

AB-8型大孔吸附树脂分离纯化 大叶金花草总黄酮

李超, 王乃馨, 郑义, 崔珏, 陈华
(徐州工程学院食品工程学院, 江苏 徐州 221000)

摘要:目的: 研究 AB-8 型大孔吸附树脂分离纯化大叶金花草总黄酮的工艺参数, 为工业化生产提供依据。方法: 通过静态、动态相结合的方法, 确定最佳工艺参数。结果: 最佳工艺参数为上样液 pH4.5、上样液质量浓度 1.00mg/mL、上样液流速 80mL/h、洗脱液为体积分数 70% 乙醇溶液、洗脱液流速 40mL/h、洗脱液用量 60mL, 分离纯化后的总黄酮产品纯度可达 66.16%。结论: 采用 AB-8 型大孔吸附树脂分离纯化大叶金花草总黄酮操作简单、安全、成本低廉, 有较高的应用价值。

关键词: 大叶金花草; 总黄酮; 分离纯化

Using AB-8 Macroporous Adsorption Resin for Separation and Purification of Total Flavonoids from *Stenoloma chusana* (L.) Ching

LI Chao, WANG Nai-xin, ZHENG Yi, CUI Jue, CHEN Hua
(College of Food Engineering, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221000, China)

Abstract: Objective: To establish optimal parameters for the separation and purification of total flavonoids from the whole plant of *Stenoloma chusana* (L.) Ching using AB-8 macroporous adsorption resin. Methods: Static and dynamic adsorption and desorption behaviors of AB-8 macroporous adsorption resin were evaluated for achieving the best purification of total flavonoids. Results: The optimum adsorption and desorption parameters were found to be: sample pH 4.5, sample concentration 1.00 mg/mL, sample loading flow rate 80 mL/h, 70% ethanol as the eluent, desorption flow rate 40 mL/h and eluent amount 60 mL, resulting in a total flavonoid purity of 66.16%. Conclusion: AB-8 macroporous adsorption resin is safe, economical and easy to use and can therefore be promisingly applied to separate and purify total flavonoids from the whole plant of *Stenoloma chusana* (L.) Ching.

Key words: *Stenoloma chusana* (L.) Ching; total flavonoids; separation and purification

中图分类号: O623.54; R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)16-0031-05

大叶金花草是鳞始蕨科植物乌蕨(*Stenoloma chusana* (L.) Ching)的全草或根茎, 又名野鸡尾、金花草、土黄连、中华金粉蕨, 具有清热、解毒、利尿、退黄止血的功效, 主产于长江以南和陕西、四川各地^[1-4]。其单方和复方均具有清热解毒、利湿、止血的功效。临床用于治疗肠炎、肝炎、咽喉炎等症, 民间用于治疗胃癌、肠癌、食物中毒和农药中毒, 有“万能解毒药”之称^[5]。现代药理证明大叶金花草有着明显的抗菌活性、解毒作用和保肝、抗炎、止血的作用, 其主要有效成分是黄酮类化合物^[6]。近年来, 随着天然药

物化学、药理研究的不断深入及其分析手段突飞猛进, 黄酮类化合物在医学上被用于预防血液类疾病及治疗冠状动脉硬化等疾病, 它可清除体内自由基延缓衰老和抑制肿瘤, 防护紫外线损伤等^[7]。大孔吸附树脂是一类不溶于酸、碱及各种有机溶剂且有较好吸附性能的有机高聚物吸附剂, 近年来广泛被应用于医药、环保和食品等领域^[8], 在中草药研究方面也较广泛, 尤其在黄酮类成分中, 如红树莓总黄酮^[9]、银杏叶总黄酮^[10]和杭白菊总黄酮^[11]等及其他各类成分均有采用大孔吸附树脂法进行分离纯化的研究, 应用于大叶金花草总黄酮分离纯化

收稿日期: 2010-10-20

基金项目: 江苏省高校自然科学研究面上项目(10KJD360002); 徐州工程学院培育项目(XKY2010114)

作者简介: 李超(1978—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为天然产物化学及食品加工。E-mail: chaoge002@163.com

方面至今未见报道。本实验对 AB-8 大孔吸附树脂纯化大叶金花草总黄酮的工艺进行研究,为该资源的进一步开发提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大叶金花草购自安徽亳州药材市场,粉碎后过 40 目筛备用;芦丁对照品 中国药品生物制品检定所;AB-8 型大孔吸附树脂 安徽三星树脂有限公司;其他均为分析纯。

1.2 仪器与设备

标准检验筛 浙江上虞华美仪器筛厂;风选中药粉碎机 山东省青州市精诚机械制造有限公司;FA2104N 型电子分析天平、7230G 型可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;SENCO R201L 型旋转蒸发器 上海申生科技有限公司;SBS 型数控记滴自动部分收集器 上海沪西分析仪器厂;pHS-3C 型酸度计 上海雷磁仪器厂;LGJ-10 型冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 大孔吸附树脂的预处理^[12]

按文献[12]方法稍加修改:将准备装柱的新树脂先用适量的乙醇浸泡充分溶胀,然后装柱,以 120~160mL/h 的流速使 5~8 倍的乙醇通过树脂层,洗至洗出液加适量的水无白色浑浊现象,再以 240~320mL/h 的流速使双蒸水通过树脂层,洗净乙醇,最后转入酸碱处理,即用 200mL 质量分数 5% HCl 溶液以 160mL/h 的流速通过树脂层,并浸泡 3h,而后用双蒸水以同样流速洗至出水 pH 值为中性,再用 240mL 质量分数 5% NaOH 溶液,以 200mL/h 的流速通过树脂层,并浸泡 3h,而后用双蒸水以同样流速洗至出水 pH 值呈中性。

1.3.2 样品溶液的制备及测定

1.3.2.1 样品溶液的制备

精密称取大叶金花草样品 3.00g 和纤维素酶 0.012g 于 50mL 三角瓶中,再加入 pH4.5 的缓冲溶液 30mL,在 45℃ 下酶解 2h,灭酶、离心、抽滤,定容,摇匀。

1.3.2.2 总黄酮含量测定

以芦丁为对照品,采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法^[13]。精密称取芦丁 20mg 置于 250mL 容量瓶中,加体积分数 60% 乙醇溶液稀释至刻度,摇匀,配成质量浓度 0.08mg/mL 的对照品储备液。精密量取对照品储备液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL,分别置于 10mL 具塞刻度试管中,先依次分别加体积分数 60% 乙醇溶液 5.0、4.0、3.0、2.0、1.0、0mL,再加入 0.3mL 质量分数 5% NaNO₂ 溶液摇匀后静置 6min,再加入 0.3mL 质量分数 10% Al(NO₃)₃ 溶液摇匀后静置 6min,最后加入 4mL 1mol/L

NaOH 溶液后用体积分数 60% 乙醇溶液定容至刻度,摇匀后静置 10min,以体积分数 60% 乙醇溶液为空白参比,于波长 510nm 处测定吸光度。以芦丁质量浓度为横坐标、吸光度为纵坐标,得回归方程: $A = 11.688C - 0.0301$, $R^2 = 0.9990$,结果表明在 0.008~0.040mg/mL 之间线性良好。

1.3.3 大孔吸附树脂对大叶金花草总黄酮吸附容量和吸附率的测定

分别称取预处理好的 AB-8 型大孔吸附树脂 4.00g 于 250mL 具塞磨口三角瓶中,精密加入 30mL 质量浓度为 0.978mg/mL 的样液,避光密封,并置恒温振荡器中,在 30℃ 条件下,以 120r/min 振荡 24h 后,过滤,取滤液 1mL 按 1.3.2 节方法在波长 510nm 处测定吸光度(A),代入芦丁标准曲线方程,计算吸附平衡后溶液中总黄酮质量浓度。

$$R = \frac{(C_0 - C_1) \times V_1}{m}$$

式中: R 为吸附容量/(mg/g); C_0 为吸附液初始质量浓度/(mg/mL); C_1 为吸附液平衡质量浓度/(mg/mL); V_1 为吸附液体积/mL; m 为树脂干质量/g。

假设吸附前后吸附液体积不变,可由下式计算吸附率:

$$S/\% = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100$$

式中: S 为吸附率; C_0 为吸附液初始质量浓度/(mg/mL); C_1 为吸附液平衡质量浓度/(mg/mL)。

1.3.4 大孔吸附树脂对大叶金花草总黄酮洗脱率的测定

将上述吸附饱和的大孔吸附树脂用蒸馏水洗至洗脱液无色,滤纸吸干树脂表面残留的溶液,准确加入体积分数 75% 乙醇溶液 30mL,置恒温振荡器上振荡 24h,过滤,取滤液 1mL 按 1.3.2 节测定其在波长 510nm 处的吸光度(A),代入芦丁标准曲线方程,计算洗脱液中总黄酮质量浓度。

$$T/\% = \frac{C_2 \times V_2}{(C_0 - C_1) \times V_1} \times 100$$

式中: T 为洗脱率/%; C_0 为吸附液初始质量浓度/(mg/mL); C_1 为吸附液平衡质量浓度/(mg/mL); C_2 为洗脱液质量浓度/(mg/mL); V_1 为吸附液体积/mL; V_2 为洗脱液体积/mL。

1.3.5 静态吸附动力学特性试验

取大孔吸附树脂 4.00g,装入 250mL 具塞磨口三角瓶中,精密加入 30mL 0.978mg/mL 的样液,避光密封,并置恒温振荡器中,在 30℃ 条件下,以 120r/min 振荡

24h, 每1h各取1mL, 测定其总黄酮质量浓度, 绘制静态吸附动力学曲线。

1.3.6 动态吸附洗脱试验

首先将预处理好的树脂湿法装入(1.6cm×20cm)玻璃层析柱中, 然后将大叶金花草总黄酮提取液上柱, 待样品溶液全部通过树脂柱后用去离子水洗至流出液无色, 最后洗脱, 收集洗脱液。通过测定总黄酮含量考察各因素对树脂性能的影响, 确定最佳工艺参数。

1.3.7 纯度的测定

分别将提取液和洗脱液用旋转蒸发器回收乙醇后冷冻干燥, 得到粉状产品, 再分别准确称取总黄酮提取物和纯化物粉末0.02g, 用体积分数60%乙醇溶液定容、摇匀、测定, 计算总黄酮纯度。

2 结果与分析

2.1 静态吸附洗脱试验

2.1.1 吸附容量、吸附率及洗脱率

由表1可看出, AB-8大孔吸附树脂不仅有较大的吸附率, 还有较高的洗脱率。

2.1.2 静态吸附曲线

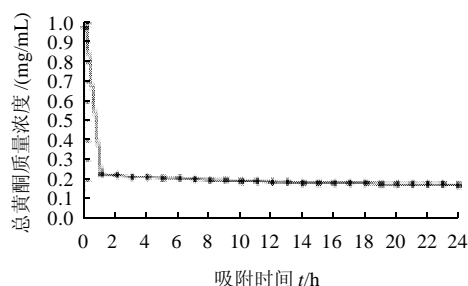


图1 静态吸附曲线

Fig.1 Static absorption curve of AB-8 macroporous adsorption resin

从图1可知, AB-8型大孔吸附树脂对大叶金花草总黄酮的吸附为快速平衡型, 起始阶段的总黄酮质量浓度较大, 在1h后基本达到平衡, AB-8型大孔吸附树脂对大叶金花草总黄酮具有良好的吸附动力学特性。综合分析可知, 该树脂对大叶金花草总黄酮具有良好的吸附洗脱特性, 适合大叶金花草总黄酮的分离纯化。

2.2 动态吸附洗脱试验

2.2.1 上样液pH值对吸附效果的影响

根据化合物的结构特点调整上样液pH值, 可达到较好的吸附效果。在上样液质量浓度0.77mg/mL和上样液流速120mL/h条件下, 考察不同上样液pH值对树脂吸附效果的影响, 结果见图2。

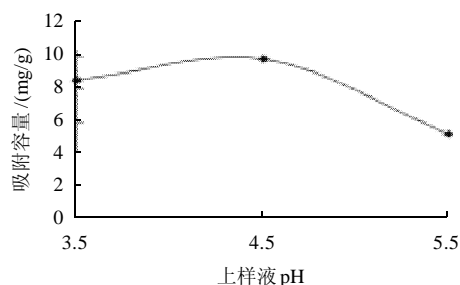


图2 上样液pH值对吸附效果的影响

Fig.2 Effect of sample pH on adsorption of AB-8 macroporous adsorption resin

由图2可知, 从吸附容量考虑, 在pH4.5条件进行吸附比较合适。这是因为黄酮类化合物含多羟基, 呈弱酸性, 故要达到较好的吸附效果, 吸附需在pH4.5条件进行。

2.2.2 上样液质量浓度对吸附效果的影响

在上样液pH4.5和上样液流速120mL/h条件下, 考察不同上样液质量浓度对树脂吸附效果的影响, 结果见图3。

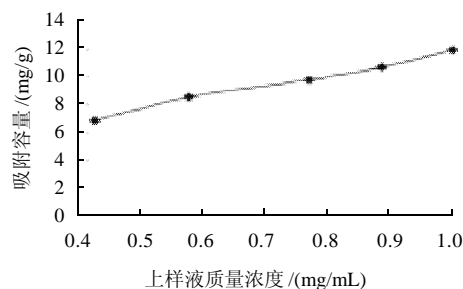


图3 上样液质量浓度对吸附效果的影响

Fig.3 Effect of sample concentration on adsorption of AB-8 macroporous adsorption resin

由图3可知, 低质量浓度不利于总黄酮的吸附, 因为上样液质量浓度偏低, 吸附不充分; 当以1.00mg/mL上柱时, 吸附容量最大, 所以选择上样液质量浓度为1.00mg/mL。

表1 AB-8大孔吸附树脂对大叶金花草总黄酮的吸附容量、吸附率及洗脱率

Table 1 Adsorption capacity, adsorption rate and elution rate of AB-8 macroporous adsorption resin towards total flavonoids from *Stenoloma chusana* (L.) Ching

树脂极性	比表面积/(m ² /g)	平均孔径/Å	初始质量浓度/(mg/mL)	平衡质量浓度/(mg/mL)	吸附容量/(mg/g)	吸附率/%	洗脱液质量浓度/(mg/mL)	洗脱率/%
非极性	480~520	0.3~1.25	0.978	0.187	17.45	80.84	0.625	79.06

2.2.3 上样液流速对吸附效果的影响

在上样液 pH4.5 和上样液质量浓度 1.00mg/mL 的条件下, 考察不同上样液流速对树脂吸附效果的影响, 结果见图 4。

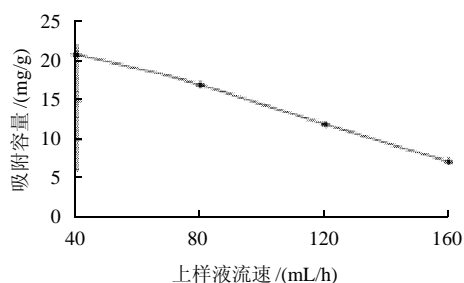


图 4 上样液流速对吸附效果的影响

Fig.4 Effect of sample loading flow rate of on adsorption of AB-8 macroporous adsorption resin

由图 4 可知, 流速为 40 mL/h 时, 渗漏点出现在 144 mL 附近; 流速为 80 mL/h 时, 渗漏点出现在 118 mL 附近; 流速为 120 mL/h 时, 渗漏点出现在 84 mL 附近; 流速为 160 mL/h 时, 渗漏点出现在 57 mL 附近。流速为 40 mL/h 时, 虽然渗漏点出现的最迟, 但因为流速慢, 导致循环周期延长。因此, 在此选择上样液流速为 80 mL/h。

2.2.4 动态吸附曲线

将上样液 pH4.5、上样液质量浓度 1.00mg/mL 和上样液流速 80 mL/h 的条件下进行动态吸附, 结果见图 5。

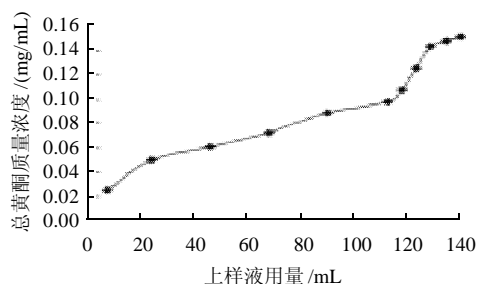


图 5 动态吸附曲线

Fig.5 Dynamic adsorption curve of AB-8 macroporous adsorption resin

由图 5 可知, 上样液体积 120 mL 起开始有少量泄漏 (此时吸附容量为 17.12 mg/g, 吸附率为 85.19%), 当达到 140 mL 时树脂基本不再吸附总黄酮。动态吸附曲线进一步说明 AB-8 型大孔吸附树脂对总黄酮有很大的吸附容量, 适用于纯化大叶金花草总黄酮。

2.2.5 洗脱液体积分数对洗脱效果的影响

洗脱流速过快, 洗脱性能差, 洗脱带宽, 而且脱

尾严重, 洗脱不完全; 但是流速过慢, 则会延长生产周期, 通常情况下控制洗脱流速为吸附流速的 1/3~1/2, 本实验采用吸附流速的 1/2 (即 40 mL/h) 进行考察^[14]。在上样液 pH4.5、上样液质量浓度 1.00mg/mL 和上样液流速 80 mL/h 条件下进行动态吸附, 待吸附达到泄漏点后再分别用体积分数 30%、45%、60%、75%、90% 的乙醇溶液进行洗脱, 结果见图 6。由图 6 可知, 体积分数 75% 乙醇溶液的洗脱率最高。

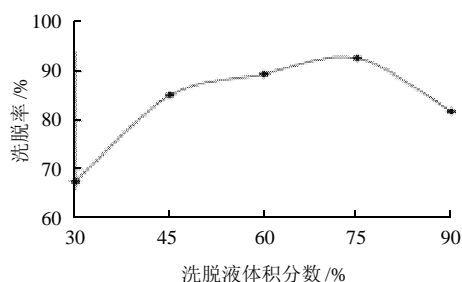


图 6 洗脱液体积分数对洗脱效果的影响

Fig.6 Effect of ethanol concentration on elution rate of AB-8 macroporous adsorption resin

2.2.6 动态洗脱曲线

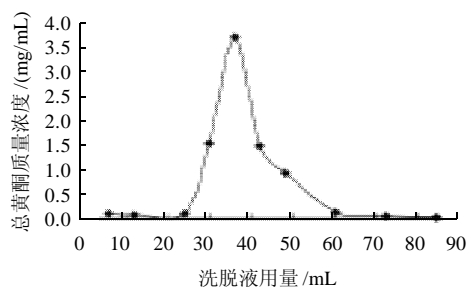


图 7 动态洗脱曲线

Fig.7 Dynamic elution curve of AB-8 macroporous adsorption resin

由图 7 可知, 体积分数 75% 的乙醇溶液通过约 24 mL 时总黄酮开始被洗脱下来, 之后在 40 mL 附近时迅速达到高峰, 通过 60 mL 后, 吸附在树脂上的总黄酮基本被洗脱下来。洗脱曲线出峰快, 且无明显的拖尾现象。

2.3 产品纯度测定

表 2 大叶金花草总黄酮的纯度

Table 2 Purities of total flavonoids from *Stenoloma chusana* (L.) Ching before and after purification using AB-8 macroporous adsorption resin

	纯度/%				
	样品 1	样品 2	样品 3	平均	RSD
纯化前	14.17	14.30	14.42	14.30	0.875
纯化后	66.16	64.93	67.39	66.16	1.859

由表2可知,经纯化后,纯度由原来的14.30%提高到了66.16%,提高了3.63倍。

3 结 论

3.1 AB-8型大孔吸附树脂为理想的大叶金花草总黄酮分离纯化的树脂,吸附率80.84%,洗脱率79.06%。

3.2 AB-8型大孔吸附树脂分离纯化大叶金花草总黄酮的吸附最佳工艺参数为上样液pH4.5、上样液质量浓度1.00mg/mL、上样液流速80mL/h、洗脱液为体积分数70%乙醇溶液、洗脱液流速40mL/h、洗脱液用量60mL。

3.3 在最佳工艺参数条件下大叶金花草纯化产品中总黄酮的纯度由14.30%提高到66.16%,提高了3.63倍,由此可以看出AB-8型大孔吸附树脂可有效地分离纯化大叶金花草总黄酮。

参考文献:

- [1] 张春椿,熊耀康,顾芳芳,等. 乌蕨总黄酮提取工艺研究[J]. 中国药业, 2008, 17(2): 42-43.
- [2] 罗娅君,肖新峰,王照丽. 大叶金花草多糖的提取、分离纯化及结构分析[J]. 林产化学与工业, 2009, 29(1): 68-72.
- [3] 罗娅君,肖新峰,王照丽. 大叶金花草化学成分的研究[J]. 化学研究与应用, 2009, 21(1): 97-99.
- [4] 李明芳,罗娅君,李辉容. 大叶金花草黄酮类化学成分的研究[J]. 四川师范大学学报, 2009, 32(3): 358-360.
- [5] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编: 上册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 532.
- [6] 蔡建秀,黄晓冬. 乌蕨总黄酮及水提液的药理试验[J]. 福建中医学院学报, 2004, 14(1): 13-14.
- [7] 胡晓,杨敬格,周青. 乌蕨对乐果的解毒作用[J]. 赣南医学院学报, 1998, 18(4): 277-279.
- [8] 朱英,何远,李丽. 大孔树脂对地锦草、金银花叶与杭白菊总黄酮吸附分离性能研究[J]. 医学研究杂志, 2007, 36(1): 56-59.
- [9] 杨国伟,白立敏,苏东海,等. 大孔吸附树脂纯化红树莓总黄酮的研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(2): 147-150; 154.
- [10] 李月,陈莹. 大孔吸附树脂分离纯化银杏叶总黄酮的研究[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(7): 55-57.
- [11] 闫克玉,于静. 大孔吸附树脂法纯化杭白菊总黄酮[J]. 现代食品科技, 2008, 24(1): 35-38.
- [12] 蔡正云,李莉,何建国. 槲寄生中黄酮类化合物纯化工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(3): 40-44.
- [13] 陈健,姚成. 野马追中总黄酮的测定[J]. 南京师范大学学报, 2004, 4(2): 16-18.
- [14] 张晴,陈勇. AB-8大孔吸附树脂对紫苏色素的吸附性能的研究: pH=3.0时吸附等温线和吸附流出曲线的测定[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25(3): 18-21.