

大孔吸附树脂纯化白箬叶总多酚的工艺优化

岑叶盛¹, 李小龙¹, 陈淑娟², 刘向前³, 曾庆钱⁴, 梁宗锁¹, 张晓丹^{1*}

1. 浙江理工大学生命科学与医药学院, 浙江 杭州 310018

2. 湖南职业技术学院药学院, 湖南 长沙 410000

3. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

4. 广东省中药研究所, 广东 广州 510520

摘要: **目的** 考察大孔吸附树脂对白箬叶总多酚的吸附性能和纯化效果, 寻找白箬叶总多酚纯化的较优工艺。 **方法** 采用Folin-Ciocalteu比色法定量, 比较5种不同型号大孔吸附树脂对药食同源植物白箬叶中总多酚的吸附和解吸效果, 从中筛选出适合分离纯化白箬叶总多酚的树脂, 并对其吸附和解吸条件进行考察和优化。经过单因素实验, 确定最终优化工艺。 **结果** 所得优化工艺为以质量浓度为1.0 mg/mL, pH值为3.0左右的白箬叶总多酚粗提液作为上样液, 同时控制其体积流量为2.0 mL/min, 上样量控制为30 mL; 然后以体积分数50%的乙醇水溶液洗脱, 调节pH值为6.0, 并控制洗脱体积流量为2.0 mL/min, 洗脱量为40 mL。经HPD100型树脂纯化后, 白箬叶多酚样品质量分数由纯化前的11.7%上升为49.7%, 纯化效果为4.25倍。通过将HPD100型树脂进行扩大30倍实验证实: 白箬叶多酚样品质量分数由纯化前的12.5%上升为54.5%, 纯化效果为4.4倍, 纯化效率并不随大孔树脂数量改变而改变。 **结论** HPD100为纯化白箬叶总多酚的最佳树脂, 该工艺适合白箬叶总多酚的提取纯化工业生产。

关键词: 白箬叶; 总多酚; 大孔吸附树脂; 纯化工艺; Folin-Ciocalteu比色法; 吸附; 解吸

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)13-3071-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.13.012

Optimization of purification of total polyphenols from *Acanthopanax trifoliate* leaves by macroporous resin

CEN Ye-sheng¹, LI Xiao-long¹, CHEN Shu-juan², LIU Xiang-qian³, ZENG Qing-qian⁴, LIANG Zong-suo¹, ZHANG Xiao-dan¹

1. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Hunan Vocational College of Science and Technology, Changsha 410000, China

3. School of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

4. Guangdong Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510520, China

Abstract: **Objective** To investigate the adsorption performance and purification effect of macroporous adsorption resin on total polyphenols in *Acanthopanax trifoliate* leaves, and to determine the technological conditions for the purification of total polyphenols from *A. trifoliate* leaves. **Methods** The Folin-Ciocalteu colorimetric method was used to quantify the adsorption and desorption effects of five macroporous adsorption resins on the total polyphenols in the *A. trifoliate* leaves. The resin suitable for separation and purification of total polyphenols in *A. trifoliate* leaves was screened, and the adsorption and desorption conditions were investigated and optimized. The final optimized parameters were determined by single factor experiments. **Results** The best purification parameters of total polyphenols were determined as follows: the concentration of sample solution was 1.0 mg/mL (crude drug) with pH 3.0, sample flow rate was at 2 mL/min, and the sample loading was controlled to 30 mL, the elution was 50% ethanol at a flow rate of 2.0 mL/min with pH 6.0, and the elution amount was 40 mL. The polyphenol sample of the *A. trifoliate* leaves was purified by HPD100 resin, and the purity increased from 11.7% to 49.7%, and the purification effect was 4.25 times than before. After 30 times

收稿日期: 2019-03-05

基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (2019JJ40223); 浙江理工大学 2018 年本科生科研创新计划项目

作者简介: 岑叶盛, 硕士研究生, 从事天然药用植物研究与开发。E-mail: cenyesheng@icloud.com

*通信作者 张晓丹 E-mail: zxd211@zstu.edu.cn

enlargement experiment, the purity of the *A. trifoliate*s leaves polyphenol sample increased from 12.5% before purification to 54.5%, and the purification effect was 4.4 times than before. The amount of macroporous resin did not affect the purification efficiency, which provided reference for HPD100 macroporous resin for industrial production of total polyphenols purification of *A. trifoliate*s leaves. **Conclusion** HPD100 is the best resin for purifying total polyphenols from *A. trifoliate*s leaves, and the process technology result in this experiment can be applied to industrial production.

Key words: *Acanthopanax trifoliate*s leaves; total polyphenols; macroporous resin; purification process; Folin-Ciocalteu colorimetry; adsorption; desorption

白筋 *Acanthopanax trifoliate*s (L.) Merr. 又名三加皮, 为五加科 (Araliaceae) 五加属 *Acanthopanax* Miq. 攀援状灌木, 主要分布于我国中南部, 其味苦、辛、凉, 具有清热解暑、祛风除湿、散瘀止痛、止咳平喘等功效^[1], 其根、根皮、茎叶均可分别作为药材和蔬菜使用。有文献记载白筋药用价值同细柱五加, 在梁代前已与细柱五加根皮同作五加皮用。白筋中主要含有皂苷、黄酮、多酚、糖苷等活性成分^[2-6], 其中多酚类化学成分具有抗氧化、细胞保护、抗高血糖、抗高血脂和抗癌等药理学活性^[7]。前期研究表明五加属植物白筋叶中咖啡酰奎宁酸类多酚化学成分群含量丰富, 其含量达到 4%^[8]。咖啡酰奎宁酸类化合物是一类由奎宁酸和不同数目的咖啡酸通过酯化反应缩合而成的酚酸类化合物^[9], 这类化合物广泛存在于植物之中, 具有抗氧化、抗炎、抗菌、抗病毒、抗高血糖、抗高血脂和抗癌等药理学活性^[10]。近些年对于白筋多酚类化合物的研究较多, 包括了白筋总多酚的提取工艺研究^[11]、对不同品种的白筋总多酚含量研究^[12]以及对白筋不同部位的多酚含量及抗氧化活性比较^[5], 尚无白筋总多酚纯化工艺的研究。本实验探讨大孔吸附树脂纯化白筋叶总多酚的工艺, 为白筋的综合利用和开发提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

瑞士 BUCHI R-3 旋转蒸发仪, 瑞士 BUCHI 有限公司; TP-214 电子天平, 美国丹佛仪器有限公司; UV-5200 紫外分光光度计, 上海元新仪器有限公司; KQ-500DE 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 材料

白筋叶于 2016 年 4 月采集于广东省凤凰山, 经浙江理工大学梁宗锁教授鉴定为五加属植物白筋 *Acanthopanax trifoliate*s (L.) Merr. 的干燥叶片; 绿原酸对照品 (质量分数 99.58%, 批号 15081903), 成都普菲德生物技术有限公司; Folin 试剂为分析

纯, 上海瑞永生物科技有限公司; 大孔树脂 AB-8、D-101、HPD100、HPD400、HPD600, 沧州宝恩吸附材料科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 白筋叶总多酚样品的制备

将干燥的白筋叶粉碎, 过筛, 称取 1 kg 于锥形瓶中, 加入 3 倍白筋叶粉末体积的 95%乙醇后超声浸提, 提取液滤过, 减压浓缩, 得膏状物, 重复提取 3~4 遍, 合并浓缩所得浸膏, 加入适量 45 °C 蒸馏水溶解, 加入 3 倍量的石油醚重复萃取 3~4 次, 将所得水相合并, 蒸发浓缩, 冷冻干燥, 即得白筋叶总多酚粗提物。称取 3 g 白筋叶总多酚粗提物, 超声溶解并定容于 500 mL 量瓶中, 制备成质量浓度为 6 mg/mL 的总多酚上样液, 备用。

2.2 白筋叶总多酚定量测定

采用 Folin-Ciocalteu 法^[13]测定白筋叶中总多酚含量。

2.2.1 对照品溶液制备 量取绿原酸对照品 10 mg 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 得到 1 mg/mL 的绿原酸对照品溶液。

2.2.2 线性关系考察 分别准确量取 0.025、0.050、0.100、0.200、0.400、0.600 mL 1 mg/mL 的绿原酸对照品溶液于 25 mL 量瓶中, 加入 1.25 mL Folin-Ciocalteu 试剂和 3.75 mL 质量分数为 20%的碳酸钠溶液, 加蒸馏水定容后于 750 nm 紫外光下测定吸光度 (A) 值, 以质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 结果绿原酸质量浓度与 A 值的标准曲线方程为 $Y=0.449X-0.017$, $r^2=0.993$ 。

2.2.3 样品中总多酚含量测定 将待测样品溶液混匀后, 用移液枪取 1 mL 溶液, 加入 3.75 mL 20%碳酸钠溶液和 1.25 mL 的 Folin-Ciocalteu 试液, 并用蒸馏水定容至 25 mL 量瓶标准线处, 做好标记于 30 °C 水浴下保存 2 h。取 3.75 mL 20%碳酸钠溶液和 1.25 mL 的 Folin-Ciocalteu 试液, 并用蒸馏水定容至 25 mL 量瓶标准线处, 标记为空白对照液, 于

30 ℃ 水浴下保存 2 h。预热紫外分光光度计 15 min，取出量瓶在 760 nm 波长处以空白对照液作为对照，测定 A 值，记录并整理数据，代入绿原酸标准曲线中即可得到所提取的总多酚质量浓度。

2.3 大孔吸附树脂的筛选

2.3.1 大孔吸附树脂预处理^[14] 大孔吸附树脂用无水乙醇浸泡 24 h，充分溶胀，用无水乙醇淋洗至析出液加等量蒸馏水混合无白色浑浊为止，再用蒸馏水洗脱树脂至其中乙醇体积分数小于 10%，然后依次用 3 倍树脂体积的 5% 盐酸、纯水、4% 氢氧化钠溶液浸泡，流过树脂柱，最后用大量纯水洗至流出的水呈中性，沥干树脂中水分，备用。

2.3.2 静态吸附试验与解吸附试验

(1) 静态吸附：分别称取经过前处理的 5 种大孔树脂各 1.0 g，置于 100 mL 带塞锥形瓶中，再加入 25 mL 6 mg/mL 的白藜叶总多酚粗提液，塞上瓶塞。置于 30 ℃，100 r/min 的恒温振荡器中充分振荡吸附 8 h，吸附结束后，取 1 mL 上清液，按照 Folin-Ciocalteu 法测定 A 值。然后由绿原酸标准方程得各多酚含量^[15]，并比较分析实验结果。

$$\text{吸附量} = (C_0 - C_1)V/M$$

$$\text{吸附率} = (C_0 - C_1)/C_0$$

C_0 、 C_1 为吸附前、后吸附液中多酚质量浓度， V 为吸附液体积， M 为树脂吸去水分的质量

由表 1 可以看出，大孔树脂 HPD100 对五加属植物白藜叶中总多酚有较强的吸附效果，其吸附率达到 64%，其他 4 种树脂的吸附率从高到低依次是 AB-8、D101、HPD400、HPD600。由此可见不同类型的树脂对于白藜叶总多酚的吸附性能各不相同。可能原因是，对于 5 种不同类型树脂，其内部结构、分子极性以及多酚的溶解度等对树脂吸附多酚能力均有不同程度的影响。而多酚由于其分子中酚羟基的存在，使其分子极性并不是很高，因而在与极性较弱或者非极性的树脂进行吸附时效果更好。

(2) 静态解吸：将所用树脂滤过，用蒸馏水冲洗去表面残余物质，并吸干表面水分。再置于带塞锥形瓶中，加入 25 mL 体积分数 60% 乙醇，同样在 30 ℃，100 r/min 恒温振荡器中充分解吸附 8 h，取 1 mL 上清液，测定 A 值。并根据得到的数据计算解吸率，将所得结果分析获得最优性能大孔树脂。

$$\text{解吸率} = C_2V_2/[(C_0 - C_1)V_1]$$

C_2 为解吸附后多酚质量浓度， V_2 为解吸附后溶液体积， V_1 为吸附多酚溶液体积

表 1 不同类型树脂对白藜叶中多酚的静态吸附率与解吸率
Table 1 Static adsorption and desorption properties of different types of resin for *A. trifoliatum* leave polyphenols

树脂类型	吸附率/%	解吸率/%
AB-8	62.30	71.90
D101	60.20	78.20
HPD100	64.00	77.90
HPD400	58.80	76.80
HPD600	57.50	72.30

采用体积分数为 60% 乙醇溶液解吸。由表 1 可知，5 种大孔树脂解吸率都普遍较高，D101 树脂解吸附效果最好，解吸率达 78.2%，HPD100 次之。结合对白藜提取液的静态吸附与解吸附试验来看，D101 型树脂对白藜叶总多酚的解吸效果最好，但吸附率却并不是最高的。而 HPD100 型树脂吸附率最大，解吸率也仅次于 D101，达到 77.9%，能够将大部分多酚洗脱下来，因此采用 HPD100 型大孔吸附树脂对白藜叶总多酚进行纯化。

2.4 HPD100 大孔吸附树脂动力学吸附与解吸试验

根据静态吸附试验的方法对 HPD100 型树脂进行白藜叶总多酚的静态吸附，每间隔 1 h 吸取 1 mL 上清液，测定 A 值，并通过绿原酸标准方程计算吸附率，绘制吸附时间与大孔树脂吸附率的动力学吸附曲线。

按静态解吸试验的方法处理已吸附结束的树脂，并进行解吸附，同样每间隔 1 h 取 1 mL 上清液，测定 A 值，并计算对应时间的解吸率，根据得出的数据结果绘制动力学解吸附曲线。

由图 1 可知，从 0 h 开始，树脂对白藜提取液中总多酚的吸附率缓慢上升，在 5 h 吸附率达到最大值。随着时间的推移，其吸附率略有下降，因此在 5 h 后树脂对总多酚的吸附达到平衡。通过解吸曲线可知，在 0~3 h 这段时间里，树脂的解吸附效

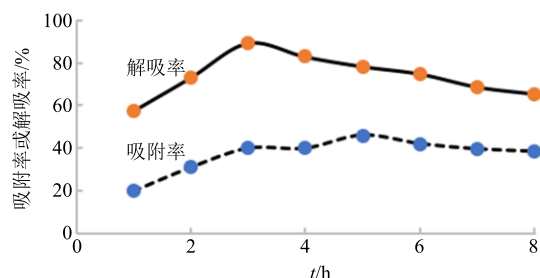


图 1 HPD100 树脂静态吸附与解吸动力学曲线

Fig. 1 Static adsorption and desorption kinetic curve for HPD 100 resin

率呈上升趋势,并在 3 h 达到解吸附的最大值,为 89.3%。但在随后时间里解吸率随时间逐渐降低,可能是由于洗脱液逐渐饱和造成的。

2.5 HPD100 大孔吸附树脂静态吸附与解吸附白藜叶总多酚实验

2.5.1 上样液质量浓度对吸附率的影响 称取 8 份经前处理的 HPD100 大孔吸附树脂各 1.0 g 于带塞锥形瓶中,分别加入质量浓度为 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mg/mL 的上样液 25 mL,置于 30 °C,100 r/min 的恒温振荡器中吸附 5 h,根据“2.3.2”项下方法处理并计算吸附率,结果吸附率分别为 61.00%、65.00%、59.00%、57.00%、55.00%、52.00%、46.00%、43.00%。上样液质量浓度对大孔树脂吸附性能有显著影响。当提取液质量浓度小于 1.0 mg/mL 时,HPD100 树脂对白藜叶中多酚的吸附率随多酚质量浓度的增加呈逐渐上升趋势,造成这种现象的原因可能是多酚质量浓度较低时,其分子有更多机会与大孔树脂的内表面接触,使多酚分子加快扩散至树脂孔道内,形成吸附。随着白藜叶总多酚质量浓度的增加,树脂对多酚的吸附率反而逐渐降低,造成这种现象可能是因为当多酚质量浓度较高时,位于树脂孔道内的白藜叶多酚分子的扩散运动受到抑制,导致树脂对多酚的吸附率下降。而且,在高质量浓度的多酚提取液中,其他化合物也可能与多酚分子存在吸附竞争,甚至可能生成沉淀造成孔道堵塞,抑制多酚分子向树脂孔道内部扩散,影响大孔树脂吸附多酚分子。因此,白藜叶总多酚上样液质量浓度选择 1.0 mg/mL 比较合适。

2.5.2 解吸附液体积分数对解吸率的影响 称取经过处理的 HPD100 型树脂 10.0 g,取最佳上样质量浓度的白藜叶总多酚提取液 250 mL,置于 500 mL 带塞锥形瓶中,在 30 °C、100 r/min 的恒温振荡器中吸附 5 h,滤过,用蒸馏水洗去表面残余多酚和其他杂质化合物,吸去水分,从中分别称取 1.0 g 5 份于编号 1~5 的带塞锥形瓶中,各加入 25 mL 体积分数为 10%、30%、50%、70%、90%乙醇溶液进行解吸 3 h,按照“1.3”的方法测定其 A 值并计算解吸率,通过解吸液中多酚质量浓度的差异绘制多酚质量浓度与乙醇体积分数的关系曲线,分析比较,得出解吸的最适质量浓度。乙醇体积分数为 10%、30%、50%、70%、90%时解吸后溶液中白藜叶总多酚质量浓度分别为 0.03、0.06、0.07、0.06、0.06 mg/mL,由此可知,当乙醇水溶液体积分数由 10%

增大到 50%时,解吸后溶液中白藜叶总多酚质量浓度呈逐渐增加的趋势;而随着乙醇体积分数从 50%增大到 90%时,解吸后多酚质量浓度逐渐减小。由此可知,在一定范围内,多酚溶解度随乙醇体积分数增大而增大;而当乙醇体积分数过大时,可能会造成溶液中某些大分子如蛋白质等物质的溶解度降低而析出形成沉淀,阻塞树脂孔道,从而影响树脂中多酚分子向外扩散,因此,50%乙醇水溶液可作作为大孔树脂解吸液进行后续试验。

2.5.3 多酚上样液 pH 及解吸液 pH 的影响 取 5 只带塞锥形瓶,分别加入 25 mL 质量浓度为 1 mg/mL 的白藜叶总多酚上样液,通过 1 mol/L 的盐酸溶液调节上样液 pH 值分别为 2、3、4、5、6。分别称取前处理过的 HPD100 大孔吸附树脂 1.0 g 于各锥形瓶中,通过吸附获得上样液 pH 值与吸附率的关系,绘制相关曲线并分析实验数据,得出吸附率最高的上样液 pH 值。pH 值能够影响白藜叶提取液中多酚和其他溶质分子的水解程度,进而影响溶质分子和溶剂的相互作用力。根据“2.3.2”项下方法处理并计算吸附率,当上样液 pH 值为 2、3、4、5、6 时,吸附率分别为 85.41%、90.32%、86.00%、73.58%、58.93%,由此可知,在 pH 值小于 3 时,随着 pH 值升高,大孔树脂对白藜叶总多酚的吸附率逐渐上升;当上样液 pH 值大于 3 时,HPD100 型树脂对白藜叶多酚的吸附率逐渐下降。可能原因是,由于多酚为弱酸性化合物,当溶液 pH 值较高时,即溶液酸性较弱,多酚分子发生解离反应,其中的酚羟基解离形成 H^+ 和相应的阴离子,削弱了与溶液中水分子的相互作用力,从而导致树脂对多酚分子的吸附力下降,进而影响吸附率。而在碱性条件下,大孔树脂易结成块状物,且能与多酚发生中和作用,形成相应的盐,并不利于多酚的吸附。因此在偏酸性溶液中,多酚能以分子形式存在,有利于吸附。

根据“2.3.2”项下方法处理并计算解吸附后多酚浓度,结果解吸液 pH 为 2、3、4、5、6、7 时,多酚质量浓度分别为 0.05、0.06、0.06、0.09、0.10、0.07 mg/mL。在解吸液 pH 值为 6.0 时,多酚解吸后质量浓度最高;在强酸性条件下,树脂解吸后溶液中多酚质量浓度随酸性增加而降低;而在中性条件下,多酚解吸后质量浓度较 pH 值为 6.0 时也稍有降低,可能是因为多酚类化合物在弱酸条件下更利于解吸附,说明解吸液 pH 值选择 6.0 较适宜。

2.6 HPD100 大孔吸附树脂动态吸附与解吸附工艺优化

2.6.1 上样液体积流量对吸附率的影响 取 50 cm×1.7 cm 的玻璃色谱柱固定, 取适量 HPD100 树脂滤过, 吸去表面水分, 称取 4.0 g 树脂, 通过湿法上柱法上柱, 轻敲柱壁, 使柱内树脂平衡, 打开下端阀门, 控制体积流量使柱内蒸馏水流出, 在液面距树脂约 1 cm 时, 将白藜叶总多酚上样液(质量浓度为 1.0 mg/mL, pH 值为 3, 上样量为 30 mL) 以不同体积流量上柱, 即 1.0、2.0、3.0 mL/min, 同时收集下端流出液, 再用蒸馏水冲洗树脂至无多酚流出, 合并流出液、水洗液, 通过 Folin-Ciocalteu 法测定 A 值并计算溶液中多酚含量, 得出吸附率分别为 80.07%、84.64%、66.34%。由此可知, 当白藜叶总多酚粗提液质量浓度一定时, 上样液体积流量越大, 白藜叶多酚在大孔树脂层的停留时间越短, 还未扩散到树脂的孔道内就流出, 导致树脂的吸附效果差。而体积流量在 1.0、2.0 mL/min 时吸附率相近, 分别为 80.12% 和 84.72%, 相差不大。而且体积流量过小会延长试验和生产周期, 故选择 2.0 mL/min 作为上样液体积流量。

2.6.2 解吸液体积流量对解吸率的影响 将白藜叶总多酚上样液(质量浓度为 1.0 mg/mL, pH 值为 3, 上样量为 30 mL) 以 2.0 mL/min 的体积流量上样, 用大量蒸馏水冲洗至无多酚流出, 用 pH 值为 6.0 的 50%乙醇溶液分别以 1.0、2.0、3.0 mL/min 的体积流量上柱洗脱。收集所流出溶液, 根据“2.3.1”的方法测定所洗脱多酚质量浓度, 并根据公式计算树脂解吸率, 解吸率分别为 55.92%、56.73%、53.47%。对于解吸液要求速度尽量缓慢, 洗脱速度快会使解吸液在树脂层停留时间减慢, 从而使解吸不充分, 解吸效果差; 降低解吸液体积流量使乙醇溶液在柱床中停留时间增加, 有利于乙醇分子向树脂内孔道移动, 将吸附的多酚分子置换出来, 但洗脱体积流量太小则会造成洗脱时间延长, 不利于生产。由上可知, 解吸液体积流量为 2.0 mL/min 时解吸率最高, 因此解吸体积流量选 2.0 mL/min 为宜, 且在吸附转为解吸附时基本无需调节旋钮。

2.7 动态洗脱曲线的绘制

根据上述实验所得最优纯化工艺条件: 取 50 cm×1.7 cm 的玻璃色谱柱, 加入 4.0 g HPD100 树脂, 以质量浓度为 1.0 mg/mL, pH 为 3.0 左右的白藜叶总多酚粗提液作为上样液, 同时控制其体积分

量为 2.0 mL/min, 上样量控制为 30 mL; 然后以体积分 50% 的乙醇水溶液洗脱, 调节 pH 值为 6.0, 并控制洗脱体积流量为 2.0 mL/min, 洗脱量为 40 mL, 将流出液按 Folin-Ciocalteu 法测定多酚含量, 根据实验数据绘制动态洗脱曲线。并将动态洗脱所得流出液合并, 浓缩干燥, 得纯化后总多酚。

由图 2 可看出, 用 pH 值为 6.0 的 50%乙醇溶液以 2 mL/min 的体积流量洗脱时, 洗脱峰集中, 拖尾不严重, 解吸剂用量为 40 mL, 解吸率为 58.8%。同时将流出液合并, 浓缩干燥得纯化多酚, 取适量采用 Folin-Ciocalteu 法测定质量分数, 发现纯化前总多酚质量分数为 11.7%, 纯化后总多酚质量分数为 49.7%, 由此可知, 总多酚纯化后的质量分数是纯化前的 4.25 倍。

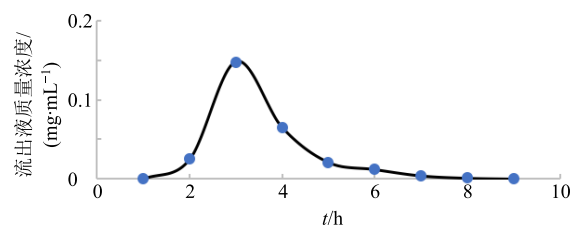


图 2 HPD100 树脂的动态洗脱曲线

Fig. 2 Dynamic elution curve for HPD100 resin

2.8 验证试验与放大试验

2.8.1 验证试验 与动态洗脱实验相同, 收集所有洗脱液, 通过旋蒸得浓缩浸膏, 再通过真空冷冻干燥获得纯化后白藜叶多酚, 并对其多酚含量进行紫外测定。

通过对白藜叶总多酚提取物进行重复实验, 结果为在纯化前白藜叶总多酚提取物样品质量分数为 11.5%, 经 HPD100 大孔树脂纯化后测得多酚质量分数为 53.1%, 纯化效果为 4.6 倍, 与动态洗脱所得纯化多酚纯度基本一致。

2.8.2 放大实验 与验证试验相同, 将树脂总量扩大 30 倍, 装于 50 cm×4.0 cm 的色谱柱中, 轻敲柱壁使树脂表面平整。将最适 pH 值和质量浓度的白藜提取液以相同速度上柱, 上样量为 900 mL。利用相同方法收集洗脱液, 旋蒸浓缩, 再通过真空冷冻干燥获得扩大试验所得总多酚, 并对其多酚含量进行紫外光谱测定。

通过将 HPD100 型树脂进行扩大 30 倍试验, 结果发现纯化前白藜叶多酚样品质量分数为 12.5%, 经大孔树脂纯化后测得样品质量分数为 54.5%, 纯化效果为 4.4 倍, 由此可见, HPD100 型

树脂对于白箬叶总多酚纯化并不随树脂质量的增加而有所下降,因此为其未来实行工厂化生产提供实验参考。

3 讨论

本实验研究了大孔树脂纯化五加属植物白箬叶中总多酚的工艺,通过实验确定 HPD100 型大孔树脂对白箬叶中多酚化合物的最佳纯化工艺:以 pH 值为 3.0,质量浓度为 1.0 mg/mL 白箬叶多酚粗提液作为上样液,调节上样体积流量,以 2 mL/min 的体积流量上柱,上柱量为 30 mL。然后先用适量蒸馏水冲洗,再用 40 mL、pH 6.0 的 50%乙醇溶液对大孔树脂进行洗脱,而洗脱体积流量亦为 2 mL/min,可得质量分数(紫外测定)为 53.1%的白箬叶多酚化合物。对各工艺参数均扩大 30 倍再进行实验,获得质量分数(紫外测定)为 54.5%的白箬叶多酚化合物。综合纯化前后多酚纯度分析,纯化后较纯化前多酚纯度精制倍数达到了 4.4 倍。

通过扩大实验可知,柱色谱对白箬叶中多酚类化合物的纯化效果明显,且能够进行工业化生产,但其纯化效率还可能与纯化内外环境温度、色谱柱的径高比、色谱柱中树脂颗粒间的紧密程度及白箬叶多酚提取物的性质有关联,因此只有考虑各种条件下才能够真正制定出高质高效的生产工艺。

参考文献

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴 (第 2 册) [M]. 北京: 科学出版社, 1985.
- [2] 杜江, 高林. 白箬叶的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 1992, 17(6): 356-357.
- [3] Kiem P V, Cai X F, Minh C V, *et al.* Lupane-triterpene carboxylic acids from the leaves of *Acanthopanax trifoliatum* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(19):

1432-1435.

- [4] Kiem P V, Minh C V, Cai X F, *et al.* A new 24-nor-lupane-glycoside of *Acanthopanax trifoliatum* [J]. *Arch Pharm Res*, 2003, 26(9): 706-708.
- [5] Yook C S, Chang S Y, Lai J H, *et al.* Lupane-glycoside of *Acanthopanax trifoliatum* forma *tristigmatis* leaves [J]. *Arch Pharm Res*, 1999, 22(6): 629-632.
- [6] 程轩轩, 张旭红, 杨慧文, 等. 白箬多糖的分离纯化及抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4219-4223.
- [7] 杨慧文, 张旭红, 梁嘉君, 等. 白箬叶黄酮的提取纯化及其抗炎作用初探 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(8): 295-298.
- [8] Zhang X D, Liu X Q, Zhou X Q, *et al.* Development and application of an HPLC-UV procedure to determine multiple flavonoids and phenolics in *Acanthopanax* leaf extracts [J]. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54(4): 574-582.
- [9] 朱乃亮, 彭平, 赵丽敏, 等. 植物中常见咖啡酰奎宁酸类化合物研究进展 [A] // 中华中医药学会中药化学分会第八届学术年会论文集 [C]. 北京: 中华中医药学会中药化学分会, 2013.
- [10] 张秋燕, 张福平. 野生保健蔬菜-白箬 [J]. 食品研究与开发, 2003, 24(3): 66-67.
- [11] 黄美娥, 李文芳, 曹红香, 等. 白箬嫩芽保鲜工艺研究 [J]. 保鲜与加工, 2006, 6(2): 38-39.
- [12] 王勤. 美味野蔬白箬 [J]. 特种经济动植物, 2003, 6(11): 35-35.
- [13] Ough C S, Amerine M A. *Methods for Analysis of Musts and Wines* [M]. New Jersey: Wiley, 1988.
- [14] 艾志录, 王育红, 王海, 等. 大孔树脂对苹果渣中多酚物质的吸附研究 [J]. 农业工程学报, 2007, 23(8): 245-248.
- [15] 李琼, 陈恺, 陈燕勤, 等. 大孔吸附树脂分离纯化核桃青皮总多酚 [J]. 食品与机械, 2015, 31(1): 175-180.