

虎杖发酵液中白藜芦醇的分离纯化工艺研究

王 辉^{1,2},董悦生²,秦建全²,王亚俊²,修志龙^{2*}(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所,海南 海口 571101; 2. 大连理工大学环境与生命学院
生物科学与工程系,辽宁 大连 116024)

摘 要:目的 分离纯化虎杖发酵液中的白藜芦醇。方法 利用大孔树脂结合聚酰胺柱色谱从虎杖发酵液的提取液中纯化白藜芦醇,并研究了大孔树脂和聚酰胺对白藜芦醇的吸附动力学。结果 大孔树脂和聚酰胺对白藜芦醇的表观静态吸附量分别为 11.70 mg/g 和 57.9 mg/g,表观动态吸附量分别为 12.47 mg/g 和 58.98 mg/g,吸附行为符合 Langmuir 动力学。利用大孔树脂结合聚酰胺两步柱色谱纯化提取液中的白藜芦醇,使其纯度达到 95.8%,总收率达 69.8%。结论 此方法操作简单,成本低廉,白藜芦醇的纯度和收率高,有工业化应用前景。

关键词:虎杖;白藜芦醇;大孔树脂;聚酰胺

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)02-0223-05

Isolation and purification of resveratrol from fermentation broth of *Polygonum cuspidatum*WANG Hui^{1,2}, DONG Yue-sheng², QIN Jian-quan², WANG Ya-jun², XIU Zhi-long²

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou 571101, China; 2. Department of Bioscience and Biotechnology, School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract : Objective To isolate and purify resveratrol from fermentation broth of *Polygonum cuspidatum*. **Methods** Macroporous resin and polyamide column chromatography were combined to purify resveratrol from the extract in fermentation broth of *P. cuspidatum*, and the adsorption dynamics of resveratrol was evaluated. **Results** Apparent static adsorptive capacities of resveratrol on macroporous resin and polyamide were 11.70 and 57.9 mg/g, respectively, and apparent dynamic adsorptive capacities were 12.47 and 58.98 mg/g, respectively. Both of the adsorption isotherms correlate well with Langmuir type. After macroporous resin and polyamide two-step column chromatography, the purity of resveratrol reached 95.8%, with the yield of 69.8%. **Conclusion** It is proved the method is potential for industrial application due to its simple procedure, lower cost as well as high purity and yield of resveratrol.

Key words: *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.; resveratrol; macroporous resin; polyamide

虎杖是蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的根和茎,具有祛风利湿,散瘀定痛,止咳化痰等功效。白藜芦醇是其最有价值的成分,具有抗癌、抗炎^[1]、抗菌、抗脂质氧化^[2]等功效,现已广泛应用在食品、保健品、化妆品等行业。前期的工作已经利用米曲霉将虎杖中的白藜芦醇苷转化为白藜芦醇,使白藜芦醇的量提高到原来的 3.1 倍^[3],且利用微波辅助双水相提取工艺对虎杖粗药材中的白藜芦醇进行了有效提取^[4],并在此基础上利用该工艺对虎杖发酵液中的白藜芦醇进行了有效提取。但

提取液中还存在着许多杂质,因此,寻找一种简单易行的分离纯化方法将使白藜芦醇的成本进一步降低。白藜芦醇的纯化方法很多,如有机溶剂萃取法、高速逆流色谱法、柱色谱法等。有机溶剂萃取法消耗溶剂和能源,同时存在着环境污染问题。高速逆流色谱法步骤简单,产物纯度高,但设备昂贵,涉及有毒、强腐蚀性的有机溶剂,分离效率不高^[5,6]。柱色谱法多采用大孔树脂和聚酰胺。大孔树脂具有吸附快,解吸快,价格低廉,易于再生,使用寿命长等优点,现已广泛应用于天然产物的分离纯化。聚酰胺

* 收稿日期:2009-04-12

基金项目:教育部新世纪优秀人才基金资助项目(NCET-05-0279)

作者简介:王 辉(1981—),女,河南焦作人,助理研究员,博士,2009 年获大连理工大学工学博士学位,发表 SCI 论文 2 篇,申报专利 1 项,研究方向为天然产物的生物转化与分离纯化。

Tel: (0898) 66968572 E-mail: wanghui12000@163.com

*通讯作者 修志龙 Tel: (0411) 84706369 E-mail: zhixiu@dlut.edu.cn

性质稳定,无有害残留物,在天然产物的分离纯化中越来越显示其优势。

大孔树脂或聚酰胺虽然都能使白藜芦醇得到一定的纯化,但单独使用都不能得到高纯度的白藜芦醇。本文采用大孔树脂结合聚酰胺两步柱色谱法分离纯化虎杖发酵液中的白藜芦醇,大大提高了其纯度和收率。

1 仪器与材料

Jasco LC-1500 高效液相色谱;虎杖,产地山东,购自仙草堂大药房;白藜芦醇,美国 Sigma 公司,质量分数为 99%;AB-8 大孔树脂(16~60 目,天津市海光化工有限公司);聚酰胺(60~100 目,分析纯,武汉药新科技有限公司);菌种米曲霉(*Aspergillus oryzae* CICC 2436);乙腈为色谱纯(美国 TEDIA 公司),其他试剂均为分析纯,水为 Millipore 制备超纯水。

2 方法与结果

2.1 白藜芦醇的 HPLC 法测定^[7]

2.1.1 色谱条件:色谱柱为 Kromasil-C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为水和乙腈,梯度洗脱:0~15 min,乙腈由 31%变化到 60%,15~20 min,乙腈由 60%变化到 98%;进样量为 10 μL;体积流量为 0.7 mL/min;柱温为室温;检测波长为 306 nm。

2.1.2 标准曲线的绘制:精密称取白藜芦醇对照品 2.0 mg,加甲醇溶解并定容于 25 mL 量瓶中,摇匀,配制成 0.08 mg/mL 贮备液。用甲醇将贮备液稀释成原质量浓度的 1/10、1/5、2/5、3/5、4/5,进行液相色谱测定。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 110\,189\,000 - 103\,693.48X$ ($r = 0.999\,7$)。

2.1.3 测定:采用外标法定量。

2.2 提取液的制备:发酵液的制备同文献报道^[3]。取发酵液,加入等体积 95%乙醇,微波辅助提取。冷却,滤过,得虎杖发酵液的粗提液,其中白藜芦醇的质量浓度为 0.18 mg/mL。

另取发酵液 540 mL,加入 250 g 无水乙醇和 210 g 固体硫酸铵,微波辅助双水相提取^[4],自然冷却,取上相备用。将发酵液的微波辅助双水相提取液稀释至乙醇体积分数为 30%,放置过夜,滤过,得到白藜芦醇质量浓度为 0.507 mg/mL 的上清液,备用。将上清液浓缩成浸膏,冷冻干燥,HPLC 法测得浸膏中白藜芦醇的质量分数为 9.5%。

2.3 大孔吸附树脂柱色谱纯化白藜芦醇

2.3.1 白藜芦醇的吸附等温线的制备:将发酵液的粗提液浓缩至无醇味,加适量乙醇稀释至乙醇体积分

数为 30%,调 pH 值为 2。放置过夜,离心,取上清液,作为样液(白藜芦醇的质量浓度为 0.30 mg/mL)。取样液,并将其稀释为不同质量浓度。分别取样液 50 mL,加入大孔树脂 0.3 g,25℃ 振摇 12 h,使其达到吸附平衡,结果见图 1。当白藜芦醇质量浓度达到 0.24 mg/mL 时,吸附量达 11.97 mg/g,且不再随质量浓度的增加而增加。

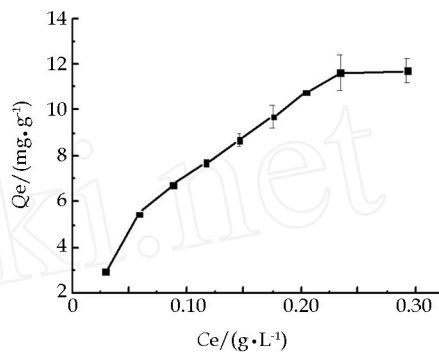


图 1 大孔树脂对白藜芦醇的吸附等温线

Fig 1 Effect of macroporous resin on adsorption isotherm of resveratrol

为了进一步验证吸附类型,对图 1 的实验数据分别用 Langmuir 公式(1)和 Freundlich 公式(2)进行拟合,以线性相关程度判断吸附类型。Langmuir 公式拟合结果见图 2,可知, $Q_m = 18.11$, C_e/Q_e 对 C_e 有较好的线性关系,相关系数较高 ($R > 0.99$),表明大孔树脂对白藜芦醇的吸附符合 Langmuir 吸附特征,即白藜芦醇在大孔树脂上的吸附遵循单分子层吸附模型。用 Freundlich 公式拟合的结果线性较差(未给出图),说明聚酰胺树脂对白藜芦醇的吸附不符合 Freundlich 所描述的多层吸附。

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{Q_m b} + \frac{1}{Q_m} C_e \quad (1)$$

$$\ln Q_e = \ln a + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (2)$$

C_e 是白藜芦醇的平衡浓度, Q_e 是白藜芦醇的平衡吸附量, Q_m 是白藜芦醇的极限吸附量

2.3.2 对白藜芦醇的动态吸附:精确称取 AB-8 大孔树脂 10.0 g,湿法装柱(10 cm × 2.1 cm),用 95%乙醇浸泡 24 h,并加水淋洗至无醇味。将白藜芦醇质量浓度为 0.18 mg/mL 的样液调 pH 值至 2,以 2 mL/min 上样,同时控制洗脱液体积流量为 2 mL/min,每 10 mL 接一管,进行 HPLC 法检测,结果见图 3。当上样量达到 820 mL 时,流出液中白藜芦醇的质量浓度与样液中的一致,表明大孔树脂的吸附已经达到饱和。计算得出大孔树脂对白藜芦醇的动态吸附量为 12.47 mg/g 湿树脂。

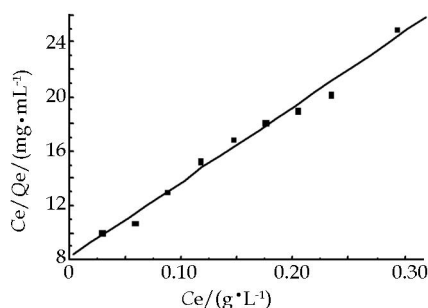


图 2 大孔树脂对白藜芦醇的 Langmuir 吸附等温线

Fig 2 Effect of macroporous resin on Langmuir adsorption isotherm of resveratrol

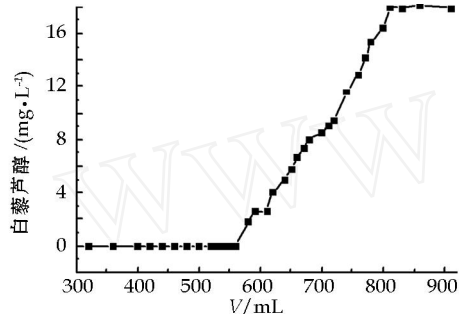


图 3 白藜芦醇在大孔树脂上的泄漏曲线

Fig 3 Leaking curve of resveratrol on macroporous resin

2.3.3 白藜芦醇洗脱条件的考察:为确定洗脱液的最佳体积分数,取白藜芦醇质量浓度为 0.18 mg/mL 提取液 200 mL 进行柱色谱分离,上样体积流量为 2 mL/min。所用色谱柱直径为 2.1 cm,柱高为 10 cm,高径比约为 5:1,柱体积为 50 mL。分别用水 3 BV (3 倍柱体积),25%乙醇 3 BV,35%、45%乙醇各 4 BV,60%、70%乙醇各 1 BV 洗脱,洗脱体积流量为 2 mL/min,每 15 mL 接一管,进行 HPLC 法检测,结果见图 4。0~200 mL 为 35%乙醇的洗脱液,200~400 mL 为 45%乙醇的洗脱液。用 35%乙醇洗脱时,前 3 BV 基本没有白藜芦醇洗脱,第 4 BV 时有少量的白藜芦醇洗脱下来,说明 35%乙醇为洗脱白藜芦醇的边界体积分数。用 45%乙醇进行洗脱,可将白藜芦醇大量洗脱下来。

2.3.4 大孔树脂柱色谱纯化提取液中的白藜芦醇:精确称取大孔树脂 25.0 g,湿法装柱(2.1 cm × 30 cm,柱体积为 114 mL)。将发酵液的微波辅助双水相提取液稀释至乙醇体积分数为 30%,放置过夜,离心,得到白藜芦醇质量浓度为 0.51 mg/mL 的上清液。取上清液 550 mL 进行柱色谱,分别以水 4 BV,35%乙醇 4 BV,40%乙醇 4 BV,45%乙醇 1 BV 进行洗脱。HPLC 分析得白藜芦醇主要富集于 40%乙醇的洗脱液中。收集 40%乙醇的洗脱液 420

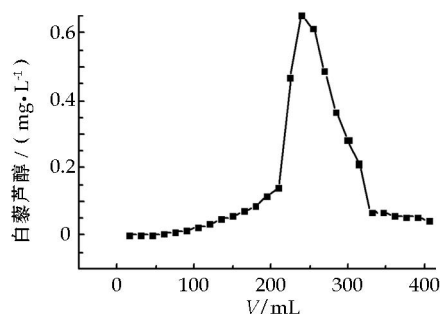


图 4 乙醇对大孔树脂吸附白藜芦醇的洗脱

Fig 4 Elution of resveratrol on macroporous resin by ethanol

mL,取其中 320 mL 浓缩,冷冻干燥,得 321.6 mg 黄色粉末。测得白藜芦醇的质量分数为 50.0%,收率为 75.9%。

2.4 聚酰胺柱色谱对白藜芦醇的纯化

2.4.1 对白藜芦醇的静态吸附:取提取液,调 pH 值为 2,并将其稀释为不同质量浓度。分别取样液 50 mL (白藜芦醇质量浓度为 0.30 mg/mL),加入聚酰胺 0.05 g,25℃ 吸附 12 h,使其达到吸附平衡,静态吸附曲线见图 5。当白藜芦醇质量浓度大于 0.17 mg/mL 时,聚酰胺对其吸附量不再增加。为了进一步验证吸附类型,对图 5 的实验数据分别用 Langmuir 公式(1)和 Freundlich 公式(2)进行拟合,以线性相关程度判断吸附类型,结果见图 6。可知, $Q_m = 78.55 \text{ mg/g}$, C_e/Q_e 对 C_e 有较好的线性关系,相关系数较高 ($R > 0.99$),表明聚酰胺树脂对白藜芦醇的吸附符合 Langmuir 吸附特征,即白藜芦醇在聚酰胺上的吸附遵循单分子层吸附模型。用 Freundlich 公式拟合的结果线性较差(未附图),说明聚酰胺树脂对白藜芦醇的吸附不符合 Freundlich 所描述的多层吸附。

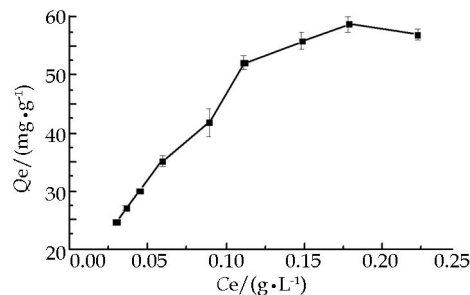


图 5 聚酰胺对白藜芦醇的静态吸附曲线

Fig 5 Static adsorption curve of resveratrol on polyamide

2.4.2 对白藜芦醇的动态吸附:精确称取干燥聚酰胺树脂(颗粒度 60~100 目)3.0 g,加水浸泡 12 h,湿法装柱(5.5 cm × 2.1 cm)。取白藜芦醇质量浓度为 0.16 mg/mL 的提取液 1800 mL,以 2 mL/min 的

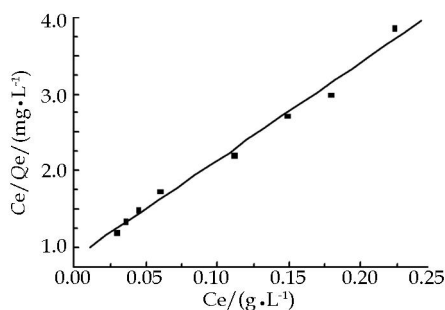


图 6 白藜芦醇在聚酰胺上的 Langmuir 吸附等温线

Fig 6 Langmuir adsorption isotherm of resveratrol on polyamide

体积流量上样,控制洗脱液体积流量为 2 mL/min,每 10 mL 接一管, HPLC 法检测,结果见图 7。当上样量达到 1 600 mL 时,流出液中白藜芦醇的质量浓度不再变化,说明此时树脂已达到吸附饱和。计算出白藜芦醇的饱和吸附量为 58.98 mg/g。

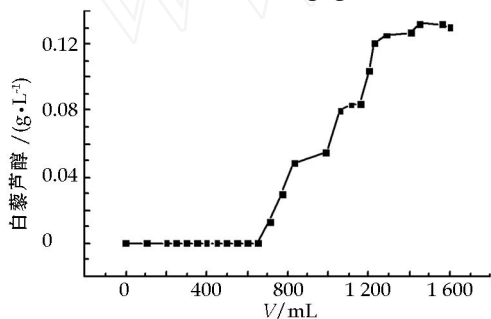


图 7 聚酰胺对白藜芦醇的动态吸附曲线

Fig 7 Dynamic adsorption curve of resveratrol on polyamide

2.4.3 白藜芦醇的洗脱:为研究乙醇对白藜芦醇的洗脱性能,取白藜芦醇质量浓度为 0.16 mg/mL 的提取液 300 mL 进行柱色谱分离,所用色谱柱直径为 2.1 cm,柱高为 25 cm,高径比为 12:1,柱体积为 87 mL。分别用纯水 3 BV, 30%、40%、50%、60% 乙醇各 4 BV 洗脱,洗脱流速为 2 mL/min,每 10 mL 接一管,进行 HPLC 法检测,结果见图 8。0~330 mL 洗脱液为 40% 乙醇,330~630 mL 洗脱液为 50% 乙醇,可见白藜芦醇主要被 40%~50% 乙醇洗脱。

2.4.4 聚酰胺柱色谱纯化提取液中的白藜芦醇:精确称取聚酰胺 20.0 g,加水浸泡 12 h,湿法装柱(30 cm × 2.1 cm,柱体积为 114 mL)。将发酵液的微波辅助双水相提取液稀释至乙醇体积分数为 30%,放置过夜,离心,得到白藜芦醇质量浓度为 0.51 mg/mL 的上清液。取上清液 100 mL 进行柱色谱,所用色谱柱内径为 2.1 cm,柱高为 30 cm,高径比为 15:1。分别用纯水 3 BV, 30%、40%、50% 乙醇各

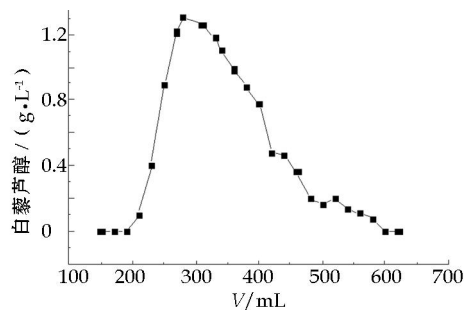


图 8 乙醇对聚酰胺上白藜芦醇的洗脱

Fig 8 Elution of resveratrol on polyamide by ethanol

4 BV 洗脱。HPLC 分析表明,白藜芦醇主要富集于 50% 乙醇洗脱液中。收集 50% 乙醇的洗脱液,浓缩,冷冻干燥,得到质量分数为 59.0% 的白藜芦醇 69.3 mg,收率为 80.7%。

2.5 大孔树脂结合聚酰胺柱色谱纯化提取液中的白藜芦醇:取大孔树脂纯化所得洗脱液 100 mL,稀释,使乙醇体积分数小于 30%,进行聚酰胺柱色谱分离。所用色谱柱直径为 2.1 cm,柱高为 30 cm,高径比为 15:1。分别用 30%、40%、50%、60% 乙醇各 2 BV 洗脱。HPLC 法跟踪检测得白藜芦醇富集于 50%、60% 乙醇的洗脱液中。收集 50%、60% 乙醇洗脱液,浓缩,冷冻干燥,得白藜芦醇粉末 48.7 mg,测得其质量分数为 95.8%,收率为 92.0%。两步纯化总收率达 69.8%,纯化倍数达 10.1 倍,见表 1。

表 1 白藜芦醇的纯化

Table 1 Purification of resveratrol

纯化步骤	质量分数/ %	收率/ %	纯化倍数
样液	9.5	100	1.0
大孔树脂柱色谱	50.0	75.1	5.3
聚酰胺柱色谱	95.8	69.1	10.1

3 讨论

Chen 等以氯仿-甲醇-水(4:3:2)为流动相,利用高速逆流色谱技术从虎杖提取液中分离纯化白藜芦醇和白藜芦醇苷,得到质量分数大于 99% 的白藜芦醇^[6],但是收率仅达到 1.07%,且所用试剂毒性大,限制了其工业化应用。Gu 等用 12% 的交联琼脂糖(Superose-12 HR 10/30)作固定相,甲醇和醋酸体系作流动相梯度洗脱,得到收率为 61%,质量分数为 96% 的白藜芦醇^[8]。虽然一步分离得到高纯度的产物,但琼脂糖价格昂贵,一般用于纯化高附加值的蛋白产品。

大孔树脂近年来广泛应用于中草药有效成分的分离纯化,并取得了很好的效果。向海艳等利用 NKA- 树脂纯化虎杖提取液中的白藜芦醇,使其质量分数达 31.6%^[9]。瞿卫林等采用 HPD-500 树

脂对虎杖粗提物中的白藜芦醇进行初步富集、分离和纯化,使白藜芦醇的质量分数由粗提物中 9.25% 提高至 39.5%^[10]。本实验使用的 AB-8 大孔树脂对白藜芦醇具有较高的吸附量和解吸率,在收率为 75.9% 的前提下,使白藜芦醇的质量分数由粗提液中的 9.5% 提高到 50.0%,纯化倍数达 5.3 倍。

由于聚酰胺具有安全无毒的特点,因此在中草药有效成分的分离纯化中倍受青睐。赵金华将含白藜芦醇的提取液用聚酰胺柱进行两次柱色谱分离,4

析晶后得质量分数为 97.5% 的白藜芦醇^[11]。

在柱色谱分离纯化中,纯度的提高必然带来收率的相应降低,所以单用一种填料进行柱色谱分离纯化有效成分,并不能同时保证高纯度和高收率。用吸附机制不同的填料进行两步柱色谱,有利于产品的纯化。AB-8 型大孔树脂对白藜芦醇的吸附为疏水吸附,而聚酰胺为氢键作用。仅用大孔树脂纯化白藜芦醇,其质量分数为 50.0%,收率为 75.9%;仅用聚酰胺纯化,质量分数为 59.0%,收率为 80.7%。利用大孔树脂结合聚酰胺两步纯化白藜芦醇,产品质量分数可以达到 95.8%,总收率为 69.8%。该工艺操作简单,收率高,且大孔树脂和聚酰胺价格低廉,可再生,因此易于实现工业化生产。

参考文献:

[1] Bertelli A A, Ferrara F, Diana G, et al. Resveratrol, a natural stilbene in grapes and wine, enhances intraphagocytosis in

human promonocytes: a co-factor in antiinflammatory and anticancer chemopreventive activity [J]. *Int J Tissue React*, 1999, 21: 93-104.

[2] Filip V, Plockov á M, Šmidrkál J, et al. Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness [J]. *Food Chem*, 2003, 83: 585-593.

[3] Wang H, Liu L, Guo Y X, et al. Biotransformation of piceid in *Polygonum cuspidatum* to resveratrol by *Aspergillus oryzae* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75: 763-768.

[4] Wang H, Dong Y S, Xiu Z L. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of piceid, resveratrol and emodin from *Polygonum cuspidatum* by ethanol/ ammonium sulphate systems [J]. *Biotechnol Lett*, 2008, 30: 2079-2084.

[5] Yang F Q, Zhang T Y, Ito Y. Large-scale separation of resveratrol, anthraglycoside A and anthraglycoside B from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 919: 443-448.

[6] Chen L, Han Y S, Yang F Q, et al. High-speed counter-current chromatography separation and purification of resveratrol and piceid from *Polygonum cuspidatum* [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 907: 343-346.

[7] 周建军,张宏杰,杨培君,等. 汉中地区虎杖中白藜芦醇苷及苷元含量的测定[J]. *中草药*, 2002, 33(5): 414-416.

[8] Gu M, Su Z G, Janson J C. One-step purification of resveratrol and polydatin from *Polygonum cuspidatum* (Sieb. & Zucc.) by isocratic hydrogen bond adsorption chromatography on cross-linked 12% agarose [J]. *Chromatographia* 2006, 64, 701-704.

[9] 向海艳,周春山,杜邵龙. 大孔吸附树脂法分离纯化虎杖中白藜芦醇的研究[J]. *中草药*, 2005, 36(2): 207-210.

[10] 瞿卫林,陈晓祥,赵伯涛. 大孔吸附树脂分离虎杖中白藜芦醇的研究[J]. *中国野生植物资源*, 2005, 24(6): 60-64.

[11] 赵金华,康 晖,姚光辉,等. 虎杖苷和白藜芦醇的新制备方法[P]. 中国专利, CN 1546503A, 2004-11-17.

大孔树脂分离纯化川西獐牙菜中环烯醚萜苷类和吡啶酮类成分的工艺研究

马丽娜¹, 张铁军^{2*}, 田成旺², 王圣明², 韩世柳³, 赵 强³

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津药物研究院中药现代研究部, 天津 300193; 3. 天津大学, 天津 300072)

摘要:目的 研究大孔吸附树脂分离纯化川西獐牙菜中环烯醚萜苷类和吡啶酮类成分的工艺。方法 考察了 HPD-300、HPD-400、HPD-600、AB-8、DM-301 及 D-101 等 6 种吸附树脂对环烯醚萜苷类和吡啶酮类的指标成分獐牙菜苦苷和当药醇苷的动态吸附及洗脱性能,从中筛选出效果较好的树脂完成实验研究。结果 HPD-300 用于同时分离纯化环烯醚萜苷类和吡啶酮类成分,吸附洗脱性能良好,其吸附过程上样量为 0.9 g 生药/mL 树脂,上柱液 pH 值约为 8,体积流量为 2 BV/h;洗脱过程采用水洗除杂,7 BV 20%、5BV 70%乙醇梯度洗脱,洗脱率都在 90% 以上,所得 2 个固体样品中两类成分质量分数均可达 50% 以上。结论 HPD-300 用于同时富集环烯醚萜苷类和吡啶酮类成分效果最佳,是一种理想的分离纯化介质。

关键词:川西獐牙菜;环烯醚萜苷类;吡啶酮类;大孔吸附树脂

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)02-0227-05

* 收稿日期:2009-05-07

基金项目:天津市应用基础及前沿技术 research 计划(08JCZDJ C24700)

作者简介:马丽娜,女,硕士,主要进行中药研究与开发。

* 通讯作者 张铁军 Tel:(022)23006848