

β -环糊精-淀粉树脂分离纯化土茯苓中的总黄酮

张清峰, 陈继光, 上官新晨, 郑国栋, 尹忠平

(江西农业大学食品科学与工程学院, 江西省高等学校天然产物开发与利用重点实验室, 江西南昌 330045)

摘要: 本文以环糊精(α -、 β -、或 γ -)和淀粉为原料, 通过环氧氯丙烷合成水不溶性的环糊精-淀粉树脂(CDP)。比较了三种环糊精-淀粉树脂对落新妇苷的吸附性能, 筛选出效果最佳的 β -CDP。考察了 β -CDP的等温吸附特性, 结果表明 β -CDP对落新妇苷的吸附量随平衡浓度的升高而增加; 吸附过程是一个放热过程, 温度升高不利于吸附。4℃条件下, 落新妇苷平衡浓度为360 $\mu\text{g/mL}$ 时, β -CDP的吸附量为49.52 mg/g。该等温吸附可以用Freundlich方程进行拟合, 说明 β -CDP对落新妇苷的吸附是一个非均匀的多层吸附。比较了不同溶剂对被吸附落新妇苷的解析效果, 结果表明60%乙醇为最佳洗脱溶剂, 超声处理10 min后解析率为91.97%。将 β -CDP用于土茯苓总黄酮的分离纯化, 总黄酮得率为2.28%。经HPLC分析产物中落新妇苷含量为51.71%, 总黄酮含量为76.63%。

关键词: 环糊精-淀粉树脂; 落新妇苷; 土茯苓; 总黄酮

文章编号: 1673-9078(2013)11-2717-2721

Separation and Purification of Flavonoids From *Rhizoma Smilacis Glabrae* by β -cyclodextrin-Starch Resin Polymer

ZHANG Qing-feng, CHEN Ji-guang, SHANGGUAN Xin-cheng, ZHENG Guo-dong, YIN Zhong-ping

(Key Laboratory of Jiangxi Provincial Department of Education in Natural Product Research and Development, Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China)

Abstract: Three water insoluble cyclodextrin (CD)-starch copolymers (α -、 β -、 and γ -CDP) were synthesized by using epichlorohydrin as the crosslink reagent. Comparative study of the kinetic adsorptions of α -、 β -、 and γ -CDP to astilbin showed that β -CDP had the best adsorption property. Static equilibrium adsorption studies revealed that β -CDP adsorption capacity rose with the increase of equilibrium concentration of astilbin. And its adsorption capacity decreased with the increase of temperature, which revealed that the adsorption was an exothermic process. Under the conditions of 4℃ and equilibrium concentration 360 $\mu\text{g/mL}$, adsorption capacity of β -CDP to astilbin was 49.52 mg/g. The adsorption could quite fit to the Freundlich adsorption isotherm, indicating that it was the nonuniform, multilayer adsorption. About 91.97% of adsorbed astilbin could be recovered by use of 60% ethanol as the elution solvent. The yield of flavonoids was 2.28% when β -CDP was used for separation and purification of flavonoids from *Rhizoma Smilacis Glabrae*. The contents of astilbin and total flavonoids were 51.71% and 76.63%, respectively, as determined by HPLC.

Key words: cyclodextrin (CD)-starch copolymers; astilbin; *Rhizoma Smilacis Glabrae*; flavonoids

土茯苓是卫生部允许“药食两用”的中草药之一。化学成分研究表明落新妇苷、黄杞苷等黄酮物质是土茯苓的主要活性成分^[1-4]。《中国药典》以落新妇苷含量评估土茯苓质量, 要求含量不低于4.5 mg/g^[3]。我们建立了土茯苓中5种主要成分的HPLC定量分析方法, 对18批土茯苓样品分析结果表明, 落新妇苷是土茯苓中最主要黄酮成分, 含量范围为5.48~25.75 mg/g; 花旗松素、黄杞苷、异黄杞苷、落新妇苷及其三种异

收稿日期: 2013-08-04

基金项目: 江西省自然科学基金资助项目(20122BAB214005); 江西农业大学青年基金资助项目(QN201108)

作者简介: 张清峰(1983-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为功能性食品成分、天然产物开发与利用

构体等七种黄酮总量介于6.72~35.3 mg/g, 平均含量为18.0 \pm 8.5 mg/g^[5]。药理研究显示土茯苓提取物有抗氧化^[6]、抑制肝癌细胞增殖和诱导凋亡作用^[7]。在STZ诱导II型糖尿病小鼠模型中, 土茯苓提取物可以诱导增强胰岛素活性^[8]。在三硝基氯苯引发的肝损伤模型中, 土茯苓水提物可诱导浸润至肝脏的CD4+T细胞凋亡, 起护肝作用^[9]。土茯苓水提物可通过下调过度活化的巨噬细胞活性, 上调炎症后期低下的T细胞功能而发挥抗慢性炎症的功能^[10]。研究表明土茯苓的这些生物活性主要来源于落新妇苷等黄酮成分^[11]。因此, 分离纯化土茯苓黄酮具有重要的现实意义。黄少伟等利用大孔树脂分离纯化了土茯苓总黄酮, 纯化后的总黄酮经比色法测定含量为62.16%, 是纯化前的近2倍

[12]。曾祥腾等利用大孔树脂富集土茯苓总黄酮, HPLC 法测定制备样品中落新妇含量为 35%, 比色法测定总黄酮含量为 78% [13]。

环糊精 (CD) 是由吡喃葡萄糖以 α -1,4 糖苷键键合的环状低聚糖。最常见的 α 、 β 、 γ -CD 分别由 6-8 个葡萄糖单元组成, 整个分子成截顶圆锥状。CD 具有特殊的外亲水内疏水的空腔结构, 能够与许多有机及无机化合物形成超分子络合物。利用环氧氯丙烷在强碱条件下将 CD 交联得到水不溶性的高聚物(CDP), 一方面保留了 CD 的空腔, 同时又将 CD 固定化, 有利于将客体分子吸附后分离。因此, CDP 在分离科学上有着很好的应用前景。如 Zhao 等研究了 β -CDP 对芦丁的吸附作用 [14]; Ma 等利用印迹 β -CDP 分离柚皮苷 [15]; Liu 等研究了三中 CDP 对水中杀虫剂的吸附和分离作用 [16]。

在前期研究中, 我们发现 β -CD 能与土茯苓中主要黄酮成分-落新妇苷形成较稳定络合物 [17]。本研究以淀粉和 CD(α -、 β -或 γ -CD) 为原料, 通过环氧氯丙烷合成三种水不溶性的 CDP。比较了三种 CDP 对落新妇苷的吸附性能, 筛选出效果最佳的 β -CDP, 并用于土茯苓中总黄酮的分离纯化。

1 材料与方法

1.1 试剂与原料

土茯苓中药饮片购买于康美药业股份有限公司, 产地为广西。 α -、 β -、和 γ -CD 购买于江苏丰园生物技术有限公司。可溶性淀粉购买与天津市永大化学试剂开发中心。HPLC 级乙腈购自 RCI Labscan (Bangkok, Thailand)。使用水为 Milli-Q 水。落新妇苷由本实验室从土茯苓中纯化, 经 UV、IR、MS、NMR 鉴定, 纯度 >98%。

1.2 主要仪器设备

754PC 型紫外分光光度计, 上海光谱仪器有限公司。水浴全温振荡器, 金坛市国旺实验仪器厂。HPLC 为安捷伦 1260 系统, 配自动进样器和二极管阵列检测器。色谱柱为 Agilent Zorbax SB C18 柱 (250 mm×4.6 mm i.d., 5 μ m)。

1.3 CDP 的合成 [18]

称取 5 g 可溶性淀粉和 20 g CD (α 、 β 或 γ -CD) 于 250 mL 烧杯中, 混匀后加入 50 mL 20% 氢氧化钠水溶液, 在 50 $^{\circ}$ C 水浴上加热溶解, 在充分搅拌下逐滴

加入 30 mL 环氧氯丙烷。随着环氧氯丙烷的加入, 混合物粘度增大, 最后凝结成凝胶状硬块, 压碎后用大量水洗涤至中性。60 $^{\circ}$ C 真空干燥后研磨并过 60 目筛, 以蒸馏水浸泡, 使用前抽滤即得。

1.4 三种 CDP 对落新妇苷吸附性能比较

精确称取 0.2 g α -、 β -或 γ -CDP 于 100 mL 的锥形瓶中, 加入 50 mL 400 μ g/mL 的落新妇苷溶液, 置于振荡器中 (18 $^{\circ}$ C), 于不同时间测定溶液在 291 nm 处吸光度并求得浓度。落新妇苷在 291 nm 的工作曲线为 $Y=0.0268X+0.0385$, $r^2=0.9997$, 式中 Y 为吸光度, X 为落新妇苷浓度 (0~50 μ g/mL)。

1.5 β -CDP 对落新妇苷等温吸附

精确称取 0.2 g β -CDP 于 100 mL 的锥形瓶中, 加入 50 mL 浓度分别为 60 μ g/mL、120 μ g/mL、180 μ g/mL、240 μ g/mL、300 μ g/mL、360 μ g/mL、480 μ g/mL、540 μ g/mL、600 μ g/mL 的落新妇苷溶液, 置于振荡器中。于常温 (18 $^{\circ}$ C) 和 4 $^{\circ}$ C 条件下振荡 30 min 达到平衡。平衡后测定溶液在 291 nm 处吸光度, 根据工作曲线, 求得浓度。根据吸附前后的落新妇苷浓度差, 计算树脂的吸附量。计算公式如下:

$$Q=(C_0-C_1)\times V/W$$

注: Q 为吸附量 (mg/g); C_0 为初始时落新妇苷浓度; C_1 为平衡时落新妇苷浓度; V 为落新妇苷溶液体积; W 为 β -CDP 质量。

1.6 解析溶剂选择

称取 2.1 g β -CDP, 加入 250 mL 600 μ g/mL 的落新妇苷溶液, 置于常温振荡器中 (18 $^{\circ}$ C) 振荡 30 min。吸附平衡后, 根据吸光度计算树脂的吸附量。抽滤后将 β -CDP 平均分成 7 份于 7 个锥形瓶中, 分别加入 50 mL 水, 甲醇, 20%、40%、60%、80% 和 100% 乙醇, 置于振荡器中振荡 10 min 或超声 10 min, 测定上清液吸光度得到被解析的落新妇苷量, 计算解析率。

1.7 β -CDP 分离纯化土茯苓中总黄酮

称取土茯苓粉末 50 g, 加入 1000 mL 60% 的乙醇溶液; 超声提取 15 min 后 3000 转离心去药渣。减压回收提取液中乙醇 (60 $^{\circ}$ C), 将剩余水溶液离心 (转速为 4000 r/min) 并弃沉淀。往上清液中加入 35 g β -CDP, 置于振荡器中振荡吸附 30 min。抽滤后得到 β -CDP, 加入 50 mL 60% 乙醇超声解析 10 min, 重复一次, 合并解析液, 减压回收乙醇后冷冻干燥, 得到

土茯苓总黄酮。

1.8 土茯苓总黄酮分析

精密称取土茯苓总黄酮 5 mg, 用 50% 甲醇溶解并定容到 25 mL, 得到浓度都是 200 $\mu\text{g/mL}$ 的样品溶液。经 0.45 μm 滤膜过滤后, 进行 HPLC 分析。流动相为乙腈 (A) 及 0.1% 醋酸水溶液 (B), 线性梯度程序为 0~15 min, 16~21% A; 15~40 min, 21~40% A。流速为 1 mL/min, 进样量为 10 μL , 检测波长为 291 nm^[5]。

1.9 数据统计

数据统计和作图软件为 origin7.0。实验平行重复三次, 结果表示为平均值 \pm 标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 CDP 的合成及对落新妇苷的吸附比较

在强碱条件下, CD 和淀粉上的羟基会发生解离, 与环氧氯丙烷发生交联反应, 使反应体系粘度增大, 最后凝结成凝胶状硬块。作为一种链状大分子, 淀粉的加入可以使高聚物更易形成, 且分子量更大; 另一方面淀粉参与共聚后, 淀粉的柔性对环糊精空腔具有很好的分散作用^[19]。

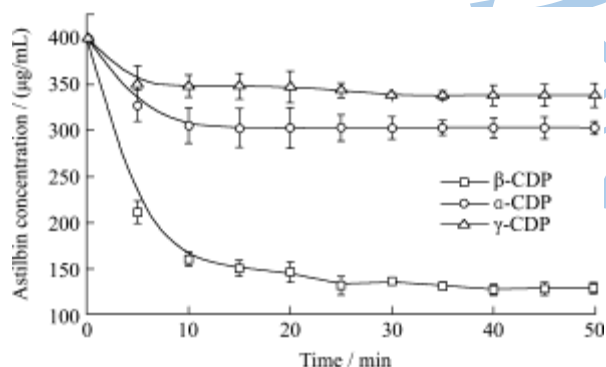


图 1 三种 CDP 对落新妇苷的吸附性能比较

Fig.1 The absorption properties of α -, β -, and γ -CDP to astilbin

α -、 β -和 γ -CDP 对落新妇苷的吸附速度如图 1 所示。吸附动力学结果表明, CDP 对落新妇苷的吸附速度较快, 在前 10 min 中溶液中落新妇苷浓度迅速下降, 随后缓慢降低并在 20 min 左右接近平衡。比较三种树脂的吸附效果, 可以发现 β -CDP 对落新妇苷的吸附能力远远强于 α -和 γ -CDP。Jiang 等对 β -CDP 比面积的测定结果表明聚合物比表面积非常小 (0.2 m^2/g), 不是一种大孔树脂^[18]。因此, CDP 对溶液中落新妇苷的吸附不同于大孔树脂源于其高比表面积的范德化力吸附, 而是源于聚合物中保留的 CD 空腔对落新妇苷的络合作用。三种 CDP 吸附效果的差异, 源

于不同 CD 空腔与落新妇苷分子结构匹配程度的差异。 α -、 β -和 γ -CD 分别由 6-8 的葡萄糖单元组成, 空腔直径分别为 0.49、0.62 和 0.79 nm。我们前期通过相溶解度法测定了 α -、 β -和 γ -CD 与落新妇苷形成络合物时的平衡常数, 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下分别为 138.2 \pm 13.4、2287.1 \pm 49.4 和 1689.3 \pm 40.0^[17]。 β -CD 空腔大小适中, 易于与落新妇苷形成包结物, 而 α -CD 和 γ -CD 空腔则相对过小和过大, 因此不易形成包结物。因此, 不同的 CDP 表现出对落新妇苷不同的吸附性能, β -CDP 效果最佳。

2.2 等温吸附比较

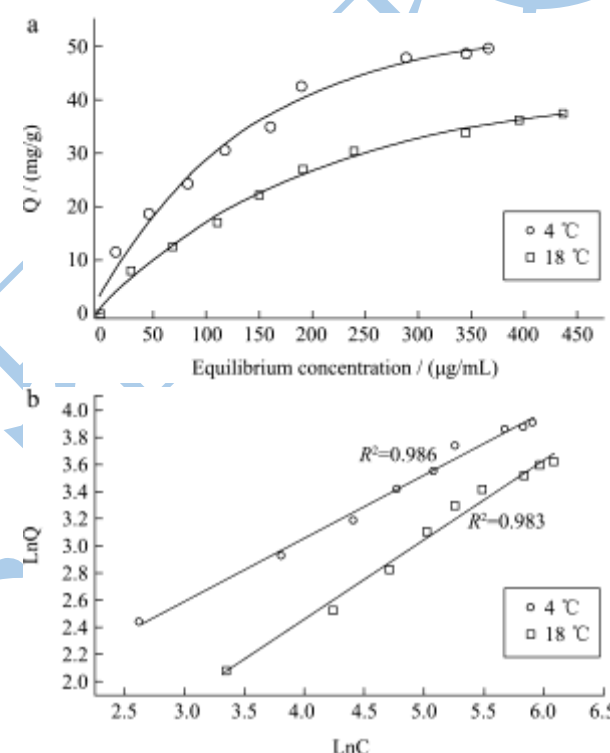


图 2 不同温度下 β -CDP 对落新妇苷的等温吸附曲线 (a); B: Freundlich 方程拟合曲线 (b)

Fig.2 The equilibrium adsorption isotherms of β -CDP to astilbin at different temperatures (a); Freundlich isotherms for experimental data (b)

比较了 4 $^{\circ}\text{C}$ 和 18 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 β -CDP 对落新妇苷的吸附性能, 吸附等温线见图 2。可以看到, 随着平衡浓度的升高, 树脂的吸附能力逐渐增大, 但增加速率逐渐减小, 说明树脂逐渐达到吸附饱和。温度对 β -CDP 的吸附性能影响很大, 4 $^{\circ}\text{C}$ 时 β -CDP 的吸附量明显高于 18 $^{\circ}\text{C}$, 说明低温有利于吸附。这是因为 β -CDP 的吸附是基于 CD 空腔与落新妇苷形成络合物。该包结反应是一个放热反应, 温度越低, 反应的平衡常数越大^[17]。

溶液中吸附剂对溶质的多层非均匀吸附可以用

Freundlich 方程进行描述:

$$Q=K_F C^{1/n} \quad (1)$$

式中 Q 为吸附量 (mg/g); C 为平衡浓度; K_F 为一个与温度有关常数, 随温度的增加而减小; $1/n$ 是反映溶质和吸附剂倾向性的参数, 一般在 0 到 1 之间 [20]。

对公式(1)两边取对数得 $\ln Q=1/n \ln C+\ln K_F$, 由 $\ln Q$ 对 $\ln C$ 进行线性回归, 通过斜率和截距可得到常数 $\ln K_F$ 和 $1/n$ 。方程对实验数据的拟合结果见图 3, 由图可知, Freundlich 方程可以很好的描述 β -CDP 对落新妇苷的吸附($r^2>0.98$)。说明该吸附是一个非均匀的多层吸附, 这与前面吸附机理的讨论一致。4 °C 条件下 $1/n$ 和 $\ln K_F$ 值分别为 0.47 和 1.18; 18 °C 条件下 $1/n$ 和 $\ln K_F$ 值分别为 0.59 和 0.09。说明随着温度的升高 β -CDP 对落新妇苷吸附倾向性减小, 这与 β -CDP 与落新妇苷包结反应的平衡常数随温度升高而降低一致。

2.3 解析溶剂选择

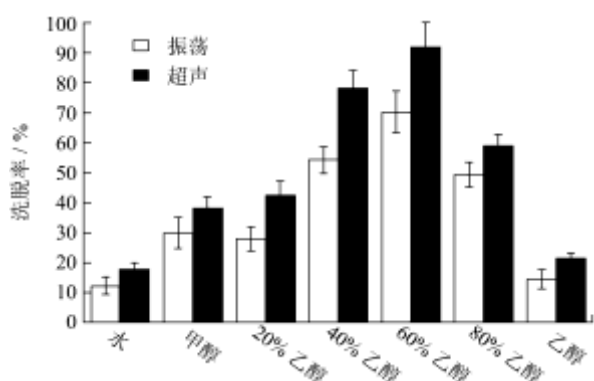


图 3 不同溶剂解析效果

Fig.3 The desorption efficiency of different elution solvents

比较了水、甲醇及不同浓度乙醇对被 β -CDP 吸附落新妇苷的解析效果。由图 3 可知, 水、甲醇和乙醇的解析效果较差; 而乙醇-水混合溶剂效果较好, 且随着乙醇浓度升高, 解析率逐渐提高, 60% 乙醇效果最佳。与震荡处理相比较, 超声处理可以显著提高溶剂解析率, 在该条件下, 60% 乙醇的解析率为 91.97%。因此, 可采用 60% 乙醇超声 10 min 进行落新妇苷解析。

2.4 β -CDP 分离土茯苓总黄酮

通过实验 1.7, β -CDP 从 50 g 土茯苓中分离纯化得到总黄酮 1.14±0.12 g, 得率为 2.28±0.24%。该总黄酮的 HPLC 分析结果见图 4。图中峰面积最大的峰 2 为落新妇苷, 峰 1、3、4 为落新妇苷异构体; 峰 5、6 为黄杞苷和异黄杞苷。通过 HPLC 建立了落新妇苷的

定量分析方法, 以落新妇苷的浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到线性回归方程为 $Y=17.734X-10.785$, $r^2=0.999$, 浓度在 0~250 $\mu\text{g/mL}$ 之间呈良好的线性关系。经计算, 总黄酮中落新妇苷含量为 51.71±3.42%。因为另外 5 种黄酮的标准品难以获得, 本实验通过落新妇苷的标准线来定量这些黄酮成分。将 6 个黄酮成分的峰面积之和代入落新妇苷的标准线计算得到总黄酮含量为 76.63±4.26%。

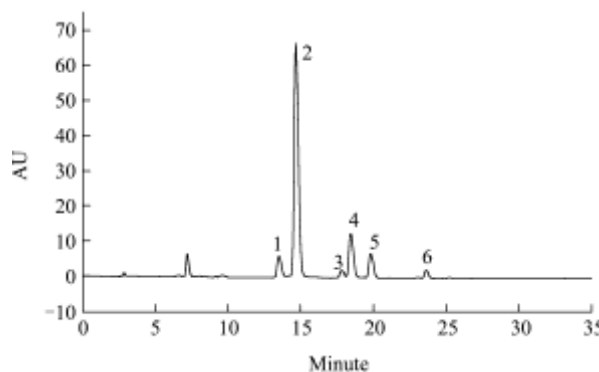


图 4 土茯苓总黄酮 HPLC 色谱图

Fig.4 The HPLC chromatography of *Rhizoma Smilacis Glabrae* flavonoids

注: 峰 2 为落新妇苷, 峰 1、3、4 为落新妇苷异构体; 峰 5、6 为黄杞苷和异黄杞苷。

3 结论

β -CDP 对落新妇苷有很好的吸附效果, 在平衡浓度为 360 $\mu\text{g/mL}$ 条件下, 吸附量为 49.52 mg/g。以 60% 乙醇为解析溶剂, 超声处理 10 min 后解吸率为 91.97%。将 β -CDP 用于土茯苓中总黄酮的分离纯化, 总黄酮得率为 2.28±0.24%。经 HPLC 分析总黄酮中落新妇苷为 51.71±3.42%, 总黄酮含量 (以落新妇苷计) 达到 76.63±4.26%。 β -CDP 对土茯苓总黄酮具有吸附快、吸附容量大、解吸率高等优点; 并且, β -CD 空腔对溶质的吸附具有一定的选择性, 产品纯度较高, 具有一定的应用价值。

参考文献

[1] Chen L, Yin Y, Yi HW, et al. Simultaneous quantification of five major bioactive flavonoids in *Rhizoma Smilacis Glabrae* by high-performance liquid chromatography [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 43: 1715-1720

[2] Zhang QF, Li SC, Lai WP, et al. β -Cyclodextrin facilitates simultaneous analysis of six bioactive components in *Rhizoma Smilacis Glabrae* by capillary zone electrophoresis [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113: 684-691

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 版第一部 [M].

- 北京:中国医药科技出版社,2010
- National Commission of Chinese Pharmacopoeia. Pharmacopoeia of Peoples Republic of China: 2010, Vol. 1[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010
- [4] Zhang Q F, Cheung H Y, Zeng LB. Development of HPLC fingerprint for species differentiation and quality assessment of Rhizoma Smilacis Glabrae [J]. Journal of Natural Medicines, 2013, 67: 207-211
- [5] 张清峰,张汉扬,上官新晨,等.高效液相法同时测定土茯苓中五种多酚成分[J].现代食品科技,2013,29(9):2275-2278
- Zhang Q F, Zhang H Y, Shangguang X C, et al. Quantitative analysis of five polyphenols in Rhizoma Smilacis Glabrae by HPLC [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(9): 2275-2278
- [6] Zhang QF, Zhang ZR, Cheung H Y. Antioxidant activity of Rhizoma Smilacis Glabrae extracts and its key constituent-astilbin [J]. Food Chemistry, 2009, 115: 297-303
- [7] Sa F, Gao JL, Fung KP, et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of Smilax glabra Roxb. extract on hepatoma cell lines [J]. Chemo-Biological Interaction, 2008, 171: 1-14
- [8] Fukunaga, T, Miura T, Furuta K, et al. Hypoglycemic effect of the rhizomes of Smilax glabra in normal and diabetic mice [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1997, 20: 44-46
- [9] Xu Q, Cao JS, Wu FG, et al. Aqueous Extract from Rhizoma Smilacis Glabrae Alleviates Immunological Liver Damage by Selectively Facilitating the Dysfunction of Liver-infiltrating Lymphocytes [J]. Pharmacy and Pharmacology Communications, 2000, 6(1): 41-47
- [10] Jiang J Y, Xu Q. Immunomodulatory activity of the aqueous extract from rhizome of Smilax glabra in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2003, 85: 53-59
- [11] 徐强,孙洋.源于中药选择性效应的新型免疫抑制疗法[J].化学进展,2009,21(1):55-62
- [12] 黄少伟,池汝安,张越非,等.大孔吸附树脂分离纯化土茯苓总黄酮[J].中国中药杂志,2008,33(10):1133-1138
- Huang SW, Chi R A, Zhang Y F, et al. Separation and purification of flavonoids from Smilax glabra by macroporous adsorption resin [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2008, 33(10):1133-1138
- [13] 曾祥腾,何燕,徐孟文,等.大孔吸附树脂富集纯化土茯苓总黄酮的研究[J].今日药学,2008,18(3):49-50
- Zeng XT, He Y, Xu MW, et al. Enrichment of Flavonoids from Smilax glabra Roxb. by Macroreticular Resins Adsorption [J]. Pharmacy Today, 2008, 18 (3): 49-50
- [14] Zhao J, Lin DQ, Yao SJ. Adsorption of rutin with a novel β -cyclodextrin polymer adsorbent: Thermodynamic and kinetic study [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90:1764-1770
- [15] Ma X, Chen Z, Chen R. Imprinted β -cyclodextrin polymers using naringin as template [J]. Polym Int, 2011, 60: 1455-1460
- [16] Liu H, Cai X, Wang Y, et al. Adsorption mechanism-based screening of cyclodextrin polymers for adsorption and separation of pesticides from water [J]. Water Research, 2011, 45: 3449-3511
- [17] Zhang QF, Nie HC, Shangguang X C, et al. Aqueous Solubility and Stability Enhancement of Astilbin through Complexation with Cyclodextrins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(1): 151-156
- [18] Yu J C, Jiang Z T, Liu H Y, et al. β -Cyclodextrin-pichlorohydrin copolymer as a solid-phase extraction adsorbent for aromatic compounds in water samples [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 477: 93-101
- [19] 高子伟,赵晓鹏,孙平,等. β -环糊精淀粉类树脂的制备和电流变性能[J].材料研究学报,2003,17(6):571-576
- Gao Z W, Zhao X P, Sun P, et al. Preparation and electro-rheological properties of β -cyclodextrin-starch resin polymer [J]. Chinese Journal of Materials Research, 2003, 17(6): 571-576
- [20] Zhang QF, Jiang ZT, Gao HJ, et al. Recovery of vanillin from aqueous solutions using macroporous adsorption resins [J]. European Food Research and Technology, 2008, 226: 377-383