

柠条单宁提取纯化 丙酮法

Method for extraction and purification of tannins from caragana
Acetone method

地方标准信息服务平台

2024-03-15 发布

2024-04-15 实施

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由内蒙古自治区畜牧业标准化技术委员会(SAM/TC 19)归口。

本文件起草单位：内蒙古自治区农牧业科学院。

本文件主要起草人：薛树媛、王莉梅、李九月、高源、田丰、李树生、袁慧萍、梁建勇、刘洋、王泳、苏雅、高秀芳、萨茹拉其其格、史娜、乌仁曹、乌银嘎。

地方标准信息服务平台

柠条单宁提取纯化 丙酮法

1 范围

本文件规定了柠条单宁提取纯化的材料与试剂、仪器与设备、单宁提取、单宁纯化和注意事项。
本文件适用于柠条中单宁的丙酮法提取。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 27985 饲料中单宁的测定 分光光度法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

单宁 tannin

植物多酚，是一类广泛存在于植物体内的具有多元酚结构的次生代谢物，分子量在 500~3000 Da。

4 材料与试剂

4.1 材料

全株柠条，经切段，粉碎，过孔径 0.425 mm 筛，置于避光处，备用。

4.2 试剂

4.2.1 试剂均为分析纯，实验室用水应符合 GB/T 6682 中三级水的要求。

4.2.2 根据用量分别配制 50%、70%丙酮水溶液。

4.2.3 根据用量配制 80%乙醇水溶液。

4.2.4 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20（溶胀度 ≥ 2.5 mL/g）。

5 仪器与设备

5.1 旋转蒸发仪（转速范围 20 rpm~280 rpm，温度范围室温 ± 5 °C~180 °C）。

5.2 真空冷冻干燥机（冷阱温度能达到-80 °C）。

- 5.3 搅拌器（转速范围 0 rpm~1000 rpm）。
- 5.4 电子天平（精度为 0.01 g, 0.0001 g）。
- 5.5 高速冷冻离心机（转速范围 0 rpm~12000 rpm, 温度 \leq 4 °C）。
- 5.6 水浴锅（温度范围室温 \pm 5 °C~100 °C）。
- 5.7 粉碎机（筛底孔径 0.425 mm）。
- 5.8 可调移液器（0.5 mL~5 mL, 1 mL~10 mL）。
- 5.9 真空泵（极限真空度-0.098 MPa）。
- 5.10 布氏漏斗（500 mL, 直径 200 mm, 带磨口三角瓶, 且带真空泵接口）。
- 5.11 聚乙烯离心管（5 mL、50 mL）。

6 单宁提取

称取 200 g 柠条样品置于 2 L 70%丙酮溶液中, 置于搅拌器上搅拌抽提 2 h 后, 将抽提物于室温下以 3500 rpm/min 离心 10 min, 取上清液。重复上述步骤提取一次, 将两次提取液混合。经旋转蒸发仪（70 rpm, 50 °C）减压蒸发浓缩。置于真空冷冻干燥机冻干, 冻干粉即为柠条单宁的粗提物, 提取率约为 5%。置于棕色瓶中, 在-20 °C 下保存。

7 单宁纯化

7.1 凝胶活化

称取 200 g 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 干粉置于可密封容器中, 加入 800 mL 80%乙醇, 密封后, 于 4 °C 条件下静置 8 小时以上, 倒掉乙醇, 再适量加入 80%乙醇浸泡, 平衡 1 h~2 h 后, 转移到布氏漏斗中, 待用。

7.2 凝胶过滤

- 7.2.1 取 6 中所得单宁粗提物冻干粉, 加入适量 80%乙醇搅拌, 直至完全溶解, 用定性滤纸过滤。
- 7.2.2 将滤过液转移到装有活化凝胶的布氏漏斗中（为层析柱）, 真空缓慢抽滤。待全部溶液滤完, 用 80%乙醇反复冲洗凝胶层析柱子除去杂质, 待到滤液颜色逐渐变浅到无色, 弃去所有滤液。
- 7.2.3 再用 50%丙酮水溶液进行洗脱, 反复操作直到滤液颜色为无色, 合并所有的滤液, 将滤液经旋转蒸发仪（70 rpm, 50 °C）浓缩, 置真空冷冻干燥机冻干（冷阱温度-45 °C, 系统压强 8 Pa）, 冻干粉即为柠条单宁的纯品, 置棕色瓶中, 于-20 °C 下保存。

7.3 纯度测定

使用本方法提纯的单宁纯度可达到 95%以上。单宁含量的测定按照 GB/T 27985。

8 注意事项

- 8.1 葡聚糖凝胶 SephadexLH-20 可重复使用。每次使用后用 80%的乙醇洗 3~5 次, 并用 80%的乙醇浸泡, 在 4 °C 条件下贮存, 备用。
- 8.2 在纯化过程中, 始终保持湿润, 不可抽干。
- 8.3 丙酮回收后可重复使用。