

应用大孔吸附树脂分离纯化香椿叶总黄酮

张京芳, 王冬梅*

(西北农林科技大学林学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 测定了6种大孔吸附树脂对香椿叶中总黄酮的吸附解吸性能, 确定了大孔吸附树脂吸附分离香椿叶总黄酮的工艺条件。结果表明 LSA-10 树脂对香椿叶总黄酮有良好的吸附解吸性能, 其最佳吸附分离的工艺条件为: 上柱液总黄酮质量浓度 0.653 mg/mL, pH 4.0 ~ 5.5, 流速 240 mL/h, 饱和吸附量 440 ~ 480 mL, 用 400 mL 50% 乙醇以流速 80 mL/h 解吸。经 4 次上柱吸附解吸, 香椿叶总黄酮纯度可达 75.2%。

关键词: 香椿; 叶; 总黄酮; 大孔吸附树脂; 分离; 纯化

中图分类号: S 644.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 06-1585-04

Separation and Purification of Total Flavonoids from *Toona sinensis* Leaves by Macroporous Resins

ZHANG Jing-fang and WANG Dong-mei*

(College of Forest, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to establish the technology for separating and purifying total flavonoids from *Toona sinensis* leaves with macroporous resin, 6 types of macroporous resins were selected to be investigated. The results showed that LSA-10 was the best for separating and purifying total flavonoids in the following conditions: the loaded concentration of total flavones 0.653 mg/mL, pH 4.0 – 5.5, the flow rate 240 mL/h; amount of saturated adsorption for total flavones 440 – 480 mL; 400 mL 50% ethanol as appropriate the eluting reagent, eluting rate 80 mL/h. The purity of total flavonoids purified by LSA-10 was 75.2% when purified four times under the optimal conditions.

Key words: *Toona sinensis*; Leaf; Total flavonoid; Macroporous resin; Separation; Purification

香椿 (*Toona sinensis*) 是我国特有的木本蔬菜, 其叶片中富含黄酮类化合物 (张仲平等, 2001; 李秀信等, 2002)。有研究表明, 香椿叶中的黄酮类化合物具有显著的抗氧化作用, 能有效清除自由基, 有较好的免疫作用。

目前国内外关于香椿叶黄酮的提取分离方法主要限于有机溶剂回流提取法 (李秀信等, 2002)、超声强化法 (董彩霞等, 2005; 丁彩梅等, 2005) 和酶法 (孟志芬等, 2005)。大孔吸附树脂分离纯化技术是采用大孔树脂从植物中有选择的吸附其中的有效成分, 去除无效成分的一种工艺 (王冬梅等, 2002; 向大雄等, 2006; 张黎明和李春莲, 2006)。

作者采用该技术, 通过对6种大孔树脂的筛选试验, 寻找对香椿叶黄酮具有良好吸附性能的树脂, 进而确定了吸附分离的生产工艺条件, 旨在为香椿的深度开发利用提供新思路。

收稿日期: 2007-06-25; 修回日期: 2007-09-12

基金项目: 陕西省科技攻关项目 (2005K03-G07); 留学人员科技活动择优资助项目; 西北农林科技大学科研启动费资助项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: dmwli@163.com)

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

芦丁, 上海生化试剂二厂生产; LSA-10、LSA-20、LSA-30、LSA-40、XDA-1、LSA-5B 大孔树脂, 西安蓝晓科技有限公司生产; 其余所用试剂均为分析纯。

香椿叶于 2006 年 8 月采自西北农林科技大学南校区, 叶片阴干后粉碎备用。RE5 旋转蒸发仪, 上海亚荣仪器厂产; UV754N 紫外可见分光光度计, 上海光学仪器厂产; 电子分析天平, 上海天平仪器厂产; PHS-25 型 pH 计, 上海雷磁仪器厂产; 玻璃层析柱 Φ 30 mm, 长 550 mm, 树脂柱体积 80 mL。

1.2 树脂预处理

6 种大孔树脂分别用无水乙醇浸泡 24 h, 充分溶胀, 用无水乙醇淋洗至洗出液加适量水无白色浑浊为止, 再用去离子水洗涤树脂至无醇味, 过滤, 室温晾干备用。

1.3 黄酮含量的测定方法

参照丁彩梅等 (2005) 的方法。回归方程为 $Y = 6.4435X + 0.0201$, $r = 0.9987$ (X 表示吸光度; Y 表示芦丁浓度, mg/mL), 线性范围 0 ~ 0.142 mg/mL。

1.4 香椿叶总黄酮粗提物及上柱液的制备

向香椿叶中加入 80% 乙醇, 料液比为 1:10 (g/mL), 在 80℃ 下回流提取 3 次, 每次 2 h。将 3 次的提取液合并, 减压浓缩, 于 50 ~ 55℃ 下真空干燥, 得香椿叶总黄酮粗提物。精确称取香椿叶总黄酮粗提物 0.5 g, 溶于 30 mL 95% 乙醇中, 加入 100 mL 蒸馏水, 置超声波发生器中振荡使其溶解, 过滤, 洗涤, 转容至 250 mL 容量瓶中, 加蒸馏水定容, 得上柱液。

1.5 树脂吸附率、解吸率的测定

分别称取经预处理的 6 种干树脂各 1.00 g, 置 50 mL 具塞磨口锥形瓶中, 各加入上述配制好的上柱液 30.00 mL, 盖紧瓶塞, 室温下振荡 (120 次/min) 24 h, 充分吸附后, 过滤, 用 15.00 mL 蒸馏水洗涤吸附后的树脂, 将滤液与洗涤液合并, 定容至 50 mL, 测定其中的黄酮浓度, 按下式计算各种树脂在室温下对香椿叶黄酮的吸附率。 $D(\%) = (C_0V_0 - C_aV_a) / C_0V_0 \times 100$ 。式中 D 吸附率; C_0 初始浓度, mg/mL; V_0 初始体积, mL; C_a 吸附液质量浓度, mg/mL; V_a 吸附液体积, mL。

向上述吸附饱和的树脂中分别加 70% 乙醇 30.00 mL, 室温下振荡 24 h, 解吸, 过滤, 用 15.00 mL 70% 乙醇洗涤树脂, 合并洗涤液与滤液, 定容至 50 mL, 测定其中的黄酮浓度, 按下式计算各种树脂在室温下对香椿叶总黄酮的解吸率。 $E(\%) = C_d \times V_d / (C_0V_0 - C_aV_a) \times 100$ 。式中: E 解吸率; C_d 解吸液质量浓度, mg/mL; V_d 解吸液体积, mL。

1.6 上柱液的 pH 值对总黄酮吸附率的测定

用 5% NaOH 溶液和 5% HCl 溶液调整上柱液 pH 值分别至 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0。称取筛选的干树脂 1.00 g, 置于 50 mL 具塞磨口锥形瓶中, 准确加入各 pH 值的上柱液 30.00 mL, 盖紧瓶塞, 置室温下振荡 (120 次/min) 24 h, 充分进行静态吸附后, 过滤, 用 15.00 mL 蒸馏水洗涤吸附后的树脂, 将滤液与洗涤液合并, 定容至 50 mL, 计算香椿叶总黄酮的吸附率。

1.7 大孔吸附树脂对香椿叶总黄酮的动态吸附—脱附试验

对筛选出的理想树脂, 湿法装入层析柱中, 蒸馏水洗涤平衡, 上柱液总黄酮浓度为 0.653 mg/mL, 并将其 pH 值调至从上述 1.6 中得到的最适范围, 然后以不同速度上柱, 每 80 mL 的流出液单独收集, 测定流出液中总黄酮含量, 考察上柱液流速等因素对树脂吸附性能的影响, 绘制吸附透过曲线, 确定最佳吸附工艺条件。

待树脂达到动态吸附平衡后进行解吸, 测定解吸剂浓度、解吸剂流速等对树脂脱附性能的影响, 确定解吸工艺条件。

2 结果与分析

2.1 大孔吸附树脂静态试验结果

2.1.1 6种大孔吸附树脂对香椿叶总黄酮的静态吸附—解吸效果 树脂极性不同,对黄酮的吸附强弱不同,解吸难易也不一样。6种树脂对香椿叶总黄酮的吸附率大小顺序为: XDA-1 > LSA-10 > LSA-20 > LSA-30 > LSA-40 > LSA-5B, 吸附率依次为 68.0%、65.5%、48.8%、47.6%、38.9%、20.4%, 其中 XDA-1 和 LSA-10 树脂的吸附率最高,且差异不大。就树脂的解吸率而言, LSA-10 > LSA-40 > LSA-20 > LSA-30, 以 LSA-10 树脂的解吸率最高,达 91.3%, LSA-5B、XDA-1 两种树脂的解吸率相对较低,以 XDA-1 树脂的解吸率最低,仅有 28.6%, 因此,综合考虑树脂的吸附—解吸效果,选择 LSA-10 树脂进行香椿叶总黄酮的分离纯化。

2.1.2 上柱液 pH 值对香椿叶总黄酮吸附效果的影响 当上柱液 pH 在酸性条件下, LSA-10 大孔树脂对香椿叶总黄酮的吸附率大,而在中性和微酸性条件下吸附率急剧下降;当 pH 4.0 ~ 5.5 时最大,吸附率在 61.7% ~ 63.1%, pH 6.0 ~ 7.0 时,吸附率降至 52.5% 以下。其原因是大孔树脂对分子态的物质吸附效果好,而对离子态的物质不吸附。酸性化合物在适当酸性溶液中充分吸附。黄酮类化合物含有多个酚羟基,呈酸性,在中性条件下易发生电离,以离子形式存在,在碱性条件下,以盐的形式存在,这两种形式均不利于大孔树脂对黄酮的吸附。因此对香椿叶黄酮类的吸附应在酸性环境下进行,上柱液的适宜 pH 值是 4.0 ~ 5.5。

2.2 LSA-10 大孔树脂分离纯化香椿叶总黄酮的工艺确定

2.2.1 上柱液质量浓度对吸附的影响 随上柱液浓度的增加,黄酮泄漏加快,当上柱液总黄酮浓度为 0.653 mg/mL,流出液在 480 mL 时才有黄酮泄漏,上柱液总黄酮浓度为 1.306 mg/mL,流出液在 320 mL 时出现黄酮泄漏,上柱液总黄酮浓度为 1.959 mg/mL,流出液在 240 mL 时出现黄酮泄漏,因此选择上柱液总黄酮浓度为 0.653 mg/mL 为宜。

2.2.2 上柱液流速 流速过快,树脂尚未及时吸附黄酮类化合物,黄酮类化合物已随吸附液流出,流速低,有利于黄酮在柱体上的充分吸附,但如果流速太慢,会降低工作效率。由图 1 可看出,流速小,泄漏点出现较晚,流速大,泄漏点出现较早。以 160、240、320 和 400 mL/h 的流速上柱,随流出液的流出,黄酮的检出量逐渐增加,当上柱流速为 160 mL/h 时,流出液为 320 mL 时才有少量黄酮被检出,当流出液为 560 mL 时黄酮有明显泄漏;上柱流速为 240 mL/h 时,虽然流出液在 240 mL 时有微量黄酮被检出,但当流出液为 560 mL 时黄酮才有很大泄漏,因此综合考虑纯化效率和生产效率,以 LSA-10 大孔树脂吸附分离香椿叶总黄酮时,上柱液流速以 240 mL/h 比较适宜。

2.2.3 吸附透过曲线的制作 用 LSA-10 大孔树脂吸附香椿叶总黄酮时,在 240 mL 时有少量黄酮被检出,随着流出液的流出,黄酮的检出量逐渐增加,在 400 ~ 560 mL 范围内,黄酮泄漏量大幅度增加,说明在 400 ~ 480 mL 香椿叶总黄酮吸附已接近饱和。因此香椿叶总黄酮动态吸附的适宜量在 440 ~ 480 mL。

2.2.4 解吸剂浓度对香椿叶总黄酮解吸率的影响 本试验测定了不同体积分数的乙醇对香椿叶总黄

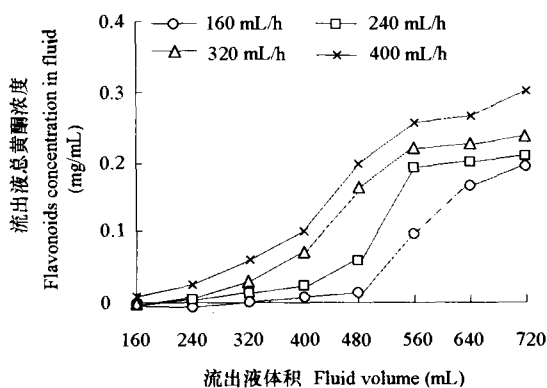


图 1 上柱液流速对 LSA-10 大孔树脂吸附性能的影响

Fig. 1 Dynamic adsorption curves of total flavonoids on LSA-10 macroporous resin column

酮解吸率的影响,依次用 320 mL 30%、50%、70%、95% 乙醇梯度洗脱,结果发现,解吸率分别为 22.7%、70.1%、5.5% 和 0.6%,30% 乙醇只能将少量黄酮洗脱下来,50% 乙醇洗脱完后,能使总黄酮的洗脱率达到 90% 以上。由此看出,香椿叶总黄酮主要集中在 30% 乙醇和 50% 乙醇洗脱部分,所以选取 50% 乙醇为解吸剂。

2.2.5 解吸剂流速对香椿叶总黄酮解吸率的影响 上柱液以 240 mL/h 的流速通过 LSA-10 大孔树脂柱(其他条件按 1.7 中所述),用 320 mL 50% 乙醇分别以 40、80、120、160 mL/h 的流速洗脱,各自解吸率分别为 91.3%、88.7%、80.6% 和 73.4%,可以看出,用相同体积的解吸剂洗脱,流速越慢,解吸率越高,但流速过慢使生产周期延长,综合考虑,选择解吸剂流速为 80 mL/h 为宜。

2.2.6 解吸剂用量对香椿叶总黄酮洗脱率的影响 按照上述确定的吸附、解吸条件,取上柱液上柱吸附,用 50% 乙醇洗脱,结果发现,当洗脱液体积达 480 mL 时,洗脱率达到 92.0%,考虑到解吸剂用量过多,会大大增加洗脱时间,延长生产周期,也会造成浪费,故以 400 mL 50% 乙醇洗脱。

按上述筛选出最佳工艺条件,进行吸附和解吸,重复上柱 4 次,得香椿叶总黄酮纯度为 75.2%。

3 小结

LSA-10 大孔树脂对香椿叶总黄酮具有良好的吸附解吸性能,其分离纯化香椿叶总黄酮的最佳条件为:上柱液总黄酮质量浓度 0.653 mg/mL, pH 4.0 ~ 5.5,上柱液流速 240 mL/h,饱和吸附量 440 ~ 480 mL,50% 乙醇洗脱,解吸剂流速 80 mL/h,用量 400 mL。经 4 次上柱吸附洗脱,纯度可达 75.2%。该工艺操作简单,处理量大,所得黄酮纯度较高,树脂可重复利用,适合工业化生产。

References

- Ding Cai-mei, Zeng Rong-hua, Qiu Tai-qiu, Feng Yue-song, Su Ru-feng. 2005. Study on the extraction of flavonoids from *Toona sinensis* leaves with ultrasonic. Chinese Traditional Patent Medicine, 27 (12): 1390 - 1392. (in Chinese)
- 丁彩梅, 曾荣华, 丘泰球, 冯岳松, 苏如锋. 2005. 香椿叶黄酮类化合物超声强化提取研究. 中成药, 27 (12): 1390 - 1392.
- Dong Cai-xia, Meng Zhi-fen, Zhang Rui. 2005. A study on the extraction of flavonoid compounds from *Toona sinensis*. Journal of Henan Institute of Science and Technology, 33 (2): 78 - 79. (in Chinese)
- 董彩霞, 孟志芬, 张蕊. 2005. 香椿中黄酮类化合物的提取研究. 河南科技学院学报, 33 (2): 78 - 79.
- Li Xiu-xin, Liu Qing-li, Zhang Yuan-min, Yang Xiu-ping. 2002. A study on the extraction methods of flavonoids in the leaves of *Toona sinensis*. Journal of Northwest Forestry University, 17 (1): 68 - 69. (in Chinese)
- 李秀信, 刘青利, 张院民, 杨秀萍. 2002. 香椿叶总黄酮提取方法研究. 西北林学院学报, 17 (1): 68 - 69.
- Meng Zhi-fen, Dong Cai-xia, Ren Duo-sheng. 2005. Study on the optimum process conditions in enzymatic extraction of total flavone from *Toona sinensis* leaves. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 22 (5): 1086 - 1089. (in Chinese)
- 孟志芬, 董彩霞, 任多胜. 2005. 酶法提取香椿叶中总黄酮的工艺研究. 光谱实验室, 22 (5): 1086 - 1089.
- Wang Dong-mei, Wei Qin, Ma Xi-han. 2002. Application of macroporus on the isolation of the constituents in pharmaceutical plants. Journal of Northwest Forestry University, 17 (1): 60 - 63. (in Chinese)
- 王冬梅, 尉芹, 马希汉. 2002. 大孔吸附树脂在药用植物有效成分分离中的应用. 西北林学院学报, 17 (1): 60 - 63.
- Xiang Da-xiong, Li Huan-de, Zhu Ye-chao, Luo Ying-jie. 2003. Studies on separation and purification of total flavones from radix puerariae by macroreticular adsorbents. Chin. Pharm. J., 38 (1): 35 - 37. (in Chinese)
- 向大雄, 李焕德, 朱叶超, 罗英杰. 2003. 大孔吸附树脂分离纯化葛根总黄酮的研究. 中国药理学杂志, 38 (1): 35 - 37.
- Zhang Li-ming, Li Chun-lian. 2006. Study on separation and purification of total flavones of *Hawthorn* leaves by macroporous adsorption resins. Chemistry and Industry of Forstry Products, 26 (1): 87 - 90. (in Chinese)
- 张黎明, 李春莲. 2006. 大孔吸附树脂分离纯化山楂叶总黄酮的研究. 林产化学与工业, 26 (1): 87 - 90.
- Zhang Zhong-ping, Niu Chao, Sun Ying. 2001. Separation and identification of flavonoids in the leaves of *Toona sinensis*. Chinese Medicine, 24 (10): 725 - 726. (in Chinese)
- 张仲平, 牛超, 孙英. 2001. 香椿叶中黄酮类成分的分离和鉴定. 中药材, 24 (10): 725 - 726.