

芦笋中总黄酮在 D101 大孔吸附树脂上静态与动态吸附性能研究

谢稳^{1,2,3}, 雷雅婷^{1,2}, 张也², 罗堃¹, 王元清⁴, 蒋波^{1,5}, 严建业^{1,2}

(1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208;

2. 湖南中医药大学科技创新中心, 湖南 长沙 410208;

3. 湖南省永州市中医医院, 湖南 永州 425000;

4. 中南林业科技大学生命科学与技术学院生物技术与工程实验室, 湖南 长沙 410004;

5. 湖南省药品审评认证与不良反应监测中心, 湖南 长沙 410013)

摘要:目的 考察禾本科芦笋中总黄酮在 D101 大孔吸附树脂上静态与动态吸附性能, 优选总黄酮纯化工艺。方法 以静态吸附率、解吸率、静态吸附曲线为依据比较 D101、AB-8 和 HPD100 的静态吸附性能, 优选最优树脂, 然后对其动态吸附工艺进行考察。结果 静态吸附量大小关系为 AB-8 > D101 > HPD100, 采用 95% 乙醇解吸附时解吸率大小顺序为 HPD100 > AB-8 > D101。以 D101 大孔树脂进行动态吸附观察, 动态优选的结果为 5 床容积(BV)的样品(水: 样品的容积比为 1: 0.25)上样于径高比 1: 5 的 D101 大孔树脂柱, 静置 4 h, 7 BV 水洗, 60 ml 90% 乙醇洗脱, 纯度提高了 6.54 倍。结论 D101 大孔吸附树脂可以用于禾本科芦笋中总黄酮的纯化。

关键词: 芦笋; D101 大孔树脂; 总黄酮; 静态; 动态

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2020)02-0163-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2020.02.007

Study on the static and dynamic adsorption properties of total flavonoids in Asparagus on D101 macroporous resin

Xie Wen^{1,2,3}, Lei Yating^{1,2}, Zhang Ye², Luo Kun¹, Wang Yuanqing⁴, Jiang Bo^{1,5}, Yan Jianye^{1,2}

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;

2. Center of Innovative Technology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208,

Hunan, China; 3. Yongzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yongzhou 425000,

Hunan, China; 4. Biotechnology and Engineering Laboratory, College of Life Science and

Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004,

Hunan, China; 5. Hunan Center for Drug Evaluation, Certification and ADR

Monitoring, Changsha 410013, Hunan, China)

Abstract: **Objective** To investigate the static and dynamic adsorption properties of total flavonoids in Asparagus of Gramineae on D101 macroporous resins and optimize the purification process for total flavonoids.

Methods The static adsorption rate, desorption rate and static adsorption curve were determined to compare the static adsorption performance of D101, AB-8 and HPD100, and the best resin was selected optimally. Then the dynamic adsorption process was investigated. **Results** The relationship of static adsorption capacity was

基金项目:长沙市科技计划项目(kq1701070);湖南中医药大学与沅江市政府科研合作基金项目[科函(2016)6号];湖南中医药大学一层中药学学科资助(湘教通[2011]76号)

第一作者简介:谢稳(1985-),男,在读硕士研究生,主管药师,研究方向:中药制剂与质量控制研究, E-mail:414903961@qq.com

通讯作者简介:严建业(1975-),男,博士,副教授,研究方向:中药制剂与质量控制研究, E-mail:yanjianye201@126.com

AB-8>D101>HPD100, and the order of desorption rate was HPD100>AB-8>D101 by using 95% alcohol for desorption. The dynamic adsorption was investigated by using D101 macroporous resin. The result of dynamic optimization was that 5 bed volume (BV) of the sample (the volume ratio of water to sample was 1 : 0.25) was placed on D101 macroporous resin column that its ratio of diameter to height was 1 : 5. After the sample sat quietly for 4 hours, it was washed with 7 BV of water and 60 ml of 90% ethanol, then the purity was increased by 6.54 times. **Conclusion** D101 macroporous resin may be used for purifying the total flavonoids in *Asparagus of Gramineae*

Key words: *Asparagus*; D101 macroporous resin; total flavonoids; static state; dynamic state

芦笋为禾本科芦苇属(*Phragmites Adans.*)植物芦苇(*P. communis Trin.*)的嫩芽,具有丰富的营养和药用价值,被誉为“洞庭虫草”。研究表明^[1-2],芦苇植物的芦根、芦叶、芦花、芦茎、芦笋等含有丰富的化学成分,包括黄酮类、酚酸类、多糖类等,其中黄酮类成分为芦苇的主要成分。目前,芦根与芦叶等相关研究报告较多^[3-4],特别是百合科天门冬属多年生宿根性草本植物的地上茎也称之为“芦笋”,它的研究报告也比较丰富^[5],而对于禾本科芦笋的研究报告零星可见。大孔吸附树脂是一类内部具有较大间隙结构的高分子吸附树脂,大量的微观颗粒组成宏观的球状颗粒,并且在微观颗粒之间存在间隙,所以大孔树脂可以大量吸附分离有机物,并且广泛应用于食材药材的活性成分分离纯化研究^[6]。本文将研究禾本科芦笋中总黄酮在大孔吸附树脂上静态与动态吸附性能,优选芦笋总黄酮纯化工艺,为禾本科芦笋食品产品开发应用提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验试剂 芦丁标准品(宝鸡市辰光生物科技有限公司);氢氧化钠(天津市大茂化学试剂厂);亚硝酸钠(湖南汇虹试剂有限公司),硝酸铝(天津市科密欧化学试剂有限公司),盐酸(株洲石英化玻有限公司),95%乙醇(天津市富宇精细化工有限公司)均为分析纯;蒸馏水(中南林业科技大学生命科学与技术学院实验室)。

1.2 实验材料 芦笋采于湖南沅江;D101大孔树脂、AB-8大孔树脂与HPD100大孔树脂(购于东鸿化工有限公司)。

1.3 实验仪器 SHB-III循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);光照恒温(恒湿)摇床(上海天呈实验仪器制造有限公司);YRE-2000旋转蒸发仪(巩义市予华仪器有限责任公司);DK-2000-III电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);UV-5500型紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);202-OA型电热恒温干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 D101大孔吸附树脂的预处理 参照文献方法^[7],对D101大孔树脂进行95%乙醇洗、蒸馏水洗、5%盐酸洗、蒸馏水洗、2%氢氧化钠洗、蒸馏水洗等过程去掉树脂中的杂质,抽滤,置于冰箱冷藏,备用。

1.4.2 芦笋的预处理 称取晒干后的芦笋150g置于2000ml的烧瓶中,加入体积分数为80%的乙醇提取3次,加乙醇量分别为1500ml、1200ml、1200ml,水浴加热回流提取时间分别为1.5h、1.0h、1.0h,合并滤液,利用旋转蒸发仪将滤液浓缩至体积为浓度为1:0.5(约300ml)的样品溶液,存放在冰箱冷冻室,备用。

1.4.3 芦丁标准曲线的制备 精确称量芦丁标准品10.50mg置于25ml的容量瓶中,80%乙醇溶液溶解,定容后摇匀。精确吸取标准溶液0.0ml、0.2ml、0.4ml、0.6ml、0.8ml、1.0ml,均置于10ml的容量瓶中,加入0.3ml5%亚硝酸钠,摇匀后静置6min,再加入0.3ml10%硝酸铝,摇匀后静置6min,加入4ml4%氢氧化钠溶液,蒸馏水定容,摇匀后静置15min,在510nm处分别测量吸光值,绘制标准曲线。以标准品浓度(x)和吸光值(y)进行拟合回归方程,标准曲线方程为: $y = 12.524x - 0.0043$, $R^2 = 0.9987$ 。

1.4.4 样品中总黄酮的测定 取适量样品溶液,照1.4.3的方法进行显色,测定吸光值,计算样品中总黄酮的含量。

1.4.5 静态吸附性能的考察

1.4.5.1 三种大孔吸附树脂对芦笋总黄酮的静态吸附率 分别精确称量预处理之后的D101、AB-8、HPD100大孔树脂各1.00g分别置于三个容量为100ml的三角瓶中,精确加入样品溶液(浓度为1:0.5)10ml,置于25℃恒温条件下,在110r/min的摇床中振荡吸附24h,吸取上清液,测定总黄酮的含量,芦笋总黄酮在D101、AB-8、HPD100三种大孔吸附树脂上的吸附率。

1.4.5.2 三种大孔吸附树脂对芦笋总黄酮的静态解吸率 将吸附饱和的D101、AB-8、HPD100大孔树脂均用50ml蒸馏水淋洗,将25ml体积分数为95%的

乙醇溶液加入饱和树脂中,置于25℃恒温条件下,以110 r/min的摇床中振荡吸附24 h,吸取上清液,测定总黄酮的含量、芦笋总黄酮在D101、AB-8、HPD100大孔吸附树脂上的解吸率。

1.4.5.3 静态吸附动力学曲线 精确称量处理之后的D101、AB-8、HPD100大孔树脂各1.00 g,分别置于容量为100 ml的三个锥形瓶中,精确加入样品溶液20 ml,置于25℃恒温条件下,在110 r/min的摇床中振荡并计时,在0 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、24 h时取适量上清液测定总黄酮的含量,绘制芦笋总黄酮在D101、AB-8、HPD100大孔吸附树脂上的静态吸附曲线。

1.4.6 动态吸附性能的考察

1.4.6.1 动态吸附径高比的选择 精确称量等量的D101大孔吸附树脂三份,分别采用湿法装柱于3根内径不同的树脂柱中,使其径高比分别为1:3、1:4、1:5,量取3份质量浓度为1:0.25的样品溶液上样于3根树脂柱,上样量为2树脂装柱体积(BV),静置4 h。调节开关,使样品溶液以1 BV每小时的流速经过D101大孔树脂柱,用4 BV水洗,合并过柱样品液与水洗液,定容至100 ml,测定总黄酮的含量,选出最佳的径高比。

1.4.6.2 动态吸附泄露曲线的测定 精确称量一定的D101大孔吸附树脂,湿法装柱,使树脂柱的径高比为1:5,量取2 BV质量浓度为1:0.25的样品溶液上样于树脂柱中,静置4 h,调节开关,使样品溶液以1 BV/h的速度流过大孔树脂柱,每4 ml泄露液装于离心管中,测定黄酮含量,绘制泄露曲线。

1.4.6.3 动态吸附洗脱剂体积分数的确定 将装柱后的树脂柱先用5 BV蒸馏水洗,先后用体积分数10%、30%、50%、70%、90%的乙醇溶液各50 ml洗脱,将各洗脱液测定总黄酮含量,计算黄酮洗脱率。

1.4.6.4 动态吸附水洗体积的确定 精确称量一定的D101大孔吸附树脂,湿法装柱,使树脂柱的径高比为1:5,量取2 BV质量浓度为1:0.25的样品溶液上样于树脂柱中,静置4 h,调节开关,使样品溶液以1 BV/h的速度流过大孔树脂柱,反复上样3次,再用蒸馏水洗,分段收集水洗液,每段收集1 BV。实验观察每段水洗液的Molish反应,确定最佳水洗体积。

1.4.6.5 动态吸附洗脱曲线 将1.4.6.4中的树脂柱用90%乙醇洗脱至树脂柱无色,将每10 ml洗脱液装于离心管中,测定洗脱液中的总黄酮含量,绘制洗脱曲线。

1.4.6.6 芦笋总黄酮纯度的验证 浓度为1:0.25(水与样品的体积比)的样品5 BV上样于径高比1:5的D101大孔树脂柱,静置4 h,7 BV水洗,60 ml 90%

乙醇洗脱,重复3次,测定洗脱液中总黄酮的纯度。

2 结果与分析

2.1 静态吸附率和静态解吸率的测定结果 考察芦笋样品溶液中总黄酮在三种不同型号大孔树脂上的静态吸附量与解吸率,结果见图1。芦笋样品溶液中总黄酮在不同型号大孔树脂上的静态吸附量与解吸率存在差异,其静态吸附量大小关系为AB-8>D101>HPD100,采95%乙醇解吸附时解吸率大小顺序为HPD100>AB-8>D101。

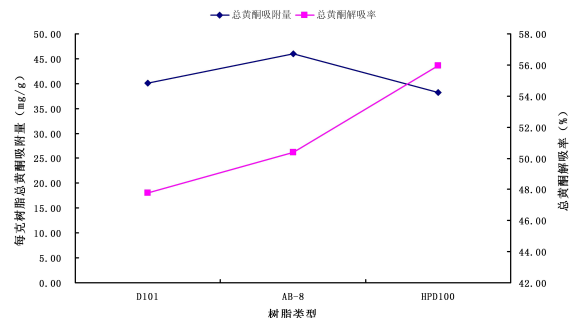


图1 三种大孔吸附树脂的总黄酮静态吸附率和解吸率

2.2 静态吸附动力曲线 D101、AB-8、HPD100三种大孔树脂吸附芦笋样品溶液24 h,其总黄酮的静态吸附动力曲线如图2。芦笋总黄酮在各大孔吸附树脂上吸附较快,吸附前期吸附速度较快,当吸附时间在4 h左右时达到静态吸附平衡。综合三种树脂对芦笋总黄酮的静态性能分析,选择D101大孔吸附树脂进行动态性能考察。

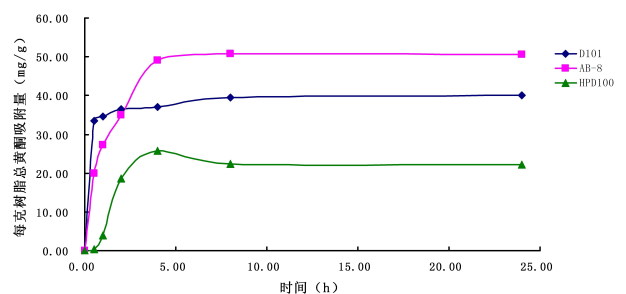


图2 大孔吸附树脂静态吸附动力曲线

2.3 动态吸附径高比考察 将样品溶液上样于不同径高比的D101大孔树脂柱中,测定每克树脂的总黄酮泄露量,结果见图3。在测试的三个比例中,径高比为1:5时,D101大孔吸附树脂的泄露量最低,说明径高比为1:5时芦笋总黄酮的吸附率最高。再综合考虑吸附率和使用树脂的利用率,选用径高比为1:5时对芦笋中总黄酮进行吸附分离。

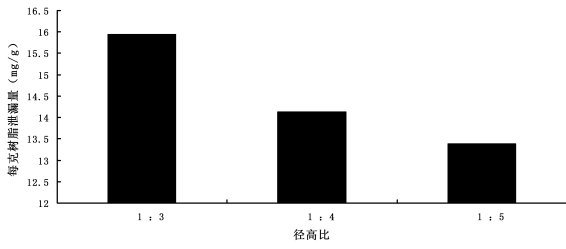


图 3 D101 大孔吸附树脂动态吸附径高比考察结果

2.4 动态吸附泄露曲线 将样品溶液上样于 D101 大孔树脂柱中,每 4 ml 一份,测定每份流出液中的总黄酮含量,泄露量与流出液的动态吸附泄露曲线见图 4,芦笋总黄酮动态泄露量-流出液体积的数学方程拟合情况见表 1。由图 4 可知,样品从第 8 份开始有不同程度的泄露;由表 1 可知,总黄酮动态泄露量-流出液的第 7~11 份数学方程模拟为: $y = 3.227x - 21.044$,线性关系较好, P 值为 $0.007 < 0.05$,表明模拟的数学方程具有统计学意义。

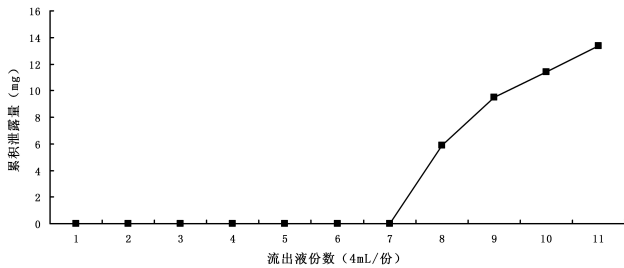


图 4 D101 大孔吸附树脂动态吸附泄露曲线

表 1 D101 大孔树脂总黄酮动态泄露量-流出液体积数学方程

成分	方程	线性范围 (流出液份数)	R^2	P
总黄酮	$y = 3.227x - 21.044$	7~11 份	0.968	0.007

2.5 动态吸附洗脱剂的体积分数 将吸附饱和的 D101 大孔树脂水洗后用不同浓度的乙醇洗脱,测定洗脱液中的总黄酮含量,结果如图 5。总黄酮在不同浓度的乙醇中都有洗脱,主要集中在 50% 乙醇洗脱液中,其洗脱量的关系大小为:50%乙醇 > 30%乙醇 > 70%乙醇 > 10%乙醇 > 90%乙醇,特别是在 90% 的乙醇溶液中有部分总黄酮,因而可以采用 90% 乙醇洗脱总黄酮,可将其洗脱完全。

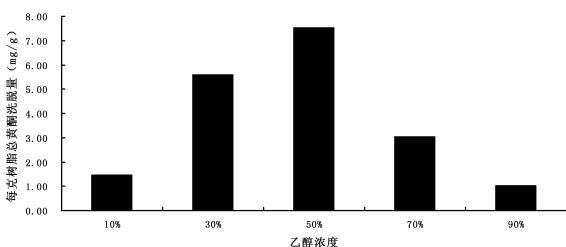


图 5 D101 大孔吸附树脂动态吸附洗脱剂的考察结果

2.6 动态吸附水洗体积的确定 将 5 BV 样品溶液上样于 D101 大孔吸附树脂,反复 3 次,用不同倍量的水洗脱, molish 反应判断终点,结果见表 2。使用 6 BV 水洗后的水洗液 molish 反应仍然为阳性,而使用 7 BV 水洗后 molish 反应为阴性,表明在上样溶液被 D101 大孔吸附树脂柱吸附之后,至少需要使用 7 BV 的蒸馏水清洗树脂柱,才能去除糖类成分。

表 2 D101 大孔吸附树脂的动态吸附水洗体积

水洗体积	1BV	2BV	3BV	4BV	5BV	6BV	7BV	8BV
molish 反应	+	+	+	+	+	+	-	-

2.7 动态吸附洗脱曲线 将水洗后的样品,用 90% 乙醇溶液洗脱,测定不同洗脱体积中的总黄酮的含量,结果见图 6。使用 90% 乙醇洗脱 D101 大孔吸附树脂中的芦笋黄酮类化合物,洗脱量先升高再降低,当洗脱溶剂达到 60 ml 时,洗脱出的总黄酮含量几乎为零,故而需要使用 60 ml 90% 乙醇进行洗脱。

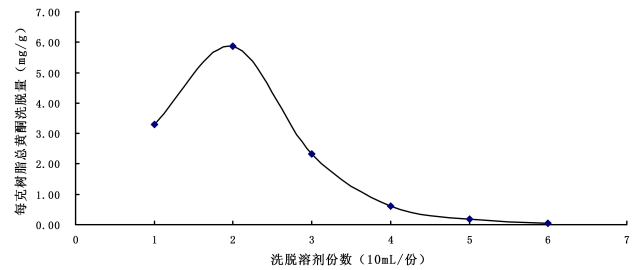


图 6 D101 大孔吸附树脂动态吸附洗脱曲线的考察结果

2.8 验证试验 按照优化的动态吸附工艺进行上样于洗脱,测定洗脱液中总黄酮的纯度,重复 3 次,结果见表 3。芦笋样品经过 D101 大孔吸附树脂纯化后,总黄酮的纯度提高了 6.54 倍。

表 3 纯化工艺验证

纯化前 纯度(%)	纯化后纯度(%)			
	1	2	3	平均
4.26	27.78	27.97	27.89	27.88

3 讨论

大孔吸附树脂具有价格低廉、吸附性好、反复利用等特点,在药材的活性成分分离纯化研究中广泛应用^[8-9]。D101 大孔吸附树脂为苯乙烯骨架结构的非极性树脂,对禾本科芦笋中总黄酮具有较好的静态吸附与解吸附性能。黄酮类化合物作为一种天然抗氧化剂,其开发应用有非常大的发展前景^[10]。本研究系统地考察了禾本科芦笋中总黄酮在 D101 大孔吸附树脂上静态与动态吸附性能,优选出了总黄酮纯化工艺。

(下转第 174 页)

- [17] Nakamachi T, Tsuchida M, Kagami N, et al. IL-6 and PACAP receptor expression and localization after global brain ischemia in mice[J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2012, 48(3): 518-525.
- [18] Fischer CD, Beatty JK, Duquette SC, et al. Direct and Indirect anti-inflammatory effects of tulathromycin in bovine macrophages; Inhibition of CXCL-8 secretion, induction of apoptosis, and promotion of efferocytosis[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(3): 1385-1393.
- [19] Lv H, Li J, Che YQ. CXCL8 gene silencing promotes neuroglial cells activation while inhibiting neuroinflammation through the PI3K/Akt/NF- κ B-signaling pathway in mice with ischemic stroke[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(5): 7341-7355.
- [20] Miao J, Wang L, Zhang X, et al. Protective Effect of Aliskiren in Experimental Ischemic Stroke: Up-Regulated p-PI3K, p-AKT, Bcl-2 Expression, Attenuated Bax Expression[J]. *Neurochemical Research*, 2016, 41(9): 2300-2310.
- [21] Salter MW, Kalia LV. SRC kinases; A hub for NMDA receptor regulation[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2004, 5(4): 317-328.
- [22] Cataldi M, Tagliatela M, Guerriero S, et al. Protein-tyrosine kinases activate while protein-tyrosine phosphatases inhibit L-type calcium channel activity in pituitary GH3 cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(16): 9441-9446.

收稿日期: 2020-03-18; 修回日期: 2020-03-30

(上接第 166 页)

禾本科芦笋中含有黄酮、酚酸、多糖等化学成分,具有良好的抗癌与抗氧化等活性^[11],而对其黄酮中的具体成分研究较少,比色法进行总黄酮含量测定时,通常以芦丁计,显色比较稳定,测定比较准确,因而在总黄酮的含量测定中以芦丁计,为总黄酮含量评价提供经典方法。

静态吸附量的比较中,本研究考察了芦笋样品溶液中总黄酮在三种不同型号大孔树脂上的静态吸附量与解吸率,静态吸附量大小关系为 AB-8 > D101 > HPD100,采用 95%乙醇解吸附时解吸率大小顺序为 HPD100 > AB-8 > D101。可见, D101 大孔吸附树脂对禾本科芦笋中总黄酮具有较好的静态吸附与解吸附性能。大孔吸附树脂的选择中,综合 3 种树脂(AB-8、D101、HPD100)对芦笋总黄酮的静态性能分析,最终选择 D101 大孔吸附树脂进行动态性能考察。动态吸附径高比考察中,在 3 个径高比(1:3、1:4、1:5)下,径高比为 1:5 时,泄漏量最低,可见径高比为 1:5 对芦笋中总黄酮吸附量较高。D101 大孔吸附树脂的纯化工艺可见,乙醇能有效溶解中草药中的黄酮成分^[12]。特别是动态洗脱时,总黄酮在不同浓度的乙醇中均有洗脱,为了提高洗脱率,选择 90%乙醇进行洗脱。进行分离纯化后,总黄酮纯度提高了 6.54 倍。

综上所述, D101 大孔吸附树脂对禾本科芦笋中总黄酮具有较好的静态与动态吸附性能,可以用于禾本科芦笋中总黄酮的纯化,与其他纯化方法相比选择性强、价格合理,为各类中药中黄酮类化合物的纯化工艺研究提供了基础。

参考文献:

- [1] 邵荣,郭海滨,许伟,等. 芦苇中活性物质研究进展[J]. *中国生化药物杂志*, 2011, 32(2): 167-168.
- [2] 余晓红,许伟,邵荣,等. 富含黄酮的芦苇提取物的抑菌性和抗氧化性研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(23): 185-188.
- [3] 孙丽芳,刘邻渭,吕俊丽,等. 芦苇叶类黄酮高效液相色谱分析[J]. *食品科学*, 2011, 32(10): 241-245.
- [4] 李娟,王智,刘塔斯,等. 芦根及其混淆品的鉴定[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(17): 3320-3325.
- [5] 姜云云,叶光明,范国荣,等. HPLC 法同时测定芦笋黄酮中 5 个黄酮苷的含量[J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(4): 623-626.
- [6] 王元清,罗堃,李顺祥,等. 淫藤骨痹康方中 7 种活性成分的大孔树脂静态吸附性能研究[J]. *中成药*, 2014, 36(7): 1424-1429.
- [7] 李瑞光,刘邻渭,郑海燕,等. 大孔树脂分离纯化芦苇叶总黄酮[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(3): 60-64.
- [8] 李俊,刘孟源,方升平,等. 大孔吸附树脂分离纯化油橄榄叶总黄酮[J]. *中成药*, 2019, 41(2): 261-265.
- [9] 李园园,李洪娟,候桂革,等. 大孔吸附树脂纯化紫菀总黄酮工艺[J]. *中成药*, 2019, 41(3): 501-505.
- [10] 孙长花,王正云,钱小丽,等. 芦笋下脚料中黄酮类物质分离纯化及鉴定[J]. *食品工业*, 2011, 32(8): 51-53.
- [11] 贺帆. 寻找在水一方的“洞庭明珠”——沅江芦笋的饕餮盛宴[J]. *中国食品*, 2015, 677(13): 30-33.
- [12] 林燕燕,罗秀针,曹林枝,等. 超声下白凤菜总黄酮的优化提取及其体外抑菌活性研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2017, 39(2): 90-93.

收稿日期: 2020-01-19; 修回日期: 2020-02-25