤膜透过液中柚皮苷在树脂上的吸附性能, 确定最佳吸附分离工艺条件。结果表明, 醇提液和膜透过液均可用大孔树脂纯化, 高效液相色谱(HPLC)测定显示从醇提液和膜透过液中分离得到的总黄酮在主要成分上没有明显区别, 大孔吸附树脂对膜透过液的循环使用次数 ≥ 6 次, AB-8大孔树脂适合应用到工业生产中对膜透过液回收柚皮黄酮, 实现柚皮加工综合利用。

关键词: 柚; 柚皮苷; 大孔树脂; 吸附; 分离

中图分类号: X703.1

引 言

柚皮总黄酮(主要为柚皮苷)是从柚皮中提取的具有生物功能的有效成分^[1], 具有抗氧化, 降血脂, 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, 研究它将对探讨和提高柚皮的综合价值有积极意义^[2]。

目前从柚皮提取液中富集分离黄酮类化合物的方法主要有有机溶剂萃取法^[3]和树脂法^[4]。有机溶剂法存在溶剂残留和生产成本高的缺点, 树脂吸附法提取的产物纯度高, 收率高, 所以树脂吸附法在天然产物分离提取中是一种大有发展前途的分离方法。大孔吸附树脂, 是近年来发展起来的一类高分子聚合物吸附剂, 具有物理化学稳定性高, 吸附选择性独特, 不受无机物存在的影响, 再生简便, 解吸条件温和, 使用周期长, 易于构成闭路循环, 节省费用等优点而广泛应用于生化物质分离纯化^[5]。

本文采用大孔树脂从酸提果胶后的超滤膜透过液^[6]中吸附分离柚皮总黄酮, 在静态吸附实验的基础上, 对动态吸附和解吸的条件进行筛选, 为采用大孔吸附树脂从柚皮果胶提取液的超滤膜透过液中分离柚皮黄酮提供理论依据和工艺条件。

1 实验部分

1.1 实验仪器及试剂

1.1.1 实验仪器 GSY-II 恒温水浴锅, 北京市医疗设备厂; UV-Vis-756MC 紫外分光光度仪, 上海精密科学仪器有限公司; 欧美特榨汁-搅拌机, 中国顺德圣康电器厂; BT-8100 高效液相色谱仪, BT-8200UV-Vis 检测器, C-R6A 积分仪, 膜设备均由南京九思高科公司提供。

1.1.2 实验试剂 柚皮苷(C₂₇H₃₂O₁₄), 标准品, 中国生物药品检验所; 甲醇, 无水乙醇, KOH 等试剂均为分析纯, 市售; AB-8 大孔树脂, 南开大学化学试剂厂; 实验用水为自制二次蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 对照品、样品溶液的配制及标准曲线的绘制

(1) 对照品溶液的配制 取干燥后的柚皮苷对照品 0.0114 g, 70%乙醇定容至刻度, 配制成浓度为 1.14 mg/mL 的柚皮苷对照溶液。

(2) 样品溶液的配制 用 200 g 新鲜柚皮粉碎, 60%的乙醇为提取液, 1:5 的料液比, 超声提取 2 次, 每次提取 30 min, 过滤, 合并滤液, 真空减压浓缩至 100 mL 得醇提液; 另外 1:5 料液比粉碎的柚皮, 用酸调 pH 至 2, 加热煮沸 1 h, 过滤, 将滤液在 63℃, pH 在 1.5~2.5, 进料压力在 0.3~0.4 MPa, 陶瓷膜孔径为 50 nm 的条件下超滤 1 h, 超滤过程中, 加入 1~2 倍重量的水稀释, 去除色素等小分子物质, 得到果胶质量分数在 3%~4% 的浓缩果胶液, 同时将超滤的透过液浓缩至一定体积得膜透过液。

收稿日期: 2007-06-29

基金项目: 湖南省自然科学基金(06JJ4117)

第一作者: 女, 1982 年生, 硕士生

E-mail: Apone0304@126.com

(3)标准曲线的绘制^[7] 柚皮苷对照液与 KOH 显色,在 410 nm 处测定,采用最小二乘法建立其标准曲线的线形回归方程为:

$$A = -0.0015 + 51.964c$$

其中, A 为吸光度; c 为柚皮苷浓度, mg/mL; 相关系数 $R = 0.99977$, $P < 0.0001$ 。

1.2.2 高效液相色谱条件 流动相: 甲醇、冰醋酸、水的体积比为 40:1:59,检测波长为 283 nm,进样量为 6 μ L,流速为 0.6 mL/min^[8]。

1.2.3 树脂预处理^[9] 将大孔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,再用去离子水洗尽醇,最后转入酸碱处理(用 5% HCl 溶液浸泡 3 h,而后用去离子水洗至出水 pH 值为中性;用 5% NaOH 溶液,浸泡 3 h,而后用去离子水洗至出水 pH 值中性),备用。

1.2.4 静态饱和吸附量和动态饱和吸附量、解吸率的考察 树脂饱和吸附量及解吸率按参考文献[10]测定。

1.2.5 酸度对树脂吸附的影响^[11] 分别取 10 mL 已知柚皮苷浓度的醇提取液,稀释至 50 mL,用浓盐酸调 pH 到 2、3、4、5,加入到 1 g 湿树脂中(相当于干树脂 0.345 g),静态吸附 24 h 后测定溶液中剩余柚皮苷含量:

$$m = m_1 - m_2$$

式中, m 为树脂吸附的柚皮苷质量, g; m_1 为已知的柚皮苷质量, g; m_2 为吸附剩下的柚皮苷的量, g。

1.2.6 浓度对泄露点的影响 将不同浓度的醇提取液加入到装有 10 cm 的树脂的层析柱中,每 2 mL 流出液收集一管,测定其吸光度。

1.2.7 洗脱剂浓度对洗脱率的影响^[8] 将一定浓度的醇提取液加到装有一定高度的树脂的层析柱中,分别用 50 mL 20%、50%、75% 和无水乙醇洗脱,收集洗脱液,根据回收柚皮苷的得率确定洗脱剂的浓度。

1.2.8 树脂再生方法,使用次数 用工业乙醇(乙醇质量分数为 95%)淋洗,然后用水反复冲至乙醇与水混合无白色混浊。吸附过后的树脂经洗脱,乙醇淋洗,水洗,直至乙醇与水混合无白色浑浊,再上柱,通过吸附的结果考察使用次数。

1.2.9 HPLC 分析 HPLC 分析膜透过液和直接醇提取液,其中膜透过液和直接醇提取液均通过减压浓缩到一定体积,分别加到装有一定高度的树脂的层析柱中,待吸附一段时间后,用一定量体积的水洗去

糖及杂质,至苯酚-浓硫酸法^[12]检测不出糖,再用 50% 的乙醇洗脱,收集洗脱液,分析。

2 结果与讨论

2.1 大孔树脂静态、动态吸附解吸结果

AB-8 大孔树脂动态及静态吸附实验数据见表 1。

表 1 树脂静态动态吸附量与解吸率考察
Table 1 Static adsorption amount and desorption ratio of the resin

上样液	静态		动态	
	饱和吸附量/(mg/g)	解吸率/%	饱和吸附量/(mg/L)	解吸率/%
醇提液	8.53	80.8	9.14	95.2
膜透过液	13.48	80.7	7.9	93.3

从表 1 可以看出膜透过液的静态饱和吸附量大于醇提液的,动态结果显示解吸率都在 90% 以上。所以醇提液和膜透过液均可用大孔树脂纯化。

2.2 酸度对树脂吸附的影响

按照 1.2.5 步骤中方法计算树脂吸附的柚皮苷的量,结果见图 1。当 pH 值为 2 时(相当于膜透过液 pH)树脂吸附量达最大。柚皮提取液的 pH 对化合物在吸附分离过程中有一定影响,吸附过程中吸附质以分子状态被吸附剂吸附,因此要达到较好的效果必须使吸附质保持分子状态,黄酮类化合物为多羟基酚类,呈弱酸性,因而在酸性或弱酸性条件下易被吸附, pH 未调即为 6.5 左右的时候,吸附较少,而 pH 值为 2 时效果较好, pH 为 3~5 时,吸附量没有显著差别,可能是因为酸性条件下黄酮类化合物保持了分子状态,不会形成伴盐($R-OH^+$),膜透过

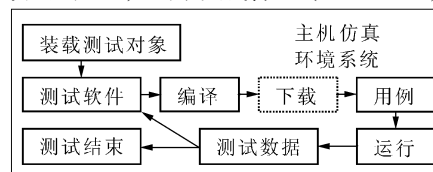


图 1 酸度对树脂吸附的影响

Fig. 1 Influence of the acidity on the adsorption performance of the resin

液又除去了大量果胶、蛋白质等大分子的原因,使黄酮类化合物有更多的接触树脂的机会^[13]。

2.3 洗脱剂浓度对柚皮苷洗脱率的影响

乙醇作为洗脱剂,50%的乙醇洗脱的柚皮苷的回收率可以达到63%(见图2),综合洗脱率及成本最终确定洗脱剂为浓度为50%的乙醇。

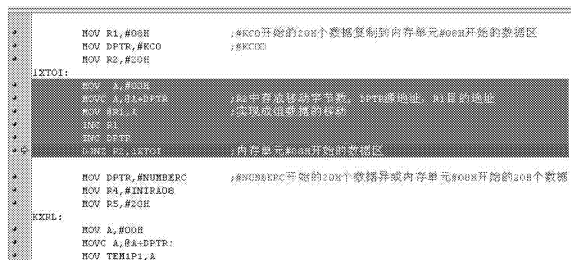


图2 洗脱剂浓度对柚皮苷洗脱率的影响

the elution ratio

2.4 柚皮苷浓度对泄露点的影响

分别将浓度为0.43和0.48 mg/mL的提取液加入到装有10cm的树脂的层析柱中,每2mL流出液收集一管,测定其吸光度,结果见图3,选择上样液浓度为0.43~0.48 mg/mL为宜,采用浓度为0.48 mg/mL上样液时,树脂最大处理量为4倍柱体积(BV)。



上样液浓度: ■—0.43 mg/mL; ●—0.48 mg/mL

图3 柚皮苷浓度对泄露点的影响

Fig. 3 Influence of the concentration of naringin on the breakthrough point

2.5 树脂重复使用次数考察

树脂重复使用6次后,对总黄酮吸附率无明显下降(见图4),但溶液中细小的结晶易造成树脂流速的降低,工业生产中可以采用玻璃纤维作为过滤筛,当树脂使用6次后,建议再生再继续使用,故

AB-8大孔树脂宜重复使用6次。



图4 树脂使用次数对柚皮苷吸附率的影响

Fig. 4 Influence of recycle times of the resin on the Naringin's adsorb performance

2.6 HPLC 测定结果

HPLC测定柚皮苷对照品、醇提液和膜透过液,结果见图5,在实验选定的条件下,其主要成分的出峰时间均为20.5 min,峰形基本与柚皮苷对照液一致,HPLC测定柚皮苷对照品、树脂处理后醇提和膜透过液的洗脱液色谱图,对照显示醇提液和膜透过液在成分上没有发生改变。



a—柚皮苷对照品;b—醇提液;c—膜透过液

图5 HPLC测定柚皮苷对照品、醇提和膜透过液色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of a standard sample of naringin, the alcohol extract and the solution permeated through the membrane, which extracted by hydrochloric acid

3 结论

(1) AB-8大孔树脂对酸提果胶后膜透过液回收柚皮黄酮是可行的。

(2) 用50%的乙醇洗脱,树脂可重复使用6次。

(3) 膜透过液与醇提液在成分上没有变化,而膜透过液上柱更适合用AB-8树脂纯化,可能是因为除去果胶和蛋白质等大分子化合物后,更利于树脂吸附回收柚皮苷。

参考文献:

- [1] 杨晓泉, 张海德, 李琳. 柚皮黄酮类抗氧化物质的纯化及其降血脂作用研究[J]. 营养学报, 2004, 26(5): 378 – 381.
- [2] 李红, 敖海英, 赵征. 柑桔类黄酮功能及应用的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(1): 18 – 20.
- [3] 杨敏, 刘娟, 朱兆荣, 等. 不同提取工艺对补骨脂黄酮溶出的影响[J]. 中兽医学杂志, 2004(5): 5 – 8.
- [4] 吴启林, 袁其朋, 陈养文. 应用大孔吸附树脂吸附分离技术制备菊苣酸的研究[J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2004, 31(5): 45 – 52.
- [5] QI Yuanying, SUN Ailing, LIU Renmin, et al. Isolation and purification of flavonoid and isoflavonoid compounds from the pericarp of *Sophora japonica* L. by adsorption chromatography on 12% cross-linked agarose gel media [J]. Journal of chromatography A. 2007, 1140: 219 – 224.
- [6] 周仲实. 膜分离技术在果胶提取中的应用[J]. 食品工业科技, 2003, 24(2): 51 – 55.
- [7] 伍蔚萍, 孙文基, 阎宏涛, 等. 分光光度法测定甘草中总黄酮的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(4): 469 – 472.
- [8] 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.
- [9] 陈来同, 唐运. 生物化学产品制备技术[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2003: 79 – 80.
- [10] 刘健伟, 陈勇, 熊富良, 等. 骨碎补总黄酮提取和大孔吸附树脂纯化的工艺研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(16): 122 – 124.
- [11] 陈炳华, 李婷, 陈婧宇, 等. 大孔吸附树脂对海边月见草总黄酮的吸附及解吸特性[J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(2): 11 – 15.
- [12] 宁正祥. 食品成分分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997: 9 – 10.
- [13] 卢锦花, 胡小玲, 岳红, 等. 大孔吸附树脂提取银杏黄酮[J]. 应用化学, 2002, 19(5): 486 – 487.

Macroporous resin adsorption of the flavone from the effluent in pomelo peel processing

LI Wei¹ ZHONG ShiAn¹ QIAO Rong¹ YUAN ZhouLv¹ DU JianPing²

(1. Department of Chemistry and Chemical Engineering of Central South University, Changsha Hunan 410083;

2. Hunan Dongshan School, Xiangxiang Hunan 411400, China)

Abstract: Naringin was recovered from the effluent from the industrial processing of pomelo peel using extraction by acid, permeation through a membrane, and chromatography with a macroporous resin. The adsorption characteristics on the resin of the solution permeated through the membrane were found by HPLC to be identical to those of a direct alcohol extract of the effluent. Permeation of the solution through the membrane, however, allowed the macroporous resin to be reused at least 6 times without loss of performance. Use of the resin in the treatment of the effluent is therefore viable in an industrial plant.

Key words: pomelo; naringin; macroporous resin; adsorption; separation