

文冠果壳总黄酮分离纯化及稳定性研究

Separation, purification and stability of total flavonoids from *Xanthoceras sorbifolia* shell

毛迪锐 姜贵全 孙继伟 罗英才

MAO Di-rui JIANG Gui-quan SUN Ji-wei LUO Ying-cai

(北华大学林学院, 吉林 吉林 132013)

(Forestry College of Beihua University, Jilin, Jilin 132012, China)

摘要:以吸附率和解吸率为评价指标,对大孔树脂分离纯化文冠果壳总黄酮的工艺进行优化,并研究纯化后文冠果壳总黄酮的稳定性。结果表明,文冠果壳总黄酮的最佳分离纯化工艺为:采用 XAD-1600 树脂,上样液 pH=4,上样浓度 0.5 mg/mL,吸附时间 6 h,上样流速 2 BV/h,洗脱液流速 3 BV/h,洗脱液乙醇浓度 40%。该条件下,纯化后总黄酮的纯度为(70.15±1.03)%,回收率为(89.63±1.58)%。稳定性试验表明:文冠果壳总黄酮在低温、酸性、避光条件下性质稳定。

关键词:文冠果壳;总黄酮;纯化;稳定性

Abstract: According to the rates of adsorption and desorption, the purification process of the total flavonoids from *Xanthoceras sorbifolia* shell was optimized by macroporous resins, and then the stability of the purified total flavonoids were conducted experimental research. The results showed that the best macroporous resin was resin XAD-1600, and the optimum separation and purification conditions were sample pH=4, concentration 0.5 mg/mL, flow rate 2 BV/h, the resin adsorption equilibrium time 6 h. The total flavonoids would be eluted with 40% alcohol at the flow rate of 3 BV/h. Under the optimum conditions, the purity of total flavonoids reached to (70.15±1.03)% with the total flavonoids recovery rate of (89.63±1.58)%. The results of the stability test showed that the total flavonoids were more stable at low temperature, low pH value and in dark condition.

Keywords: *Xanthoceras sorbifolia* shell; total flavonoids; purification; stability

文冠果(*Xanthoceras sorbifolia*)又称僧灯毛道,属于无患子科文冠果属植物,主要分布于陕西、甘肃、山西、内蒙、宁夏、安徽、吉林等地的丘陵山坡^[1]。文冠果是中国特有的珍

稀木本油料植物。研究^[2]发现,文冠果的种仁、果壳、枝干等部位都含有大量活性成分,如甾类、三萜、生物碱、黄酮等。黄酮类化合物具有抗氧化、抗肿瘤、降血糖、降血脂等生理活性。目前黄酮类物质常用的分离纯化的方法有柱层析法^[3]、薄层层析法^[4]、高效液相色谱法^[5]、金属试剂络合沉淀法^[6]、膜分离法^[7]、双水相萃取法^[8]、大孔树脂吸附法^[9]等。在各种分离方法中,大孔树脂因具有理化稳定性高,选择性好,比表面积大,吸附和交换容量大、速度快^[10]等优点,因此在黄酮、多酚等天然活性物质的分离纯化中被广泛应用。

目前对文冠果壳总黄酮的研究较少,对于文冠果壳总黄酮的分离纯化及稳定性研究未见报道。本研究拟采用大孔树脂法对文冠果壳总黄酮进行分离纯化,以提高总黄酮粗提取物中的黄酮纯度,并研究纯化后文冠果壳总黄酮的稳定性,旨为其开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

文冠果:内蒙古赤峰市翁牛特旗经济林场;

芦丁对照品:中国药品生物制品检定所;

AB-8、X-5、D-101 大孔树脂:安徽三星科技有限公司;

XAD7HP、XAD-1600、HP2MGL 大孔树脂:北京慧德易科技有限责任公司;

XAD-8 和 LSA-10 大孔树脂:西安蓝晓科技新材料股份有限公司;

HB1600 大孔树脂:上海旻永实业有限公司;

其他试剂:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

电动震筛机:8411 型,湖南湘潭恒瑞检测仪器有限公司;

可见分光光度计:722N 型,上海精密科学仪器有限公司;

真空冷冻干燥机:Beta1-8 LD plus 型,德国 Christ 公司;

旋转蒸发器:RE52CS-1 型,上海亚荣生化仪器厂。

基金项目:吉林省植物化工创新团队(编号:20130521022JH)

作者简介:毛迪锐(1978—),女,北华大学讲师,硕士。

E-mail: mdrteacher@163.com

通讯作者:姜贵全

收稿日期:2015-08-19

1.2 方法

1.2.1 标准曲线的绘制 根据文献[11]的方法绘制标准曲线。以芦丁溶液质量浓度 $y(\text{mg/mL})$ 为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,得回归方程为: $A=11.675y+0.0335$, $R^2=0.9978$,表明芦丁在 $0.02\sim 0.10\text{ mg/mL}$ 范围内线性关系良好。

1.2.2 文冠果壳总黄酮上样液的制备 将文冠果壳在 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 的条件下热风干燥 10 h ,粉碎,过 60 目筛,备用。称取一定量的文冠果壳粉末,按液料比 $43:1(V:m)$ 加入体积分数为 40% 的乙醇,超声提取 2 次(超声功率 400 W ,超声时间 20 min/次),合并滤液,离心分离($6\ 000\text{ r/min}$, 10 min),将上清液采用旋转蒸发仪减压蒸发,除去乙醇,再用蒸馏水稀释至一定浓度,作为上样液备用,测定吸光度,根据标准曲线计算上样液质量浓度。

1.2.3 大孔树脂的预处理 将大孔树脂用蒸馏水洗至无浑浊,用 2 倍树脂体积的 95% 乙醇浸泡 24 h ,使其充分溶胀后,再用蒸馏水洗至无醇味,然后用 1 mol/L 的盐酸溶液浸泡 4 h 后,用蒸馏水洗至 $\text{pH}=7$;最后用 1 mol/L 的氢氧化钠溶液浸泡 4 h ,用蒸馏水洗至 $\text{pH}=7$,备用。

1.2.4 大孔树脂的筛选 分别测定 D-101,LSA-10,HB-1600,XAD-1600,X-5,XAD-8,AB-8,XAD-7HP,HP2MGL 9 种不同型号的大孔树脂对文冠果壳总黄酮的吸附率和解吸率,从而筛选树脂。

1.2.5 树脂吸附和解吸率的测定 分别称取 2.0 g 大孔树脂放入 100 mL 三角瓶中,加入 40 mL 文冠果壳总黄酮溶液,在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温摇床振荡器(100 rad/min)中,振荡吸附 24 h ,使其达到吸附饱和,抽滤,收集吸附液,测定吸光度,计算吸附率。再向吸附饱和的树脂中,加入 60% 的乙醇 40 mL ,在相同条件下,解吸 24 h ,使其达到解吸平衡,计算解吸率。每次试验均进行 3 次平行试验,试验结果取平均值。吸附量、吸附率和解吸率按式(1)~(3)计算^[12]:

$$Y_1 = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\% \quad (1)$$

$$Y_2 = \frac{(C_0 - C_1) \times V_1}{M} \quad (2)$$

$$Y_3 = \frac{C_2 \times V_2}{(C_0 - C_1) \times V_1} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

Y_1 ——吸附率, %;

Y_2 ——吸附量, mg/g ;

Y_3 ——解吸率, %;

C_0 ——吸附液初始浓度, mg/mL ;

C_1 ——吸附液平衡初始浓度, mg/mL ;

C_2 ——洗脱液浓度, mg/mL ;

V_1 ——吸附液体积, mL ;

V_2 ——洗脱液体积, mL ;

M ——大孔树脂质量, g 。

1.2.6 静态吸附的单因素试验

(1) 上样浓度对树脂吸附量的影响:分别取 $0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0\text{ mg/mL}$ 的黄酮上样液 40 mL ,放入装有 2.0 g 大孔树脂的三角瓶中,在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温摇床振荡器(100 rad/min)中振荡吸附 24 h ,抽滤,测定上清液吸光度,计算吸附量。

(2) 吸附时间对树脂吸附量的影响:取黄酮上样液 40 mL ,放入装有 2.0 g 大孔树脂的三角瓶中,置于恒温 $30\text{ }^\circ\text{C}$, 100 rad/min 的摇床振荡器吸附 $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10\text{ h}$,抽滤,测定上清液吸光度,计算树脂吸附量。

(3) 上样液 pH 对吸附量的影响:分别取 pH 为 $3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ 的黄酮上样液 40 mL ,放入装有 2.0 g 大孔树脂的三角瓶中,在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温摇床振荡器(100 rad/min)中,振荡吸附 24 h ,抽滤,测定上清液吸光度,计算吸附量。

1.2.7 动态吸附解吸试验 将预处理好的大孔树脂湿法装入层析柱($1.5\text{ cm} \times 30\text{ cm}$)中,用蒸馏水洗至平衡。

(1) 上样流速对吸附性能的影响:将文冠果壳黄酮上样液调整到最佳的上样浓度和 pH ,分别按照 $1, 2, 3, 4, 5\text{ BV/h}$ 的流速上样,计算树脂总吸附量,确定最佳上样流速。

(2) 洗脱液流速对吸附性能的影响:用蒸馏水将吸附饱和的树脂洗至无浑浊,分别按照 $1, 2, 3, 4, 5\text{ BV/h}$ 的速度洗脱,通过计算解吸率,确定最佳的洗脱流速^[13]。

(3) 乙醇浓度对解吸性能的影响:按照最佳的上流流速吸附,分别用 $20\%, 40\%, 60\%, 80\%, 95\%$ 的乙醇溶液按照最佳洗脱液流速,通过计算解吸率,确定最佳的洗脱液乙醇浓度。

1.2.8 文冠果壳总黄酮纯度和回收率的测定 将文冠果壳总黄酮的上样液和按照最优条件纯化后的溶液减压蒸发,冻干。准确称取 0.01 g 冻干粉,加蒸馏水定容至 10 mL ,测溶液吸光度,根据标准曲线计算黄酮浓度,再根据式(4)、(5)计算纯化前后的纯度和黄酮回收率。

$$P = \frac{C \times V}{M_1 \times 1\ 000} \times 100\% \quad (4)$$

$$R = \frac{M_2}{C_0 \times V_1} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

P ——总黄酮纯度, %;

C ——冻干粉的黄酮浓度, mg/mL ;

C_0 ——上样液的黄酮浓度, mg/mL ;

V ——冻干粉溶解后总体积, mL ;

V_1 ——上样液体积, mL ;

M_1 ——冻干粉质量, g ;

R ——回收率, %;

M_2 ——纯化后黄酮总质量, mg 。

1.2.9 文冠果壳总黄酮的稳定性

(1) 温度对文冠果壳总黄酮稳定性的影响:将 40 mL 浓度为 0.9 mg/mL 文冠果壳黄酮溶液分别置于 $20, 40, 60, 80, 100\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下保温放置 6 h ,每隔 1 h 测定其黄酮浓度^[14],以考察温度对文冠果壳总黄酮稳定性的影响。

(2) pH 对文冠果壳总黄酮稳定性的影响:用缓冲溶液将文冠果壳黄酮配置成 40 mL 浓度为 0.9 mg/mL 、 pH 分别为 $1, 3, 5, 7, 9, 11, 13$ 的溶液,室温条件下放置 2 h 后,测定黄酮浓度,以考察 pH 对文冠果壳总黄酮稳定性的影响。

(3) 光照对文冠果壳总黄酮稳定性的影响:将 40 mL 浓度为 0.9 mg/mL 的文冠果壳黄酮溶液分别于避光、自然光和日光灯条件下放置 6 h ,每隔 1 h 测定其黄酮浓度,以考察光照对文冠果壳总黄酮稳定性的影响。

2 结果与分析

2.1 大孔树脂的筛选结果

9 种大孔树脂对文冠果壳总黄酮的静态吸附率和解吸率见图 1。由图 1 可知,除 AB-8 外,其余树脂对文冠果壳黄酮的吸附效果均较好,XAD-1600 和 HB-1600 树脂的吸附率分别达到 96.43%,97.94%;各型号吸附饱和的树脂在相同条件下充分解吸时,XAD-1600 树脂的解吸率最大,可达到 88.81%,HB-1600 树脂的解吸率为 79.17%。综合考虑,选择 XAD-1600 作为分离纯化文冠果壳黄酮的树脂。

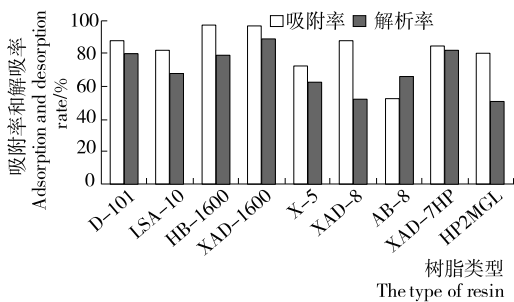


图 1 9 种大孔树脂对文冠果壳总黄酮的吸附率和解吸率
Figure 1 Adsorption and desorption rate of 9 resins for total flavonoids from *Xanthoceras Sorbifolia* shell

2.2 静态吸附试验结果

2.2.1 上样浓度对吸附量的影响 由图 2 可知,当黄酮浓度在 0.5 mg/mL 时,树脂的吸附量最大,为 37.90 mg/g,黄酮浓度大于 0.5 mg/mL 时,吸附量反而会随着浓度的增加而降低,这是因为根据吸附平衡原理,当浓度过高时,容易发生多层吸附,导致孔道堵塞,吸附量降低。因此,选择 0.5 mg/mL 作为黄酮上样液的浓度。

2.2.2 吸附时间对吸附量的影响 由图 3 可知,XAD-1600

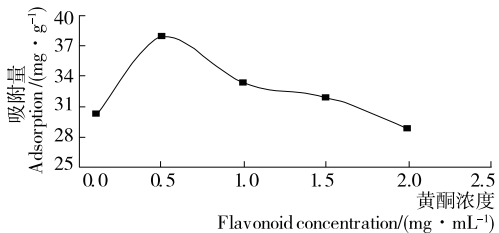


图 2 黄酮浓度对 XAD-1600 树脂吸附性能的影响
Figure 2 Effect of flavonoids concentration on adsorption capacity of XAD-1600 resin

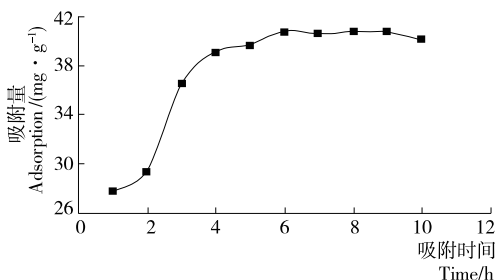


图 3 吸附时间对 XAD-1600 树脂吸附性能的影响
Figure 3 Effect of time on adsorption capacity of XAD-1600 resin

树脂吸附量随吸附时间的延长而增加。在吸附的前 6 h 内,树脂吸附量显著提高;6 h 之后,基本饱和。因此,吸附时间选择 6 h 最为适宜。

2.2.3 上样液 pH 对吸附量的影响 由图 4 可知,不同 pH 的上样液对 XAD-1600 树脂吸附量有显著影响。在酸性条件(pH=4)下,吸附量较大,随着 pH 的增加,吸附量显著下降。可能是在 pH 较大的条件下,总黄酮以盐的形式存在,而不易吸附^[11]。因此选择上样液的 pH=4 为适宜。

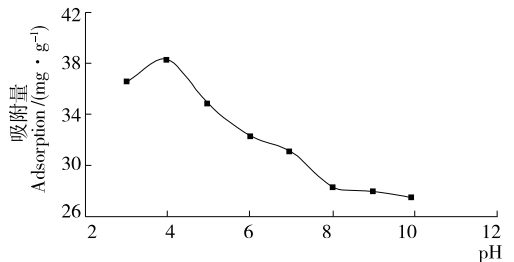


图 4 pH 对 XAD-1600 树脂性能的影响
Figure 4 Effect of pH value on adsorption capacity of XAD-1600 resin

2.3 动态吸附解吸试验结果

2.3.1 上样流速对树脂动态吸附性能的影响 由图 5 可知,随着流速的增加,吸附总量有所减少。在 1~2 BV/h 时吸附总量减少不显著,但是在 2~5 BV/h 时,吸附总量快速下降。分析原因,上样流速较慢时,有充足的时间让黄酮与树脂吸附,但上样流速过快,黄酮尚未到达树脂表面就流出。虽然 1 BV/h 的吸附总量略大于 2 BV/h,但是吸附时间过长。综合考虑,选择 2 BV/h 作为上样流速。

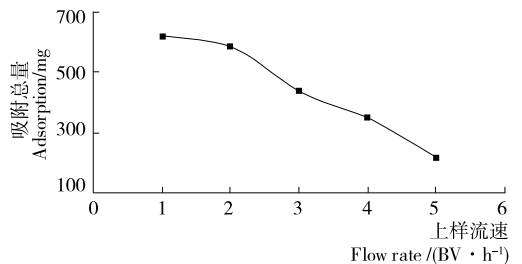


图 5 上样流速对 XAD-1600 树脂吸附性能的影响
Figure 5 Effect of flow rate on adsorption capacity of XAD-1600 resin

2.3.2 洗脱液流速对树脂脱附性能的影响 由图 6 可知,随着洗脱流速的增加,解吸率先快速增加,达到 3 BV/h 以后,解吸率趋于平衡。因此选择 3 BV/h 作为洗脱流速。

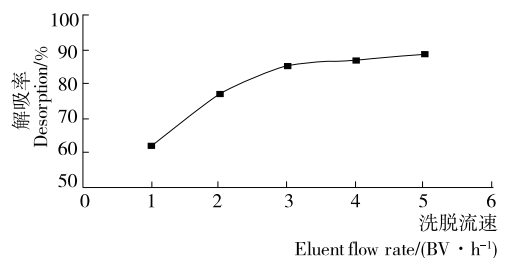


图 6 洗脱液流速对 XAD-1600 树脂脱附性能的影响
Figure 6 Effect of eluent flow rate on desorption capacity of XAD-1600 resin

2.3.3 乙醇浓度对树脂解吸性能的影响 由图7可知,当乙醇浓度达到40%时,XAD-1600树脂的解吸性能最高。这是因为文冠果壳黄酮在40%的乙醇中溶解度最大,因此解吸效果最好,可达到87.65%,乙醇浓度大于40%时,解吸率略有下降。综合考虑,选择40%的乙醇作为洗脱液。

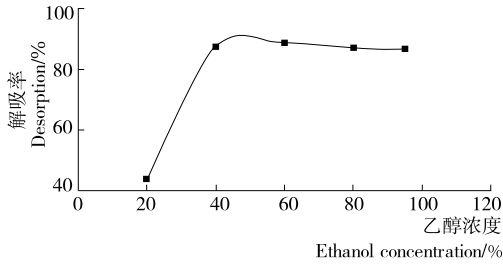


图7 乙醇浓度对XAD-1600树脂解吸性能的影响

Figure 7 Effect of ethanol concentration on desorption capacity of XAD-1600 resin

2.4 文冠果壳总黄酮的纯度和回收率

文冠果壳总黄酮提取液采用XAD-1600树脂,在上样液pH=4,上样浓度0.5 mg/mL,吸附时间6 h,上样流速2 BV/h,洗脱液流速3 BV/h,洗脱液乙醇浓度40%的条件下分离纯化,纯化前纯度为(27.96±0.88)%,纯化后的总黄酮纯度为(70.15±1.03)%,提高了2.5倍左右,总黄酮回收率为(89.63±1.58)%。

2.5 稳定性研究

2.5.1 温度对文冠果壳总黄酮稳定性的影响 由图8可知,在低温(40℃以下)时,总黄酮稳定性较好,在6 h以内,浓度变化不明显;温度高于40℃时,黄酮浓度随着时间的延长,浓度显著降低;说明总黄酮适宜在低温条件下保存。

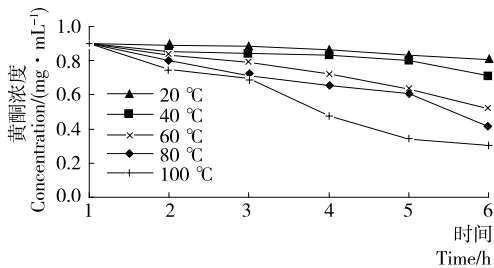


图8 温度对文冠果壳总黄酮稳定性的影响

Figure 8 Effect of temperature on the stability of total flavonoids

2.5.2 pH对文冠果壳总黄酮稳定性的影响 由图9可知,随着pH的增加,黄酮浓度先上升,当溶液呈碱性时,浓度显著降低,说明文冠果壳总黄酮在酸性条件下较为稳定,碱性溶液对黄酮稳定性影响较大。

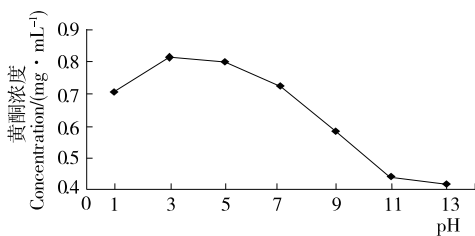


图9 pH对总黄酮稳定性的影响

Figure 9 Effect of pH on the stability of total flavonoids

2.5.3 光照对文冠果壳总黄酮稳定性的影响 由图10可知,黄酮溶液在避光条件下,浓度没有明显变化。但在自然光和日光灯的照射下,浓度有所下降。因此,文冠果壳总黄酮溶液需要避光保存。

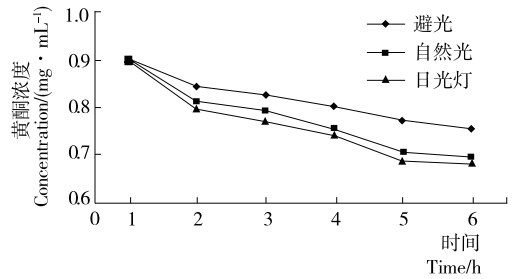


图10 光照对总黄酮稳定性的影响

Figure 10 Effect of light on the stability of total flavonoids

3 结论

本试验研究了大孔树脂法纯化文冠果壳总黄酮的工艺。结果表明其最佳工艺条件为:采用XAD-1600树脂,上样液pH=4,上样浓度0.5 mg/mL,吸附时间6 h,上样流速2 BV/h,洗脱液流速3 BV/h,洗脱液乙醇浓度40%。该工艺条件下产品纯度为70.15%。稳定性试验表明,文冠果壳总黄酮化合物在低温、避光及酸性条件下性质比较稳定。在今后的研究中,还可考虑其他因素如金属离子、氧化剂、还原剂等对文冠果壳总黄酮的影响,其抗氧化活性也有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 李连旺, 闫东佳. 我国文冠果资源及可开发利用研究[J]. 西北农业大学学报, 2005, 4(5): 102-103.
- [2] 万国盛, 王晓波, 吴立军, 等. 文冠果的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药, 2013, 44(13): 1 842-1 851.
- [3] 陈丛瑾. 柱色谱法分离纯化黄酮类化合物研究进展[J]. 西北药学杂志, 2011, 26(2): 150-153.
- [4] 李升锋, 徐玉娟, 陈智毅, 等. 微乳薄层析法分离桑叶中的黄酮类化合物[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 87-89.
- [5] Chen Ming-lei, Hu Wei, Zhang Chao, et al. High performance liquid chromatography for the determination of flavonoids[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2011(20): 313-324.
- [6] 张静, 张晓鸣, 佟建明, 等. 金属络合法纯化银杏黄酮的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(5): 751-754, 776.
- [7] 许萍萍, 梁志家, 田娟娟. 应用膜分离结合醇沉法纯化大豆异黄酮[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 78-82.
- [8] 陈丛瑾, 屈丽娟, 陈东. 双水相萃取法分离纯化黄酮类化合物的研究进展[J]. 应用化工, 2010, 39(10): 1 587-1 590.
- [9] 钟方丽, 王晓林, 王志敏, 等. 大孔吸附树脂纯化玉竹总黄酮工艺研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(1): 131-134.
- [10] 罗艳玲, 欧仕益. 大孔树脂在食品活性成分分离中的应用[J]. 食品与机械, 2005, 21(5): 81-83.
- [11] 乔孟, 屈晓清, 丁之恩. 响应面法优化超声波辅助提取湖北海棠叶中总黄酮工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(2): 143-147.
- [12] 安卓, 贾昌喜. 大孔树脂分离纯化苦苣菜黄酮的工艺研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(3): 122-126.
- [13] 邱佳妹, 周爱存. 马尾松松针总黄酮纯化工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(5): 247-250.
- [14] 宋珊珊, 谭沙, 蔡国跃, 等. 火龙果果皮色素提取工艺及稳定性研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(2): 121-125.