

二氢杨梅素纯化方法的比较研究

谭斌¹, 周双德¹, 张友胜²

(1.湖南农业大学湖南省天然产物工程技术中心, 湖南 长沙 410128)

(2.广东省果蔬加工重点实验室, 广东 广州 510610)

摘要: 用活性炭、水提醇溶、水提石油醚萃取、大孔吸附树脂吸附和高速逆流色谱等5种方法对藤茶中粗提二氢杨梅素进行纯化并对其结果进行比较研究, 结果表明5种方法均能获得较高纯度有二氢杨梅素, 不同方法各有优缺点。

关键词: 二氢杨梅素; 纯化方法; 比较研究

中图分类号: TS202.3; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2008)07-0631-04

Comparative Study of Methods for Purification of Dihydromyricetin

TAN Bin¹, ZHOU Shuang-de¹, ZHANG You-sheng²

(1.The Hunan Engineering and Technology Center for Natural Products, HNAU, Changsha 410128,China)

(2.Key Lab of Guangdong for Deep Processing of Fruit and Vegetable, Guangzhou 510610,China)

Abstract: Five kinds of purification methods including activated carbon absorption, water extraction with alcohol dissolving, water-petroleum ether extraction, macroporous resin absorption and HSCCC, were used to purify dihydromyricetin. A comparative study showed that dihydromyricetin could be gained with high purify by all the five methods.

Key words: dihydromyricetin; purification method; comparative study

二氢杨梅素是一种有重要作用的二氢黄酮类化合物^[1,2]。该化合物首次由 Kotake 和 Kubota 于 1940 年从葡萄科蛇葡萄属植物福建茶的叶中分离得到。由于之后不同研究工作者在分离鉴定时的命名不一致, 其有许多中文名字, 如双氢杨梅树皮素、福建茶素、白蕊素、蛇葡萄素等等, 英文名有 ampelopsin 和 dihydromyricetin。

近十余年研究表明二氢杨梅素大量存在于葡萄科蛇葡萄属植物中, 如藤茶即显齿蛇葡萄 (*A. grosseedentata*)、粤蛇葡萄 (*A.cantonensis*)、羽叶蛇葡萄 (*A.cha-ffanjonii*)、蛇葡萄 (*A.sinica*)、东北蛇葡萄 (*A.brevipedunculata*)、*Ampelopsis Radix*、光叶蛇葡萄 (*A.sinica-var.hancei*) 等, 其中藤茶尤其特别, 从我国广东、广西、云南、湖南、湖北、江西等省区的样品含量测定结果来看, 春夏幼嫩茎叶中一般含有样品干重的 20% 以上, 最高部位 (幼叶中的心叶) 可达 40%^[3]。二氢杨梅素作为黄酮类成分中的重要一员, 在天然植物中单体含量如此之高, 实属罕见。据初步

收稿日期: 2008-02-26

基金项目: 国家自然科学基金 (30570186) 资助项目。

作者简介: 谭斌 (1968-) 女, 工程师, 主要研究方向为仪器分析

通讯作者: 张友胜 (1965-), 博士, 研究员, 研究方向为食品加工和天然产物

检索, 该植物系目前国内外发现的天然植物中生理活性成分单体含量最高的植物。本文以藤茶为原料, 对其中的二氢杨梅素进行了提取实验, 并以目前国内外常用的纯化方法对其进行了纯化比较实验, 以期规模为规模化纯化生产提供理论依据。

1 仪器与试剂

1.1 大孔吸附树脂柱及树脂

自行设计定制保温玻璃层析柱 (内柱 $\Phi 30 \times 700$ mm, 外柱 $\Phi 50 \times 900$ mm), 树脂 NKA-9 (南开大学化工厂生产, 极性, 粒径范围 0.3~1.25 mm)。

1.2 高速逆流色谱系统

由 GS10A 型逆流色谱仪 (北京天宝物华生物技术有限公司, 由速度控制系统和逆流系统组成, 聚四氟乙烯分离管柱, 总柱容积为 210 mL, 管柱最大压力为 1 MPa) 和 AKTaprime plus 层析系统 (GE Healthcare Amersham Biosciences AB 带 primeview 5.0 在线监测软件, 带溶液自动泵入系统、溶液自动收集系统和紫外、压力、压强、电导率等自动检测系统) 共同组成的高速逆流色谱联用系统。

1.3 高效液相色谱仪

Agilent 高效液相色谱仪。检测波长为 UV-290 nm; 高效液相色谱柱为 Eclipse XDB-C18 4.6×250 m; 流动

相为甲醇-水=36/64 (V/V, 用磷酸调 pH 至 3.0); 流速为 1.0 mL/min; 进样量为 10 μ L; 柱温为 30 $^{\circ}$ C。

所用试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 二氢杨梅素粗提样品的制备

用市售干藤茶样品(广州)用水按 1:20 的质量比提取 3 次(95~100 $^{\circ}$ C), 每次 30 min, 过滤, 去滤渣, 合并提取液, 将滤液直接放入 0~4 $^{\circ}$ C 的冷库中静置 24 h 进行结晶, 取沉淀物干燥即得二氢杨梅素粗提样品。用 HPLC 检测二氢杨梅素粗提样品的纯度(样品纯度为 40.1%) 作为相关实验样品中二氢杨梅素的起始纯度。

2.2 活性炭纯化二氢杨梅素

在加热条件(95~100 $^{\circ}$ C)下, 用 100 倍质量的水溶解二氢杨梅素粗样品, 在溶解过程中同时加入活性炭(活性炭比例为二氢杨梅素粗样品的 1%), 趁热过滤, 将滤液放入 0~4 $^{\circ}$ C 的冷库中静置 24 h 结晶, 取沉淀物检测二氢杨梅素纯度。

2.3 水提醇溶纯化二氢杨梅素

将用水粗提的二氢杨梅素用 10 倍质量的 95%乙醇溶解, 过滤, 将滤液放入 0~4 $^{\circ}$ C 的冷库中静置 24 h 进行结晶; 之后取结晶继续用 10 倍质量的 95%乙醇溶解, 继续重结晶。

2.4 水提石油醚萃取纯化二氢杨梅素

用水作溶剂溶解粗二氢杨梅素样品, 溶液过滤后, 按 1:1 的比例加入石油醚萃取, 去石油醚层, 将水层放入 0~4 $^{\circ}$ C 的冷库中静置 24 h, 取沉淀物检测二氢杨梅素纯度。

2.5 大孔吸附树脂纯化二氢杨梅素

用热水作溶剂溶解粗二氢杨梅素样品, 溶液过滤后, 直接将滤液过自行设计定制的保温玻璃层析柱, 柱内装 NKA-9 大孔吸附树脂柱, 玻璃夹层灌 80~85 $^{\circ}$ C 温水, 利用大孔吸附树脂柱吸附杂质原理进行纯化^[4]。本实验配制的粗二氢杨梅素总溶液为 1000 mL, 每馏份收集体积为 50 mL, 每馏份收集后分别直接放入 0~4 $^{\circ}$ C 的冷库中静置 24 h 结晶。

2.6 高速逆流色谱法纯化二氢杨梅素

将 GS10A 型逆流色谱仪的进液管和出液管分别与 AKTAprime plus 层析系统的进液管和出液管相连, 组成 GS10A-AKTAprime plus 高速逆流色谱联用系统; 分离方法的设置在 AKTAprime plus 系统上操作, 转速设置在 GS10A 上操作^[5]。

3 结果与分析

3.1 活性炭纯化二氢杨梅素。

根据二氢杨梅素在不同温度的水中的溶解度的差别, 可用热水溶解、冷水结晶, 使之不断提高纯度。该法工艺相对简单, 操作比较方便, 适应于中、小企业应用该技术。在利用重结晶纯化二氢杨梅素时, 加入一定量活性炭可提高纯化速度。表 1 为 40.1%纯度的二氢杨梅素粗提物进行重结晶的纯度的变化情况。从表 1 知, 40.1%纯度的二氢杨梅素粗提物经 11 次结晶后, 不加活性炭处理时其产品纯度达 91.3%, 加活性炭处理时其产品纯度可提高到 99.1%。在精制提纯过程中, 活性炭表现了良好的快速纯化效果, 但不能否认, 活性炭在吸附杂质的同时, 对活性成分二氢杨梅素也有一定的吸附, 从而造成了整个产品制率的下降; 同时使用活性炭在工业上会带来成本增加、环境污染等问题, 因此, 是否使用活性炭要根据具体情况决定。

表 1 活性炭对二氢杨梅素重结晶的影响

Table 1 Effect of active carbon on dihydromyricetin purity

重结晶 次数 (次)	不加活性炭/%			添加活性炭/%		
	样品 纯度	结晶后 纯度	回收 率	样品 纯度	结晶后 纯度	回收 率
1	40.1	51.3	56.97	40.1	54.5	57.31
2	51.3	59.8	72.50	54.5	63.2	71.93
3	59.8	67.4	76.99	63.2	71.6	73.33
4	67.4	73.5	75.03	71.6	79.8	73.42
5	73.5	78.5	74.02	79.8	87.5	73.80
6	78.5	83.7	76.81	87.5	92.3	72.10
7	83.7	87.2	77.45	92.3	94.5	72.34
8	87.2	90.1	76.60	94.5	96.7	73.12
9	90.1	90.7	75.89	96.7	97.8	72.34
10	90.7	91.1	74.39	97.8	98.3	73.42
11	91.1	91.4	75.12	98.3	99.1	71.01

3.2 水提醇溶法纯化二氢杨梅素。

表 2 水提结合醇溶对二氢杨梅素纯化的影响

Table 2 Effect of water extraction and alcohol dissolving on dihydromyricetin purity

重结晶次数(次)	样品纯度/%	结晶后纯度/%	回收率/%
1	40.1	70.5	60.8
2	70.5	80.5	71.2
3	80.5	81.2	72.5
4	91.2	95.3	72.1
5	95.3	98.1	70.8

在重结晶过程中, 由于部分水溶性和脂溶性杂质难以去掉, 或者去杂速度太慢, 如果要求产品纯度过高, 运用水作溶剂多次重结晶一是太麻烦、二是最终产品得率太低, 因此, 可以运用重结晶与其它溶剂应用相结合的办法进行纯化。从表 2 可知, 在水提干燥溶样品中加利用乙醇进行溶解, 在乙醇溶液中进行重结晶, 可将提纯次数减少。

3.3 水提石油醚萃取纯化二氢杨梅素

热水提取藤茶时, 藤茶中的部分脂类物质会一起提取出来, 用石油醚萃取去脂后进行重结晶, 较在水溶液中加入活性炭进行重结晶的办法(参照表 1)这可快速增加提纯速度, 减少二氢杨梅素的损失(表 3), 但不足之处在于生产上运用石油醚等有机溶剂, 在最后成品中可能有少量有机溶剂存在, 从而影响产品的安全性和应用范围, 同时增加了生产成本。

表 3 水提混合物用石油醚萃取对纯度的影响

Table 3 Effect of petroleum ether extraction of the water extract on dihydromyricetin purity

重结晶次数/次	样品纯度/%	结晶后纯度/%	回收率/%
1	40.1	70.8	64.8
2	70.8	83.5	71.5
3	83.5	85.8	70.1

3.4 大孔吸附树脂纯化二氢杨梅素

在天然产物活性成分的提取分离纯化过程中, 利用大孔吸附树脂的吸附和解吸作用纯化活性成分是一种常用办法。绝大多数情况下, 利用树脂主要是吸附活性成分然后通过解吸的办法来获得高纯度的目标产物, 而本实验则是利用树脂吸附粗二氢杨梅素中的杂质后直接从馏份中获得高纯度的二氢杨梅素。由表 4 可以看出, 40.1%的样品溶液过柱后直接在第 10 个馏份就可以获得 95%以上的高纯度样品。

表 4 过柱流出液中不同馏份二氢杨梅素含量

Table 4 Content of dihydromyricetin in different fractions of solvent flowed

样品纯度/%	馏份中二氢杨梅素纯度/%				
	7	8	9	10	11
40.1	50.4	70.2	80.1	95.3	78.2

3.5 高速逆流色谱法纯化二氢杨梅素

高速逆流色谱法(High-speed Countercurrent chromatography, HSCCC)是一种不用固态支撑体或载体的液液分配色谱和能实现连续有效的分配功能的实用分离技术。它利用了一种特殊的流体力学现象, 即单向流体动力平衡现象, 在这种平衡体系中, 两种互不混溶的溶剂相在转动螺旋管中单向分布。在高速逆流

色谱仪工作时, 重力和螺旋管转动组合形成的阿基米德螺线力促使固定相移向螺旋管的入端, 使得固定相予以保留, 同时两相溶剂在螺旋管中得以混合, 溶质在两相溶剂中得以分配平衡, 从而使得不同成分得以分离。

实验结果表明, 使用 GS10A-AKTAprime plus 高速逆流色谱联用设备, 采用石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水-三氯乙酸五元溶剂系统, 当进样体积为 2~50 mL 样品量约为 300 mg~6 g、转速为 700~800 r/min、流速为 1.5~2.5 mL/min 时, 5 h 内均可将粗二氢杨梅素粗样品分成 A、B、C 三个部分, 其中 A 部分分离时间约为 190~220 min, B 部分分离时间约为 230~250min, C 部分分离时间约为 260~290 min(图 1, A、B、C 部分依次为图中从左至右排列, 下同)。就本实验而言, 调整逆流色谱仪转速、进样量、流动相流速等因素, 除各峰保留体积和分离所需的时间略为增加或减少外, 分离效果没有明显变化, 如果将相邻组分的管号去掉, 则不影响分离效果。将分离得到的 A、B、C 三个组分相对应的管中溶液分别收集到一起, 浓缩至原体积的 1/3~1/2, 冷却结晶。结果表明, A 组分不产生晶体, B 组分呈现大量白色针状细晶, C 组分呈现大量绿色针状细晶。分别将 A 组分溶液、B 组分和 C 组分晶体用 HPLC 检测, 结果表明 A 组分为 4~5 个峰的混合物, B 和 C 为纯度超过 99%以上的单一物质。进一步检测可证明 B 组分即为纯化的二氢杨梅素, 其纯度可达 99%以上。在逆流色谱仪的设置转速为 750 转/min, 流速为 2.5 mL/min, 进样体积为 50 mL 的条件下, 99%以上纯度的二氢杨梅素的回收率为 85.5%。

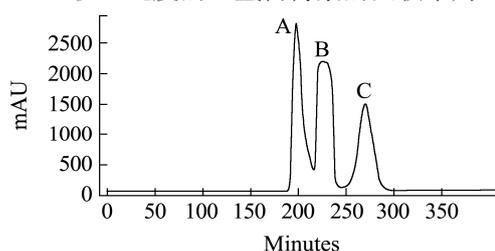


图 1 HSCCC 分离二氢杨梅素色谱图

Fig.1 HSCCC chromatogram of dihydromyricetin

注: 进样量 2 mL、进样速度 2.0 mL/min、转速 800 r/min

4 讨论

纯化某一天然产物并非只有一种固定的办法, 不同方法各有其优缺点。就本实验而言, 在纯化过程中, 添加活性炭的方法, 工艺相对简单, 操作比较方便, 适应于中、小企业应用该技术, 但使用活性炭在工业上带来了成本增加、环境污染等问题。利用水提醇溶

法纯化二氢杨梅素,简单,但设备相对复杂一些,且工艺中使用了乙醇,增加了成本。利用水提石油醚萃取纯化二氢杨梅素主要缺点是最后成品中可能含有少量有机溶剂存在,从而影响产品的安全性和应用范围,同时增加了生产成本。利用大孔吸附树脂纯化二氢杨梅素,方法方便,处理量大,能连续生产,但其主要缺陷是过柱时要求保温,且涉及树脂再生等问题。高速逆流色谱法纯化可以一次性获得高纯度样品,但缺点是样品处理量少,难以一次性获得大量样品。因此,HSCCC法在应用于化学成分分离提纯时,应尽可能地与其它常用分离方法互补进行。

参考文献

- [1] Qizhen Du, Weijian Cai, Ming Xiao, Yoichiro Ito. Purification of (+)-dihydromyricetin from leaves extract of *Ampelopsis grossedentata* using high-speed countercurrent chromatograph with scale-up triple columns[J]. *Journal of Chromatography A*, 973(2002): 217-220
- [2] 胡自勇,宁正祥,张友胜.天然食品抗氧化剂 α -HT 的制备及在食品工业中的应用[J]. *广州食品工业科技*, 2002, (6): 102-105
- [3] 张友胜,宁正祥,杨伟丽. 藤茶学[M]. 广东科学出版社, 2003
- [4] 张友胜,杨伟丽,胡自勇. “增温溶解,保温过柱,温水解吸” 提制二氢杨梅素(一)[J]. *天然产物研究与开发*, 2002, 14(3): 50
- [5] 张友胜,施英,徐玉娟,等. 利用高速逆流色谱法同时纯化藤茶中的二氢杨梅素和杨梅素[J]. *现代化工*, 2008, 28(3): 44-46
-
- (上接第 623 页)
- [4] Urakaev F K, Boldyrev V V. Mechanism and kinetics of mechanochemical processes in comminuting devices, 2. Applications of the theory[J]. *Powder Technology*, 2000, 107(2): 197-206
- [5] Venkataraman K S, Narayanan K S. Energetics of collision between grinding media in ball mills and mechanochemical effects[J]. *Powder technology*, 1998, 96(3): 190-201
- [6] Gary R. Molecular aspects of the fatigue and fracture of rubber[J]. *Rubber Chemistry and Technology*, 1994, 67(3): 529-536
- [7] Balaz A, Alacova M, Achimovicova J, et al. Godocikova. Mechanochemistry in hydrometallurgy of sulphide minerals [J]. *Hydrometallurgy*, 2005, 77: 9-17
- [8] Giovanni M, Paolo P. Mechanochemical dissociation of calcium carbonate: laboratory data and relation to natural emissions of CO₂[J]. *Physics of the Earth and Planetary Interiors*, 2004, 142: 205-214
- [9] Lin C K, Du C L, Chen G S, et al. Structural investigation of iron sulfides synthesized by mechanochemical reaction[J]. *Materials Science and Engineering*, 2004, A375~377: 834-838
- [10] 丁金龙,孙远明.机械力化学及其在生物材料中应用展望[J]. *食品与机械*, 2003, (8): 4-6
- [11] 何曼君, 陈维孝, 董西侠. 高分子物理[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2000
- [12] 韩哲文(编). 高分子科学教程[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2001
-
- (上接第 626 页)
- [8] Rival S. G., Boeriu C., Wichers H. Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition [J]. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49(1): 295-302
- [9] Rival S., Fornaroli S., Boeriu C. Caseins and casein hydrolysates. 1. Lipoxygenase inhibitory properties [J]. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49(2): 287-294
- [10] 邱隽,王小雪,李琳,等.乳蛋白活性肽的延缓衰老作用研究[J]. *中国公共卫生*, 2002, 18(3): 312-313
- [11] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. *Lebensm-Wiss. Technol.* 1995, 28(1): 25-30
- [12] Alder N. J. Enzymatic hydrolysis of food proteins [M]. Elsevier Applied Publishers, London, 1986, 57-69
- [13] 王叔淳. 食品卫生检测技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 1988: 18-34
- [14] Adler-Nissen. J. Enzymatic hydrolysis of food protein [J]. *Proc. Biochem.* 1997, 12 (6): 18
- [15] Shahidi F., Han X. Q., Synowiecki J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*) [J]. *Food chemistry*, 1995, 52(3): 285-293