

# 大孔吸附树脂分离纯化高良姜黄酮类化合物的研究

侯红瑞<sup>1</sup>, 陈玲<sup>1</sup>, 冯毅凡<sup>2</sup>, 张志平<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640 2. 广东药学院药物研究所, 广东 广州 510224)

**摘 要:** 利用大孔吸附树脂柱层析法对高良姜黄酮粗提物进行纯化研究, 以紫外分光光度法检测纯化后黄酮纯度和得率, 作为纯化效果的评价。并对各种可能影响黄酮粗提物纯化的因素进行研究, 得出较佳的纯化工艺参数, 经纯化后的高良姜黄酮的含量可达到 90.32%, 得率为 49.91%。

**关键词:** 高良姜; 黄酮; 大孔吸附树脂; 纯化

Study on Separation and Purification of Flavonoids in *Alpinia officinarum* Hance by  
Macroporous Adsorption Resin

HOU Hong-rui<sup>1</sup>, CHEN Ling<sup>1</sup>, FENG Yi-fan<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-ping<sup>1</sup>

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China;  
2. Institute of Drug Research, Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510224, China)

**Abstract:** In this experiment column chromatography composed of the macroporous adsorption resin was used to purify the extract of flavonoids in *Alpinia officinarum* Hance. The content of flavonoids in the sample and the yield, as an evaluation of the result of purification, was determined in UV spectrophotometer. The optimum technological parameters of purification were obtained, which included all the factors of affecting purification of flavonoids. The results showed the content of flavonoids in

收稿日期: 2007-07-10

作者简介: 侯红瑞(1984-), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然多糖药物制备及其生物利用。

为主要原料, 经发酵、陈酿及膨化等物理、化学技术处理使大分子物质降解、酯酸转化, 醇醛缩合等反应, 将天然降糖降脂成分与醋有机地溶为一体, 低温真空浓缩处理一方面减少水分, 另一方面富集营养成分, 再与卵磷脂、燕麦油、助悬剂等脂性配料形成“油包水型”物相。选用的燕麦油、苦荞原料不仅是山西地方特色资源, 而且具有特殊的生理活性。卵磷脂、助悬剂有生理功能, 又有乳化剂功能, 与功能性植物油脂混合, 不仅能降低其黏稠度, 增强操作性, 而且对油脂起保护作用, 抵抗其氧化变性。双重功效的优质原料是优质产品的基础, 是生产优质产品的关键。经均质、乳化等独特有效的配料工艺处理, 内容物互为载体相溶相乳, 提高了生物利用率, 保护易氧化物质的稳定性, 又利于产品的生产工序。

苦荞醋软胶囊集多种天然保健功能因子于一体, 富含多种有机酸和微量元素, 采用国际流行的软胶囊剂

型, 直接用水送服, 便于携带, 有效地解决醋不适刺激酸的问题, 对于开发山西优势资源, 发展高产优质高效农业具有重要作用<sup>[7]</sup>。

## 参考文献:

- [1] 王桂泽. 食醋治病验方[J]. 健康顾问, 2004(6): 39.
- [2] 周永治, 陆培基. 恒顺醋胶囊调节血脂研制报告[J]. 中国酿造, 2001(5): 14-17.
- [3] 陆培基, 周永治. 食醋胶囊——饮食酸碱平衡的好帮手[J]. 江苏调味品副食品, 2000(2): 25-26.
- [4] 朱瑞, 高南南, 陈建民. 苦荞麦的化学成分和药理作用[J]. 中国野生植物资源, 2003(2): 7-9.
- [5] 刘飞, 谢镇远. 吸光度法测定荞麦花叶中总黄酮[J]. 理化检验: 化学分册, 2005(2): 93-95.
- [6] 卫世杰, 刘建平, 郑文杰, 等. 尼莫地平软胶囊的稳定性和体内外相关性研究[J]. 中国药科大学学报, 2006(3): 233-237.
- [7] 牛西午. 富硒黑苦荞醋的制作技术[J]. 农产品加工, 2006(1): 26-27.

the sample was up to 90.32%, and the yield was 49.91% by means of purifications via macroporous adsorption resin from *Alpinia officinarum* Hance.

**Key words** *Alpinia officinarum* Hance; flavonoid; macroporous adsorption resin; purification

中图分类号: TS201

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0258-03

高良姜(*Alpinia officinarum* Hance)为姜科多年生草本植物的干燥根茎,具有温胃散寒,消食止痛功效,主要用于脘腹冷痛,胃寒呕吐,暖气吞酸<sup>[1]</sup>。高良姜药材中含有多种黄酮类成分,黄酮类成分主要为 $\beta$ -谷黄酮类高良姜素、山奈素、山奈酚、槲皮素、异鼠李素和高良姜酚等,是反映高良姜主要功效的有效成分。近年文献也报道高良姜黄酮类化合物具有多种生物活性,如抗溃疡、抗腹泻、利胆、镇痛、消炎、抗缺氧、抗凝、抗血栓形成等。因此,高良姜在食品和药品行业的应用越来越广泛,其黄酮类化合物的提取纯化的研究近年来引起了人们极大的关注<sup>[2]</sup>。目前,从高良姜初提物中分离纯化高良姜黄酮主要是采用聚酰胺柱层析法和溶剂萃取法<sup>[3]</sup>。这些方法处理高良姜黄酮初提物量少、得率不高、工艺复杂、不容易操作。而且产品纯度低,同时溶剂本身常带有一些甲苯和铅化物等毒性物质,从而影响产品质量;若采用混合溶剂萃取,则溶剂回收较困难,且费用高<sup>[4-5]</sup>。本实验选择具有吸附选择性好,易放大工艺的精制树脂建立高良姜黄酮提取纯化技术路线,采用大孔吸附树脂代替传统工艺,取得了令人满意的效果,希望为高良姜黄酮分离纯化提供一种高效、切实可行,且可工业化生产的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

高良姜黄酮初提物(43%)、高良姜素对照品 广东省药学院药物研究所;大孔吸附树脂 HPD-600 河北沧州宝恩化工有限公司;UV-2102 紫外可见分光光度计 尤尼柯仪器有限公司生产;BT00-100M 恒流泵 保定兰格恒流泵有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 大孔吸附树脂的预处理<sup>[6]</sup>

将树脂用蒸馏水充分淋洗,用95%的乙醇浸泡24h,再对树脂进行真空脱气,将200ml体积的大孔树脂装入树脂柱(2.6×40cm玻璃柱)中,用2BV(2倍树脂体积)的0.1mol/L盐酸溶液以4~6BV/h的速度冲洗并浸泡4h后,用蒸馏水以同样的流速冲洗至中性;再用2BV的0.1mol/L氢氧化钠溶液以4~6BV/h的速度冲洗后浸泡4h,然后用蒸馏水冲洗至中性。

#### 1.2.2 黄酮的纯化

将一定量高良姜黄酮粗提物上大孔吸附树脂柱,用蒸馏水洗5min使样品充分分布在柱中,并静置一段时

间,使样品尽可能吸附在柱材料上,然后用蒸馏水洗脱除去蛋白质、多糖等杂质,最后用乙醇解吸并收集洗脱液,浓缩,真空烘干。

### 1.2.3 含量测定方法

#### 1.2.3.1 标准曲线的绘制

精确称量高良姜素标准品10.0mg(纯度99%以上),用95%乙醇定容至10ml,吸取2ml定容至20ml,再分别吸取0.5、1.0、1.5、2.0、2.5ml于10ml容量瓶中,定容至刻度,在紫外分光光度计360nm下测定其吸光度,以高良姜素浓度( $\mu\text{g/ml}$ )为横坐标,吸光度值(A)为纵坐标,绘制标准曲线。得回归方程: $A=53.48C-0.003$ ,  $R^2=0.9999$ ,式中,A为吸光度,C为高良姜素溶液浓度( $\mu\text{g/ml}$ )。

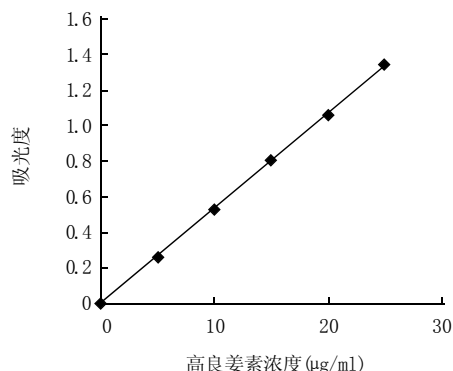


图1 高良姜素标准曲线

Fig.1 Standard curve of galangin

#### 1.2.3.2 总黄酮含量的测定

总黄酮含量测定一般采用紫外分光光度法。通过对高良姜黄酮进行紫外扫描,确定波长为360nm处有最大吸收峰,粗提物与高良姜素标品在同一波长下有最大的吸收峰带。将乙醇洗脱后的液体收集,浓缩蒸干,再用50%乙醇定容,在360nm波长测定其吸光值,根据标准曲线回归方程计算其纯度和得率。

$$\text{纯度} = \frac{X \times V}{G} \times 100\%$$

式中,X为洗脱液中黄酮浓度;V为洗脱液体积;G为洗脱液浓缩烘干后得固形物重量。

$$\text{得率} = \frac{X \times V}{X_{\text{样}} \times V_{\text{样}}} \times 100\%$$

式中,  $X$ 、 $V$  同上;  $X_{\text{样}}$  为上样样品中黄酮浓度;  
 $Y_{\text{样}}$  为上样体积。

## 2 结果与分析

### 2.1 上样流速的确定

配制浓度为 0.82mg/ml 的高良姜粗提品溶液 5000ml 分别以 1、2、3BV/h 上 HPD-600 大孔吸附树脂柱至吸附饱和, 静止 5min, 然后用蒸馏水洗脱 30min 除去蛋白质、多糖等杂质, 最后用 95% 乙醇解吸并收集洗脱液, 浓缩, 真空烘干。计算黄酮纯度及得率。

表 1 上样流速对高良姜黄酮纯化的影响  
Table 1 Effects of purity by velocity of flow

上样流速(BV/h)	纯度(%)	得率(%)
1.5	66.89	40.84
2	77.54	58.32
3	56.73	46.26

结果如表 1 所示, 随着流速的增加, 黄酮的纯度和得率均不同程度提高, 但当流速达到 3BV/h 时, 黄酮纯度和得率呈明显下降趋势, 上样流速主要是影响被吸附物质向树脂内表面扩散的速度, 从而决定了吸附效果, 如果流速太快, 被吸附物质分子来不及扩散到树脂的内表面, 就会发生提早泄露。因此适当控制上样流速可以提高大孔树脂的吸附能力, 在实际生产过程中应结合时间, 综合考虑上样流速, 本研究选择流速为 2BV/h。

### 2.2 上样浓度的确定

分别配制浓度为 0.5、0.7、0.8、0.9、1.1mg/ml 高良姜粗提液上预处理好的 HPD-600 大孔吸附树脂柱, 静止 5min, 然后用蒸馏水洗脱 30min 除去蛋白质、多糖等杂质, 最后用 95% 乙醇解吸并收集洗脱液, 浓缩, 真空烘干。计算黄酮纯度及得率。

表 2 上样原液浓度对高良姜黄酮纯化的影响  
Table 2 Effects of purity by concentration of sample

浓度(mg/ml)	纯度(%)	得率(%)
0.5	54.73	53.31
0.7	57	40.16
0.8	78.76	59.4
0.9	60.07	60.9
1.1	55.3	59.5

结果如表 2 所示, 上样浓度增加, 黄酮的纯度及得率也增加, 当浓度为 0.8mg/ml 时达到最大, 随之随着浓度增加, 黄酮纯度反而下降; 吸附量与被吸附物浓度的关系符合 Freundlich 和 Angmur 经典吸附式, 即被吸附物浓度增加吸附量也随之增加, 但被吸附物浓度增加有一定的限度, 不能超过大孔吸附树脂的吸附容量, 因

此, 上样浓度采用 0.8mg/ml 为最佳。

### 2.3 洗脱剂的选择

精密称取 4.00g 高良姜粗提品溶解于 50% 乙醇溶液, 配制该浓度的高良姜粗提液五份, 分别上柱, 吸附饱和后静止 5min, 先用蒸馏水洗脱 30min, 再分别用 75%、80%、85%、90%、95% 不同浓度的乙醇溶液洗脱, 洗脱液每 20ml 收集一份, 测其吸光度, 合并收集洗脱液, 浓缩, 真空烘干。计算黄酮纯度及得率。

表 3 洗脱剂对高良姜黄酮纯化的影响  
Table 3 Effects of purity by extracting solvent

洗脱剂种类	纯度(%)	得率(%)
75% 乙醇	64.34	27.25
80% 乙醇	66.07	40.64
85% 乙醇	90.32	49.91
90% 乙醇	73.72	44.51
95% 乙醇	61.87	39.83

吸附层析法是根据被分离物质与树脂之间吸附力强弱来选择不同的洗脱剂和相应的洗脱剂浓度。对于极性不大的大孔树脂和被分离物来说, 洗脱剂极性越小, 洗脱能力就越强; 对于极性较大的大孔树脂和被分离物而言, 则用极性较大的溶剂较为合适。高良姜黄酮为弱极性, 一般洗脱剂选择为适当浓度的乙醇溶液。从表 3 结果可以看出: 85% 乙醇洗脱时中黄酮纯度和得率分别为 90.32% 和 49.91%, 比其他浓度的乙醇溶液解吸效果要好, 因此确定 85% 为最佳乙醇洗脱浓度。

## 3 结 论

黄酮类化合物为高良姜中重要的活性物质, 本实验考察了 HPD-600 大孔吸附树脂纯化高良姜黄酮的工艺条件, 确定以上样原液浓度为 0.8mg/ml, 上样流速为 2BV/h, 洗脱剂乙醇浓度为 85% 时高良姜黄酮得率为 49.91%, 纯度可到达 90.32%。纯化之后高良姜黄酮的洗脱率和纯度均较高, 并且大孔树脂再生后可反复利用, 工艺简单、成本低, 适用于工业化大生产应用于食品及药业。影响大孔吸附树脂纯化效果的因素很多, 有关纯化后的高良姜黄酮中树脂残留物等问题有待今后进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 张明发, 沈雅琴. 高良姜的温理药理研究[J]. 陕西中医, 1996, 17(7): 324.
- [2] 吴清和, 荣向路. 高良姜素药效学研究[J]. 中药材, 2000, 3(11): 699-701.
- [3] 董乃维, 刘凤芝, 甘春丽, 等. 高良姜素提取工艺改进研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2006, 40(2): 168-169.
- [4] 林辉. 中药高良姜总黄酮的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2001(12): 486-487.
- [5] 宋爱清, 刘杰. HPLC 法测定蜂胶中黄酮类化合物的含量[J]. 中国养蜂, 2001, 52(3): 10-11.
- [6] 屠鹏飞, 贾存勤, 张洪全. 大孔吸附树脂在中药新药研究和生产中的应用[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2004, 6(3): 22-28.