

虎杖中白藜芦醇的吸附特性和稳定性研究

杜苏萌, 王媛, 任勇, 李建鹏, 王燕子 (太原工业学院环境与安全工程系, 山西太原 030008)

摘要 [目的]研究用大孔树脂吸附分离虎杖中白藜芦醇的特性及其稳定性。[方法]分析大孔树脂对白藜芦醇的吸附曲线,分析流速、乙醇体积分数、提取时间、提取温度、pH等因素对大孔树脂吸附白藜芦醇的影响。[结果]AB-8树脂对虎杖中白藜芦醇的吸附更接近单分子层吸附。以1.5 mL/min流速通过层析柱时吸附率更高,用70%乙醇提取虎杖中白藜芦醇时提取率最高,3 h是最佳提取时间;60 ℃是最佳提取温度;pH为4时白藜芦醇提取率最高。稳定性研究表明,白藜芦醇在酸性条件下保存浓度基本不变。[结论]用大孔树脂吸附分离白藜芦醇具有一定的优势。

关键词 虎杖;白藜芦醇;吸附;稳定性;大孔树脂

中图分类号 S567.23*6;Q599 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)13-0130-03

Research on the Adsorption Characteristics and Stability of Resveratrol from *Polygonum cuspidatum*

DU Su-meng, WANG Yuan, REN Yong et al (Department of Environmental and Safety Engineering, Taiyuan Institute of Technology, Taiyuan, Shanxi 030008)

Abstract [Objective]The research aimed to study the adsorption characteristics and stability of resveratrol from *Polygonum cuspidatum* by macroporous resin adsorption. [Method]The adsorption curve of resveratrol was analyzed by macroporous resin. The effects of flow rate, ethanol volum fraction, extraction time, extraction temperature and pH on the adsorption of resveratrol by macroporous resin were analyzed. [Result]The adsorption of AB-8 resin for resveratrol was more close to the monolayer adsorption. When the flow rate was 1.5 mL/min, the adsorption rate was higher; extraction rate of resveratrol from *Polygonum cuspidatum* with 70% ethanol was the highest;3 h was the optimum extraction time; 60 ℃ was the optimum extraction temperature; when the pH was 4, extraction rate of resveratrol was highest. Stability research showed that resveratrol concentration kept unchanged under acidic conditions. [Conclusion]Adsorption and separation of resveratrol by macroporous resin has some advantages.

Key words *Polygonum cuspidatum*; Resveratrol; Adsorption; Stability; Macroporous resin

白藜芦醇是植物受到外界刺激而产生的一种植物抗癌素^[1-2],1940年首次从毛叶藜芦根部分离得到^[3-5],目前已在虎杖、葡萄、花生等至少72种植物中发现白藜芦醇的存在^[6-7]。研究表明,白藜芦醇具有多种药理活性^[1-2],可预防癌症的发生及发展,具有广泛的应用价值,市场需求量大。白藜芦醇的提取方法有微波辅助法、超声提取法、超临界CO₂萃取法、酶法、有机溶剂提取法^[8-10]。大孔树脂是20世纪60年代末发展起来的一类新型树脂^[11],具有物理化学性质稳定、吸附和交换容量大、比表面积大、吸附速度快、选择性好、吸附条件温和、再生容易、强度好等优点,广泛用于天然植物中各种活性成分的提取与纯化^[12]。笔者研究AB-8树脂吸附葡萄和虎杖中白藜芦醇的吸附特性、吸附的影响因素,寻找AB-8大孔树脂吸附白藜芦醇的最优条件,为更好地提取和分离白藜芦醇提供一定的理论依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 试材。虎杖(荣华大药房);葡萄(市售);AB-8大孔树脂(食品级,天津南大树脂科技有限公司)。

1.1.2 主要仪器。蠕动泵(兰格恒流泵有限公司),离心机(无锡市龙泰化工机械设备有限公司),pH酸度计(PHS-3C,上海平轩科学仪器有限公司),紫外分光光度计(上海美析仪器),层析柱(规格1.5 cm×20 cm,太原兴昌盛仪器有限公司)。

1.1.3 主要试剂。白藜芦醇对照品(德斯特生物,纯度98%以上),乙醇(分析纯),水为去离子水,其他试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 白藜芦醇标准曲线的绘制。精密吸取白藜芦醇对照品溶液5 mg/mL,分别稀释成0.05、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80 mg/mL的溶液,依次在紫外分光光度计306 nm处测定各浓度的吸光值,平行测定3次,求平均值,以白藜芦醇标准品浓度(mg/L)为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线,得出线性回归方程。

1.2.2 白藜芦醇的提取。把虎杖烘干粉碎,过40目筛,准确称取2 g置于250 mL锥形瓶中,每次加入50 mL体积分数为70%的乙醇,60 ℃下水浴加热3 h,多次提取,直至提取液中不含白藜芦醇为止,合并各次提取液,测定吸光度,根据标准曲线方程计算出白藜芦醇浓度。提取率的计算公式如下:

$$\text{提取率} = \frac{m_2}{m_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中, m_1 为2 g虎杖中总白藜芦醇的质量; m_2 为每次从2 g虎杖中提取出的白藜芦醇的质量。

1.2.3 白藜芦醇的吸附。取经预处理的AB-8型湿树脂2.0 g,装入15 mm×200 mm层析柱中,加入白藜芦醇提取液25 mL,置于恒温振荡器上振荡(45 ℃、180 r/min)吸附白藜芦醇,4 h后过滤,得滤液1,测定滤液1中白藜芦醇质量浓度,计算吸附量 Q 。滤去粗提液后的树脂经蒸馏水洗2次,滤干,精密加入70%乙醇溶液50 mL,在相同的条件下解吸2 h后过滤,得滤液2,测定滤液2中白藜芦醇的质量浓度。根据吸附量计算吸附率和解吸率,研究树脂的吸附动力学,相关计算公式如下:

$$\text{吸附量 } Q = \frac{(C_0 - C_1) \times V_1}{m} \quad (2)$$

$$\text{吸附率} = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{解吸率} = \frac{C_2 V_2}{(C_0 - C_1) \times V_1} \times 100\% \quad (4)$$

式中, Q 为白藜芦醇吸附量 (mg/g 湿树脂); C_0 为起始质量浓度 (mg/mL); C_1 为滤液 1 的质量浓度 (mg/mL); C_2 为滤液 2 的质量浓度 (mg/mL); V_1 为吸附溶液体积 (mL); V_2 为解吸溶液体积 (mL); m 为树脂质量 (g)。

1.2.4 白藜芦醇吸附等温线。 吸附等温线是在 293 K 温度下, 分别用 50 mL 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mg/mL 的白藜芦醇溶液, 以 1.5 mL/min 的流速通过装有 20 g 树脂的层析柱进行吸附试验, 收集 50 mL 流出液, 测定白藜芦醇浓度。

1.2.5 各因素对白藜芦醇吸附率的影响。

1.2.5.1 白藜芦醇溶液流速。 把 50 mL 浓度为 1 mg/mL 的白藜芦醇溶液, 分别以流速为 1.5、2.7、3.5、6.0、7.2 mL/min 通过装有 20 g 的 AB-8 大孔树脂的层析柱, 收集 50 mL 流出液, 测定吸光度, 根据标准曲线方程计算出白藜芦醇浓度, 并根据公式(3)计算吸附率。

1.2.5.2 乙醇体积分数。 将 95% 乙醇溶液分别用水稀释至 30%、40%、60%、70%、80%, 称取 5 份虎杖粗粉, 每份 5 g, 分别加入 50 mL 不同浓度的乙醇水溶液, 在 60 °C 下提取 1 h, 测定不同乙醇体积分数的白藜芦醇提取率。

1.2.5.3 提取时间。 称取 6 份虎杖粗粉, 每份 5 g, 分别在 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 h 提取白藜芦醇, 计算白藜芦醇提取率。

1.2.5.4 提取温度。 称取 4 份虎杖粗粉, 每份 5 g, 用 70% 乙醇分别在 40、50、60、70 °C 下浸提 3 h, 测定白藜芦醇浓度, 计算提取率。

1.2.5.5 pH。 白藜芦醇起始浓度一定时, 分别在 pH 为 3、4、5、6、7 时, 以 1.5 mL/min 流速通过层析柱, 测定白藜芦醇吸附率。

1.2.6 pH 对芦醇浓度稳定性的影响。 用白藜芦醇标准品配制 3 份 pH 分别为 3、7、11 且初始浓度为 10 mg/mL 的溶液, 并在 20、30、50、100、150 min 时测定浓度。

2 结果与分析

2.1 白藜芦醇标准曲线的绘制 按照“1.2.1”方法操作, 以白藜芦醇标准品浓度为横坐标 (x)、吸光度为纵坐标 (y) 绘制标准曲线如图 1 所示, 计算线性回归方程为 $y = 0.1933x + 0.3544$ ($R^2 = 0.9551$), 表明白藜芦醇浓度在 0.05 ~ 0.80 mg/mL 呈现良好的线性关系。

2.2 白藜芦醇的提取 按照“1.2.2”方法操作, 根据总提取液的吸光度, 由标准曲线方程计算出 2 g 虎杖中白藜芦醇含量为 45.29 mg。

2.3 白藜芦醇的吸附等温线 按照方法“1.2.4”操作, 以溶液浓度为横坐标、吸附量为纵坐标绘制吸附等温线(图 2),

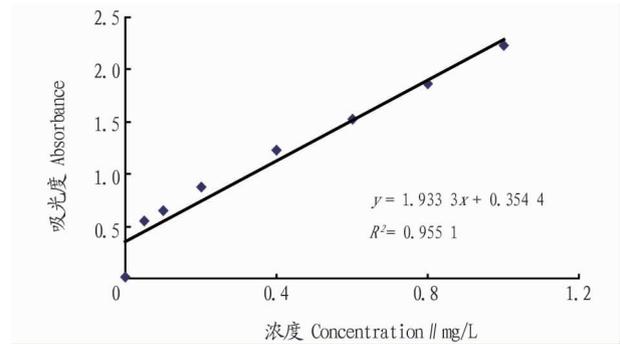


图 1 白藜芦醇标准曲线

Fig. 1 Standard curve of resveratrol

结果表明, 随着吸附溶液浓度的增加, 吸附量也随着增加, 但当溶液浓度增加至 0.4 mg/mL 时, 再增加溶液浓度吸附量不变, 说明大孔树脂已经吸附饱和, 根据曲线特征, AB-8 大孔树脂吸附白藜芦醇属于单分子层吸附。

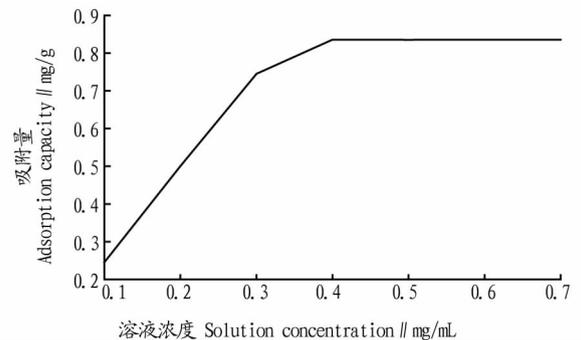


图 2 白藜芦醇的吸附等温线

Fig. 2 Adsorption isotherm of resveratrol

2.4 各因素对白藜芦醇吸附的影响

2.4.1 白藜芦醇溶液流速对其吸附的影响。 按照“1.2.5.1”方法操作, 吸附率计算参照公式(3)进行, 以流速为横坐标、吸附率为纵坐标绘制曲线。结果表明(图 3), 当流速为 1.5 mL/min 时吸附率最高, 随着流速的增加吸附率不断降低, 当流速达 7.2 mL/min 及以上时, 吸附率几乎降为 65% 以下。因此, 白藜芦醇溶液的最佳流速是 1.5 mL/min。

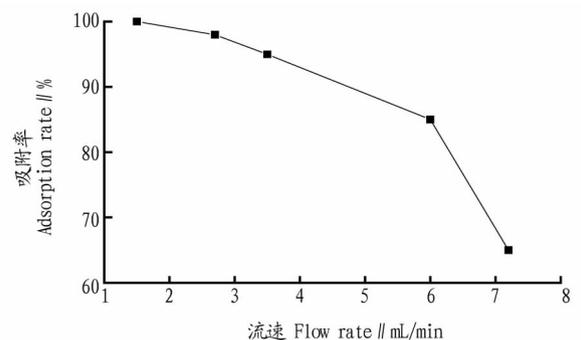


图 3 白藜芦醇溶液流速对其吸附率的影响

Fig. 3 Effect of flow rate of resveratrol on its adsorption rate

2.4.2 乙醇体积分数对白藜芦醇提取率的影响。 按照“1.2.5.2”方法操作, 提取率计算参照公式(1)进行, 以乙醇体积分数为横坐标、提取率为纵坐标绘制曲线。结果表明(图 4), 在乙醇体积分数为 30% ~ 70% 时, 随着乙醇体积分

量的增加提取率也随着增加,到70%乙醇时提取率最大,此时再增加乙醇体积分数提取率反而下降。因此,最适宜的乙醇体积分数为70%。

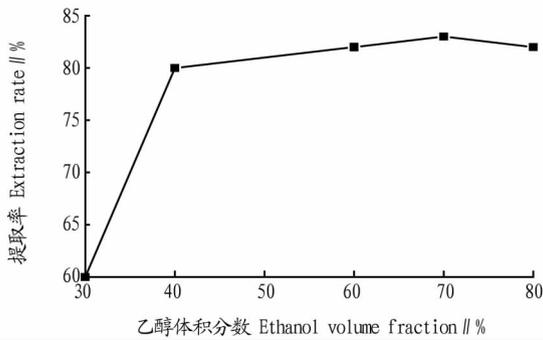


图4 乙醇体积分数对白藜芦醇提取率的影响

Fig. 4 Effect of ethanol volume fraction on the extraction rate of resveratrol

2.4.3 提取时间对白藜芦醇提取率的影响。按照“1.2.5.3”方法操作,提取率计算参照公式(1)进行,以提取时间为横坐标、提取率为纵坐标绘制曲线。结果表明(图5),随着提取时间的延长,提取率增加,当提取时间为3 h时,提取率达到最大,此时再延长提取时间提取率不变。因此,最佳提取时间为3 h。

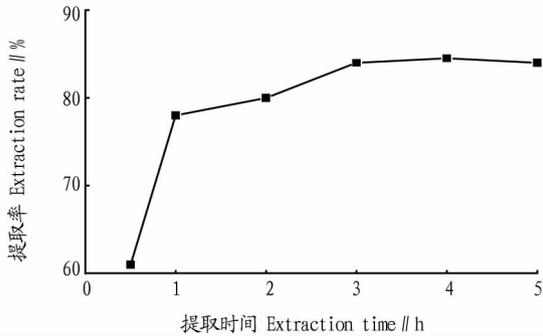


图5 提取时间对白藜芦醇提取率的影响

Fig. 5 Effect of extraction time on the extraction rate of resveratrol

2.4.4 提取温度对白藜芦醇提取率的影响。按照“1.2.5.4”方法操作,提取率计算参照公式(1)进行,以提取温度为横坐标、提取率为纵坐标绘制曲线。结果表明(图6),在提取温度为40~60℃时,随着温度的提升,提取率增加,当温度达60℃时提取率最高;当温度超过60℃时,提取率出现下降的趋势。因此,最佳的提取温度为60℃。

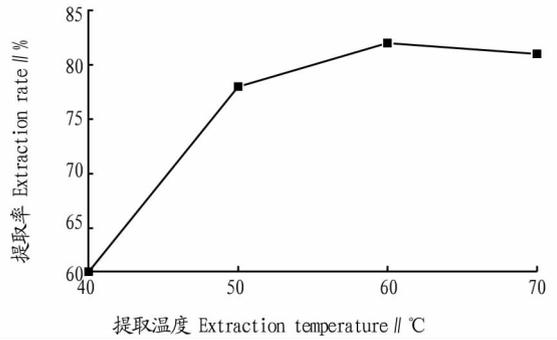


图6 提取温度对白藜芦醇提取率的影响

Fig. 6 Effect of extraction temperature on the extraction rate of resveratrol

2.4.5 pH对白藜芦醇吸附率的影响。按照“1.2.5.5”方法操作,吸附率计算参照公式(3)进行,以pH为横坐标、吸附率为纵坐标绘制曲线。结果表明(图7),pH为4时,吸附率最高,当pH低于4或高于4时,提取率均明显呈现下降的趋势。因此,白藜芦醇吸附的最适pH为4。

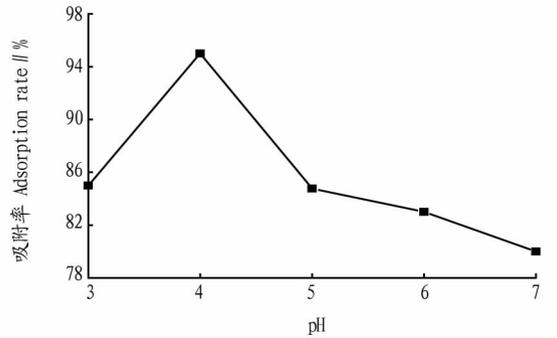


图7 pH对白藜芦醇吸附率的影响

Fig. 7 Effect of pH on the adsorption rate of resveratrol

持不变;当白藜芦醇溶液pH为11时,随着溶液保存时间的延长,白藜芦醇溶液浓度变化很大,从10.0 mg/mL降至8.7 mg/mL;当白藜芦醇溶液pH为7时,白藜芦醇溶液随着保存时间的延长,浓度也随之有所下降,但下降幅度不及pH为11时。

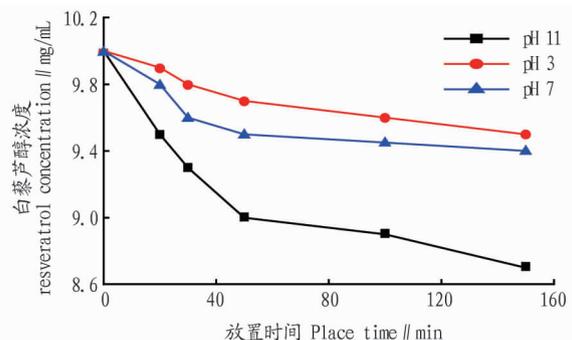


图8 pH对白藜芦醇浓度稳定性的影响

Fig. 8 Effect of pH on the stability of resveratrol concentration

3 结论与讨论

该研究发现AB-8树脂对虎杖中白藜芦醇的吸附等温曲线更接近单分子层吸附,所以推测大孔树脂吸附白藜芦醇属于物理吸附,依赖大孔树脂和白藜芦醇之间的范德华引力吸附。

研究不同因素对白藜芦醇吸附的影响发现,以1.5 mL/min流速通过层析柱时吸附率最高,流速越高可能导致大孔树脂和白藜芦醇之间来不及吸附,便被大的流速冲击

(下转第140页)

墨西哥湾株 FL_21 聚成一个小的分支。但这个分支在 2 个树中的相对位置不同,分别处于不同的大分支上。造成这种现象的原因,还有待进一步探讨。

参考文献

- [1] 范超. 斑石鲷卵鞭虫病和上皮囊肿病的研究[D]. 上海:上海海洋大学, 2016:26-30.
- [2] PAPERNA I, ROSS B, COLORNI A, et al. Diseases of marine fish cultured in Eilat mariculture project based at the Gulf of Aqaba, Red Sea[J]. European mariculture society special publication, 1981(6):81-91.
- [3] NOGA E J. Propagation in cell culture of the dinoflagellate *Amyloodinium*, an ectoparasite of marine fishes [J]. Science, 1987, 236 (4806): 1302-1304.
- [4] BROWN E M, HOVASSE R. *Amyloodinium ocellatum* (Brown), a peridinium parasitic on marine fishes[J]. Proceedings of the zoological society of London, 1946, 116(1):33-46.
- [5] SARAIVA A, JERÓNIMO D, CRUZ C. *Amyloodinium ocellatum* (Chromalveolata; Dinoflagellata) in farmed turbot[J]. Aquaculture, 2011, 320 (1/2): 34-36.
- [6] 周胜利, 陈慧. 闽东大黄鱼人工养殖主要病害调查[J]. 中国水产, 2002 (1):52-54.
- [7] 徐绍刚, 朱华, 田照辉, 等. 漠斑牙鲆淀粉卵甲藻病的防治[J]. 科学养鱼, 2008(7):48-49.
- [8] WOO P T K. Fish diseases and disorders: Volume 1: Protozoan and metazoan infections[M]. 2nd ed. Oxon, UK: CABI Publishing, 2006:17-18.
- [9] LITAKER R W, TESTER P A, COLORNI A, et al. The phylogenetic relationship of *Pfiesteria piscicida*, Cryptoperidiniopsis sp. *Amyloodinium ocellatum* and a *Pfiesteria*-like dinoflagellate to other dinoflagellates and apicomplexans [J]. Journal of phycology, 1999, 35(6):1379-1389.
- [10] GÓMEZ F, SKOVGAARD A. The molecular phylogeny of the type-species

of *Oodinium* Chatton, 1912 (Dinoflagellata: Oodiniaceae), a highly divergent parasitic dinoflagellate with non-dinokaryotic characters[J]. Systematic parasitology, 2015, 90(2):125-135.

- [11] LEVY M G, POORE M F, COLORNI A, et al. A highly specific PCR assay for detecting the fish ectoparasite *Amyloodinium ocellatum*[J]. Diseases of aquatic organisms, 2007, 73(3):219-226.
- [12] 范超, 史成银. 硫酸铜对斑石鲷幼鱼的急性毒性及对眼点淀粉卵鞭鞭虫的杀灭效果[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(11):98-102.
- [13] 张艺, 黄伟卿, 韩坤煌, 等. 眼点淀粉卵鞭鞭虫包裹阶段生活史的观察及防治[J]. 水产科学, 2015, 34(11):722-725.
- [14] 杜庆红, 陈栩, 朱长寿, 等. 海马卵甲藻病的防治研究[J]. 海洋科学, 2005, 29(11):4-7.
- [15] 熊向英, 徐力文, 董兰芳, 等. 网箱养殖卵形鲳鲹鱼体寄生虫初步调查[J]. 广西科学院学报, 2015(4):281-285.
- [16] OLDACH D W, DELWICHE C F, JAKOBSEN K S, et al. Heteroduplex mobility assay-guided sequence discovery: Elucidation of the small subunit (18S) rRNA sequences of *Pfiesteria piscicida* and related dinoflagellates from complex algal culture and environmental sample DNA pools [J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2000, 97(8):4303-4308.
- [17] 黄殿盛, 池洪树, 黄河, 等. 眼点淀粉卵甲藻 ITS 和核糖体大亚基基因 (28S) 片段序列分析[C]//福建水产学会学术年会. 福州:福建省水产学会, 2015:370-380.
- [18] PICON-CAMACHO S M, THOMPSON W P, BLAYLOCK R B, et al. Development of a rapid assay to detect the dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Vet Parasitol, 2013, 196(3/4):265-271.
- [19] SHAO P, CHEN Y Q, ZHOU H, et al. Genetic variability in Gymnodiniaceae ITS regions: Implications for species identification and phylogenetic analysis[J]. Marine biology, 2004, 144(2):215-224.

(上接第 132 页)

下来,所以流速对吸附有影响,提取时要选择合适的流速;乙醇体积分数对白藜芦醇提取也有影响,通常 70% 乙醇提取的白藜芦醇最高;提取时间对提取率也有影响,在 3 h 时提取率最高,时间超过 3 h 时,提取率基本不变,可能乙醇对白藜芦醇的提取是一个慢慢浸提的过程,超过一定时间可以达到充分提取,所以在提取白藜芦醇时根据具体称量的原材料克数,需要摸索最佳提取时间;提取温度对白藜芦醇提取率也有一定影响,在 60 ℃ 时提取率最高,高于或低于 60 ℃ 提取率都不佳,可能白藜芦醇在这个温度下溶解性更好,超过这个温度可能会破坏白藜芦醇的结构;pH 为 4 时吸附率最高,可能在这个 pH 时白藜芦醇和大孔树脂之间的引力最大,所以在提取纯化白藜芦醇时要控制好 pH,否则会造成白藜芦醇的流失。

白藜芦醇溶液在中性和碱性条件下长期保存浓度会降低,而在酸性条件下保存,浓度基本保持不变。白藜芦醇是一种多酚类物质,可能在酸性条件下保存时,有助于保护其结构,所以在具体保存白藜芦醇溶液时要控制合理 pH,否则

会造成白藜芦醇损失。

参考文献

- [1] 田凤, 徐德生, 冯怡, 等. 虎杖药渣中白藜芦醇的提取和纯化[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(10):824-826.
- [2] 肖林霞, 卢其能, 李润根. 白藜芦醇的研究进展[J]. 现代农业科技, 2015 (24):264-265.
- [3] 汶海花, 李梦耀, 王莉莉, 等. LS-303B 大孔树脂吸附白藜芦醇的研究[J]. 应用化工, 2010, 39(7):1060-1073.
- [4] 佟瑞利, 赵娜娜, 刘成蹊, 等. 无机、有机高分子絮凝剂絮凝机理及进展[J]. 河北化工, 2007, 30(3):3-6.
- [5] 罗艳玲, 欧仕益. 大孔树脂在食品活性成分分离中的应用[J]. 食品与机械, 2005, 21(5):81-83.
- [6] 李燕, 刘军海. 大孔树脂对虎杖白藜芦醇的静态吸附动力学研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(5):82-86.
- [7] 吴朝霞, 吴朝晖. 大孔树脂纯化葡萄籽原花青素的研究[J]. 食品与机械, 2006, 22(4):46-48.
- [8] 王伏超, 任育萱, 张磊. 葡萄籽的成分开发利用与研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2015(7):151-155.
- [9] 汶海花. 葡萄废渣中白藜芦醇的提取与分离纯化研究[D]. 西安:长安大学, 2012.
- [10] 马绍英, 苏利荣, 李胜, 等. 葡萄籽中原花青素、葡萄籽油和白藜芦醇的联合提取[J]. 甘肃农业大学学报, 2015, 50(5):145-149.
- [11] 黄卫文, 黎烈烈, 姜瑞清, 等. 大孔树脂纯化花生根中白藜芦醇工艺及其动力学研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(11):120-126.
- [12] 冯艳芸, 岳田利, 王周利. 葡萄皮中白藜芦醇提取工艺优化[J]. 农产品加工, 2015(12):35-39.