

DOI:10.3969/j.issn.1000-1298.2010.09.028

南瓜多糖大孔吸附树脂纯化工艺*

王丽波 赵玉 徐雅琴

(东北农业大学理学院, 哈尔滨 150030)

【摘要】 为提高南瓜多糖的纯度,筛选适宜南瓜多糖纯化的大孔树脂,确定纯化工艺参数,选用9种大孔树脂材料,采用静态与动态吸附-解吸方法对南瓜多糖进行纯化,以吸附量与解吸率为考察指标对树脂进行选择与工艺研究。结果表明:D101-I型大孔树脂更适宜作为南瓜多糖纯化的树脂;其纯化最佳工艺条件为:上柱液质量浓度4.79 mg/mL,上柱液体积3.2 BV,上柱流速3 BV/h,洗脱液乙醇体积分数25%,洗脱速度4 BV/h,洗脱液体积3.6 BV;上述纯化工艺使南瓜多糖纯度从25.68%提高到61.39%。

关键词: 南瓜多糖 大孔吸附树脂 分离纯化

中图分类号: TS244 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2010)09-0138-05

Purification Technology of Pumpkin Polysaccharides with Macroporous Adsorption Resin

Wang Libo Zhao Yu Xu Yaqin

(College of Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract

In order to select suitable macroporous resin, to improve the purity of pumpkin polysaccharide and to determine purification process parameters, 9 kinds of macroporous resin were chosen to carry out static and dynamic adsorption-desorption experiments. With the indexes of adsorption capacity and elution rate, the suitable macroporous resin was selected and process parameters were confirmed. The results show that D101-I resin has the best performance of adsorption and desorption effects for purification of pumpkin polysaccharide, the optimum technology parameters are sample concentration of 4.79 mg/mL, sample volume of 3.2 BV, flow rate of 3 BV/h, 25% ethanol for elution, elution velocity of 4 BV/h, elution volume of 3.6 BV. The purity of pumpkin polysaccharide increases from 25.68% to 61.39% by using the above technology.

Key words Pumpkin polysaccharides, Macroporous adsorption resin, Separation and purification

引言

南瓜多糖(pumpkin polysaccharide, 简称 PPS)是从南瓜中提取得到的一种水溶性杂多糖,越来越多的研究已证明^[1-5],南瓜多糖具有多方面的生物活性和功能。南瓜多糖的提取纯化,日益引起人们的关注。

目前,提取南瓜多糖的方法主要有水提法、超声辅助和微波辅助萃取法以及复合酶法,均取得了较好效果^[6-9]。但采用上述分离方法获得的多糖提取液都含有许多杂质,因此必须对粗提物进行进一步纯化,得到纯度较高的产品。本文采用大孔吸附树脂分离纯化南瓜多糖的工艺,筛选出适宜南瓜多糖纯化的大孔树脂,并优化其纯化工艺条件,以期为制

收稿日期:2009-09-28 修回日期:2009-11-29

* 黑龙江省自然科学基金资助重点项目(ZJN0606-01)

作者简介:王丽波,讲师,博士生,主要从事天然产物开发与应用研究, E-mail: wanglibo99166@yahoo.com.cn

通讯作者:徐雅琴,教授,主要从事天然产物化学研究, E-mail: xu-yaqin@163.com

备纯度较高的南瓜多糖奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

南瓜,品种为榭花面;纤维素酶(15 000 u/g),果胶酶(30 000 u/g),上海兰季科技发展有限公司;蒽酮,中国医药集团上海化学试剂公司。

D101-I型、D3520型、D4006型、D4020型、DM130型、S-8型、AB-8型、NKA-9型、X-5型大孔吸附树脂由南开大学化工厂提供。

1.2 仪器与设备

FW80型高速万能粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;微波催化合成/萃取仪,北京祥鹤科技发展有限公司;202-2A型电热恒温干燥箱,天津市泰斯特仪器有限公司;TU-1901型双光束紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;LD4-2型离心机,北京医用离心机厂。

1.3 实验内容与方法

1.3.1 南瓜多糖的提取制备

按照文献[9]方法制得南瓜多糖提取液。具体工艺为:南瓜多糖提取液 $\xrightarrow{\text{离心}}$ 0.45 μm 微孔滤膜 $\xrightarrow{\text{浓缩}}$ 醇沉(乙醇体积分数 80%) \rightarrow 南瓜粗多糖 \rightarrow 蒸馏水复溶透析(3 d,截留分子量大于 3 500) \rightarrow 醇沉 \rightarrow 真空干燥 \rightarrow 南瓜多糖,备用。

1.3.2 南瓜多糖含量的测定

参考文献[10],总糖测定:蒽酮-硫酸法;还原糖测定:3,5-二硝基水杨酸比色法,以葡萄糖为标准品。多糖测定:总糖与还原糖含量的差值。

1.3.3 大孔吸附树脂的预处理

首先用蒸馏水充分淋洗树脂,除去表面杂质,再用无水乙醇浸泡 24 h,使树脂充分溶胀。弃去无水乙醇,用蒸馏水冲洗至树脂无醇味,然后分别用 4% HCl 溶液浸泡 3 h,蒸馏水洗至中性;再用 4% NaOH 溶液浸泡 3 h,蒸馏水洗至中性,备用。

1.3.4 大孔树脂的静态吸附和解吸实验

分别称取预处理后的 9 种型号大孔树脂各 1 g 于锥形瓶中,加入 15 mL 质量浓度为 4 mg/mL 的南瓜多糖溶液,于 20℃ 恒温水浴振荡器中吸附 12 h,抽滤,取滤液测定剩余多糖含量。充分吸附后的树脂用滤纸吸干表面溶液,置于干燥的锥形瓶中,加入 15 mL 25% 的乙醇进行解吸,于 20℃ 的恒温水浴振荡器中解吸 12 h,抽滤,取滤液测定多糖含量。计算不同树脂的吸附量、吸附率和解吸率,计算公式为

$$Q = \frac{(C_0 - C_e)V}{m}$$

$$A = \frac{(C_0 - C_e)}{C_0} \times 100\%$$

$$D = \frac{C_1}{C_0 - C_e} \times 100\%$$

式中 Q ——吸附量,mg/g

A ——吸附率,% D ——解吸率,%

C_0 ——起始溶液质量浓度,mg/mL

C_e ——吸附平衡溶液质量浓度,mg/mL

C_1 ——解吸液质量浓度,mg/mL

V ——多糖液体体积,mL m ——树脂质量,g

选取上述 9 种型号树脂中,吸附和解吸效果较好的 3 种树脂进行静态吸附-解吸动力学实验,筛选出一种效果最佳,用以提纯南瓜多糖的大孔树脂,并考察温度、吸附液质量浓度和不同解吸液对树脂吸附-解吸效果的影响。

1.3.5 大孔树脂的动态吸附和洗脱实验

根据静态吸附-解吸的实验数据选用 D101-I 型大孔树脂进行动态吸附。

配置南瓜多糖溶液,在静态吸附实验确定的初始条件下,考察上样流速分别为 2、3、5 BV/h 对多糖吸附的影响,同时接收流出液(3 mL/管),分别测定每管中的多糖质量浓度,根据泄漏点(以上样液质量浓度的 10% 计算)出现的位置确定最佳流速。

在上述实验所确定的最佳吸附条件下连续上样,收集流出液(5 mL/管),测定管中漏出液南瓜多糖的质量浓度,以上样液体积为横坐标,流出液南瓜多糖质量浓度为纵坐标,绘制树脂动态吸附曲线,计算吸附量和吸附率。

在最佳流速下上样,用 25% 的乙醇洗脱,调节不同的洗脱流速(2、4 和 6 BV/h),收集洗脱流出液(5 mL/管),根据洗脱曲线确定最佳洗脱流速。

2 结果与讨论

2.1 大孔吸附树脂的筛选

如表 1 所示,9 种树脂中 D101-I 型、D3520 型和 D4020 型 3 种非极性树脂的吸附率和解吸率均较高,静态吸附率分别达到 80.48%、76.38% 和 79.63%,静态解吸率分别为 93.77%、87.19% 和 82.93%。根据大孔树脂的性质,吸附率和解吸率都较高,可以保证有效成分的最大吸附及较高回收率,因此选择以上 3 种树脂进一步考察其静态吸附-解吸能力。

图 1 比较了 D101-I 型、D3520 型和 D4020 型树脂的吸附速率和吸附率,其中 D101-I 型大孔吸附树脂达到吸附平衡的时间最短,而 D3520 型、D4020 型大孔吸附树脂达到吸附平衡的时间较长。

由图2可以看出,乙醇溶液对3种树脂都有很好的解吸能力。D101-I型大孔吸附树脂在2h时解吸率已明显高于D3520型、D4020型树脂,达到解吸平衡的时间也比另外的两种树脂更早。

表1 不同大孔树脂静态吸附及解吸结果

Tab.1 Results of static adsorption-desorption of different macroporous resins

树脂型号	吸附量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	吸附率/%	解吸率/%
D101-I	48.07	80.48	93.77
D3520	45.66	76.38	87.19
D4006	38.97	65.26	70.64
D4020	47.58	79.63	82.93
DM130	41.19	69.00	65.72
X-5	27.81	40.21	72.32
NKA-9	23.34	39.05	66.95
S-8	12.21	20.41	69.80
AB-8	16.94	28.38	72.69

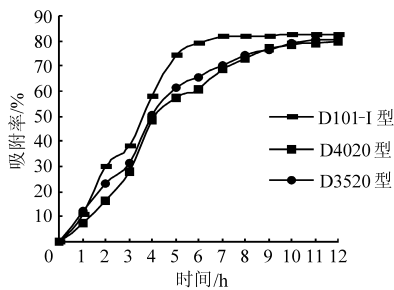


图1 大孔树脂对南瓜多糖静态吸附曲线

Fig.1 Static adsorption curves of different types of macroporous resin

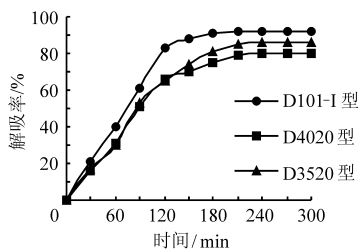


图2 大孔树脂对南瓜多糖静态解吸曲线

Fig.2 Static desorption curves of different types of macroporous resin

综合比较这3种树脂对多糖的静态吸附和解吸性能,D101-I型大孔吸附树脂显示出更好的实验效果,静态吸附量最大为 48.07 mg/g ,吸附率为 80.48% ,静态解吸率也高达 93.77% ,所以选择D101-I型大孔吸附树脂用于提纯南瓜多糖的研究。

2.2 D101-I型大孔树脂静态吸附-解吸实验

2.2.1 温度

考察了 20 、 30 和 40°C 下D101-I型大孔树脂

吸附量随时间变化曲线,结果如图3所示。

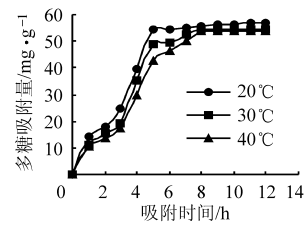


图3 温度对吸附效果的影响

Fig.3 Effect of temperature on adsorption effect

实验数据表明,D101-I型大孔吸附树脂随着温度的升高多糖吸附率降低,即D101-I型树脂的吸附属放热过程。因此,温度升高不利于对南瓜多糖的吸附,可以选择室温(20°C)作为吸附温度。

2.2.2 吸附液质量浓度

D101-I型大孔树脂对不同吸附液质量浓度的吸附效果如表2所示。当吸附液的质量浓度达到 4.79 mg/mL 时,吸附率最大。继续增加吸附液质量浓度,吸附率反而降低。这是由于在低质量浓度条件下(低于 4.79 mg/mL),增大吸附液质量浓度,多糖总量增加,树脂的吸附量也在增加,而此时解吸量很少,随着吸附液质量浓度继续提高,树脂的吸附量随之增加,但与多糖竞争吸附的杂质质量也会增加,这会降低多糖在树脂内部扩散能力,当树脂与吸附液之间达到吸附平衡,即达到饱和状态(4.79 mg/mL)后,继续增加溶液质量浓度,树脂吸附量也有所下降。考虑到树脂的使用效率,选择最佳吸附液质量浓度为 4.79 mg/mL (即上柱液质量浓度)。

表2 吸附液质量浓度对吸附效果的影响

Tab.2 Effect of sample concentration on adsorption efficiency

实验序号	初始质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	平衡质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	吸附量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	吸附率/%
1	0.53	0.17	5.29	67.92
2	1.44	0.58	12.63	59.72
3	2.95	1.27	24.77	50.97
4	4.29	0.72	52.29	83.22
5	4.79	0.69	60.73	85.59
6	6.85	3.60	47.05	47.45
7	8.86	7.35	22.22	14.90

2.2.3 解吸液

选择蒸馏水、 15% 乙醇、 25% 乙醇、 35% 乙醇、 0.1 mol/L NaCl 作为解吸液,分别考察其解吸能力,实验结果见表3。

表中数据表明,乙醇溶液具有较好的解吸效果,不同体积分数的乙醇对多糖的解吸率均达到 85%

以上,其中25%乙醇的解吸率最高,达到94.44%,而15%和35%乙醇的解吸效果略差。因此,选择25%乙醇作为解吸液(即动态纯化的洗脱剂)。

表3 不同解吸液的解吸效果

Tab.3 Desorption effect of different desorption liquid

解吸液	初始质量浓度 /mg·mL ⁻¹	平衡质量浓度 /mg·mL ⁻¹	吸附量 /mg·g ⁻¹	吸附率/%	解吸率/%
蒸馏水	0.5723	0.1286	6.29	77.53	10.37
15%乙醇	0.5723	0.1332	6.22	76.73	89.73
25%乙醇	0.5723	0.1303	6.24	77.23	94.44
35%乙醇	0.5723	0.1256	6.27	78.05	90.82
0.1 mol/L NaCl	0.5723	0.1327	6.21	76.81	8.42

2.3 D101-I型大孔树脂动态吸附-洗脱实验

2.3.1 吸附过程的优化

不同上样流速的树脂动态吸附曲线如图4,当上柱流速为2、3和5 BV/h时,泄漏点分别为4、3.2和2.5 BV(以糖质量浓度为0.47 mg/mL时计)。可见,流速达到5 BV/h时泄漏点出现最早,因为树脂对多糖的吸附是一种动态过程,吸附流速过快使多糖与树脂接触时间缩短,致使多糖不能被充分吸附,随上样液流出;吸附流速慢,虽然减少了多糖的漏出量,提高了吸附率,但作业周期过长,同时也会造成树脂再生能力差,因此选择适宜的吸附流速为3 BV/h。

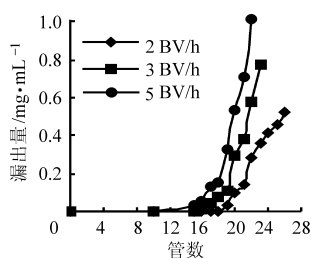


图4 上柱液流速对树脂吸附的影响

Fig.4 Effect of flow rate on adsorption efficiency

由图5树脂动态吸附曲线可以看出,上柱流速为3 BV/h时,D101-I型大孔树脂对南瓜多糖有良好的动态吸附性能。上柱液直到3.2 BV(64 mL)时出现泄漏点,此时多糖上柱量为316.1 mg,漏出多糖6.4 mg,树脂吸附量309.7 mg,吸附率为97.98%。

2.3.2 洗脱过程的优化

由图6可知,D101-I型大孔树脂对南瓜多糖具有良好的洗脱性能,使用25%乙醇以3种洗脱流速得到的洗脱曲线较接近。流速为2 BV/h时,解吸率高达98.86%,但流速较慢时需要的作业周期比较长;在流速为4 BV/h时,洗脱曲线峰形更对称且集中,当洗脱液用量为3.6 BV(16管)时,基本已将

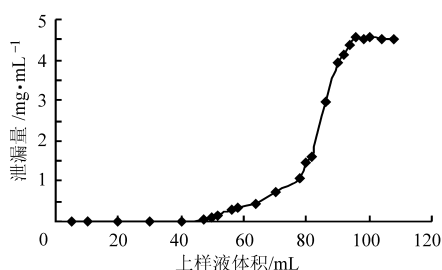


图5 D101-I型大孔树脂的动态吸附曲线

Fig.5 Dynamic adsorption curve of resin D101-I

多糖洗净,解吸率达到98.02%;流速增至6 BV/h时,解吸率只有84.14%,这可能是由于流速加快导致洗脱剂未能与被吸附的多糖进行充分作用,不能将多糖从树脂上置换下来。综合考虑流速选择4 BV/h。

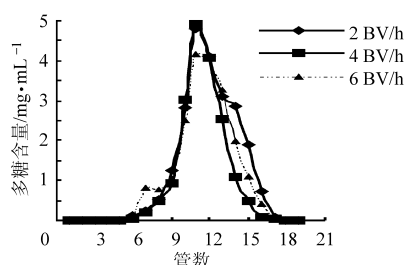


图6 流速对洗脱效果的影响

Fig.6 Effect of elution rate on desorption efficiency

综上所述,大孔吸附树脂纯化南瓜多糖最佳吸附条件为:上柱液质量浓度4.79 mg/mL,上柱液体积3.2 BV,上柱流速3 BV/h;最佳洗脱条件为:洗脱液乙醇体积分数25%,洗脱流速4 BV/h,洗脱液体积3.6 BV。在此条件下,吸附率、解吸率分别为97.98%、98.02%。

2.4 D101-I型大孔吸附树脂对南瓜多糖的纯化效果

按照上述实验确定的最佳上柱和洗脱条件对南瓜多糖进行纯化验证实验,根据图6,收集7~16管洗脱液,干燥所得纯化后样品结果见表4。经过树脂纯化后南瓜多糖粗品的纯度由柱前的25.68%提高到61.39%,纯度提高了1.4倍,蛋白质的含量较纯化前也有较大幅度的降低。同时,D101-I型大孔吸附树脂对多糖还有明显的脱色效果(纯化前南瓜固体多糖为浅黄色,纯化后的样品为灰白色)。

表4 南瓜多糖纯化前后组分的分析结果

Tab.4 Components analysis before and after purification of pumpkin polysaccharide

样品	样品质量/mg	总糖含量/%	还原糖含量/%	多糖含量/%	蛋白质含量/%
纯化前	100.2	36.98	11.30	25.68	32.86
纯化后	27.6	62.30	0.91	61.39	17.59

3 结束语

通过对9种大孔树脂吸附南瓜多糖对比研究,筛选出吸附量大、解吸率高的D101-I型大孔吸附树脂。通过静态—动态实验确定最佳纯化条件为:上柱液质量浓度4.79 mg/mL,上柱液体积3.2 BV,

上柱流速3 BV/h;洗脱液乙醇体积分数25%,洗脱流速4 BV/h,洗脱液体积3.6 BV。南瓜粗多糖经过超滤去除水溶性大分子杂质,再经大孔树脂纯化后,多糖含量由25.68%提高到61.39%,纯度提高了1.4倍,同时大孔吸附树脂还表现出较好的脱蛋白和脱色效果。

参 考 文 献

- 1 叶盛英,郭琪. 南瓜多糖的提取及其药理作用研究概况[J]. 天津药学, 2003, 15(2): 58~60.
Ye Shengying, Guo Qi. Summarization of study on extraction and separation of pumpkin polysaccharide and its pharmacological actions[J]. Tianjin Pharmacy, 2003, 15(2): 58~60. (in Chinese)
- 2 中国园艺学会. 全国南瓜营养、保健功能与产业发展研讨会论文集[C]. 北京: 中国园艺学会, 2004: 28~32.
- 3 刘银成,张名位,孙远明,等. 南瓜的保健功能及其应用研究进展[J]. 广东农业科学, 2006(11): 17~18.
- 4 刘颖,金宏,许志勤,等. 南瓜多糖对糖尿病大鼠血糖和血脂的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2006, 22(3): 358~361.
Liu Ying, Jin Hong, Xu Zhiqin, et al. Effects of pumpkin polysaccharides on blood glucose and blood lipids in diabetic rats [J]. Chinese Journal of Applied Physiology, 2006, 22(3): 358~361. (in Chinese)
- 5 李俊丽,王运强,向长萍. 南瓜水溶性多糖的体外抗氧化作用[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(2): 256~259.
Li Junli, Wang Yunqiang, Xiang Changping. The anti-oxidative effect of pumpkin polysaccharide in vitro [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2007, 26(2): 256~259. (in Chinese)
- 6 张涛,王利军,高梦祥. 微波辅助浸提南瓜多糖的工艺研究[J]. 农产品加工, 2006(7): 14~17.
Zhang Tao, Wang Lijun, Gao Mengxiang. Research on the extraction of water-soluble polysaccharides from astragalus by microwave [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2006(7): 14~17. (in Chinese)
- 7 孙俊,邓红,仇农学. 南瓜多糖超声提取工艺的优化[J]. 西北农业学报, 2007, 16(2): 198~202.
Sun Jun, Deng Hong, Qiu Nongxue. Optimization of extraction technology of pumpkin polysaccharide by ultrasonic wave [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2007, 16(2): 198~202. (in Chinese)
- 8 王洪伟,崔崇士,徐雅琴. 南瓜多糖复合酶法提取及纯化的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 247~249.
Wang Hongwei, Cui Chongshi, Xu Yaqin. Study on extraction of pumpkin polysaccharide with complex enzymes and its purification [J]. Food Science, 2007, 28(8): 247~249. (in Chinese)
- 9 赵玉,徐雅琴. 微波协同酶法提取南瓜多糖最佳提取条件的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(1): 221~223.
Zhao Yu, Xu Yaqin. Study on the optimum technology of extracting polysaccharide from pumpkin by microwave-enzyme synergistic method [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 30(1): 221~223. (in Chinese)
- 10 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- 11 高振鹏,岳田利,袁亚宏,等. 苹果汁中溴氰菊酯残留的大孔树脂吸附分离[J]. 农业机械学报, 2009, 40(6): 124~128, 152.
Gao Zhenpeng, Yue Tianli, Yuan Yahong, et al. Separation of deltamethrin residue in apple juice with macroporous adsorption resin [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009, 40(6): 124~128, 152. (in Chinese)

(上接第132页)

- 4 Noh E J, Park S Y, Pak J I, et al. Coagulation of soymilk and quality of tofu as affected by freeze treatment of soybeans [J]. Food Chemistry, 2005, 91(4): 715~721.
- 5 Maltais A, Remondetto G E, Gonzalez R, et al. Formation of soy protein isolate cold-set gels: protein and salt effects [J]. Journal of Food Science, 2005, 70(1): C67~C73.
- 6 Kohyama K, Sano Y, Doi E. Rheological characteristics and gelation mechanism of tofu (soybean curd) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(7): 1808~1812.
- 7 Nakamura A, Furuta H, Kato M, et al. Effect of soybean soluble polysaccharides on the stability of milk protein under acidic conditions [J]. Food Hydrocolloids, 2003, 17(3): 333~343.