

荔枝黄酮提取和大孔树脂分离及其组分的 HPLC 分析

董华群¹, 张英慧², 黄剑波², 董华强^{2*}

(1. 贵阳护理职业学院, 贵阳 550081; 2. 佛山大学, 广东 佛山 528231)

〔摘要〕 目的:研究荔枝黄酮提取分离工艺及其产物黄酮组分构成。方法:采用紫外吸收芦丁标准曲线法测定荔枝黄酮含量,比较乙醇水溶液和酸化乙醇水溶液提取荔枝黄酮效果,优化大孔树脂分离荔枝黄酮粗提物,采用 HPLC 图谱法分析荔枝黄酮提取分离产物的黄酮组分。结果:采用紫外吸收芦丁标准曲线法检测荔枝黄酮含量方法简便、有效;70% 乙醇水溶液提取荔枝黄酮较其酸化溶液有更好的提取效果,且粗提物黄酮组分更简单,该法提取荔枝皮黄酮粗提物得率达到(92.5 ± 2.0)% ,纯度(28.7 ± 1.8)% ;在比较的 6 种大孔树脂中,AB-8 分离荔枝黄酮效果最好,以 80% 乙醇水溶液为洗脱剂分离荔枝黄酮,得率为(86.5 ± 2.1)% ,纯度达到(68.6 ± 1.5)% 。结论:采用 70% 乙醇水溶液提取结合大孔树脂 AB-8 分离荔枝黄酮工艺简单而有效。

〔关键词〕 荔枝; 黄酮; 提取分离; 大孔树脂; 高效液相色谱

〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)11-0111-05

Litchi Flavonoid Extraction and Separation with Macroporous Resins
and the Constituents Analysis with HPLC

DONG Hua-qun¹, ZHANG Ying-hui², HUANG Jian-bo², DONG Hua-qiang^{2*}

〔收稿日期〕 20111112(006)

〔第一作者〕 董华群,副教授,本科,从事预防医学和营养学,E-mail:18985003235@ 189. cn

〔通讯作者〕 * 董华强,教授,博士,从事食品化学,E-mail:huaqiangdong@ 163. com

2.9 样品测定 称取 3 批次芪芍方有效部位样品各 3 份,每份约 80 mg,精密称定,按 2.2 项下方法操作制备供试品溶液,按样品测定项下方法测定峰面积积分值,计算样品含量,结果见表 2。

表 2 3 批次样品中芒柄花素的含量测定(n = 3) %

批次	芒柄花素含量	RSD
1	0.81	2.55
2	0.74	2.06
3	0.63	1.59

3 讨论

异黄酮类、黄芪总苷类及芍药苷类化合物为芪芍方有效部位中主要有效成分,前期我们建立了芪芍方有效部位中葛根素、大豆苷等极性较大的异黄酮类物质的含量控制方法^[5]。本实验首次采用高效液相色谱法对芪芍方有效部位中弱极性异黄酮类物质芒柄花素进行了质量控制研究,为全面表征芪芍方有效部位的主要异黄酮类化合物提供了实验支

撑,为创新新药研制奠定了基础。所建立的方法误差小、灵敏高、简单快捷可重复。

〔参考文献〕

[1] 曲智威,温春阳,王爱平,等. 葛根素对酒精性肝纤维化影响的实验研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2010, 18(3):180.
[2] 黄可儿,赵敏,王建华. 黄芪总苷的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2005, 16(6):461.
[3] 丁美萍,封菲,胡海涛,等. 葛根素对脑缺血再灌注后核因子 KappaB 表达的影响[J]. 中国中药杂志,2008, 32(23):255.
[4] 高雪岩,孙建宁,王文全,等. 赤芍总苷的制备及其对小鼠肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志. 2010,16(18):183.
[5] 代丽萍,石任兵. HPLC-PDA 法测定芪芍方有效部位中葛根素、大豆苷、芍药苷的含量[J]. 北京中医药大学学报,2010,3(3):200.

〔责任编辑 蔡仲德〕

(1. Guiyang Nursing Vocational College, Guiyang 550081, China;
2. Department of Food Science, Foshan University, Foshan 528231, China)

[Abstract] **Objective:** To research the technologies of Litchi flavonoid separation and the flavonoid constituents. **Method:** The flavonoid content was detected with rutin as the standard reference by UV absorption, comparisons of the flavonoid extraction effects with ethanol and its acidification solutions were conducted, the technologies of litchi flavonoid separation with macroporous resin were optimized, and the flavonoid constituents of the extraction and separation products were analyzed with HPLC graph. **Result:** The UV absorption method to detect Litchi flavonoid content was simple and workable; the extraction effect of 70% of ethanol solution was better than its acidification solution, the flavonoid constituent was simpler than the acidification one, and its recovery rate and purity reached $(92.5 \pm 2.0)\%$ and $(28.7 \pm 1.8)\%$ respectively. Resin AB-8 had the best effect of flavonoid separation among the 6 macroporous resins, the recovery rate and the purity of the separated product with the eluant of 80% ethanol solution were $(86.5 \pm 2.1)\%$ and $(68.6 \pm 1.5)\%$ respectively. **Conclusion:** The technology of extraction with 70% ethanol followed by separation with resin AB-8 to extract and separate Litchi flavonoid was simple and workable.

[Key words] litchi; flavonoid; extraction and separation; macroporous-resin; HPLC

荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)原产于我国南方,属无患子科果树,在 20 多个国家有种植^[1-2]。我国是荔枝主产区,种植面积和产量分别占世界的 80% 和 75%^[3]。采后荔枝果皮和果核一般作为废物丢弃,不仅造成资源浪费,而且污染环境。研究发现荔枝果皮中存在大量不同种类多酚物质^[4-7],具有多种生物活性,如抗氧化、防治心血管疾病、抗炎、抗癌等^[8-11]。

植物多酚包括黄酮类物质^[12]。关于荔枝荔枝多酚和黄酮的提取分离已有一些研究报道,常用乙醇水溶液提取^[13-14],也有用酸化乙醇水溶液提取^[5-7, 15],但是关于醇法和酸化醇法提取荔枝黄酮效果比较尚未见研究报道。大孔树脂分离植物黄酮有许多优点^[16-17],采用大孔树脂分离荔枝黄酮的研究也有报道^[18-19],但未见大孔树脂分离荔枝黄酮产物组分的比较分析。

我们在研究荔枝黄酮提取分离工艺基础上,采用 HPLC 图谱分析法,对荔枝黄酮粗提物和大孔树脂分离产物的黄酮组分进行了分析,对更有效的提取分离荔枝黄酮及其后续纯化和活性评价研究提供指导。

1 材料

荔枝果实:品种桂味,2011 年 7 月采于广东从化;芦丁对照品(国药集团化学试剂有限公司)。ADS-7,AB-8,NKA-9,ADS-17,S-8,X-5 大孔吸附树脂,南开大学化工厂;甲醇色谱纯,上海化学试剂厂,其余试剂均为分析纯。

2690 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),TGL-16G 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂),HH 型数显恒温水浴锅(浙江金坛市金城国胜实验仪器厂),精密电子天平(1/万)(上海民桥精密科学仪器有限公司),756MC 型紫外-可见光分光光度计(上海分析仪器总厂)。

2 紫外吸收法测定荔枝黄酮含量

2.1 对照品与样品紫外吸收波长扫描 分别测定芦丁对照品和荔枝黄酮粗提物溶液在 200 ~ 400 nm 波长的吸收曲线。

2.2 芦丁标准曲线的绘制 配制 20.0, 40.0, 60.0, 80.0, 100.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的芦丁对照品梯度浓度溶液,分别测定特征波长下的吸光度 A;以芦丁浓度为横坐标、吸光度为纵坐标作图,得芦丁标准曲线及其回归方程。

2.3 样品黄酮含量测定 取剪碎的荔枝皮、核适量,加入 15 倍体积的 70% 乙醇回流提取 3.0 h,滤纸过滤后收集滤液,真空浓缩后定容,得样品黄酮提取液。按照对照品吸光度测定方法测得样品提取液的吸光度,带入回归方程计算得样品溶液黄酮含量,按下式计算荔枝样品黄酮含量:

$$\text{样品黄酮含量} = \frac{\text{样品黄酮质量}}{\text{干样品质量}} \times 100\% \quad (1)$$

2.4 荔枝黄酮含量测定方法学考察 线性关系考察:配置荔枝黄酮粗提取物系列梯度浓度溶液,分别测定在特征吸收波长的吸光度值,以黄酮粗提物浓度为横坐标、对应吸光度值为纵坐标作图,考察其线

性关系。

稳定性试验:配制同一样品溶液,分别在配制后 0,2,4,8,16,24,36 h 进行检测分析,测得黄酮质量浓度 RSD 0.85%,表明在 36 h 稳定。

精密性试验:对同一样品溶液平行取样 5 份,按照上述条件进行吸光度检测,测得吸光度 RSD 1.05%,表明精密性良好。

重复性试验:取同一批次荔枝样品,按样品提取液制备方法分别制备 5 份样品液,测定其黄酮含量,测得结果 RSD 2.19%,表明本方法重复性良好。

回收率测定:采用加样回收法。取已知黄酮含量的荔枝样品溶液 10.0 mL,分别加入 1.0,2.0,4.0 mL 已知浓度的相同黄酮对照品溶液,测定溶液黄酮含量。

2.5 荔枝黄酮提取及其得率与纯度表示 取一定量剪碎的荔枝皮、核,分别加入 15 倍量 70% 乙醇溶液和 70% 乙醇酸化(含 3.0% 盐酸)溶液溶剂^[1],于 95 ℃ 下水浴加热 1.0 h 后停止加热,浸泡过夜,滤纸过滤后收集滤液,真空浓缩后挥干,得荔枝皮、核黄酮粗提物。荔枝黄酮提取物得率和纯度按下式表示:

$$\text{得率} = \text{产物黄酮质量} / \text{样品黄酮质量} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{纯度} = \text{产物黄酮质量} / \text{产物质量} \times 100\% \quad (3)$$

2.6 大孔吸附树脂分离荔枝黄酮

2.6.1 大孔吸附树脂预处理 取一定量的大孔吸附树脂,先用无水乙醇浸泡 0.5 h,充分溶胀,倾倒掉上层乙醇,继续用无水乙醇洗,期间不断更换乙醇,以除去树脂中所含有的低聚物、填充剂等杂质。洗至流出液加水(1:5)不出现白色浑浊为止,再用蒸馏水洗,洗至无乙醇味,收集备用。

2.6.2 大孔吸附树脂的筛选 在 20.0 mL 质量浓度为 5.0 g·L⁻¹ 的荔枝黄酮粗提物水溶液中,入 1.0 g 预处理好的大孔树脂,充分搅拌、振荡后,于室温静置过夜,测定溶液黄酮浓度变化,按照公式(4)计算各树脂的吸附率;滤纸过滤留下吸附树脂,树脂置 20.0 mL 70% 乙醇溶液中搅拌、静置 0.5 h,滤纸过滤收集滤液,重复此步骤一次,合并滤液,测定滤液黄酮浓度,按公式(5)计算解吸率。

$$\text{吸附率} = (C_0 - C) / C_0 \times 100\% \quad (4)$$

$$\text{解吸率} = V_1 C_1 / (C_0 - C) V \times 100\% \quad (5)$$

式中 C_0 , C 为吸附前后溶液中黄酮类化合物的浓度; V 为溶液体积, C_1 为解吸液中黄酮类化合物的浓度, V_1 为解吸液体积。根据静态吸附率和解吸率以筛选出最适树脂。

2.7 最佳洗脱剂筛选 黄酮类化合物易溶于甲醇、乙醇、丙酮等有机试剂,考虑到甲醇的毒性和丙酮的挥发性,本研究采用乙醇-水体系作为洗脱剂。按照 2.4 方法,采用不同浓度乙醇水溶液为洗脱剂,对饱和吸附荔枝黄酮的树脂进行静态解吸 24 h 后,根据解吸率选出最佳洗脱剂。

2.8 HPLC 分析条件 Diamond-C₁₈ 色谱柱,流动相 甲醇-水(6:4),检测波长 260 nm,进样量 10.0 μL,流速 1.0 mL·min⁻¹。

2.9 试验设计和数据统计分析 所有处理都设 3 次重复,试验数据均经单因素方差分析,在 F 测验显著的基础上再进行 Duncan's 多重比较。

3 结果与分析

3.1 荔枝黄酮含量测定方法考察

3.1.1 对照品和样品溶液特征吸收波长 对芦丁对照品和荔枝黄酮提取物乙醇水溶液光吸收波长扫描结果表明,二者都在 260 nm 处出现一个明显的最大吸收峰,因此确定 260 nm 为紫外吸收法测定荔枝黄酮的特征波长。

3.1.2 标准曲线测定 根据标准品芦丁溶液系列质量浓度(X)对应 260 nm 处吸光(Y)作出的标准曲线,得到其回归方程 $Y = 5.623X + 0.2203$ ($R^2 = 0.9897$),相关性良好。

3.1.3 紫外吸收测定荔枝黄酮含量方法学检验 线性关系:根据荔枝黄酮提取物溶液系列梯度浓度(X)对应的 260 nm 处吸光度(Y)作图得一线性曲线,其回归方程 $Y = 1.751X + 0.0819$ ($R^2 = 0.9896$),有良好相关性。

其他方法学考察结果:稳定性 RSD 6.4%,精密性 RSD 5.8%,重复性($n=5$) RSD 7.1%,加样回收率 RSD 2.1%。

3.1.4 荔枝黄酮含量测定 采用上述方法测得荔枝果皮和果核的黄酮类含量分别为 $(5.7 \pm 1.5)\%$ 和 $(3.32 \pm 1.2)\%$ 。

3.2 荔枝黄酮醇提和酸化醇提结果

3.2.1 荔枝黄酮粗提物得率及黄酮纯度 从荔枝皮、核黄酮类粗提物提取结果(表 1)看出,虽然提取剂 A 和 B 对荔枝皮黄酮粗提物得率差别不明显 $92.5\% \pm 2.0\%$ 和 $91.3\% \pm 2.1\%$,但提取剂 A 粗提物黄酮纯度 $28.7\% \pm 1.8\%$ 明显高于提取剂 B 的纯度 $24.6\% \pm 1.5\%$,说明 A 的提取效果更好。而采用同样溶剂 A 提取荔枝皮和核黄酮类的效果差异不明显。

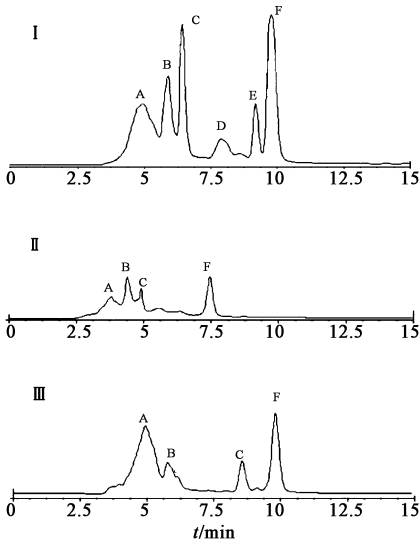
3.2.2 荔枝黄酮粗提物组分 HPLC 分析 从图 1

表 1 荔枝黄酮提取($\bar{x} \pm s, n = 3$)

提取剂 ¹⁾	材料	得率/%	纯度/%
A	皮	92.5 ± 2.0a	28.7 ± 1.8a
B	皮	91.3 ± 2.1a	24.6 ± 1.5b
A	核	89.8 ± 2.5a	27.5 ± 2.0a

注: ¹⁾表中每一数值是 3 次重复的平均值,经邓肯多重比较检验,同一列中带相同字母的数值在 5% 水平不显著;2) A 为 70% 乙醇溶液, B 为 70% 乙醇 + 3.0% 盐酸 70%。

看出,采用 70% 乙醇提取荔枝皮黄酮粗提物的组分(Ⅱ)较酸化乙醇提取剂(Ⅰ)少了 2 个(D 和 E),说明酸化提取物成分更复杂。而用相同提取剂提取的荔枝核黄酮粗提物组分(Ⅲ)比荔枝皮较提取剂(Ⅱ)少 3 个(C, D 和 E),却多出各 F,说明荔枝皮和核的黄酮组分是不同的。



I. 荔枝皮-提取剂 B; II. 荔枝皮-提取剂 A; III. 荔枝核-提取剂 A
图 1 荔枝黄酮粗提物 HPLC

3.3 大孔树脂分离荔枝黄酮结果 用 70% 乙醇提取荔枝黄酮粗提物为材料,对大孔树脂分离荔枝黄酮粗提物的最佳工艺进行研究。

3.3.1 树脂筛选结果 从静态吸附试验结果看(表 2),树脂 ADS-7, AB-8, S-8 的吸附率(高于 95%)明显高于其他 3 种树脂(低于 70%),被筛选出进行解吸试验;静态解吸试验结果表明(表 2),ADS-7 的解吸效果较差。综合吸附和解吸试验结果,筛选出树脂 AB-8 和 S-8 进行荔枝黄酮的进一步分离试验。

3.3.2 洗脱剂筛选结果 以为例,采用不同体积分数乙醇溶液作为洗脱剂,对 AB-8 树脂吸附荔枝黄酮进行洗脱效果评价,结果如图 2。

表 2 不同树脂对荔枝黄酮提取物水溶液的吸附和解吸效果($\bar{x} \pm s$)

树脂类型	吸附率/%	解吸率/%
ADS-7	95.4 ± 1.5a	75.7 ± 2.1b
AB-8	96.8 ± 2.1a	85.6 ± 1.8a
NKA-9	67.5 ± 2.5b	—
ADS-17	56.6 ± 2.0c	—
S-8	97.2 ± 2.8a	83.1 ± 2.5a
X-5	69.3 ± 1.5b	—

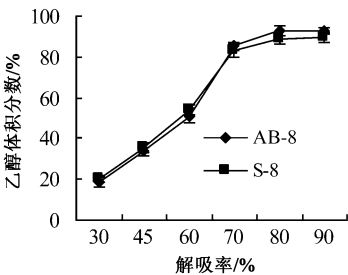


图 2 不同浓度乙醇水溶液的解吸效果

由图 2 看出,随着乙醇浓度增加,树脂 AB-8 和 S-8 的解吸率呈明显上升趋势,至 70% 后上升趋势缓,达到在 80% 后不再上升。因此,选择 80% 乙醇溶液作为树脂 AB-8 和 S-8 分离荔枝黄酮的最佳洗脱剂。

3.3.3 大孔树脂最佳工艺分离荔枝黄酮结果 用大孔树脂 AB-8 和 S-8 作为分离树脂,以 80% 乙醇作为洗脱剂,按前述工艺对 70% 乙醇提取的荔枝皮黄酮粗提物水溶液进行分离,树脂 AB-8 分离得率为(86.5 ± 2.1)%,纯度为(68.6 ± 1.5)%,树脂 S-8 分离得率为(80.3 ± 1.8)%,纯度为(65.6 ± 2.0)%。

3.4 大孔树脂分离荔枝黄酮产物组分 HPLC 分析 由图 3 看出,用树脂 AB-8 和 S-8 对同样组分的荔枝皮黄酮粗提物进行分离,分离产物的黄酮组分明显减少,只剩下 A、B 两个明显的峰,纯度大大提高;同时也看到,树脂 AB-8 和 S-8 分离产物黄酮组分基本相同。

综合比较树脂 AB-8 和 S-8 分离荔枝皮黄酮粗提物的得率、纯度和产物组分可以看出,树脂 AB-8 明显比 S-8 有更好的分离效果。

4 结论

采用紫外吸收法测定荔枝黄酮含量方法简便,检测结果准确、可靠;采用此法测得荔枝果皮和果核的黄酮类含量分别为(5.7 ± 1.5)%和(3.32 ± 1.2)%。

70% 乙醇提取荔枝黄酮粗提物的纯度明显高于添加 3% 盐酸的 70% 乙醇提取剂,该法提取荔枝皮

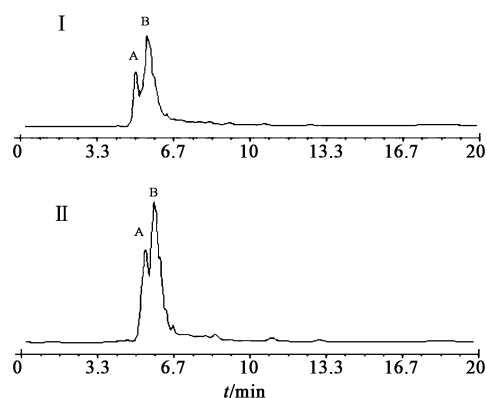


图3 树脂 S-8(I)和 AB-8(II)分离荔枝黄酮粗提物 HPLC 图谱

黄酮粗提物得率达到 $(92.5 \pm 2.0)\%$, 纯度 $(28.7 \pm 1.8)\%$, 且粗提物黄酮组分更简单。

本研究大孔树脂分离荔枝黄酮粗提物以 AB-8 的分离效果最好, 洗脱剂采用 80% 乙醇水溶液, 黄酮得率达到 $(86.5 \pm 2.1)\%$, 纯度为 $(68.6 \pm 1.5)\%$, 分离产物黄酮类组分与树脂 S-8 分离产物基本相同。

因此, 采用 70% 乙醇提取荔枝黄酮粗提物, 结合用大孔树脂 AB-8 进行分离纯化, 可以有效地获得纯度和得率较高的荔枝黄酮提取物, 为进一步研究开发和利用荔枝黄酮类化合物打下基础。

[参考文献]

- [1] Phunchaisri C, Apicha Rtsrangkoon A. Effects of ultra-high pressure on biochemical and physical modification of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) [J]. Food Chem, 2005(93):57.
- [2] WALL M M. Ascorbic acid and mineral composition of longan (*Dimocarpus longan*), lychee (*Litchi chinensis*) and rambutan (*Nephelium lappaceum*) cultivars grown in Hawaii [J]. J Food Composition Anal, 2006(19):655.
- [3] 程泽南, 庐喻辰, 叶冉. 我国荔枝产业竞争力现状及提升策略[J]. 中国热带农业, 2010(6):16.
- [4] Prasad K, Yang B, Yang S, et al. Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) seeds[J]. Food Chem, 2009(116):1.
- [5] Duan X, Wu G, Jiang Y. Evaluation of antioxidant properties of phenolics from litchi fruit in relation to pericarp browning prevention [J]. Molecules, 2007,

(12):759.

- [6] Zhao M, Yang B, Wang J, et al. Identification of the major flavonoids from pericarp tissues of lychee fruit in relation to their antioxidant activities [J]. Food Chem, 2006(98):539.
- [7] Zhang D, Quantick C, Grigor M. Changes in phenolic compounds in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit during post harvest storage [J]. Postharvest Biol Technol, 2000(19):165.
- [8] Yao L, Jiang Y, Shi J, et al. Flavonoids in food and their health benefits [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2004, 59(3):113.
- [9] Zhao M, Yang B, Wang J, et al. Immunomodulatory and anticancer activities of flavonoids extracted from Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp [J]. Int Immunopharmacology, 2007, 7(2):162.
- [10] Zheng G, Yi Z, Zhang J, et al. Studies on the antioxidative effect of extract from mature and premature litchi pericarp [J]. Nat Prod Res Dev, 2003, 15(4):341.
- [11] Wang X, Wei Y, Yuan S, et al. Potential anticancer activity of litchi fruit pericarp extract against hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. Cancer Letters, 2006, 239(1):144.
- [12] 张培成. 黄酮化学[M]. 北京:化学工业出版社, 2009:1.
- [13] 颜仁梁, 刘志刚. 荔枝核多酚类物质的分离与鉴定[J]. 中药材, 2009, 32(4):522.
- [14] 乔小瑞, 烟利亚, 刘兴岚, 等. 荔枝壳多酚提取工艺的响应面法优化及自由基清除活性研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(5):22.
- [15] 杨宝, 赵谋明, 刘洋. 荔枝壳主要黄烷醇类物质分析[J]. 天然产物研究与开发, 2005(5):48.
- [16] 夏林波, 李博, 邓仕任, 等. 大孔吸附树脂分离纯化白花黄酮苷元工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17):13.
- [17] 曾永长, 梁少瑜, 邢学峰, 等. 白花蛇舌草总黄酮的大孔树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18):26.
- [18] 汤建萍, 周春山, 丁立稳. 大孔吸附树脂分离纯化荔枝核黄酮类化合物的研究[J]. 离子交换与吸附, 2006, 22(6):551.
- [19] 王妍, 俞发. 大孔吸附树脂富集荔枝核中总黄酮类成分的工艺研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 9(11):160.

[责任编辑 蔡仲德]