

大孔吸附树脂法纯化杭白菊总黄酮

闫克玉, 于静

(郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 采用优选树脂纯化杭白菊总黄酮, 以分光光度法测定杭白菊总黄酮含量。确定大孔吸附树脂纯化杭白菊总黄酮的最佳工艺条件; AB-8 树脂纯化杭白菊总黄酮的工艺参数为: 树脂最大静态吸附容量为 23.06 mg/g (黄酮/树脂), 树脂吸附率为 89.22%, 提取液上样后吸附 1 h, 用 4 BV 的 70% 乙醇进行洗脱, 洗脱率可达到 96.64%; 结果表明, AB-8 树脂对杭白菊总黄酮具有良好的吸附和纯化性能。

关键词: 杭白菊; 总黄酮; 大孔吸附树脂

中图分类号: TS201.2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)01-0035-04

Purification of Total Flavonoids from HangZhou White Chrysanthemum using Macroporous Absorption Resin

YAN Ke-yu, YU Jing

(School of Food and Biological Engineering Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The total flavonoids of Hangzhou white chrysanthemum was purified by macroporous absorption resin and its content was determined by UV spectrophotometry. The optimal purification conditions by AB-8 macroporous absorption resin were as follows: maximum static adsorption capacity of 23.06 mg/g, resin adsorption rate of 89.22%, absorption time of 1 h. Besides, 4BV of 70% alcohol was used as eluent with an eluent rate of 96.64%. AB-8 resin showed good absorption and purification capability of the total flavonoids from Hangzhou white chrysanthemum.

Key words: Hangzhou white chrysanthemum; total flavone; macroporous adsorption resin

杭白菊 (HangZhou White Chrysanthemum), 又名杭菊、甘菊、茶菊, 为菊科植物菊的干燥头状花序。具有疏风散热、解毒消肿、利咽明目、降低血压的作用^[1]。现代药理学实验证实, 杭白菊所含黄酮类成分主要有金合欢素-7-O- β -D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷、木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷等^[2], 具有抗炎、抗病毒、抗真菌、抗疟疾、降血脂、增加冠脉流量、抗心肌缺血、抗自由基、降血压等多种药理活性^[3,4]。对抑制肿瘤、延缓衰老及增强人体免疫力有一定功效^[5-7]。大孔吸附树脂是二十世纪六十年代发展起来的一类具有良好吸附性能的不含离子基团的有机高聚物吸附剂^[8], 具有很好大孔网状结构和较大的比表面积, 可以通过物理吸附从水溶液中有选择性地吸附有机物。目前广泛应用于废水处理、医药工业、化学工业、分析化学、临床鉴定、工业脱色、环境保护等

收稿日期: 2007-09-10

基金项目: 郑州轻工业学院重大科技项目预研专项基金资助项目(2005XYJJ04)

作者简介: 闫克玉(1950-), 男, 教授, 主要从事烟草原料学、烟草化学、卷烟工艺学的教学和科研工作

领域^[9]。在中草药的分离上可用于皂苷、黄酮、蒽醌、生物碱、水溶性酚性成分等的富集, 其吸附性能、吸附条件参数因化合物的理化性质不同而不同, 中草药有效成分在大孔树脂上经一定的溶剂洗脱而达到分离的目的。本实验采用该技术, 以杭白菊中主要成分总黄酮为评价指标, 考察了 AB-8 型大孔吸附树脂富集杭白菊有效成分的工艺条件与参数, 旨在为利用该技术制备杭白菊总黄酮提供参考, 为该技术的规范应用积累资料。

1 材料与方法

1.1 试验仪器与材料

SP-2100 型可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司); SHB-III 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); BS 200S 电子天平 (误差 ± 0.001 g, 北京赛多利斯天平有限公司); 701-A 型干燥箱 (大连实验设备厂); KDM 可调控温电热套 (山东省光明仪器有限公司); HZQ-F160 全温振荡培养箱 (太仓市实验设备厂); 500 mL 索氏提取器。

芦丁 (Rutin, 生化试剂, 上海药品检验所, 批号: 20050310); 杭白菊 (购于河南省医药药材有限公司, 产地杭州, 60 °C 干燥, 粉碎过 40 目筛备用); AB-8 大孔吸附树脂 (天津市光复精细化工研究所, 批号: 070424); 所用试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 对照品溶液配制

精确称取经 120 °C 干燥至恒重的芦丁对照品 25 mg, 置 50 mL 容量瓶中, 加乙醇适量, 使之充分溶解, 用乙醇稀释至刻度, 摇匀。从中精密量取 20 mL, 置于 50 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 所得溶液每 1 mL 含芦丁对照品 0.2 mg^[10]。

1.2.2 供试品溶液的制备

准确称取杭白菊 35 g, 用滤纸包好, 置于索氏抽提器中, 在 500 mL 平底烧瓶中加入 300 mL 石油醚, 电热套加热回流提取, 直至滤液无色, 弃去石油醚提取液, 将滤纸包取出晾干后再置于索氏提取器中, 在平底烧瓶中加入 300 mL 75% 乙醇, 加热回流提取, 至滤液无色, 提取液趁热过滤、定容, 作供试液待用。

1.2.3 含量测定

标准曲线的制作: 精确量取芦丁对照品溶液 0.0 mL、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL、5.0 mL、6.0 mL, 分别置于 25 mL 容量瓶中, 各加水至 6 mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL, 混匀, 放置 6 min, 加 10% 硝酸铝溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 4% 氢氧化钠溶液 10 mL, 再加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min。按分光光度法(中国药典 2000 年版一部附录 VB)在 510 nm 波长处测定吸光度, 以质量浓度 C 为横坐标, 吸光度 A 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到标准曲线方程为:

$$A=0.0122C-0.0001, R^2=0.9996$$

供试液的测定: 精密吸取各供试品液 0.2 mL 于 25 mL 容量瓶中, 按照标准曲线方法进行操作显色, 在 510 nm 波长处测定吸收度 A, 由标准曲线方程计算样品中总黄酮的含量。

1.2.4 AB-8 树脂的预处理

在吸附树脂生产和储存过程中, 加入了防腐剂, 因此在树脂使用之前必须进行水合及除杂。将树脂放在水中浸泡 24 h, 使之充分溶胀, 赶尽气泡, 然后用蒸馏水反复洗涤除去有机和无机杂质; 用 95% 乙醇浸泡 24 h 除去醇溶物, 用蒸馏水洗至无醇味; 5% 盐酸浸泡 3 h, 用蒸馏水洗涤至中性, 5% 氢氧化钠浸泡 3 h, 再用蒸馏水洗至中性, 备用。

1.2.5 装柱

以蒸馏水湿法装柱, 并用乙醇在柱上流动清洗, 检查流出的乙醇与水混合不呈白浊色为止, 然后以大量蒸馏水洗去乙醇, 从而避免因为少量乙醇的存在大大降低大孔吸附树脂的吸附力。

2 结果与分析

2.1 静态吸附试验

2.1.1 样品上样量的确定

精密称取 1 g、2 g、3 g、4 g、5 g AB-8 大孔树脂, 置于 5 个 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密吸取 15 mL (溶液中黄酮的质量浓度为 3.464 mg/mL) 样品液, 置于振荡器中, 在 220 r/min、30 °C 条件下振荡 24 h, 静止一段时间, 使其达到饱和吸附, 吸取上层液测定总黄酮质量浓度, 最后折算为黄酮吸附量和黄酮吸附率。

黄酮吸附量 = (初始质量浓度 - 吸附后质量浓度) × 吸附液体积 / 树脂量;

黄酮吸附率 = (初始质量浓度 - 吸附后质量浓度) / 初始质量浓度)

从表 1 可以看出, 总黄酮量与树脂量比不同, 黄酮吸附率也不同。当树脂量为 2 g, 即黄酮量与树脂量的质量比为 1:38 时, 其最大静态吸附容量为 23.06 mg/g, 树脂吸附率为 89.22%, 大孔树脂吸附总黄酮量基本达到饱和。

表 1 总黄酮量与树脂的不同比例的静态吸附测定结果

Table 1 Result of static adsorption of different content ratio between total flavone and adsorption resin

树脂量/g	黄酮量:树脂量 (g:g)	吸附后黄酮的质量浓度 (mg/mL)	黄酮吸附量(mg/g)	黄酮吸附率/%
1.014	1:19	1.11	34.87	68.04
2.010	1:38	0.37	23.06	89.22
3.012	1:57	0.31	15.70	91.00
4.027	1:76	0.28	11.85	91.82
5.000	1:95	0.26	9.60	92.42

2.1.2 大孔吸附树脂的吸附动力学特征

吸附动力学特征反映的是随时间的延长, 树脂对样品分子吸附量的变化趋势。精密称取 4 g AB-8 大孔树脂置于 100 mL 烧杯中, 加入 30 mL (溶液中黄酮质量浓度 3.464 mg/mL) 样品液, 然后静置 24 h, 使其达到饱和吸附, 静置期间, 每隔一定时间吸取上层液测定总黄酮质量浓度, 折算成树脂吸附量。绘制大孔树脂静态吸附动力学曲线: 时间 (h) 与吸附量 (mg/g) 的关系图。

由图 1 可看到: AB-8 大孔吸附树脂对抗白菊总黄酮的吸附为快速平衡型, 起始阶段吸附量都较大, 到 1 h 以后吸附量变化平缓。因此在实际应用中, 应综合考虑生产周期等因素, 上样后静态吸附 1 h 即可。

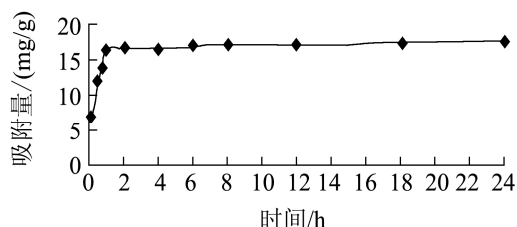


图 1 静态吸附动力学曲线

Fig.1 The dynamics curve of static adsorption

2.1.3 洗脱剂体积分数的选择

常用的解吸剂是以最能溶解吸附质为原则, 但要求沸点低, 易于蒸馏回收, 且同时要考虑环境保护等问题^[18]。综合考虑以上因素, 选用乙醇作为解吸剂最好。采用静态吸附—洗脱方法分别研究了不同浓度乙醇对抗白菊黄酮类化合物的洗脱性能。

精密称取处理好的 AB-8 型大孔树脂 1 g (6 份), 分别置带塞锥形瓶中, 加 15 mL 样品液 (3.464 mg/mL), 充分吸附后, 分离树脂, 晾干。然后对应加入体积分数分别为 10%、30%、50%、60%、70%、90% 的乙醇各 20 mL, 置于振荡器中, 在 220 r/min、30 °C 条件下, 每隔 5 min 振摇 10 s, 持续 2 h, 吸取上层液测定总黄酮的质量浓度, 测定洗脱量, 计算洗脱率。

表 2 洗脱剂浓度对总黄酮的影响

Table 2 The effect of eluent concentration on total flavone

乙醇体积分 数/%	洗脱后总黄酮的质 量浓度/(mg/mL)	洗脱量/mg	洗脱率/%
10	0.25	5.01	14.36
30	1.04	20.83	59.73
50	1.37	27.47	78.77
60	1.59	31.89	91.46
70	1.68	33.70	96.64
90	1.69	33.86	97.11

表 2 结果表明, 10%、30%乙醇洗脱率较低, 而乙醇浓度达到 70% 以上, 洗脱率就不再明显增加。所以初步选定在以后试验中以 70% 乙醇作为洗脱剂。

2.2 动态吸附试验

2.2.1 乙醇洗脱量的确定

大孔树脂湿法上柱, 上样杭白菊提取液, 用水冲洗, 用 70% 的乙醇进行洗脱, 每洗脱 1 BV 乙醇溶液

后留样 1 mL, 共留样 5 次, 测溶液中总黄酮质量浓度, 试验结果 (图 2) 表明: 用 4 BV 的 70% 乙醇洗脱, 树脂中的黄酮类物质已经基本洗脱完全。

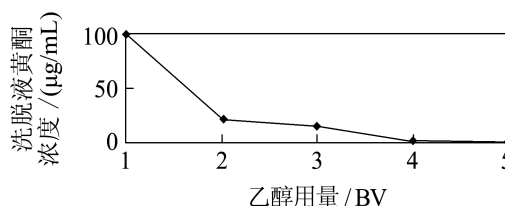


图 2 乙醇洗脱量的确定

Fig.2 Confirmation of the capacity of ethanol

2.2.2 吸附流速和洗脱流速的选择

吸附流速主要是影响溶质对树脂表面的扩散, 如果流速太高, 溶质分子来不及扩散到树脂的表面, 就发生泄漏, 上柱吸附原液随着吸附流速的加快, 黄酮类化合物的泄漏越来越严重, 本试验按一般文献报道 3 BV/h 进行吸附, 效果较好。

解吸流速一般都要求慢, 这是因为流速过快, 洗脱性能差, 洗脱带宽, 且拖尾严重, 洗脱不完全, 而且严重浪费溶剂; 流速过慢, 洗脱时间延长, 生产效率降低。常用的解吸流速是吸附流速的 1/3~1/2^[11], 本试验采用 2 BV/h 进行洗脱, 试验表明解吸效果较好。

2.2.3 不同体积分数的乙醇洗脱对总黄酮纯度的影响

索氏抽提法提取杭白菊, 提取液经过滤, 减压浓缩至无醇味, 浓缩液加水定容于 100 mL 容量瓶备用, 经检测黄酮类化合物质量浓度为 5.685 mg/mL。

表 3 不同体积分数的乙醇洗脱得黄酮量检测结果

Table 3 The content of flavone get by different concentration of ethanol

乙醇/%	浸膏量 /mg	黄酮纯度 /%	黄酮量 /mg	占洗脱得总黄 酮比例/%
10	72	10.7	7.7	1.1
30	175	75.9	132.8	18.9
50	563	83.1	467.8	66.5
70	125	71.8	89.8	12.8
95	39	14.3	5.6	0.8
总计	974		703.6	100

上样杭白菊提取液 97 mL, 用水洗脱, 然后用 10%、30%、50%、70%、95% 的乙醇水溶液进行梯度洗脱, 洗脱至洗脱液无色为止, 收集不同体积分数的乙醇洗脱液于烧杯中, 每种洗脱液各留样 2 mL 于试管中备用。将烧杯中各浓度洗脱液浓缩干燥, 检测结果见表 3、表 4。从表 3、表 4 中可以看出, 30%、50%、70% 乙醇洗脱得黄酮的量占洗脱所得总黄酮的 98.1%, 占洗脱得总黄酮绝大部分, 且三者混合物总

黄酮含量为 80.0%，满足试验前预计的分离产物总黄酮含量达 80% 的目的。因此 10% 乙醇洗脱得到的洗脱液弃去，然后用 70% 乙醇洗脱，收集洗脱液，并浓缩干燥。

表 4 不同体积分数的乙醇洗脱物混合的结果

Table 4 The total content of flavone washed by ethanol of different concentration

乙醇/%	混合物总黄酮含量/%	占洗脱得总黄酮比例/%
10、30、50、70、95	72.2	100
10、30、50、70	74.7	99.2
30、50、70、95	77.2	98.9
30、50、70	80.0	98.1
30、50	81.4	85.4
50、70	81.0	79.2

3 结论

3.1 AB-8 型树脂对抗白菊总黄酮有良好的吸附性能，其工艺条件为杭白菊最大静态吸附容量为 23.06 mg/g，树脂吸附率为 89.22%，提取液上样后吸附 1 h，用 4 BV 的 70% 的乙醇进行洗脱，洗脱率可达到 96.64%。

3.2 本实验证实了 AB-8 型树脂富集总黄酮不仅具有吸附快、解吸率高等特点，而且具有吸附容量较大、洗脱率高等优点，在杭白菊富集总黄酮工艺中具有一定的推广应用价值。

3.3 大孔吸附树脂技术虽在工业化进程中还存在一些实际应用问题，但比其它天然吸附剂具有不可替代的优点，尤其是其孔径和孔度的大小，比表面积、极

性等性能都可以人为控制调节，供任意选择，因此在天然植物产物分离、纯化等研究中已日趋成熟，应用前景广泛。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1997, 2008-2011
- [2] 张清华, 张玲. 菊花化学成分及药理作用的研究进展[J]. 食品与药品, 2007, 9: 60-63
- [3] Kaiser S, Hwang J J, Gregor M. High-density microarray genechip analysis reveals different gene expression profiles in hepatoma cell lines and in hepatocellular carcinoma tissue. *Gastroenterology*, 2000, 118(4): 905
- [4] 张晓媛, 雷和稳, 张文英. 菊花总黄酮的提取工艺[J]. 河北化工, 2007, 4: 44-45
- [5] 黄亚非, 张永明, 陶玲, 等. 广东野菊花挥发油的化学成分[J]. 分析测试学报, 2001, 20(6): 40-41
- [6] 邵华, 南蓬. 微甘菊花挥发油成分分析[J]. 中药材, 2001, 24(5): 341-342
- [7] 李竣, 卢金清. 金菊花挥发油化学成分的 GC-MS 分析[J]. 中药材, 2001, 24(9): 642-643
- [8] 张虹, 柳正良, 王洪泉. 大孔吸附树脂在药学领域的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2001, 32(1): 41
- [9] 王冬梅, 尉芹, 马希汉. 大孔吸附树脂在药用植物有效成分分离中的应用[J]. 西北林学院学报, 2002, 17(1): 60
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000 : 563
- [11] 李敏杰, 邓启刚, 安东正义. 中药有效成分分离纯化工艺概述[J]. 齐齐哈尔大学学报, 2004, 90-107, 109, 177-183

韩国开发出营养、环保的螺旋藻

韩国科学家近日培育出一种可以大规模养殖的新型螺旋藻，既可以用作动物饲料添加剂，又有助于减少大气中的温室气体。

据韩联社报道，由韩国生物科学与生物技术研究所以生物学家吴熙穆领导的研究小组表示，他们利用甲基磺酸乙酯培育出编号为 M2OCJK3 的螺旋藻菌。

这种螺旋藻是蓝藻家族中的一员，它通过生命体的光合作用吸收二氧化碳。吴熙穆说，如果进行大规模养殖，这种新品种螺旋藻的二氧化碳固定率可以稳定在每天每平方米 21.8 克二氧化碳，比广为人知的 CG590 型螺旋藻高 13%。

吴熙穆还说，如果养殖方法得到改善，新型螺旋藻可作为水产动物饲料添加剂出售。初步实验结果表明，吃了这种螺旋藻的虾比不吃这种螺旋藻的虾多长 10% 以上。该研究小组正在申请国际专利。

(新闻来源：中国食品产业网)