

大孔吸附树脂纯化板栗壳总黄酮的研究

冉靛¹, 武子敬², 冉阳¹, 李素莲¹

(1. 贵阳学院化学与材料科学系, 贵州贵阳 550005; 2. 通化师范学院制药与食品科学系, 吉林通化 134002)

摘要 [目的]为板栗壳总黄酮的纯化筛选合适的工艺。[方法]采取静态和动态吸附/解吸附结合的方法,以解吸附率和黄酮含量为主要指标对板栗壳总黄酮的纯化进行研究。[结果]4种大孔吸附树脂中,AB-8最适合纯化板栗壳总黄酮,纯化工艺为:按9.1 mg黄酮/g树脂,以2 BV/h的速度上样,用45%乙醇,2 BV/h的速度洗脱,所得总黄酮含量达47.86%。[结论]大孔吸附树脂AB-8对板栗壳总黄酮具有较好的纯化效果。

关键词 板栗壳; 黄酮; 大孔吸附树脂; 纯化

中图分类号 S664.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)02-00827-03

Purification Technology of Total Flavonoids in Chestnut Shell with Macroporous Resin

RAN Liang et al (Department of Chemistry and Materials Science, Guiyang University, Guiyang, Guizhou 550005)

Abstract [Objective] To establish the optimum purification conditions of total flavonoids in chestnut shell with macroporous resin. [Method] With desorption rate and flavonoid content as main indicator, the technological conditions of purification were examined by the static adsorption and desorption experiment as well as dynamic adsorption and desorption tests. [Result] Among the four kinds of macroporous resin, AB-8 was best for the purification of total flavonoids from chestnut shell. The flavonoid content could amount to 47.86% with the way which the extract were loaded at the rate of 2 BV/h, according 9.1 mg flavonoid/g resin, and eluted at 2 BV/h. [Conclusion] The total flavonoids in chestnut shell could be well purified with AB-8.

Key words Chestnut shell; Total flavonoids; Macroporous resin; Purification

板栗为壳斗科栗属(*Fagaceae Castanea* Mill)植物的果实,广泛分布于温带及亚热带,在我国大部分地区均有栽种^[1],其果实除供食用外,还有养胃健脾、补肾强筋之功效^[2]。板栗果壳多为废弃物,研究表明,其果壳有降逆止血的功效^[3];板栗壳中含有生物碱、黄酮、萜类、皂苷等多种化合物^[4-5];而对黄酮类化合物的药理研究表明,其具有抑菌、抗病毒等广泛的生物活性^[6]。大孔吸附树脂是一种多孔性高分子聚合材料,具有吸附容量大、解吸条件温和、再生处理方便、使用周期长等优点,已广泛用于中草药化学成分的提取、分离、富集和中药复方制剂去除杂质等方面^[7-8],而有关板栗壳总黄酮纯化工艺的研究未见相关报道。笔者采用大孔吸附树脂对板栗壳中总黄酮进行纯化,以期对板栗壳总黄酮的开发提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料 板栗壳购于贵阳市农贸市场。主要试剂:芦丁,中国药品生物制品鉴定所,批号100080-200707;甲醇、乙醇、亚硝酸钠、三氯化铝、盐酸、氢氧化钠等均为国产分析纯;大孔吸附树脂AB-8、D-101、HPD450、HPD600,均购自上海摩速科学器材有限公司。主要仪器:数显恒温水浴锅,上海梅香仪器有限公司;RE52CS-1旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;SHB-III型循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;电热鼓风干燥箱,北京市永光明医疗仪器厂;恒温振荡器,常州澳华仪器有限公司;752型紫外可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;HL-I恒流泵,上海沪西分析仪器有限公司;层析柱(1.6 cm×30 cm)。

1.2 方法

1.2.1 板栗壳总黄酮提取液的制备。板栗壳阴干,粉碎,准确称取100 g,于60℃下用70%乙醇溶液回流提取3次,每次2 h,抽滤,合并滤液,再用旋转蒸发器浓缩至适量,过滤,定容待用。

1.2.2 树脂的预处理。取大孔树脂AB-8、D-101、HPD450、HPD600各100 g,分别用95%乙醇浸泡24 h,然后用乙醇洗至洗出液加水无浑浊为止,再用蒸馏水洗至无醇味产生,接着用5% HCl溶液浸泡8 h,然后用蒸馏水洗至中性,最后用2% NaOH溶液浸泡8 h,再用蒸馏水洗至中性,浸泡于蒸馏水中,备用。

1.2.3 黄酮含量的测定方法^[9]。

1.2.3.1 标准曲线的制作。精确称取干燥至恒重的芦丁对照品22.5 mg,加无水乙醇溶解摇匀定容于100 ml,得浓度为0.225 mg/ml的对照品溶液,备用。分别准确吸取0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 ml芦丁对照品溶液于10 ml比色管中,先加入0.4 ml 50 g/L的NaNO₂溶液,摇匀,静置6 min;再各加入0.4 ml 100 g/L的Al(NO₃)₃溶液,摇匀,静置5 min;再各加入4 ml 40 g/L的NaOH溶液静置5 min,最后加入去离子水定容至10 ml,摇匀,静置15 min后,以相应试剂为空白,于510 nm波长下测定吸光度值。

1.2.3.2 试液中黄酮含量的测定。准确移取板栗壳总黄酮提取液、吸附后溶液以及解吸附溶液适量,按“1.2.3.1”的方法依次加入显色溶液,于510 nm波长下测定相应吸光度值,然后用标准曲线求解。

1.2.4 树脂的筛选^[10]。选择AB-8、D-101、HPD450、HPD600 4种极性、比表面积以及孔径等参数不同的大孔吸附树脂分别进行静态吸附和解吸附试验,综合评价其吸附和解吸附性能,筛选性能较佳的树脂进行后续试验。

基金项目 贵阳学院青年基金项目(201111)。

作者简介 冉靛(1980-),女,重庆人,讲师,硕士,从事天然产物分离纯化及其活性研究,E-mail: ranliang23@yahoo.com.cn。

收稿日期 2012-11-19

精确称取上述4种树脂各1.0 g,分别加入总黄酮浓度为1.20 mg/ml的板栗壳总黄酮提取液15 ml于50 ml具塞三角烧瓶中,置于振荡器中,在室温下振荡12 h,过滤,测定滤液中黄酮含量,按式(1)、(2)计算单位吸附量和吸附率。取出上述充分吸附的4种树脂,吸干表面水分,分别加入95%乙醇15 ml,置于振荡器中,于室温下振荡12 h,过滤,测定滤液中黄酮含量,按式(3)计算解吸附率。

$$\text{单位吸附量 (mg/g)} = \frac{(C_o - C_e) \times V}{W} \quad (1)$$

$$\text{吸附率 (\%)} = \frac{C_o - C_e}{C_o} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{解吸附率 (\%)} = \frac{C_1 \cdot V_1}{(C_o - C_e) \times V} \times 100\% \quad (3)$$

式中, C_o ,起始浓度; C_e ,平衡浓度; V ,吸附液体积; W ,树脂重量; C_1 ,解吸附液浓度; V_1 ,解吸附液体积。

1.2.5 优选树脂的静态吸附和解吸附试验。

1.2.5.1 静态吸附动力学研究。准确称取“1.2.4”中优选树脂1.0 g,加入总黄酮浓度为1.20 mg/ml的板栗壳总黄酮提取液15 ml于50 ml具塞三角烧瓶中,置于振荡器中,在室温下振荡,每隔30 min,吸取少量溶液测定黄酮含量,计算单位吸附量,绘制其静态吸附动力学曲线。

1.2.5.2 静态解吸附试验。准确称取“1.2.4”中优选树脂1.0 g,分别加入总黄酮浓度为1.20 mg/ml的板栗壳总黄酮提取液15 ml于50 ml具塞三角烧瓶中,置于振荡器中,在室温下振荡12 h进行吸附,充分吸附后过滤,吸干树脂表面水分,再分别加入不同体积浓度的乙醇溶液,重新置于振荡器中,在室温下振荡12 h进行解吸附,过滤,测定滤液中黄酮的含量。

表1 4种大孔吸附树脂吸附和解吸附性能比较

型号	极性	比表面积	平均孔径	单位吸附量	吸附率	解吸附率
		m ² /g	nm	mg/g	%	%
AB-8	弱极性	480~520	13~14	14.29	76.49	68.23
D-101	非极性	500~550	9~10	17.02	91.10	25.40
HPD450	中极性	500~550	9~11	16.89	90.38	40.78
HPD600	极性	500~550	9~12	15.64	83.71	34.07

2.3 选定树脂的静态吸附和解吸附实验结果 按“1.2.5.1”进行操作,计算不同时间下的单位吸附量,绘制AB-8大孔吸附树脂的静态吸附动力学曲线。从图1可以看出,AB-8大孔吸附树脂对板栗壳提取液中黄酮类物质的静态吸附为快速平衡型,起始阶段的单位吸附量变化程度较

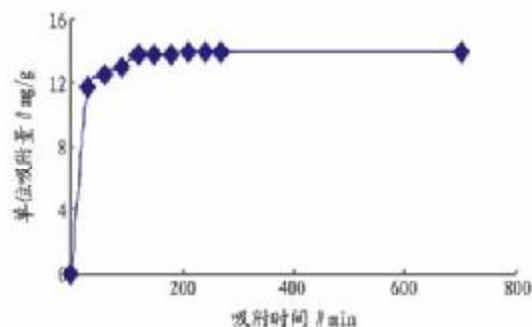


图1 总黄酮的静态吸附动力学曲线

1.2.6 优选树脂的动态吸附和解吸附试验。称取“1.2.4”中优选树脂35.0 g,湿法装柱,用总黄酮浓度为1.20 mg/ml的板栗壳总黄酮提取液以2 BV/h的速度上样,以15 ml/管分部收集,测定洗脱液中的黄酮浓度,绘制泄漏曲线。按上述方法装柱上样,然后分别用水、45%乙醇溶液、65%乙醇溶液、95%乙醇溶液进行梯度洗脱,每种洗脱液以2 BV/h的速度洗脱3 BV,分别收集洗脱液,浓缩烘干后,测定洗脱液中的总黄酮含量。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的制作 按“1.2.3”中方法,以芦丁质量含量C($\mu\text{g/ml}$)为横坐标,相应吸光度A为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为: $A = 0.0089C - 0.0013$, $r = 0.9939$,表明芦丁在11.25~56.25 $\mu\text{g/ml}$ 内线性关系良好。

2.2 树脂的筛选 按“1.2.4”中操作,并计算整理数据得表1。大孔树脂的官能团和空间结构是影响其吸附性能的主要因素,其中比表面积和平均孔径是衡量树脂空间结构的重要参数^[11],从表1可以看出,由于大孔吸附树脂主要为物理吸附,故在比表面积大的时候,树脂的吸附率均较高;而在解吸附过程中,在比表面积相差不大的情况下,平均孔径大的树脂却显示出较高的解吸附率,这可能是因为在吸附过程中通过孔径扩散到树脂孔内,但解吸附时孔径较小,在某种程度上成为制约因素;大孔吸附树脂除了能使有效成分得以吸附富集,吸附富集之后有效成分的解吸附释放,才使其真正具有应用价值,故选择大孔吸附树脂应综合考虑吸附率和解吸附率。综上所述,表1中的4种树脂,AB-8更适合分离纯化板栗壳提取液中的黄酮类物质。

大,30 min后单位吸附量变化减缓,120 min后单位吸附量基本无变化,说明此时已达到吸附平衡,此时树脂已饱和。说明上样流速对树脂的吸附行为具有一定影响,将流速放缓能实现大孔吸附树脂对目标化合物的充分吸附,但生产成本的考虑不容忽视,故应在一定范围控制流速,实现两者的平衡,在该试验的后续操作中,选择2 BV/h的速度进行上样和洗脱。

按“1.2.5.2”中操作,计算用不同体积分数浓度的乙醇溶液静态解吸附时的解吸附率。由图2可得,随着乙醇体积分数浓度的增加,静态解吸附能力逐渐增强,当乙醇浓度达到95%时,静态解吸附能力最好,这可能与大孔树脂本身极性有关^[11],这也说明在动态单次洗脱操作条件下,选择低极性的洗脱溶剂效果较好。

2.4 选定树脂的动态吸附和解吸附实验结果 按“1.2.6.1”操作,绘制泄漏曲线。由图3可知,当洗脱液体积小

大孔吸附树脂未达到饱和状态,只有少量不被树脂吸附的黄酮化合物流出;当洗脱液达到 240 ml 后,洗脱液中黄酮化合物含量随洗脱液体积增加明显,说明大孔树脂的吸附能力开始下降;取洗脱液中黄酮的浓度为上样液浓度的 1/10 为泄漏点,则在该试验条件下的上样量为 9.1 mg 黄酮/g 树脂。

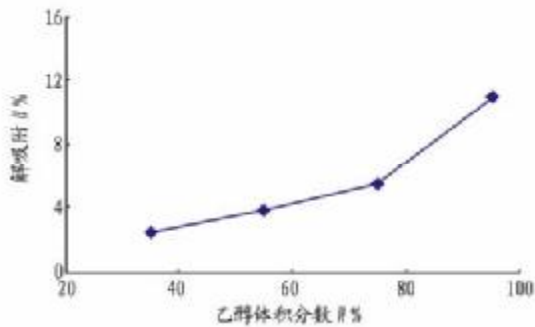


图 2 不同体积分数浓度乙醇溶液的静态解吸附效果

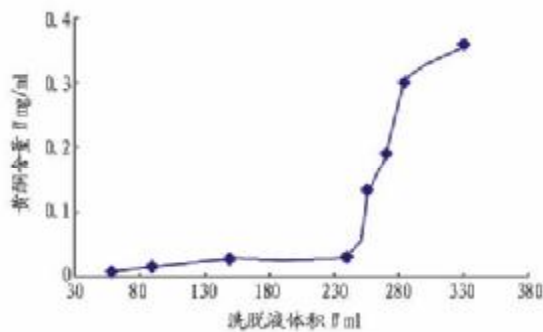


图 3 泄漏曲线

按“1.2.6.2”操作,分别测定 45% 乙醇溶液、65% 乙醇溶液、95% 乙醇溶液中黄酮的纯度,其中 45% 乙醇溶液中黄酮含量最高,达到 47.86%,与板栗壳粗提液中 24.38% 的总黄酮含量相比,有显著提高;而动态梯度洗脱与单次洗脱条件下,洗脱剂的洗脱能力具有显著不同,这可能与板栗壳提

物中黄酮化合物类型的多样性有关。梯度洗脱条件下的结果更说明板栗壳醇提物中的主要黄酮化合物的极性与 45% 左右乙醇溶液的极性相当。

3 结论

研究通过静态吸附和解吸附试验从 4 种大孔吸附树脂中筛选出 AB-8 大孔吸附树脂能较好地吸附和解吸附板栗壳中黄酮类化合物;对其吸附动力学研究表明,AB-8 大孔吸附树脂对板栗壳中黄酮化合物的吸附属快速吸附类型;静态解吸附条件下,极性较小的 95% 乙醇溶液表现出较强的解吸附能力,而按 9.1 mg 黄酮/g 树脂上样,进行柱层析纯化,梯度洗脱时,45% 乙醇溶液中黄酮含量最高,达 47.86%,比粗提液中黄酮含量有所提高,而板栗壳醇提物中黄酮化合物主要集中在 45% 乙醇洗脱液中,这为后续研究提供了重要依据。

参考文献

- [1] 郑万钧. 中国树木志·第二卷[M]. 北京:中国林业出版社,1983:2203-2207.
- [2] 中药辞海编审委员会. 中药辞海(第二卷)[M]. 北京:中国医药科技出版社,1993:2014-2015.
- [3] 中华本草编辑委员会. 中华本草(第二卷)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:419-421.
- [4] 赵德义,高文海,花成文,等. 板栗壳化学成分的初步研究[J]. 陕西林业科技, 2003(2):1-2.
- [5] 贾陆,席芳,王娜,等. 板栗壳化学成分研究[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(2):98-102.
- [6] 张鞞灵,刘国强,高锦明,等. 黄酮类化合物生物活性与结构的关系[J]. 西北林学院学报, 2001, 16(2):75-79.
- [7] 马盼香,金华,李雅玲,等. 大孔吸附树脂在天然药物有效成分提取分离的应用进展[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(6):101-102.
- [8] 王高森,侯世祥,朱浩,等. 大孔树脂吸附纯化中药复方特性研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(15):1237-1240.
- [9] 苏克曼,张济新. 仪器分析实验[M]. 2 版. 北京:高等教育出版社,2005:176.
- [10] 胡志军,沈玲玲,王南溪,等. 大孔吸附树脂分离纯化金银花中黄酮类物质的研究[J]. 离子交换与吸附, 2011, 27(3):229-237.
- [11] 郭立玮. 中药分离原理与技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:503-517.

(上接第 826 页)

3 结论

KLD2-3 型滚筒烘丝机前低后高、一段式、前高后低 3 种控制方式下,顺流模式烘后烟丝的总糖和还原糖测定值均高于逆流模式,顺流模式不同控制方式烘后烟丝总糖和还原糖差别不大,逆流模式下总糖一段式最高,前高后低控制方式最低,还原糖变化不明显。除逆流模式一段式外,其他顺流模式和逆流模式各控制方式烟碱含量比较接近,逆流模式一段式烟丝烟碱含量高于其他控制方式。顺流模式 3 种控制方式和逆流模式 3 种控制方式烘后烟丝的氯、钾、常规烟气的含量和烟气中性香味成分总量均比较接近。顺流模式前高后低控制方式烘后烟气酸性香味成分总量、烟气碱性香味成分总量高于逆流模式前高后低控制方式,一段式、前低后高控制方式也具有相同结果。

参考文献

- [1] DAVIS D L, NIELSEN M T. 烟草——生产,化学和技术[M]. 北京:化

学工业出版社,2003.

- [2] 黄嘉初. 烟草工业手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.
- [3] 全国烟草标准化技术委员会. YC/T 159-2002 烟草及烟草制品 水溶性糖的测定 连续流动法[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [4] 全国烟草标准化技术委员会. YC/T 160-2002 烟草及烟草制品 总植物碱的测定 连续流动法[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [5] 全国烟草标准化技术委员会. YC/T 173-2003 烟草及烟草制品 钾的测定 火焰光度法[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. YC/T 162-2002 烟草及烟草制品 氯的测定 连续流动法[S]. 北京:中国标准出版社,2002.
- [7] 国家烟草质量监督检验中心. GB/T 19609-2004 卷烟 用常规分析用吸烟机测定总颗粒物 and 焦油[S]. 北京:中国标准出版社,2005.
- [8] 全国烟草标准化技术委员会. YC/T 157-2001 卷烟 总颗粒物中水分的测定 气相色谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [9] 全国烟草标准化技术委员会. YC/T 156-2001 卷烟 总颗粒物中烟碱的测定 气相色谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [10] 国家烟草质量监督检验中心. YC/T 30-1996 卷烟 烟气气相中一氧化碳的测定非散射红外法[S]. 北京:中国标准出版社,1996.