

大孔树脂柱层析法纯化蕨菜总黄酮的工艺条件研究*

陈乃富, 张莉, 韩邦兴, 谷仿丽, 何永松

(皖西学院化学与生命科学系, 安徽六安, 237012)

摘 要 从最适样品浓度、吸附速率、pH、上样量、乙醇洗脱液浓度、乙醇洗脱速率、乙醇洗脱用量等方面对 AB-8 大孔树脂纯化蕨菜总黄酮的工艺条件进行了研究。结果表明:其最适宜工艺条件为黄酮水溶液浓度 0.3 mg/mL、pH 为 2、上样量为 5 mg 黄酮/g 树脂,以 0.5~1 mL/min 吸附速率进行吸附,4 倍床体积的体积分数 70% 乙醇以 0.5~1 mL/min 的流速进行洗脱效果最佳。未经大孔树脂纯化的蕨菜粗黄酮粉中黄酮含量是 18.4%,经 AB-8 大孔树脂柱层析法纯化后的蕨菜总黄酮可达 63.36%,纯度提高约 3.4 倍,此种方法纯化后得精制黄酮粉相对原粗黄酮粉的得率为 18.0%。

关键词 蕨菜,大孔吸附树脂,总黄酮,纯化

黄酮类化合物是自然界药用植物中主要活性成分之一,具有消除氧自由基、抗氧化、调节血脂、抗肿瘤、抗病毒等生理活性^[1~7]。蕨菜中富含黄酮类化合物,文献中报道蕨菜中黄酮含量高达 7.28%^[1,2]。

郑亚杰等人的研究结果表明:AB-8 型大孔吸附树脂对黄酮类物质有较好的吸附和解吸效果^[8~15]。本实验研究了 AB-8 型大孔吸附树脂对影响蕨菜黄酮的动态吸附及解吸的影响,为蕨菜黄酮的纯化提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

采摘蕨菜长出地面 15~20 cm 高的幼嫩叶(嫩叶拳卷期)为试验材料。采摘地点为金寨县黄林镇。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器

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),GL 20G. II 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),RE-52D 旋转蒸发器(上海浦沪仪器厂),SHANGPING FA1004 电子天平(上海精科天平),LG100B 理化干燥箱(上海市实验仪器总厂),标准检验筛(40 目 浙江省上虞县纱筛厂),pHs-pl 型酸度计(上海大浦仪器有限公司),玻璃层析柱(15×200 mm)。

1.2.2 试剂

AB-8 型大孔吸附树脂(天津市光复精细化工研究所),芦丁(rutin,上海化学试剂公司),其余试剂均为国产分析纯(AR)。

1.3 黄酮类化合物的提取^[1,2]

1.3.1 样品处理

称取一定质量的干蕨菜剪碎在研钵中研成粉末,过 40 目筛后收集粉末于烘箱中 103℃ 烘至恒重,在干燥器中冷却后备用。

1.3.2 脱脂

采用 Soxhlet 提取法,以无水乙醚为脱脂剂,于 45℃ 下脱脂约 20 h,充分除去样品中脂类和脂溶性色素。当用玻棒沾一滴刚要发生虹吸时浸提管中的浸提液,当浸提液滴到滤纸上,对光观察滤纸无油痕迹,可以认为脱脂完全。取出样品滤纸包先用电吹风吹干,再将滤纸包置烘箱中 103℃ 烘干,备用。

1.3.3 浸提

将脱脂后的滤纸包,放入三角烧瓶中捣碎,加入一定体积的体积分数 70% 乙醇,在 90℃ 水浴加热经冷凝回流浸提,共浸提 10 次,第一次浸提固液比(g:mL)为 1:5,以后每次固液比为 1:3,浸提时间为每次 2 h,最后一次乙醇浸提液几乎无色,表明浸提充分。合并 10 次浸提液,在分液漏斗中加入适量的石油醚充分振荡、静置,弃去石油醚层以进行二次脱脂,收集脱脂处理后的粗黄酮提取液,用旋转蒸发器减压浓缩至一定体积后取出,置于烧杯内,在水浴锅 90℃ 加热条件下,将提取液浓缩成浆状于 103℃ 烘箱中烘至恒重,得粗黄酮粉并计算蕨菜粗黄酮粉中黄酮含量。

1.4 黄酮含量的测定

按参考文献[7]所述分光光度法进行。标准曲线的回归方程: $A = 12.721C - 0.02903$, 相关系数 r

第一作者:学士,教授。

* 安徽高校省级自然科学研究重点项目资助(No. 2006KJ064A)

收稿日期:2007-01-30,改回日期:2007-03-20

$= 0.9998(C \text{ 为芦丁浓度 } \text{mg/mL}, A \text{ 为吸光度})$ 。

样品中的黄酮含量参照标准曲线制作的测定方法测定吸光度,再由回归方程计算出黄酮含量。

1.5 树脂的预处理^[15]

用 40 目筛在水中筛选出大小合适、分布均匀的树脂,先用体积分数 95%乙醇充分浸泡 24h 后装柱,然后用体积分数 95%乙醇洗至洗出液加适量水无白色浑浊,再用去离子水洗至无醇味后加入大约 4 倍体积的体积分数 5% HCl 浸泡 3~4 h,用去离子水洗至中性,再加入大约 4 倍体积的质量分数 5% NaOH 溶液浸泡 3~4 h,最后用去离子水洗至中性即可使用。

1.6 AB-8 大孔吸附树脂的动态吸附实验^[8-15]

取预处理的 AB-8 大孔吸附树脂装柱,装柱约 10 cm 高,测得其树脂湿量为 20 g。将样液上柱、水洗、再洗脱,然后测定吸附率、解吸率。按下列公式计算:

$$\text{吸附率} / \% = [(m_0 - m_1) / m_0] \times 100$$

$$\text{解吸率} / \% = [m_2 / (m_0 - m_1)] \times 100$$

式中: m_0 ,样液中含有的黄酮总量(mg); m_1 ,吸附流出液中含有的黄酮总量(mg); m_2 ,洗脱液中含有的黄酮总量(mg)。

2 结果与分析

2.1 粗黄酮粉中黄酮含量

取一定量的粗黄酮粉,按参考文献[7]方法测定出粗黄酮粉中的黄酮含量为 18.4%。

2.2 样液浓度对吸附率的影响

取一定量的粗黄酮粉与水在 90℃ 水浴中充分溶解后,再在离心机(10 000 r/min)中离心 15 min,取上清液定容到 500 mL,测量其浓度为 0.48 mg/mL。均分成 5 份,分别配制 0.1、0.2、0.3、0.4、0.48 mg/mL 的黄酮样液 5 份,分别上柱,皆以 1 mL/min 的流速进行吸附后,各用 3 倍床体积的水洗柱,收集所有吸附及洗柱流出液,测定其中黄酮含量,计算吸附的黄酮量及吸附率,结果见图 1。

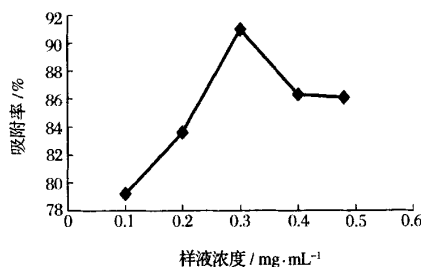


图1 样液浓度对吸附率的影响

从图1中可以看出:当样液浓度为 0.3 mg/mL 时吸附率达到最大为 91.0%,黄酮液浓度过高或过低都影响吸附效果。即样液浓度为 0.3 mg/mL 时上样最佳。

2.3 吸附速率对吸附率的影响

同 2.2 方法配制黄酮浓度为 0.3 mg/mL 的黄酮水溶液 160 mL 5 份,分别上柱,分别以 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min 的速率进行吸附,再用 3 倍床体积的水洗柱。收集所有吸附及洗柱流出液,测定其中黄酮含量,计算吸附的黄酮量及吸附率。结果见图 2。

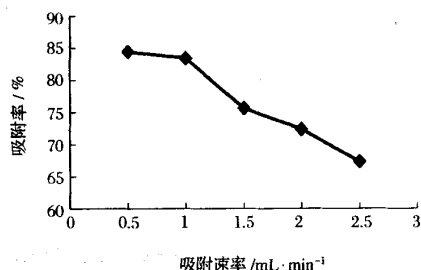


图2 吸附速率对吸附率的影响

从图2中可以看出,当吸附速率 0.5 mL/min 时吸附率达到 84.4%,而当吸附速率为 1.0 mL/min 时的吸附率略有下降为 83.4%,但时间却节省一半,综合考虑认为,吸附时流出速率不宜太快,当吸附速率为 0.5~1.0 mL/min 时最佳。

2.4 样液 pH 对吸附率的影响

同 2.2 方法配制黄酮浓度为 0.3 mg/mL 的黄酮水溶液 160 mL 5 份,分别将其 pH 调至 1、2、3、4、5 后上柱,均以 1.0 mL/min 的速率进行吸附,再用 3 倍床体积的水洗柱。收集所有吸附及洗柱流出液,测定其中黄酮含量,计算吸附的黄酮量及吸附率,结果见图 3。

从图3中可以看出:当样液 pH 为 2 时其吸附率达到最大为 96.0%, $2 < \text{pH} < 2$ 皆不利于黄酮的吸附,因此认为样液的 pH 为 2 时上样最佳。

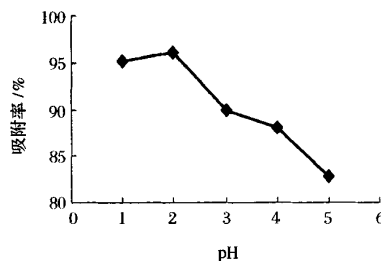


图3 样液 pH 对吸附率的影响

2.5 上样量对吸附率的影响

同 2.2 方法分别配制含黄酮 60、80、100、120、140 mg 且浓度均为 0.3 mg/mL 的黄酮水溶液 5 份, 分别上柱, 均以 1.0 mL/min 的速率进行吸附, 再用 3 倍床体积的水洗柱。收集所有吸附及洗柱流出液, 测定其中黄酮含量, 计算吸附的黄酮量及吸附率, 结果见图 4。

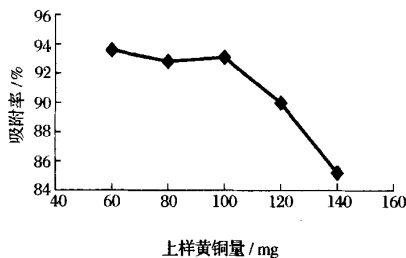


图4 上样量对吸附率的影响

从图4可以看出, 上样量对吸附率有影响, 当上样量在 60~100 mg 时吸附率均较高, 但当上样量超过 100 mg 时, 吸附率明显下降, 因此, 根据柱用大孔吸附树脂用量 20 g 计算即每克大孔吸附树脂上样的黄酮量不宜超过 5 mg, 以保证其对黄酮有较高的吸附率。

2.6 洗脱剂体积分数对解吸率的影响

同 2.2 方法配制浓度是 0.3 mg/mL 的黄酮水溶液 160 mL 5 份, 分别上柱, 均以 1.0 mL/min 的速率进行吸附, 再用 3 倍床体积的水洗柱, 然后分别用 4 倍床体积的体积分数分别为 30%、50%、70%、80%、90% 的乙醇以 1.0 mL/min 的速率进行洗脱, 收集洗脱液测定黄酮含量, 计算解吸出的黄酮量及解吸率, 结果见图 5。

从图5看出, 乙醇体积分数 < 70%, 随乙醇体积分数的增加, 解吸效果增加, 当体积分数 > 70% 时解吸率呈下降趋势, 当乙醇体积分数为 70% 时, 洗脱效果最好, 洗脱率为 83.1%。因此用 70% 乙醇洗脱为最佳。

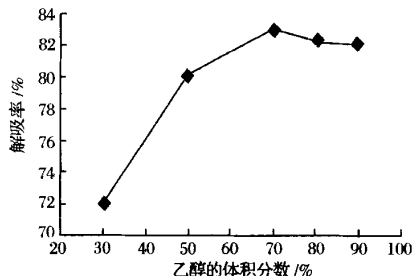


图5 不同体积分数乙醇洗脱对解吸率的影响

2.7 乙醇的洗脱速率对解吸率的影响

同 2.2 方法配制黄酮浓度是 0.3 mg/mL 的黄酮水溶液 160 mL 5 份, 分别上柱, 均以 1.0 mL/min 的速率进行吸附, 再用 3 倍床体积的水洗柱, 然后分别用 4 倍床体积 70% 的乙醇分别以 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL/min 的速率进行洗脱, 收集洗脱液测定黄酮含量, 计算解吸出的黄酮量及解吸率, 结果见图 6。

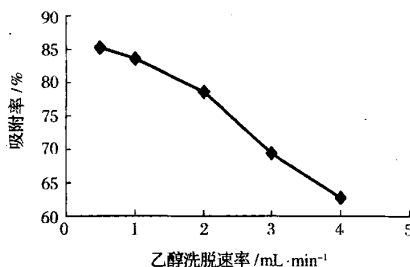


图6 乙醇的洗脱速率对解吸率的影响

乙醇的洗脱速率越快解吸率越低, 因此洗脱时宜慢不宜快, 当考虑洗脱速率小则洗脱时间长, 故选择洗脱速率则要根据解吸率及时间综合考虑。图6中可以看出, 当洗脱速率为 0.5 mL/min 时洗脱效果较好, 而洗脱速率为 1.0 mL/min 时洗脱效果与之相差不多, 但可以节省一半时间, 因此洗脱速率以 0.5~1.0 mL/min 为最佳洗脱速率。

2.8 乙醇洗脱用量对解吸率的影响

同 2.2 方法配制黄酮浓度是 0.3 mg/mL 的黄酮水溶液 160 mL 5 份, 分别上柱, 均以 1.0 mL/min 的速率进行吸附, 再用 3 倍床体积的水洗柱, 然后分别用 2 倍床体积数、3 倍床体积数、4 倍床体积数、5 倍床体积数、6 倍床体积数的体积分数为 70% 的乙醇以 1.0 mL/min 的速率进行洗脱, 收集洗脱液测定黄酮含量, 计算解吸出的黄酮量及解吸率, 结果见图 7。

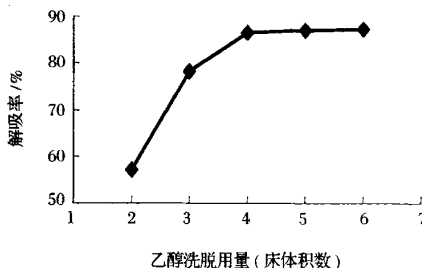


图7 乙醇洗脱用量对解吸率的影响

从图7中可以看出, 当乙醇的洗脱用量达到 4 倍床体积数时, 解吸率为 87.1%, 超过 4 倍床体积数时, 解吸率基本不再增加。因此, 乙醇的最佳洗脱用

量为4倍床体积数。

2.9 大孔吸附树脂柱层析纯化蕨菜总黄酮的效果

按每克大孔吸附树脂吸附5 mg 黄酮计算,将粗黄酮粉配制成0.3 mg/mL 黄酮水溶液并调pH为2,上柱的吸附速率为1.0 mL/min,然后用3倍床体积水洗柱,再用4倍床体积的70%乙醇以1.0 mL/min 洗脱速率洗脱,收集洗脱液经旋转蒸发器浓缩后烘干得精制蕨菜黄酮粉,经测定其总黄酮含量达到63.36%与纯化前的粗黄酮粉中黄酮含量18.4%相比,纯度提高约3.4倍,纯化效果较为显著。此种方法纯化后得精制黄酮粉相对原粗黄酮粉的得率为18.0%。

3 小 结

AB-8型大孔吸附树脂对蕨菜黄酮具有较好的纯化效果。黄酮液浓度在0.3 mg/mL时AB-8大孔吸附树脂对黄酮吸附率最佳,达91.0%;AB-8型大孔吸附树脂在pH为2时对蕨菜黄酮的吸附率为96.0%,比在其他pH条件下都高;70%的乙醇对蕨菜黄酮的解吸附有很好的效果,解吸率为83.1%。在上述适宜条件下,AB-8型大孔吸附树脂柱层析纯化蕨菜黄酮效果较好,由纯化前的18.4%提高到纯化后的63.36%,纯度提高约3.4倍,此种方法纯化后得精制黄酮粉相对原粗黄酮粉的得率为18.0%。该法简单可行,纯化效果好,能满足于工业生产的要求。

参 考 文 献

1 陈乃富. 蕨菜黄酮类化合物的提取及其抗氧化作用[J]. 食

品与发酵工业,2003,29(11):63~66

- 2 陈乃富, 张 莉. 蕨菜黄酮类化合物的提取与分析[J]. 中国林副特产,2004(6):1~4
- 3 朱杰英,陈功锡. 湘西野生蕨菜植物资源及其开发利用研究[J]. 吉首大学学报(自然科学版),2000,21(4):6~9
- 4 谢榛祥,张敏红. 生物类黄酮的生理功能及其应用研究进展[J]. 动物营养学报,2003,15(2):11~15
- 5 赵国华,陈宗道. 柑橘类黄酮生物活性的研究进展[J]. 食品与发酵工业,2002,27(3):71~75
- 6 杨 洋,韦小英. 柚皮黄酮类化合物提取方法和抗氧化性研究[J]. 食品与发酵工业,2002,28(6):9~12
- 7 陈乃富. 蕨菜茶的加工工艺研究[J]. 食品与发酵工业,2006,32(3):125~128
- 8 郑亚杰,张长弓,李晓斌. 大孔吸附树脂分离纯化山楂总黄酮的研究[J]. 华中科技大学学报,2004,33(2):136~142
- 9 陆志科,谢碧霞. 大孔树脂对竹叶黄酮的吸附分离特性研究[J]. 经济林研究,2003,21(3):1~4
- 10 任顺成,丁霄霖. 大孔树脂对玉米须类黄酮的吸附分离特性研究[J]. 食品与发酵工业,2003,29(12):17~21
- 11 杨荣平,王宾豪,方艾全等. 大孔树脂分离葛根总黄酮工艺优化[J]. 中成药,2004,26(10):784~788
- 12 金向群,刘永刚,随志刚,等. D140大孔吸附树脂纯化淫羊藿黄酮的研究[J]. 中成药,2004,26(11):872~875
- 13 卢锦花,胡小玲,岳 红,等. 大孔吸附树脂对银杏叶黄酮类化合物吸附及解吸附的研究[J]. 化学研究与应用,2002,14(2):164~167
- 14 崔堂兵,石漫莹,郭 勇,等. 银杏黄酮的提取与大孔树脂吸附研究[J]. 广西农业生物科学,2002,12(4):266~270
- 15 李剑君,李稳宏,李多伟,等. 葛根总黄酮中葛根素的分离研究[J]. 西北大学学报,2000,31(4):311~314

Study on the Technologic Conditions of Purifying Total

Pteridium aquilinum Flavonoids by AB-8 Macro-resin Absorption

Chen Naifu, Zhang Li, Han Bangxin, Gu Fangli, He Yongsong

(Department of Chemistry and Life Science, West of Anhui University, Luan 237012, China)

ABSTRACT Using AB-8 macro-resin as absorption, the technical conditions of purifying crude flavonoid powder from *Pteridium aquilinum* were studied in 5 aspects, which included the best drug concentration, adsorption rate, pH, adsorption ratio, etc. The best conditions were: soluble flavonoid content 0.3mg/ml, pH2, 5mg flavonoids / g resin, speed at 0.5~1 ml/min. best elution condition was: 4BV 70%(mL/mL) alcohol at speed 0.5~1 m/min. The total flavones of *Pteridium aquilinum* was 18.4% without purification. After being purified, the total flavones can be reached to 63.36%, 3.4 times more than unpurified. The ratio of refined flavanoid powder to the crude flavanoids powder was 18.0%.

Key words *Pteridium aquilinum*, adsorption resin, total flavones, purification