大孔树脂纯化沙棘茎中5-羟色胺的工艺研究

王津慧[1]，利毛才让[2,3]，热增才旦[1*]，索有瑞[3]
(1.青海大学医学院药学系，西宁 810001；2.青海师范大学民师院化学系，
西宁 810008；3.中国科学院西北高原生物研究所，西宁 810008)

摘要：从中国沙棘茎中提取5-羟色胺(5-HT)是替代动物原料中提取5-HT的最佳途径之一。应用10种大孔吸附树脂对中国沙棘茎5-HT吸附性能筛选，确定HPD树脂对沙棘5-HT具有良好的吸附分离性能。其纯化沙棘5-HT的适宜工艺条件为：乙醇提取物的上样浓度为2.8 μg/mL，原液(pH3.9)上样，树脂柱径高比1:5，上样量与树脂体积比1:5。以4倍树脂体积的蒸馏水清洗树脂柱后，用10%乙醇洗脱，洗脱剂用量为4倍量树脂体积，洗脱流速4 BV/h。使用95%乙醇和2%盐酸纯化得到的5-HT的得率为54.67%。

关键词：沙棘；5-羟色胺；大孔树脂；纯化工艺
中图分类号：R 284.2 文献标志码：A 文章编号：1005-9989(2014)10-0254-04
DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2014.10.055

Technology of purification serotonin in seabuckthorn stems by macroporous resins

WANG Jin-hui[1], LIMAO Cai-rang[2,3], REZENG Cai-dan[1*], SUO You-rui[3]

(1.Department of Pharmacy, Qinghai University Medical College, Xining 810001; 2.Chemistry Department of Nationality Teacher College, Qinghai Normal University, Xining 810008; 3.Northwest Plateau Institute of Biology Chinese Academy of Sciences, Xining 810008)

Abstract: It is one of the best way to extract serotonin (5-hydroxytryptamine) from seabuckthorn stems than blood in animals. Ten kinds of adsorption resin was applied to research its adsorption performance, and determine HPD is good for adsorption and separation serotonin in seabuckthorn stems. The technology of purification of serotonin (5-hydroxytryptamine) in seabuckthorn was determined such as the sample concentration was 2.8 μg/mL. Resin column diameter and high ratio is 1:5, sample weight and volume of resin ratio is 1:5. The flow rate of 4 BV/h, then it was purified by 95% ethanol and 2% hydrochloric acid, yield of 5-hydroxytryptamine was 54.67%.

Key words: seabuckthorn; serotonin (5-hydroxytryptamine); macroporous resin; purification

沙棘Hippophae rhamnoides L. (Seabuckthorn)是胡颓子科(Elaeagnaceae)沙棘属Hippophae L.多年生乔灌植物。我国分布的沙棘占世界沙棘总面积的95%以上。沙棘中富含不饱和脂肪酸、胡萝卜

收稿日期：2014-04-01 *通讯作者
基金项目：中国科学院西部计划项目。
作者简介：王津慧(1959—)，女，青海西宁人，教授，研究方向为中医药基础研究。

素、V_E等多种维生素以及36种黄酮类和多酚类物质、甾醇、5-羟色胺(5-hydroxy tryptamine)等近160多种活性物质，具有抗肿瘤、抗溃疡、抗衰老、抗过敏[1-2]、抗病毒、抗氧化抗菌、抗辐射、增强人体防病抗病能力等广泛的药理功效[3-5]。

5-羟色胺作为一种神经递质，在脑内可参与多种生理功能及病理状态的调节，如睡眠、摄食、体温、精神情感性疾病的调节[6]，有助于情感调节，维持神经系统活动的稳定性。中枢神经系统5-HT含量及功能异常与精神病和偏头痛等疾病的发病有关。5-HT还能加速纤维蛋白原转化为纤维蛋白，有助于血液凝固，具有抑制肿瘤的产生等作用而一直受到医药学界的广泛关注。

沙棘的不同部位中含有不同量的5-羟色胺，在根皮中含量为0.323%，茎皮中含0.2%，二年生的根茎和叶中含0.298%[7]。鲁长征等通过响应面分析法对沙棘中5-羟色胺的提取工艺进行了优化，但提取量甚微[8]。本文用乙醇为提取溶剂，通过超声提取法提取沙棘茎中5-羟色胺后，利用吸附性能好、吸附效率高、树脂再生容易等优点的大孔吸附树脂，考察10种不同大孔吸附树脂对沙棘茎中5-羟色胺吸附分离能力和工艺。从而，使沙棘茎中提取5-羟色胺成为替代动物原料中提取5-HT的途径之一，以达到更好地利用我国沙棘植物资源，为开发沙棘5-羟色胺相关的医疗健康产品奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

沙棘(Hippophae rhamnoides L.)：青海清华博众生物技术有限公司；5-羟色胺盐酸盐对照品：中国药品生物制品检定所，批号：111656-200401，供含量测定用；甲醇、乙腈：色谱纯；乙醇等试剂：均为分析纯；树脂D101、X-5、NKA-Ⅱ、S-8、HPD、强阴离子交换、聚酰胺、DM301、AB-8、D140。

1100型高效液相色谱-质谱联用仪：Agilent公司；色谱柱：Hypersil BDS-C_8(200 mm×4.6 mm，5 μm)，配备四元梯度泵、在线真空脱气机、荧光检测器和自动进样器；大气压化学电离源：APCI Source公司，配备四元梯度泵、在线真空脱气机、荧光检测器、100位自动进样器和电喷雾电离源(ESI)。荧光检测的激发和发射波长分别为λex=300 nm，λem=400 nm。溶剂为乙腈，流速：1.0 mL/min，进样量：10 μL，柱温：30 ℃。

1.2 实验方法

1.2.1 沙棘茎中5-羟色胺的提取及纯化工艺流程

干燥沙棘茎→粉碎→乙醇浸泡→超声提取→浓缩→大孔树脂(10种树脂)→吸附→洗脱→浓缩→酸化95%乙醇→5-羟色胺。

1.2.2 大孔树脂纯化沙棘茎中5-羟色胺 预处理的10种大孔树脂去表面水后，各称取2 g，精密吸取一定浓度的沙棘茎提取液，考察静态吸附效果，优选树脂后考察动态吸附效果。按上述实验条件下检测沙棘5-羟色胺的含量。

1.2.2.1 大孔吸附树脂预处理流程[9]

(1)1 BV的乙醇浸泡树脂24 h(1 BV为1个树脂床体积)；(2)用2 BV的乙醇以2 BV/h的流速通过树脂柱，并浸泡树脂4 h；(3)用乙醇2 BV/h的流速洗涤树脂，至流出液加水不呈白色混浊为止，再用水以同样流速洗净乙醇；(4)用2 BV的5% NaOH溶液以6 BV/h的流速通过树脂层，并浸泡树脂3 h，而后用水以同样流速洗至出水pH中性；(5)用2 BV的10% HAC溶液以6 BV/h的流速通过树脂层，并浸泡树脂3 h，而后用水以同样流速洗至出水pH中性。

1.2.2.2 树脂的静态吸附效果 经过预处理的10种大孔树脂去表面水后，各称取2.0 g，各放置于具塞磨口锥形瓶中，分别加入浓度为4.035 mg/mL的沙棘5-羟色胺提取液5.0 mL，放置48 h，中间摇动几次，使树脂充分吸附后测定树脂的静态吸附效果。将吸附后的树脂过滤，再用10 mL 20%的乙醇解吸，过滤，分别测定两次滤液的浓度。各种树脂的吸附率和解吸率按以下公式计算：

吸附量=(原料液中5-羟色胺的浓度-吸附后药液中5-羟色胺的浓度)×5 mL；

解吸量=解吸液中5-羟色胺的浓度×10 mL；

解吸率(%)=解吸量/吸附量×100。

1.2.2.3 HPD-600树脂洗脱液的选择 树脂吸附沙棘5-羟色胺以后，要将其洗脱下来，在洗脱液的选择上多采用乙醇，残留少且无副作用，因此，本试验采用乙醇和蒸馏水按不同比例为洗脱液。

将粗沙棘5-羟色胺提取液2.8 μg/mL，树脂在2 BV/h的流速下吸附沙棘5-羟色胺后用蒸馏水淋洗后再分别用3 BV的10%、20%、40%、60%和无水乙醇溶液洗脱树脂，分别收集并浓缩干燥之后用高效液相色谱法测定沙棘5-羟色胺的量。

1.2.2.4 HPD-600树脂动态吸附的影响因素 沙棘

5-羟色胺原液的浓度、柱流速和树脂柱内径是影响树脂动态吸附效果的重要因素，设3个水平，见表1。采用正交试验研究了这3个影响因素，正交试验设计如表3。

表1 正交试验因素及水平

水平	因素		
	原液浓度/(μg/mL) A	柱内径/cm B	流速/(BV/h) C
1	1.20	3	1
2	2.80	4	2
3	4.035	5	4

取不同浓度沙棘5-羟色胺溶液，选择不同内径的分离柱，控制柱流速考察HPD树脂吸附能力。

2 结果与讨论

2.1 树脂的静态吸附效果

各种树脂的吸附结果见表2：

表2 10种大孔树脂的静态吸附效果

树脂名称	原液浓度4.035 μg/mL				
	滤液浓度/(μg/mL)	吸附量/μg	洗脱液浓度/(μg/mL)	解吸量/μg	解吸率/%
D101	0.378	18.28	1.115	11.15	62.9
X-5	0.213	19.11	1.694	16.94	88.6
NKA-Ⅱ	0.806	16.15	0.174	1.74	10.8
S-8	0.337	18.49	1.610	16.10	84.7
HPD	0.194	19.21	1.903	19.03	96.3
聚酰胺	2.196	9.20	0.584	5.844	63.52
DM301	1.285	13.75	1.133	11.33	82.40
AB-8	0.843	15.96	1.022	10.22	64.03
D140	0.198	19.19	1.753	17.53	91.34
强离子交换	0.199	19.18	1.863	18.63	92.3

由表2可以看出，10种树脂中HPD树脂的吸附量和解吸率都是最高，当原液浓度为4.035 μg/mL时，吸附量为9.21 μg，解吸量为19.43 μg，解吸率为96.3%，其次是强离子交换树脂，虽原液浓度为4.035 μg/mL时，吸附量为19.18 μg，解析量为18.53 μg，效果较差的是HKA-Ⅱ树脂，吸附量分别为16.15 μg，解吸量为1.74 μg。因此，选择HPD树脂进一步作动态吸附。

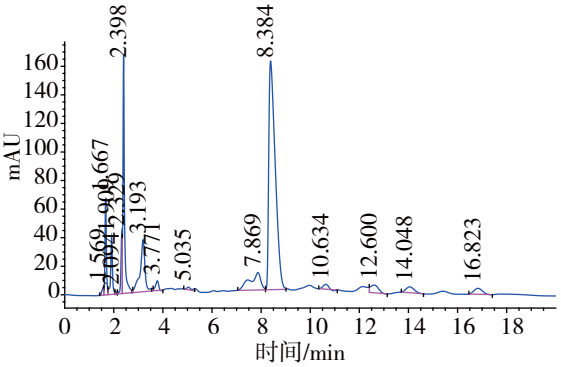

图1 10%乙醇洗脱液的色谱图

2.2 HPD树脂洗脱液的选择

从结果发现，10%的乙醇溶液作为洗脱液效果较好，洗脱液中沙棘5-羟色胺的提取量高，其他浓度的洗脱液洗脱提取量低。液相色谱图如图1。

2.3 HPD树脂吸附的影响因素

沙棘5-羟色胺原液的浓度、柱流速和树脂柱内径为影响因素，本实验设3个水平，采用正交试验研究了这3个影响因素，正交试验结果如表3。

表3 正交试验结果

试验号	因素			解吸率/%
	A	B	C	
1	1	1	1	91
2	1	2	2	86
3	1	3	3	82
4	2	1	2	94
5	2	2	3	85
6	2	3	1	78
7	3	1	3	80
8	3	2	1	96
9	3	3	2	84
k_1	88.33	88.33	86.67	
k_2	89.00	88.00	81.33	
k_3	81.33	82.33	90.67	
R	7.67	6.00	9.33	

表4 方差分析表

误差来源	SS	Df	F比	F	显著性
浓度	1.56	2	0.014	19.00	
柱内径	108.22	2	1.000	19.00	*
柱流速	68.22	2	0.630	19.00	*
误差	1.56	2	1.216		

注：*P<0.05。

由表3可以看出，样品液浓度不变时，不同柱内径对沙棘中5-羟色胺的洗脱影响较大；流速不同，洗脱率也不同，样品液浓度高，流速过快，会使树脂的吸附量下降，提早泄漏；浓度也是影响吸附的一个重要因素，在浓度较低时，随着原液浓度的提高，吸附量和解析量都增加，浓度过高，也会提早泄漏。表3的结果显示，样品液浓度为2.8 μg/mL，以流速为4 BV/h、柱内径为3 cm的组合的效果最好。

2.4 验证试验

选用内径为3 cm的层析柱，采用湿法装柱，树脂柱床体积为50 mL。取2.8 g/mL沙棘5-羟色胺提取液10 mL，吸附流速为4 BV/h。洗脱液用旋转蒸发仪浓缩，用95%乙醇和2%的盐酸纯化，干燥，制得纯沙棘5-羟色胺19.31 μg，制得率为54.67%。

5-羟色胺亦称血清素(Serotonin)，最早是从动物血清中分离出来，为一种吲哚衍生物，其分子式为$C_{10}H_{12}N_{20}$。在沙棘中除了5-羟色胺还含有较多量的不饱和脂肪酸、黄酮类化合物、磷脂类化合物及甾醇类等化合物，所以要用乙醚、乙酸乙酯和三氯甲烷萃取沙棘水提液，在色谱中减少干扰峰。

采用HPD树脂吸附分离沙棘5-羟色胺要采用合适的条件，原液浓度、上柱流速是影响树脂吸附效果的重要因素，如果原液浓度过高或流速过快，泄漏偏早，处理量小，树脂的再生周期缩短，再生次数增多；如果原液浓度过低或流速过慢，则耗时增加，工作效率降低；树脂吸附沙棘5-羟色胺之后，用4 BV的90%的乙醇溶液洗脱，再用10%的乙醇溶液洗脱，获得产品的纯度高；随着洗脱液浓度增加，带来的杂质越多，分离效果反而不好。

HPD树脂对沙棘5-羟色胺的吸附性能好，吸附量大，易洗脱，用10%的乙醇溶液就能将其洗脱下来，分离效果好。但如果流速过快，泄漏较早。

3 结论

确定了提取5-羟色胺的工艺为：温度30 ℃时，10%的乙醇超声提取料液比为1:10的沙棘12 min。通过10种大孔吸附树脂对沙棘5-羟色胺中的吸附性能筛选，确定HPD树脂对沙棘 5-羟色胺具有良好的吸附分离性能。其纯化沙棘5-羟色胺的适宜工艺条件为：乙醇提取物上样浓度为2.8 μg/mL，原液(pH3.9)上样，树脂柱径高比1:5，上样量与树脂体积比1:5。以4倍树脂体积的蒸馏水清洗树脂柱后，用10%乙醇洗脱，洗脱剂用量为4倍量树脂体积，洗脱流速4 BV/h。

参考文献：

[1] Baotu Yang, Kirsti O Kalimo, et al. Effect of dietary supplementation with sea Buckthorn (Hippopharhamnoides) seed and pulp oils on the fatty acid composition of skin glycerophospholipids of patients with atopic dermatitis[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry,2000,11(6):338-340

[2] Baoru Yang, Kirsti O Kalimo, et al. Effects of dietary supplementation with sea Buckthorn (Hippopharhamnoides) seed and pulp oils on atopic dermatitis[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry,1999,11(10):622-630

[3] Yuwen Hsu, Chiafang Tsai, Wenkang Chen, et al. Protective effects of seabuckthorn (Hippophae rhamnoides L.) seed oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice[J]. Food and Chemical Toxicology,2009,47(9):2281-2288

[4] 银建中.超临界二氧化碳萃取沙棘油实验研究[J].化学工程,2002,30(4):13-15

[5] 李永海,李敏.沙棘油脂概论[M].西安:西北大学出版社,1997:73-78

[6] WuYuan C D, Chen C Y, Wu R T. Gallotannins Inhibit Growth, Water insoluble Glucan Synthesis and Aggregation of Mumns Streptococci[J]. J Dent Res,1988,67(1):51

[7] 张哲民,邱德明,李永海.俄罗斯沙棘抗癌研究[J].国际沙棘研究与开发,2010,8(2):19-22

[8] 鲁长征,山永凯,李树志,等.响应面分析法优化沙棘中5-羟色胺提取工艺[J].食品科技,2010,35(6):199-203

[9] 中国医学科学院药物研究所植化室.大孔吸附树脂在中草药化学成分提取分离中的一些应用[J].中草药,1980,(3):138-141

全国中文核心期刊 食品行业的优秀伙伴
广告服务热线：010-83557685
订阅热线：010-67913893