

• 制剂工艺 •

春花胡枝子黄酮大孔树脂纯化工艺研究 及纯化前后抗氧化性变化比较

周守标*, 陈乃东, 胡金蓉, 罗琦, 王贵军, 王春景

(安徽师范大学生命科学学院, 重要生物资源保护与利用安徽省重点实验室, 安徽 芜湖 241000)

[摘要] 目的: 研究 AB-8 型大孔吸附树脂纯化春花胡枝子总黄酮的条件、参数及纯化前后体外抗氧化能力的变化。方法: 通过静态实验、动态实验对影响粗黄酮纯化的因素进行研究; 同时, 对春花胡枝子黄酮的体外抗氧化能力进行测定。结果: 吸附原液浓度为 0.3 mg/mL; 静态吸附时, 温度 20~40 °C, pH=4~5 条件下吸附, 并以 70% 的乙醇作为解吸剂效果较好; 动态时, pH=4~5, 以 0.5~1.0 mL/min 流速上样, 70%~90% 的乙醇以 0.5~1.5 mL/min 洗脱效果较好。浓度 0.12 mg/mL 的精制黄酮和粗黄酮对羟自由基清除率分别为 78.43% 和 29.25%; 浓度 0.375 mg/mL 的精制黄酮和粗黄酮对邻苯三酚自氧化反应速度的抑制率分别为 98.49% 及 63.02%。结论: AB-8 型大孔吸附树脂对春花胡枝子粗黄酮纯化效果较好, 纯度及体外抗氧化能力都得到较大提高。

[关键词] 春花胡枝子黄酮; AB-8 型大孔吸附树脂; 静态吸附; 动态吸附; 清除率; 抑制率

[中图分类号] R286.3, 285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)12-0002-06

Researches on Purification Technologic Conditions of *Lespedeza dunnii* Flavonoids with AB-8 Macroporous Resin and Comparison of their Purification Antioxidant Changes before and after Being Purified

ZHOU Shou-biao*, CHEN Nai-dong, HU Jin-rong, LUO Qi, WANG Gui-jun, WANG Chun-jing
(Key Lab. of Biological Resources Conservation and Utilization of Anhui Province,
College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the conditions and parameters of purifying total flavonoids from *L. dunnii* with AB-8 macroporous resin and to compare with antioxidant ability before and after being purified. **Method:** Some factors which effected purification in static and dynamic adsorptions were studied. Furthermore, the antioxidant ability were also determined. **Result:** The concentration of the sample solution was 0.3 mg/mL. In static adsorption, the effects were preferable when temperature was at 20~40 °C and pH value was 4~5 and using 70% ethanol as desorption reagent. In dynamic adsorption, pH value of sample solution was 4~5 and flowing rate of loading was 0.5~1.0 mL/min. Using 70%~90% ethanol and 0.5~1.5 mL/min flow rate, the eluting effect was good. The clearance rates of 0.12 mg/mL refined flavonoid powder and crude flavonoid powder were 78.43% and 29.25% respectively. The inhibitory rates to pyrogallol autoxidation of 0.375 mg/mL crude flavonoid powde and refined flavonoid powder were 98.49% and 63.02%

[收稿日期] 2006-03-01

[基金项目] 安徽省自然科学基金(NO: 00042415) 和安徽省重要生物资源保护与利用重点实验室基金以及安徽省教育厅自然科学基金重点项目(NO: 2006KJ060A)

[通讯作者] * 周守标, Tel: (0552) 2239256; E-mail: zhoushoubiao@vip.16e.com

respectively. **Conclusion:** AB-8 macroporous resin had an excellent purification effect to crude flavonoid of *Lespedeza dunnii*. The purity and antioxidant ability were improved remarkably.

[**Key words**] *Lespedeza dunnii* flavonoids; AB-8 macroporous resin; static adsorption; dynamic adsorption; clearance rate; inhibitory rate

截止目前,已在 2 000 多种植物中发现了黄酮类化合物(flavonoids)^[1]。黄酮类化合物具有抑菌消炎、抗氧化、抗衰老、抗癌防癌、抗病毒^[1-4]等诸多功效,有着广阔的市场前景。

以乙醇作提取剂,可从豆科胡枝子属(*Lespedeza*)春花胡枝子(*L. dunnii*)的叶粉中提取到含黄酮类化合物的粗黄酮粉,需纯化以提高黄酮的含量。

从天然植物中富集分离黄酮类化合物的方法主要有有机溶剂萃取法^[7,8]、树脂法^[9,10]、超临界 CO₂ 萃取法^[11]和高速逆流色谱技术法等。其中大孔吸附树脂纯化简单易行,与其它纯化方法相比具有成本低、效率高、稳定性好及容易再生等优点,因而在天然物质分离技术中已成主流。本文主要是研究 AB-8 型大孔吸附树脂纯化春花胡枝子粗黄酮粉的条件及效果,并对纯化前后体外抗氧化能力进行测试、比较,为今后进一步研究及工业生产提供参考依据。

1 仪器与材料

索氏提取器; TU-1201 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器设备有限公司); 101AS-2 型不锈钢数显电热鼓风干燥箱(上海浦东跃欣科学仪器厂); HH-4 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司); TGL-20M 离心机(上海安亭科学仪器厂); RE-52D 旋转蒸发器(上海浦沪仪器厂); 恒流泵(上海沪西分析仪器厂); 玻璃层析柱(15 × 200mm); 自动部分收集器(上海沪西分析仪器厂); SHANGPING FA1004 电子天平(上海精科天平); 标准检验筛(40 目,浙江省上虞县纱筛厂); pHs-p1 型酸度计(上海大浦仪器有限公司)。

AB-8 型大孔吸附树脂; 芦丁(上海生化试剂二厂)、乙醇、石油醚、乙醚、NaNO₂、HCl、Al(NO₃)₃ 等为分析纯。

实验材料春花胡枝子采于皖西天堂寨。

2 方法

2.1 粗黄酮粉的提取及含量测定 春花胡枝子叶粉经乙醚脱色素后,按 1:30 料液比加入 75% 的乙醇

于 75 °C 水浴中回流提取 3.5 h,适当浓缩后加入等体积石油醚充分脱脂,旋转蒸发器减压蒸馏并干燥得粗黄酮粉。

精密称取 103 °C 烘干至恒重的芦丁 10 mg,加入 100 mL 70% 的乙醇配制成标准溶液,吸取该标准溶液 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL,加入 70% 的乙醇定容至 10 mL。分别加入 0.6 mL 5% NaNO₂, 摇匀,静置 6 min; 加入 0.6 mL 10% Al(NO₃)₃, 摇匀,静置 6 min; 加入 4% 的 NaOH 4 mL,静置 15 min,于 λ= 510 nm 处测吸光度,用最小二乘法求回归方程。同样方法测定粗黄酮吸光度,用回归方程求黄酮含量。

2.2 吸附原液的预处理 配制一定浓度粗黄酮液,65 °C 水浴超声波处理 1 h,5 000 转/min 离心处理 15 min,测浓度,备用。

2.3 静态吸附实验

2.3.1 静态吸附等温曲线的测定 取 5 个 100 mL 的三角烧瓶各加入 6 g 已活化的湿树脂,再加入 70 mL,0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 经 2.2 预处理黄酮水溶液,20 °C 时测吸附率。重复操作,测 40、60、80 °C 时吸附率。制作等温曲线,确定吸附原液最适浓度及最佳吸附温度。吸附率的计算公式为:

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

式中: C₀ 和 C_r 分别为吸附前后黄酮粗提液的浓度(mg/mL)。

2.3.2 pH 值对大孔树脂静态吸附的影响 取 5 个 100 mL 的三角烧瓶各加入 6 g 已活化的湿树脂及 70 mL 经 2.2 预处理浓度 0.3 mg/mL 黄酮水溶液,调节 pH 值(加入 5% 的 HCl 或 2% 的 NaOH),测定在不同 pH 值下大孔树脂对春花胡枝子黄酮吸附率,确定最佳 pH 值。

2.3.3 解吸附实验 取 5 个 100 mL 的三角烧瓶各加入 6 g 已活化的湿树脂,加入经 2.2 预处理浓度 0.3 mg/mL,黄酮水溶液 70 mL,吸附平衡后,测吸光度,计算吸附量。加入 50 mL 浓度 30%、50%、70%、90%、100% 的乙醇,每隔 1 h 测吸光度至稳定时为止。计算解吸附率。计算公式如下:

$$\text{解吸率}(\%) = m / m_0 \times 100\%$$

$$\text{吸附量} = V(C_0 - C_r) / M$$

式中: C_0 和 C_r 分别为解吸附前后粗黄酮液浓度(mg/mL); m 为洗脱剂中黄酮含量(mg), m_0 为树脂吸附黄酮量(mg); V 为样液体积(mL); M 为树脂干重。

2.4 动态吸附及动态洗脱实验

2.4.1 穿透曲线的测定

称取已活化的湿树脂 20 g/份 4 份装入 4 支 15 mm × 200 mm 的层析柱, 经 2.2 预处理浓度 0.3 mg/mL 黄酮水溶液分别以 0.5、1.0、1.5、2.0 mL/min 流速上样。每管收集 6 mL 溶液, 隔 4 管用比色法测样一次, 至流出液吸光度与上样液相同时停止上样。计算穿透率, 制作穿透曲线。公式为:

$$\text{穿透率}(\%) = C / C_0 \times 100\%$$

式中: C_0 和 C 分别为上样液及流出液的浓度(mg/mL)。

2.4.2 样液 pH 值对动态吸附的影响

将黄酮粗提液加入 HCl 或氨水配制成不同 pH 值(pH4~ 9)的上样液, 测定 pH 对动态吸附的影响。

2.4.3 洗脱剂浓度的确定

按 2.4.1 及 2.4.2 测定的上样速度, pH 值上样 600 mL, 以浓度 30%、50%、70%、90% 的乙醇以 1.0 mL/min 速度洗脱, 每 5 管比色法测样一次, 绘洗脱曲线, 根据洗脱曲线确定洗脱浓度。

2.4.4 洗脱速度的确定

重复 2.4.3 操作上样, 70% 的乙醇为以 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min 速度分别洗脱, 制做洗脱曲线, 根据洗脱曲线确定适宜洗脱速度及洗脱体积。

2.5 抗氧化性实验比较

2.5.1 春花胡枝子黄酮对羟自由基的清除作用

主要参照赵二劳等^[12]方法进行。

2.5.2 春花胡枝子黄酮对超氧阴离子的清除作用

主要由赵二劳^[12]等方法改进而来, 操作如下:

取 18 支 10 mL 的比色管, 各加入 2.0 mL 在 25 °C 下预热 20 min 的 pH= 8.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液, 在 2~ 9 号试管分别加入 2.0 mL 浓度为 0.025、0.075、0.125、0.175、0.225、0.275、0.325、0.375 mg/mL 粗黄酮液, 向 10~ 18 号试管中加入 2.0 mL, 0.025、0.075、0.125、0.175、0.225、0.275、0.325、0.375 mg/mL 精制黄酮液, 再加入 1.0 mL 在 25 °C 下预热 20 min 的 0.2 mmol/L 的邻苯三酚, 双蒸水定容至刻度。在 $\lambda = 325$ nm 处每隔 30 s 以试剂空白(指不加

邻苯三酚及黄酮液只含 pH= 8.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液和双蒸水) 为对照测一次吸光度(A), 根据邻苯三酚自氧化速率计算抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = [(\Delta_1 / \Delta - \Delta_2 / \Delta) / (\Delta_1 / \Delta)] \times 100\%$$

式中: Δ_1 / Δ 指邻苯三酚自氧化时反应速率, Δ_2 / Δ 为加入提取液后邻苯三酚自氧化反应速率。

3 结果与分析

3.1 标准曲线的制定及粗黄酮粉, 黄酮含量的测定

2.1 操作测得吸光度及回归方程(图 1)。测得春花胡枝子粗黄酮粉对干叶粉的得率为 17.3%, 粗黄酮粉中黄酮含量为 28.7%。

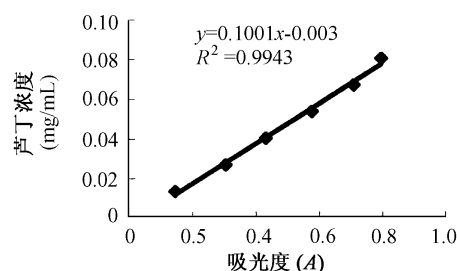


图 1 工作曲线

Fig. 1 Work curve

3.2 静态实验结果

3.2.1 树脂型号的选择

大孔吸附树脂在天然产物分离纯化中应用前景广泛, 但应根据树脂的极性、孔径、比表面积、孔容的综合性能等及待纯化物质理化性质综合考虑, 设计出合适的分离纯化条件。目前最常用的树脂有 AB-8、D-101、DA-201、H103、LD605、CDA-40、D1300 型及 NKA 和 SIP 系列等。实验室中分离纯化黄酮类化合物, AB-8 型大孔树脂效果较好^[14~ 16], 本实验采用 AB-8 型大孔树脂纯化春花胡枝子粗黄酮。

3.2.2 静态吸附等温线的测定结果

吸附原液浓度和静态吸附时整个体系的温度是影响吸附率的重要因素。二者对大孔吸附树脂吸附率的影响见图 2。温度在 20~ 40 °C 时树脂对黄酮的吸附率逐渐升高, 60~ 80 °C 时吸附率下降。可能由于温度升高大孔树脂对春花胡枝子黄酮的吸附率升高, 而解吸附率升高更快; 温度升至一定值时解吸附率超过吸附率, 使大孔树脂对春花胡枝子黄酮的吸附率总体表现为先缓慢上升, 60~ 80 °C 时大幅下降; 因此, 静态吸附温度在 20~ 40 °C 较为适宜。相同温度下, 大孔树脂吸附率随着吸附原液浓度的提高而降低, 在 0.1~ 0.3 mg/mL 时, 下降幅度相对较为平缓, 大于 0.3

mg/mL 后, 虽然每克树脂吸附量继续增加, 但吸附率随吸附原液浓度的增加迅速下降; 为节约原材料, 采用 0.3 mg/mL 作为静态吸附原液浓度比较合适。

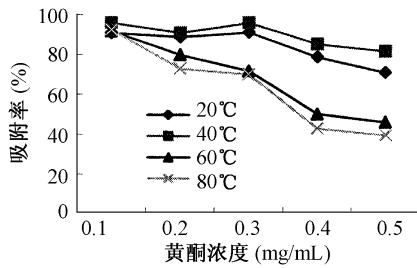


图 2 静态吸附等温线

Fig. 2 Adsorption isotherm of resin

3.2.3 最佳 pH 值的确定 黄酮类化合物呈弱酸性, 要达到较好的效果必须在弱酸性或酸性的条件下吸附, 而 AB-8 型大孔吸附树脂属弱酸性树脂, 使用 pH 值在 4~10。实验探讨了春花胡枝子粗黄酮液在 pH 值为 4 5 6 7 8 9 时与吸附率的关系, 结果见图 3。pH 值在 4~5 时吸附率都在 90% 以上, 而 pH=9 时, 吸附率降至 60% 以下。可能因为 AB-8 型大孔吸附树脂是弱酸型树脂, 在弱酸性环境中, 吸附能力较强。同时, 在弱酸性时黄酮类化合物以分子形式存在, 易于被吸附。因此, 在静态吸附情况下, 选择 pH 在 4~5 之间较为适宜。

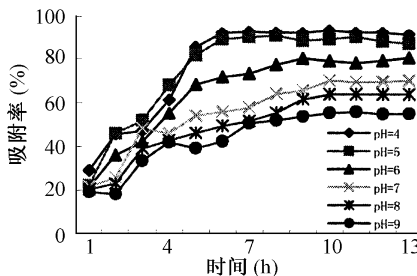


图 3 pH 值对吸附动力学曲线的影响

Fig. 3 The effects of pH of static adsorption dynamic curve

3.2.4 乙醇浓度对静态解吸附效果的影响 考虑经济、安全、环保等因素, 本实验选取浓度 30%、50%、70%、90%、100% 乙醇作为解吸剂^[7], 结果见图 4。春花胡枝子黄酮的解吸附作用随着乙醇浓度的升高而迅速增强, 浓度 70%~90% 时, 解吸率达 80% 左右; 超过 90% 时, 解吸率反而下降。可能浓度过高时, 溶出的杂质也增多, 与黄酮竞争溶剂导致解吸附率下降。考虑到节约及乙醇的挥发性, 选择 70% 的乙醇为解吸剂。

3.3 动态吸附结果

3.3.1 穿透曲线及最佳上样量, 吸附流速的确定

为了避免上样过多导致层析柱过饱和而使粗黄酮直接

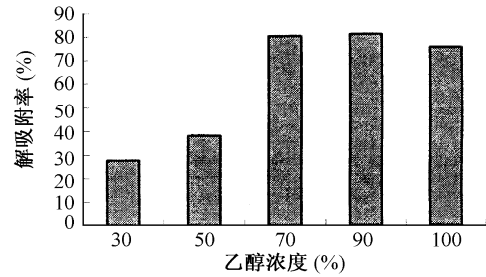


图 4 乙醇浓度对解吸附率的影响

Fig. 4 The effects of ethanol concentration to desorption rate

过柱, 本实验测定了穿透曲线(图 5)。当吸附流速为 0.5、1.0、1.5、2.0 mL/min 时, 饱和上样量分别为 3 500、3 800、4 600、5 100 mL, 此时树脂吸附量约为 65 mg/g 树脂。考虑到生产效率、节约原材料等因素, 必须考虑吸附率、生产周期, 采取适当的上样速度及上样量。由图 5 可见, 上样 500 mL 时, 流速 0.5、1.0、1.5、2.0 mL/min 的穿透率分别为 22%、27.5%、31.5%、39%。1 800 mL 时穿透率全部超过了 50%, 2.0 mL/min 的穿透率甚至达到 70%, 这表明泄漏严重, 继续加样效果很差, 1.5、2.0 mL/min 流速不适宜, 吸附流速以慢速为好, 但过慢会延长生产周期而提高成本。综合考虑, 本实验条件下上样量不超过 500 mL, 吸附流速 0.5~1.0 mL/min 为宜。

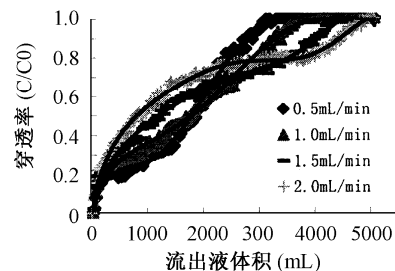


图 5 穿透曲线

Fig. 5 Breakthrough curve

3.3.2 上样液 pH 值的确定 上样液 pH 值对动态吸附效果的影响见图 6。与静态吸附相似, AB-8 型大孔吸附树脂对春花胡枝子黄酮的动态吸附作用随着 pH 值的升高而下降, 但不如静态吸附明显。pH 值 8.09 时, 流出液浓度明显高于 pH 值为 4 时的流

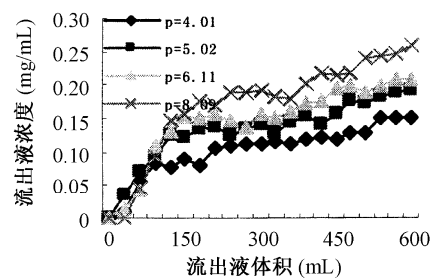


图 6 pH 对动态吸附的影响

Fig. 6 The effects of pH to adsorption

出液浓度。表明在碱性条件下,黄酮液更易泄漏,树脂对黄酮的吸附量下降。而在 pH=4 时,流出液浓度变化相对比较平缓,选择上样液 pH=4 为宜。

3.4 动态洗脱实验结果

3.4.1 洗脱剂浓度的确定 选择解吸剂,以最能溶解吸附质为原则,同时考虑回收、环保等问题^[14];因此乙醇可作为较好的解吸剂。浓度为 30%、50%、70%、90% 乙醇对黄酮类化合物的洗脱结果见图 7。30% 及 50% 的乙醇洗脱,峰宽且拖尾,工作周期长,成本高,黄酮类化合物难以洗脱干净;70% 及 90% 乙醇洗脱,峰较为集中,洗脱时间短。因此,选择 70%~90% 乙醇做洗脱剂为宜。本实验中,用 150 mL 70% 乙醇,可将黄酮类化合物基本解吸下来。

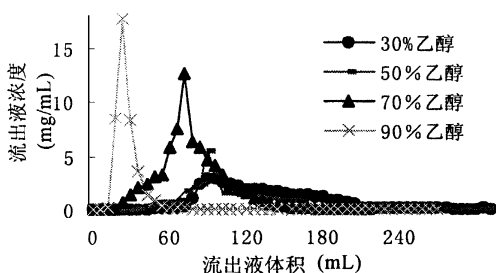


图 7 乙醇浓度对洗脱效果的影响

Fig. 7 The effects of ethanol concentration to eluting

3.4.2 洗脱速度的确定 洗脱流速一般要求慢。因为流速过快,洗脱性能差,洗脱带宽,拖尾严重,洗脱不完全;流速过慢,会延长生产周期。实验设计的五种洗脱流速,结果见图 8。随着洗脱速度的加快,洗脱峰明显降低,洗脱带变宽,拖尾越来越明显,洗脱效果变差且乙醇的消耗量增大。因此选择 0.5~1.5 mL/min 流速洗脱为宜。

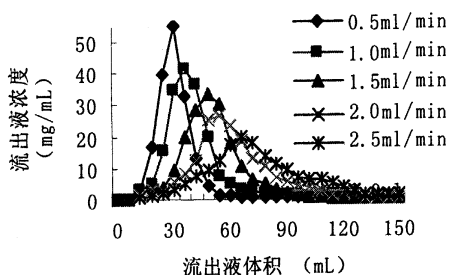


图 8 洗脱速度的影响

Fig. 8 The effects of eluting flowing rate

3.5 体外抗氧化性实验结果

3.5.1 对自由基清除效果 邻二氮菲溶液的 $\lambda=450\sim 550\text{ nm}$ 扫描结果见图 9,在 $\lambda=508.2\text{ nm}$ 处最大吸收峰。在该波长下测吸光度,结果见图 10。随着黄酮浓度的提高,对羟自由基的清除作用也逐渐加强;相同浓度的精制黄酮对羟自由基的清除作用

明显大于粗黄酮,表明大孔吸附树脂纯化春花胡枝子黄酮,既提高了纯度,又加强了羟自由基的清除作用。

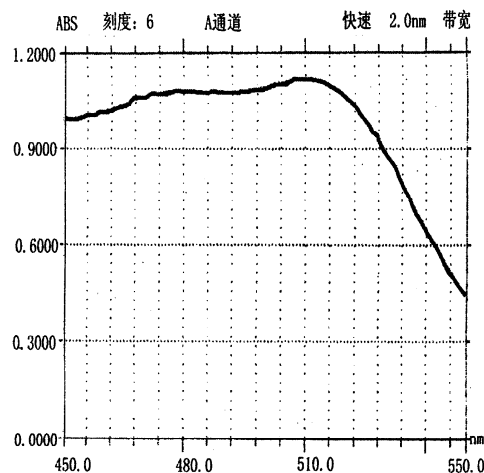


图 9 邻二氮菲吸收光谱

Fig. 9 The spectrum of electrolyte

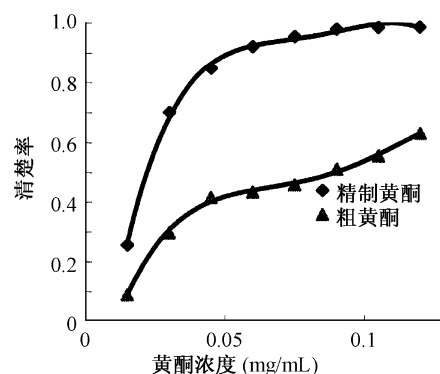


图 10 对羟自由基的清除作用

Fig. 10 The function of *L. dunnii* flavonoids to clear hydroxide radical

3.5.2 对超氧阴离子的清除效果 春花胡枝子黄酮对超氧阴离子的清除作用,结果见图 11。春花胡枝子黄酮对邻苯三酚自氧化速率有较强的抑制作用,抑制率随黄酮浓度加大而提高;精制黄酮抑制率明显高于粗黄酮。

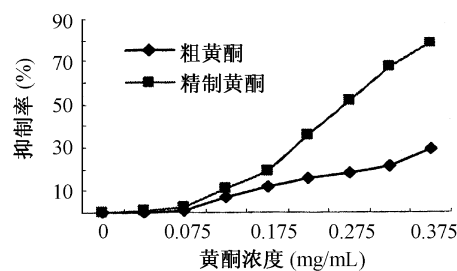


图 11 黄酮对超氧阴离子的清除作用

Fig. 11 The function of *L. dunnii* flavonoids to clear superoxide anion

4 结论

(1) AB-8 型大孔吸附树脂适宜精制春花胡枝子

黄酮,精制黄酮粉相对粗黄酮粉得率为 34.09%,精制黄酮粉中黄酮的含量为 78.15%,而粗黄酮粉中黄酮含量仅为 28.7%。

(2) 静态吸附条件: 本实验条件下, 吸附原液浓度 0.3 mg/mL, 温度 20~ 40 °C, pH= 4~ 5, 吸附时间 6 h, 树脂的吸附量为 5 mg/g 树脂。70%~ 90% 乙醇为解吸附剂解吸效果较好。

(3) 动态吸附及洗脱条件: 本实验条件下, 上样速度 0.5~ 1.0 mL/min, 上样量 500 mL 左右, 上样液 pH 值在 4~ 5; 以 70%~ 90% 的乙醇为洗脱剂, 洗脱速度 0.5~ 1.5 mL/min 洗脱 150 mL 左右。

(4) 春花胡枝子黄酮对羟自由基、超氧阴离子有一定的清除作用。用 AB-8 型大孔吸附树脂纯化的春花胡枝子黄酮体外抗氧化能力明显增强。

[参考文献]

- [1] 汪秋安, 周冰, 单杨. 天然黄酮类化合物的抗氧化活性和提取技术研究进展[J]. 化工生产与技术, 2004, 11 (5): 29-33.
- [2] 唐栩, 许东晖, 梅学婷, 等. 26 种黄酮类天然活性成分的药理研究进展[J]. 中药材, 2003, 27(1): 46-54.
- [3] 年进兴, 董俊兴. 抗 HIV 活性天然黄酮类化合物研究进展[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(8): 571-573.
- [4] 农朝赞, 黄华艺. 黄酮类化合物抗肿瘤作用的研究应用[J]. 中国药房, 2004, 15(9): 568-569.
- [5] 黄河胜, 马传庚, 陈志武. 黄酮类化合物药理作用研究

进展[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(10): 589-592.

- [6] 王威, 闫喜英, 王永奇, 等. 胡枝子属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药, 2000, 31(2): 144-146.
- [7] 陈冲, 罗思奇. 银杏叶提取物的生产工艺条件研究[J]. 中草药, 1997, 28(7): 402-404.
- [8] 张春秀, 胡小玲, 岳红, 等. 银杏黄酮类化合物的提取分离[J]. 应用化学, 2001, 18(4): 338-339.
- [9] 胡敏, 张声华. 银杏黄酮苷的不同提取精制方法比较[J]. 武汉大学学报, 1998, 18(1): 255-258.
- [10] 张海德. 柚皮抗氧化物质的分离纯化研究[D]. 华南理工大学博士学位论文, 2002. 41-43.
- [11] 徐任生, 陈仲良. 中草药有效成分提取与分离[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1981. 132-141.
- [12] 赵二劳, 张海容, 盖青青, 等. 沙棘黄酮的测定及其抗氧化作用[J]. 化学研究与应用, 2003, 15(2): 284-286.
- [13] 钱庭宝. 吸附树脂及其应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 1990. 10, 433-436.
- [14] 郑功源, 杨安树, 邓丹雯. 大孔吸附树脂分离纯化藜蒿中黄酮类化合物[J]. 食品科技, 2003, (1): 11-13.
- [15] 刘兴玲. 芦笋种类黄酮的提取及纯化研究[J]. 江苏食品与发酵, 2005, (1): 4-7.
- [16] 张光亮, 朱靖博, 朱蓓薇. 仙人掌黄酮类化合物的超声波提取和纯化[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(12): 137-144.
- [17] 吉云锈, 葛文光. D101 型吸附树脂纯化银杏叶中黄酮类化合物的研究[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 2000, 23(2): 175-177.