

树脂理化特性对分离葛根总黄酮的影响

方俊, 王建华^{*}(重庆大学生物工程学院, 重庆 400044)

摘要: 目的 研究吸附树脂理化性质对分离葛根总黄酮的影响。方法 采用分光光度法分别对 5 种 ADS 系列吸附树脂作静态、动态研究, 并对较优树脂进行动态吸附-脱附工艺参数的优化。结果 静态实验表明, 树脂的极性和空间结构是影响吸附效果的重要因素; 树脂 ADS-8 上柱液浓度约为 $0.453 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 5~6, 吸附速率 $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 400 mL 蒸馏水洗去杂质, 洗脱剂为 70% 乙醇, 洗脱流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 用量为 60 mL。结论 ADS-8 是分离纯化葛根总黄酮的较优树脂。

关键词: ADS 吸附树脂; 葛根总黄酮; 分离纯化

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)04-0281-04

Impact of Physical and Chemical Characteristics of Resin on Separating Total Flavones from Radix Puerariae Lobatae

FANG Jun, WANG Jianhua^{*} (College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Study on the impact of the physical and chemical characteristics of resin on separating total flavones from Radix Puerariae Lobatae. **METHODS** Five kinds of ADS adsorbing resins were tested in the static and dynamic research about separating and purifying total flavones. And the best resin was screened out, then its technical parameters in dynamic adsorption-desorption were optimized. **RESULTS** The static adsorption tests showed that the polarity and textual structure were main factors on the adsorptive capacity. The optimum conditions for ADS-8 were identified, which were $0.453 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ corresponding to crude drug for concentration of extract, pH 5-6 with the adsorption speed of $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$; water volume for removing impurities was 400 mL; and the concentration of the eluant ethanol 70%, volume of ethanol was 60 mL with the desorption speed of $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$. **CONCLUSION** ADS-8 is the best resin for separating and purifying total flavones.

KEY WORDS: ADS adsorbing resins; total flavones from Radix Puerariae Lobatae; separation and purification

葛根, 又名干葛或甘葛, 为豆科葛属植物野葛的干燥根。主要成分为异黄酮成分葛根素、葛根素木糖甙、大豆黄酮、大豆黄酮甙等。具有解肌退热、生津止渴的功能, 临床试验证明可以扩张冠状动脉、脑血管; 另外有降压、降胆固醇、降血糖等作用^[1-5]。近期还发现某些有效成分具有雌激素样活性, 并能抑制破骨细胞骨吸收、促进长骨生长^[6-8]。因而它的药用和食用价值都很高, 已被卫生部认定为药食两用植物。目前, 采用大孔吸附树脂分离葛根总黄酮, 分离效果较好, 工艺操作简便, 成本较低, 而且树脂可以重复利用, 适合工业生产, 是一种很有前途的新颖分离方法。ADS 吸附树脂是南开大学高分子化学研究所研制的一系列新型吸附树

脂, 由于各树脂不同的特性, 在中草药有效成分的分离纯化方面取得了比较满意的效果^[9]。本研究旨在探讨这些特性对分离葛根总黄酮的影响, 为工业生产奠定理论基础。

1 实验部分^[10-13]

1.1 仪器及试剂

752S 型紫外可见分光光度计(上海棱光技术有限公司); AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); R-200 型旋转蒸发器(瑞士 buchi 公司); 恒温振荡器(上海福码实验设备有限公司)。

干野葛(产地重庆合川市, 重庆葛恩生物科技开发有限公司, 由重庆市中药研究院鉴定); 葛根素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 080320, 纯

基金项目: 人事部留学人员基金项目(20071749); 重庆市自然科学基金项目(2006BB5017); 国家科技支撑计划(2007BAD51B05)

作者简介: 方俊, 男, 硕士生 Tel: 13675734375 E-mail: fangjuna@163.com ^{*}通信作者: 王建华, 男, 博士, 教授

Tel: 13983657810 E-mail: wjh@cqu.edu.cn

度 $\geq 98\%$); ADS-7, ADS-8, ADS-17, ADS-22, ADS-F8 型大孔树脂(天津南开和成科技有限公司); 其他试剂均为分析纯。

1.2 标准曲线的绘制

精确称量葛根素对照品 0.5 mg, 用 70%乙醇定容至 10 mL, 即浓度为 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液, 分别吸取 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 mL 的对照品储备液, 用 70%的乙醇定容至 10 mL, 配制不同浓度的对照溶液, 250 nm 处测定吸光度。

1.3 总黄酮的提取与检测

取干野葛 500 g, 用 70%乙醇加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并滤液, 再回收乙醇直至无醇味,

高速离心分离, 取上清液备用(浓度约为 $6.8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。提取液及洗脱液中总黄酮含量测定采用以葛根素为对照品的紫外分光光度法。

1.4 大孔树脂预处理及其再生

本试验共选择了 5 种树脂进行实验, 这些树脂均对黄酮类化合物有一定的吸附能力, 其物理性质参数见表 1。

将各树脂用 90%乙醇浸泡 24 h, 使之充分溶胀后湿法装柱, 先用乙醇清洗至流出液加水不浑浊为止, 再用蒸馏水洗至水液澄清。用过的大孔树脂用 1% NaOH 水溶液淋洗 3~4 BV 后, 用蒸馏水洗至中性即可再生。

表 1 5 种大孔树脂理化性质

Tab 1 Physical and chemical properties of the five kinds of macroporous resins

型号	外观	比表面积/ $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$	粒径范围/ mm	平均孔径/ nm	湿视密度/ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	孔隙率/%	特性	类型
ADS-8	乳白色球粒	450~550	0.3~1.2	12~16	0.65~0.75	45~50	非极性	
ADS-7	乳白色或浅黄色球粒	100~150	0.3~1.2	25~30	0.65~0.75	40~45	强极性	聚苯乙烯型
ADS-17	乳白色球粒	100	0.3~1.2	25~30	0.65~0.75	40~50	中极性	
ADS-22	黄色球粒	—	0.3~1.2	—	0.65~0.7	—	极性	
ADS-F8	浅黄色球粒	—	0.3~1.2	无孔	0.65~0.75	—	极性	凝胶氢键型

1.5 静态吸附-解吸实验

1.5.1 饱和吸附量的测定 精确量取一定质量 (2.000 0 g) 经预处理的树脂装入具塞磨口三角瓶中, 精确加入备用液, 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 于恒温振荡器上中速 ($180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 振摇, 分别测定 20, 40, 60, 120, 180 min 时及 24 h 后的溶液中总黄酮浓度, 并以 24 h 为吸附终点, 按下式计算饱和吸附量:

$$Q=(C_1-C_2)\times V_1/m$$

式中, Q : 饱和吸附量, $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$; C_1 : 起始质量浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; C_2 : 平衡质量浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; V_1 : 吸附液体积, L; m : 树脂质量, g。

1.5.2 解吸率的测定 将“1.5.1”项下制得的树脂滤出, 吸干表面水分, 置于干净的三角瓶中, 分别加入 70%乙醇 50 mL, 恒温振荡器上振摇 2 h, 测定洗脱液中总黄酮浓度, 按下式计算解吸率:

$$D=C_3V_2/Qm\times 100\%$$

式中, D : 解吸率, %; C_3 : 解吸液质量浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; V_2 : 解吸液体积, L。

1.6 动态吸附-洗脱实验

在室温下, 10 mL 葛根总黄酮提取液以一定的流速通过装有约 15 mL 树脂的玻璃层析柱 (2 cm $\times$ 20 cm), 测定每 5 mL 流出液中的总黄酮含量, 考察不同树脂的洗脱效果与区别; 对较优树脂进行参数优化, 考察不同上样浓度、pH 值、吸附流速、乙醇浓度、洗脱流速、水洗用量等对树脂性能的影响。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线

葛根素标准曲线的线性回归方程为: $Y=8.225X+0.115$, $r=0.998\ 9$ 。Y 表示葛根溶液中总黄酮浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), X 表示吸光度。

2.2 静态吸附-解吸

在相同的实验条件下, 采用不同的大孔吸附树脂考察其对总黄酮的吸附量, 结果见表 2。

树脂的极性(功能基)和空间结构(孔径、比表面积等)是影响吸附效果的重要因素。本试验所用的树脂有强极性、极性、中极性、非极性几类。相对而言, 有极性的树脂吸附量较非极性树脂大, 这是由

表 2 5 种大孔树脂的葛根总黄酮静态吸附量

Tab 2 Static adsorption amounts of total flavones with the five kinds of macroporous resins

型号	吸附量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	解吸率/%
ADS-8	64.2	91.0
ADS-7	87.6	65.2
ADS-17	45.9	48.3
ADS-22	203.7	13.7
ADS-F8	73.8	71.9

于葛根黄酮具有酚羟基和糖苷链,有一定的极性和亲水性,生成氢键的能力较强,有利于在极性树脂上吸附。非极性树脂,如 ADS-8,为一种广谱型吸附树脂,它的非极性表面能以范德华力从水溶液中吸附物质,因此吸附量不高,适用于各种疏水性物质的吸附。另外,在某些情况下,吸附作用力过强,解吸起来困难,如 ADS-22 吸附量非常大,但解吸率很低,也不适用于分离和提纯。

在 4 种有极性的树脂中,强极性树脂要优于中极性树脂,如 ADS-7 和 ADS-17 的物理参数都差不多,但前者的吸附量和解吸率明显高于后者。原因是由于 ADS-7 是一种双功能吸附树脂,带有不同功能基,其吸附机制可能包含范德华力、静电力、氢键力等多种吸附力,对黄酮类物质有较高的选择性。

各树脂对葛根总黄酮的静态吸附动力学曲线见图 1。

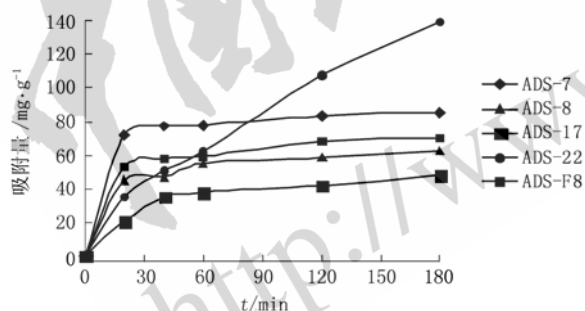


图 1 不同树脂对葛根总黄酮的静态吸附动力学曲线

Fig 1 Static adsorption dynamic curves of total flavones with different samples

由上图很明显可以看出, ADS-22 树脂在该时间段对葛根总黄酮的吸附量仍呈上升趋势,并未达到最大吸附量;而其他 4 种树脂在前 30 min 内变化速率较大,后面时间段变化趋势不明显,3 h 内基本上已达到平衡状态,总体上看呈指数变化趋势。

2.3 动态吸附-解吸

2.3.1 动态洗脱曲线 在其他条件均相同的情况下,各树脂的洗脱曲线见图 2。

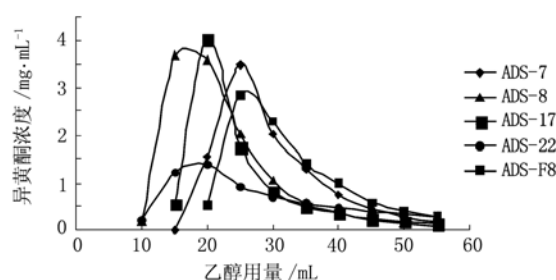


图 2 不同树脂的洗脱曲线

Fig 2 Eluting curves of different samples

图中表明各树脂的洗脱曲线呈正态分布,且当洗脱剂用量为 60 mL 的时候,可认为异黄酮已完全被洗脱下来。ADS-22 的峰值明显小于其它树脂,说明其洗脱量相对较小,洗脱效果差,不利于葛根异黄酮的分离。而 ADS-8 曲线较宽,洗脱量较大,且最先达到洗脱峰,说明洗脱相同量的异黄酮,ADS-8 所用时间最短,提高了分离效率。

2.3.2 ADS-8 动态参数优化 由以上实验可知, ADS-8 具有合适的吸附量与较理想的洗脱效果,应作为分离纯化总黄酮的首选树脂,因此对其作了优化工艺的筛选。

2.3.2.1 上样浓度 各取 10 mL 样品液,分别稀释 0, 5, 10, 15, 20 倍,上样,吸附速率约 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;用蒸馏水洗去杂质直至流出液无色,流速约 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 70%乙醇洗脱,流速约 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,收集洗脱液,计算洗脱液浓度及洗脱率。结果表明,用比原液稀 15 倍的料液上样时,洗脱率达到最大,但与没稀释的情况相比,洗脱率差别不是很大,因此以下实验直接取原液上样。

2.3.2.2 pH 值 各取 10 mL 样品液,用 NaOH 或 HCl 溶液分别调节 pH 至 1~2, 3~4, 5~6, 7~8, 9~10, 上样,吸附速率约 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;用蒸馏水洗去杂质直至流出液无色,流速约 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 70%乙醇洗脱,流速约 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,收集洗脱液,计算洗脱液浓度及洗脱率。结果显示,上样溶液 pH 为 5~6 时,洗脱率最高,达 90%以上,因此以下实验均采用 pH 为 5~6 的溶液上样。

2.3.2.3 吸附速率 各取 10 mL 样品液,调节 pH 至 5~6,上样,分别控制吸附速率为 1, 2, 3, 4, 5 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$;用蒸馏水洗去杂质直至流出液无色,流

速约 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 70%乙醇洗脱, 流速约 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 收集洗脱液, 计算洗脱液浓度及洗脱率。结果显示, 吸附速率为 $4 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 时效果最好。

2.3.2.4 水洗用量 取 10 mL 样品液, 调节 pH 至 5~6, 上样, 控制吸附速率约 $4 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$; 用蒸馏水洗去杂质, 水洗脱液于 100, 200, 300, 400, 500 mL 时测试总黄酮损失率和多糖反应, 通过总黄酮损失率和多糖反应确定洗脱剂加水量^[14]。用水洗脱可洗去葛根提取液中的多糖杂质, 同时也会洗脱掉少部分的葛根素。试验结果表明, 水洗脱用量为 400 mL, 多糖反应呈阴性, 表明多糖杂质基本除尽, 且 400 mL 时总黄酮损失率为 5.68%, 小于 500 mL 时的总黄酮损失率 6.17%, 故确定水的用量为 400 mL。

2.3.2.5 乙醇浓度 各取 10 mL 样品液, 调节 pH 至 5~6, 上样, 控制吸附速率为 $4 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$; 用 400 mL 蒸馏水洗去杂质, 分别用 10%, 30%, 50%, 70%, 90% 的乙醇洗脱, 流速约 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 收集洗脱液, 计算洗脱液浓度及洗脱率。结果表明, 70% 的乙醇洗脱效果最好。

2.3.2.6 洗脱速率 取 10 mL 样品液, 调节 pH 至 5~6, 上样, 控制吸附速率为 $4 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$; 用 400 mL 蒸馏水洗去杂质, 并用 70%乙醇洗脱, 洗脱速率分别为 1, 2, 3, 4, $5 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 收集洗脱液, 计算洗脱液浓度及洗脱率。结果表明, 洗脱流速越慢, 洗脱率越高, 葛根中总黄酮的利用率越高, 但考虑到提高洗脱效率, 节约洗脱液, 本研究中洗脱流速以 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 较合适, 其洗脱速率与 $1 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的情况相差不多。

2.3.2.7 乙醇用量 由图 2 的洗脱曲线可以看出, 乙醇用量为 60 mL, 即 4 BV 时, 葛根异黄酮可视为已被完全洗脱。

3 结论

通过对 5 种树脂吸附葛根总黄酮的研究, 综合考虑多方面因素, 认为 ADS-8 是分离纯化葛根总黄酮的较优树脂。在本试验范围内, ADS-8 树脂室温下对葛根总黄酮吸附分离的最佳工艺参数为: 上柱液浓度约为 $0.453 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 值 5~6, 吸附速率 $4 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$; 400 mL 蒸馏水洗去杂质; 洗脱剂为 70%乙醇, 洗脱流速 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 用量 4 BV。若扩大化生产,

有可能取得良好效果, 具有潜在的工业应用价值。

REFERENCES

- [1] PU Z H, WANG N. Pharmacology research progress of Puerariae Lobatae [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2000, 15(2): 81-83.
- [2] HE W S. Pharmacology and clinical research progress of cardiovascular and cerebrovascular diseases cured by Puerariae Lobatae and its extract [J]. Res Tradit Chin Med (中医药研究), 2001, 17(3): 58-59.
- [3] HUANG Z Y, ZHAO Y T, LI Y. Progress of Puerariae Lobatae in pharmacological effect and clinical application [J]. Guangming J Chin Med (光明中医), 2007, 22(6): 63-66.
- [4] DI L, YU Y, YANG H X, et al. Mechanism research progress of puerarin effected on the angiocardopathy [J]. Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis(中西医结合心脑血管病杂志), 2009, 7(3): 328-329.
- [5] MA X H. Clinical application of puerarin [J]. China Pract Med (中国实用医药), 2009, 4(1): 231.
- [6] ZHENG G L, ZHANG X Y, ZHENG J W, et al. Estrogen-like effect of puerarin and total isoflavones from Puerariae lobatae [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2002, 25(8): 566-568.
- [7] LI L Z, LIU Q B, JIANG M C, et al. Inhibitory effect of puerarin on osteoclastic bone resorption *in vitro* [J]. Acta Acad Med Mil Tert(第三军医大学学报), 2004, 26(20): 1830-1834.
- [8] LI L Z, ZHANG Y L, LIU Q B, et al. Effect of puerarin on the expression of estrogen receptor beta in long bones of mouse embryos *in vitro* [J]. Chin J Clin Rehabil Tissue Engin Res (中国组织工程研究与临床康复), 2006, 10(35): 25-28.
- [9] SHI Z Q, SHI R F, FAN Y G, et al. Application of polymer adsorbent in extraction of medical herbs [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2001, 32(7): 660-662.
- [10] GUI B, GUO J, CHI R A, et al. Study on adsorptive property of total flavones from kudzu vine root (Radix Puerariae) with macroporous resins [J]. Appl Chem Ind (应用化工), 2007, 36(5): 451-453.
- [11] ZHANG L M, LI C L. Study on separation and purification of total flavones of Hawthorn leaves by macroporous adsorption resins [J]. Chem Ind Forest Prod (林产化学与工业), 2006, 26(1): 87-90.
- [12] LIU Y J, DONG X Y, CUI Y, et al. Study on the method of separation and purification of puerarin [J]. Acta Acad Med CPAPE(武警医学院学报), 2006, 15(6): 583-584.
- [13] LIU H A, WANG B C, DAI C Y, et al. Optimization of preparative separation and purification of total flavonoids from Radix Puerariae by macroporous resin method [J]. J Chin Pharm Sci(中国药学: 英文版), 2006, 15(2): 121-126.
- [14] HE Y X, YU J, LI L, et al. Study on the technology of isolation and purification of gross anthoxanthin in Radix Puerariae with macroporous adsorbing resin [J]. J Southwest Agricul Univ: Nat Sci (西南农业大学学报: 自然科学版), 2006, 28(6): 957-960.

收稿日期: 2009-10-12