

大孔吸附树脂对杜仲叶中绿原酸、总黄酮的分离研究*



马希汉¹, 王冬梅², 苏印泉²

(1. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 西北农林科技大学 陕西省经济植物资源开发利用重点实验室, 陕西 杨陵 712100)

MA X H

摘要: 通过对静态吸附容量和洗脱效果的选择, 从 10 种大孔吸附树脂中确定出最适于杜仲叶中绿原酸、总黄酮分离的 XDA-5 树脂。研究了用该树脂吸附分离杜仲叶中绿原酸和总黄酮的方法, 得出以下结论: 1) 杜仲叶绿原酸和总黄酮的最佳分离工艺为: 上柱液 pH 值为 2~3, 静态吸附时间 8 h, 绿原酸最佳洗脱剂为 10%~15% 乙醇溶液, 黄酮洗脱剂为 50%~70% 乙醇溶液, 流速为每分钟流出液体积相当于吸附剂体积的 8%; 2) 10%~15% 乙醇洗脱液经真空浓缩后, 其固形物得率为 4.85%, 绿原酸含量为 36.65%; 3) 50%~70% 乙醇洗脱液经真空浓缩后, 其固形物得率为 4.98%, 总黄酮含量为 28.34%。

关键词: 杜仲叶; 绿原酸; 总黄酮; 树脂

中图分类号: TQ351.473; Q949.751.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2417(2004)03-0047-05

STUDY ON ISOLATION OF CHLOROGENIC ACID AND FLAVONOIDS IN *EUCOMMIA ULMOIDES* LEAF BY MACROPOROUS RESIN

MA Xi-han¹, WANG Dong-mei², SU Yin-quan²

(1. College of life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China; 2. Shanxi Key Laboratory of Exploration and Utilization of Economic Plants, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: A specific macroporous resin, XDA-5 was selected from 10 different resins to adsorb and isolate chlorogenic acid and flavonoids from the leaves of *Eucommia ulmoides* through investigating the factors such as the capability of static adsorption and desorption. Thereafter, a methodological study was carried out on this resin. The following results were obtained. 1) The favorable technological parameters for the isolation are pH value 2-3 of the liquid extract to be isolated, static adsorption time 8 h, eluant for chlorogenic acid 10% - 15% ethanol, for flavonoids 50% - 70% ethanol, elution rate 8% of the volume of the adsorbent per minute; 2) The eluent rich in chlorogenic acid is concentrated by vacuum distillation at a yield of solid extracts 4.85%, content of chlorogenic acid in solid extract 36.65%, yield of chlorogenic acid 1.78%; 3) The eluent rich in flavonoids is concentrated at a yield of solid extracts 4.98%, content of flavonoids 28.34%.

Key words: *Eucommia ulmoides* leaf; chlorogenic acid; flavonoids; resin

绿原酸和黄酮类化合物为杜仲叶主要有效成分, 具有显著的生理活性。作者曾用 40% 乙醇提取,

* 收稿日期: 2003-11-17

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA502B0403)

作者简介: 马希汉(1958-), 男, 陕西乾县人, 教授, 主要从事植物资源化学教学与研究工作。

铅沉法分离等手段对杜仲叶中绿原酸的提取分离进行了研究^[1-2]。但迄今为止,用大孔吸附树脂吸附、分离杜仲叶绿原酸和总黄酮的研究还未见报道。作者以同时兼顾绿原酸和总黄酮的提取分离为宗旨,以杜仲叶提取液为原料,从10多种树脂中筛选出最适于分离杜仲叶中绿原酸和总黄酮的XDA-5型大孔吸附树脂,并对其分离工艺过程进行了研究,为大规模提取、分离杜仲叶中绿原酸和黄酮类化合物提供一种新的生产工艺。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 杜仲叶采自西北农林科技大学校园内,阴干,备用。绿原酸(德国进口);芦丁(生化试剂);乙醇(分析纯);大孔吸附树脂:XDA-1、XDA-5、LSA-20、LSA-10、LSF-311、LSF-208、S-8均购于西安电力树脂厂,X-5、D4020、AB-8购于南开大学树脂厂。

1.1.2 主要仪器 754型紫外-可见分光光度计(上海第三分析仪器厂),365 nm紫外分析仪(上海科艺光学仪器厂),2FG-85A型旋转蒸发器(上海医械专机厂),层析柱。

1.2 方法

1.2.1 绿原酸与总黄酮含量的测定 绿原酸采用纸层析分离紫外-分光光度法测定^[3]。总黄酮采用纸层析分离-亚硝酸钠硝酸铝比色法测定^[4]

1.2.2 树脂的预处理^[5-6] 将市售树脂用95%乙醇浸泡24 h,充分溶胀后用蒸馏水洗至无醇,然后用5%盐酸溶液浸泡12 h,用蒸馏水洗至中性;最后用5%氢氧化钠溶液浸泡12 h,再用蒸馏水洗至中性,备用。

1.2.3 树脂的再生^[7] 用95%乙醇洗脱树脂柱至流出液无色,以大量水洗去醇,再自柱上端加入5%氢氧化钠水溶液,至下口呈强碱性,浸泡12 h,用水洗至下口流出液为中性即可使用。如果柱上方沉积有悬浮物影响流速,可用水或甲醇从柱下方进行反洗,将悬浮物顶出。

1.2.4 比吸附量和比洗脱量的测定 参照文献[8],准确称取已处理好的各类树脂,分别装入100 mL容量瓶中,精确加入过量的杜仲叶提取物样液,摇匀,放置冰箱3 d,充分吸附后,过滤,收集滤液,分别测定滤液中的绿原酸和总黄酮含量;对已过滤的树脂,用蒸馏水洗至无绿原酸和总黄酮,收集洗脱液,测定其绿原酸和总黄酮含量,按下式计算其比吸附量:

$$A = (M_{\text{样}} - M_{\text{残}} - M_{\text{水洗}}) / M$$

式中: A —比吸附量, mg/g; $M_{\text{样}}$ —吸附前杜仲叶提取液中的绿原酸/总黄酮质量, mg; $M_{\text{残}}$ —吸附后杜仲叶提取液中的绿原酸/总黄酮质量, mg; $M_{\text{水洗}}$ —吸附完毕后,最初用水洗脱下来的绿原酸/总黄酮质量, mg; M —干树脂质量, g。并按公式分别计算绿原酸和总黄酮的比吸附量和比洗脱量。

1.2.5 树脂洗脱效果的确定 准确称取已处理好的树脂,分别湿法装柱于高30 cm、内径2.3 cm的层析柱中,再分别加入相同质量的杜仲叶样液于层析柱中,使其静态吸附8 h后,分别用500 mL的水、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%和85%乙醇溶液梯度洗脱。收集各洗脱液,分别浓缩定容于50 mL容量瓶中,用微量进样器将各洗脱浓缩液等量地点于同一层析纸上,BAW系统(正丁醇、冰醋酸、水体积比为4:2)展开。在365 nm紫外分析仪下检测绿原酸,365 nm紫外分析仪结合氨熏检测黄酮,确定各树脂的洗脱效果。

2 结果与讨论

2.1 不同树脂类型对杜仲叶中绿原酸和总黄酮的吸附效果

大孔吸附树脂是近年来发展起来的一类有机高分子聚合物吸附剂,它具有物理化学性稳定、吸附选择性独特、解吸条件温和、再生简便、使用周期长等优点,可广泛应用于有效成分的分离和纯化。表1为本实验中所采用的10种树脂的物理性能及其对杜仲叶中绿原酸和总黄酮吸附效果的影响(树脂、供试液的体积比为140)。

表 1 吸附树脂的物理性能及其对杜仲叶中绿原酸和总黄酮吸附效果的影响

Table 1 Physical properties of macroporous resin and their adsorption effects on chlorogenic acid (CGA) and flavonoids

树脂类型 resin types	极性 polarity	比表面积/(m^2g^{-1}) specific surface area	平均孔径/nm average pore size	吸附容量 absorption capacity/(mgg^{-1})	
				绿原酸 CGA	总黄酮 flavonoids
LSI-208	强极性 strong			26.64	28.44
LSI-311	强极性 strong			32.82	38.75
S-8	极性 polar	100~200	28~30	59.95	63.83
XDA-5	弱极性 weak	560~700	25~30	48.43	51.68
XDA-1	弱极性 weak	800~1000	26~32	46.37	49.77
AB-8	弱极性 weak	480~520	13~14	29.06	31.00
X-5	非极性 non-polar	500~600	29~30	37.29	42.91
LSA-20	非极性 non-polar	500~540	85~90	39.12	49.91
LSA-10	非极性 non-polar	420~500	14	25.48	34.60
D4020	非极性 non-polar	540~580	10~10.5	31.33	31.83

影响大孔吸附树脂吸附、分离效果的因素很多,主要有树脂的结构、被分离的化合物的结构、上柱液浓度及 pH 值、外界环境温度等因素。一般来说,树脂的极性(功能基)和空间结构(孔径、比表面积、孔容)是影响吸附性能的重要因素。非极性化合物在水中可以被非极性树脂吸附,极性树脂则易在水中吸附极性物质。在一定条件下,化合物的体积越大,其吸附力越强^[8]。

由于杜仲叶中所含的绿原酸和黄酮类化合物均具有酚羟基结构,黄酮类化合物还具有糖苷键,故它们有一定的极性和亲水性,生成氢键的能力较强,因而易于与弱极性和极性树脂发生吸附作用。本研究所用的树脂可分为非极性、弱极性、极性和强极性 4 种类型。从表 1 可以看出,对杜仲叶中有效成分吸附量较大的树脂多为极性或弱极性树脂,如 S-8、XDA-1、XDA-5 树脂。S-8 树脂为极性树脂,它对绿原酸和黄酮类化合物的吸附能力最强,分别达到 59.95 和 63.83 mg/g。XDA-1、XDA-5 树脂为弱极性树脂,它们也对绿原酸和黄酮类化合物表现出较高的吸附性能。AB-8 树脂虽为弱极性树脂,但它对绿原酸和黄酮类化合物的吸附能力远远不及 XDA-5 和 XDA-1,比吸附量仅为 29.06 和 31.00 mg/g,为 S-8 树脂的一半。原因是在用蒸馏水除糖及水溶性色素时,水洗液中有大量的绿原酸和黄酮类化合物流失,从而使其吸附量降低。对于非极性树脂,即使有较大的孔径,其吸附容量也不大,如 LSA-20 树脂。至于强极性树脂,由于极性与绿原酸和黄酮类化合物差异较大,故吸附容量也较低。

但是在实际应用中,也不能过分强调树脂的吸附容量,吸附容量太高会使解吸过程变得困难,从而影响有效成分的回收,同样不适用于分离。例如本实验中的 S-8 树脂就属于这种情况。

当然,树脂仅具有适当的极性还不够,树脂的孔径、孔容、比表面积等因子也起着重要的作用。树脂的平均孔径小,会造成吸附速度慢、吸附容量小、解吸不够集中、分离效果差。杜仲叶中绿原酸和黄酮类化合物的分子质量较大(绿原酸、槲皮素、山柰酚的分子质量分别为: 354、302、286),因此应选择孔径大的树脂,这些化合物才能通过树脂的孔径扩散到树脂孔内表面而被吸附,比表面积才能充分发挥作用, XDA-5 树脂恰好符合这一要求。

总之,杜仲叶中的有效成分在不同树脂上具有不同的吸附效果,在所选的 10 种树脂中, S-8 树脂对绿原酸和总黄酮的吸附容量最大,其次为 XDA-5 和 XDA-1。鉴于该 3 种树脂对绿原酸和黄酮类具有较大的吸附容量,故对它们从洗脱效果方面进一步进行筛选,由于 AB-8(D101)树脂广泛应用于有效成分的提取和分离,也对该树脂作了进一步研究。

2.2 树脂洗脱效果及洗脱剂浓度的确定

据文献报道^[9],洗脱液的选择应根据树脂对指标成分的吸附能力强弱来定,一般来说,对非极性和弱极性大孔树脂,洗脱剂极性越小,洗脱能力越强;对中等极性大孔树脂和极性较大的化合物来说,则用极性较大的溶剂较为合适。常见的洗脱液类型有甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯等。考虑到生产中的可行性,本研究探讨了不同浓度的乙醇对绿原酸和总黄酮的洗脱效果。结果如表 2 所示。

可以看出, XDA-5、XDA-1 和 AB-8 型树脂吸附杜仲叶提取物后,均能用不同浓度的乙醇解吸出绿原酸和总黄酮。但 AB-8 树脂吸附容量小,且在水水洗糖类杂质时绿原酸和总黄酮流失最多。而 S-8

树脂虽然吸附容量最大,但在用不同乙醇为洗脱剂的情况下,解吸率几乎为零,故这两种树脂不可取。从表2还可以得知,绿原酸主要集中在10%~20%的乙醇洗脱液中,洗脱液的颜色近无色。而黄酮主要集中在50%~70%的乙醇洗脱液中,洗脱液的颜色也由浅变深。就XDA-5和XDA-1型树脂来说,两者仅在吸附容量上稍有差别,去劣存优,应选择XDA-5树脂。由于20%乙醇洗脱液中已有微量黄酮成分洗出、流失,不利于绿原酸后续的分和纯化,故将绿原酸洗脱剂选为10%~15%乙醇梯度洗脱,总黄酮洗脱剂选50%~70%乙醇,梯度洗脱。

表2 不同浓度乙醇对杜仲叶绿原酸和总黄酮精制效果¹⁾

Table 2 Effects of the concentration of ethanol eluant on the separation of CGA and flavonoids

乙醇质量分数/ EtOH mass parts	XDA-5		XDA-1		S-8		AB-8	
	绿原酸 CGA	总黄酮 flavonoids	绿原酸 CGA	总黄酮 flavonoids	绿原酸 CGA	总黄酮 flavonoids	绿原酸 CGA	总黄酮 flavonoids
水 water	-	-	-	-	-	-	+++	+++
10	+++	-	+++	-	-	-	++	+
20	+++	+	+++	+	-	-	+	++
30	++	+	++	+	-	-	-	++
40	+	++	+	++	-	-	-	+++
50	-	+++	-	+++	-	-	-	+++
60	-	+++	-	+++	-	-	-	+++
70	-	+++	-	+++	-	-	-	++
85	-	+++	-	+++	-	-	-	++

1) +++、++、+、- 分别表示含量多、少、微、无 The symbols“+++、++、+、-” indicate the contents more, less, little and nil, respectively

2.3 影响 XDA-5 树脂吸附杜仲叶绿原酸和总黄酮的因素研究

2.3.1 上样液浓度对吸附效果的影响 图1给出了不同浓度的杜仲叶提取液在大孔树脂上的吸附情况(以溶液中所含固形物计)。

由图1可以看出,随着样品浓度的增加,绿原酸和总黄酮在XDA-5树脂上的比吸附量也相应增加,而且浓度越大,这种差别越明显。但浓度不宜过高,以澄清为好。在本研究中,最高浓度为200 mg/mL,大于此值时,上样液呈粘稠状,在洗脱过程中会堵塞树脂柱,影响分离。根据实验结果,就树脂的总吸附量而言,一般树脂与杜仲叶的上样比例为3(折合杜仲叶),上样液总固物含量为20%。

2.3.2 上样液 pH 值对吸附效果的影响 上样液 pH 值对化合物的吸附纯化效果至关重要,根据化合物的结构特点,灵活改变溶液的 pH 值,可使提纯工作达到理想结果。根据酸性化合物能在适当酸性溶剂中充分吸附,中性化合物可在中性介质中吸附^[9]这一原则,根据绿原酸和黄酮类化合物的结构,本研究考察了 pH 值分别为1、2、3、4、5、6、7时树脂对杜仲样液的吸附效果,结果见图2。

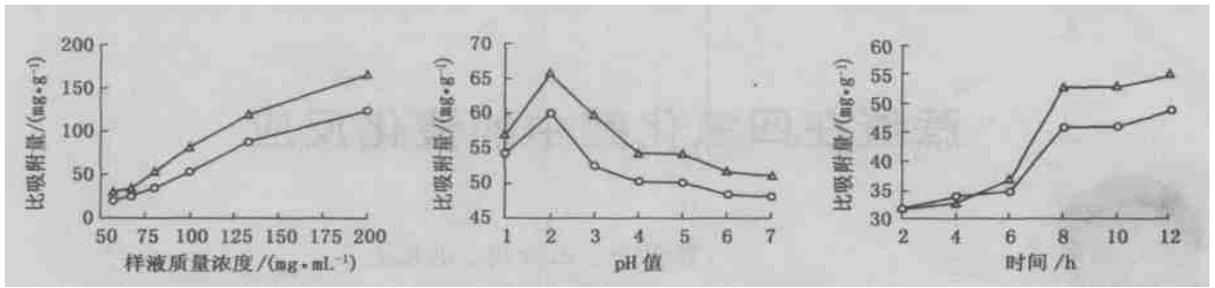
由图2可以看出,随着样液酸度的增加,树脂的吸附容量逐渐增加,当样液 pH 值为2时,树脂对绿原酸和总黄酮的吸附容量均达到最大,这是由于在酸性条件下,具有酚羟基结构的绿原酸和黄酮均以分子状态存在,可以凭借范德华力与树脂发生物理吸附作用,但是酸性也不能过大,否则吸附容量反而会下降。

2.3.3 吸附时间对吸附效果的影响 图3给出了不同停留时间的吸附效果。

由图3可知,XDA-5树脂对绿原酸和总黄酮的比吸附量随着吸附时间的增加而升高,而且在起始阶段的吸附量较小,但6 h后能迅速升高,吸附时间达8 h后,增大的趋势变小,几乎已达到平衡。说明已达到吸附终点,再延长吸附时间,已无意义。故将吸附时间选为8 h。

2.3.4 流速对洗脱效果的影响 为了考察流速对洗脱效果的影响,以绿原酸为测定指标,将每分钟流出液体积分别控制为吸附剂体积的2%、4%、6%、8%、10%和12%,收集相同体积的流出液,测定其绿原酸含量,计算比洗脱量,分别为36.71、34.70、30.86、28.55、18.42和18.27 mg/g。

以上可以看出,流速越大,单位体积洗脱液中有效成分的质量越小,洗脱效率越低,但流速过小,洗脱时间会加长,从节省洗脱溶剂和时间的角度出发,流速应控制为每分钟流出液体积相当于树脂体积的8%较好。



—○—绿原酸 CGA; —△—总黄酮 flavonoids

图 1 不同浓度上样液对吸附效果的影响

Fig. 1 Effects of sample concn. on adsorption

图 2 上样液 pH 值对吸附效果的影响

Fig. 2 Effects of sample pH value on adsorption

图 3 吸附时间对吸附效果的影响

Fig. 3 Effects of time on adsorption

2.3.5 XDA-5 树脂对杜仲叶中绿原酸和总黄酮的分离效果 根据以上筛选结果, 采用 XDA-5 树脂对杜仲叶中的绿原酸和总黄酮进行了分离, 表 3 给出了用该树脂分离过程中有效成分变化的相关数据。

表 3 XDA-5 树脂对杜仲叶中绿原酸和总黄酮的分离效果

Table 3 Separation effect of XDA-5 resin for CGA and flavonoids

项目 Items	杜仲叶 leaves of <i>E. ulmoides</i>	60% 乙醇提取物 60% ethanol extract	水转溶后的提取物 water-soluble extract	15%~20% 乙醇洗脱液 eluate by 15%~20% EtOH	50%~70% 乙醇洗脱液 eluate by 50%~70% EtOH	%
固形物得率 yield of solid matter		31.67	30.65	4.85	4.98	
绿原酸含量 content of chlorogenic acid	2.96	8.43	9.91	36.65		
总黄酮含量 content of flavonoids	1.86	5.49	6.97		28.34	

从表 3 可以看出, 树脂分离法使得杜仲叶中的有效成分得到有效的提取与纯化, 如果与其他方法结合, 可进一步分离出绿原酸纯品。

3 结论

3.1 在所研究的 10 种大孔树脂中, XDA-5 树脂具有较大的吸附容量和较强的被解吸能力, 适合于杜仲叶中有效成分的分离。

3.2 用大孔吸附树脂分离有效成分的最佳工艺参数为: 上样液 pH 值 2~3, 静态吸附时间 8 h, 洗脱液流速为每分钟流出液体积相当于吸附剂体积的 8%, 上样量为: 杜仲叶、树脂体积比 13。绿原酸最佳洗脱剂为 10%~15% 乙醇溶液, 黄酮类最佳洗脱剂为 50%~70% 乙醇溶液。

3.3 10%~15% 乙醇洗脱液经真空浓缩后, 其固形物得率为 4.85%, 绿原酸含量为 36.65%; 50%~70% 乙醇洗脱液经真空浓缩后, 其固形物得率为 4.98%, 总黄酮含量为 28.34%。

参考文献:

[1] 尉芹, 景谦平, 马希汉. 杜仲叶中绿原酸的提取工艺条件研究[J]. 林产化学与工业, 2001, 21(4): 27-32.
 [2] 马希汉, 尉芹, 景谦平. 杜仲叶提取绿原酸的中间试验[J]. 林产化学与工业, 2003, 23(3): 72-76.
 [3] 张凤云, 毛富春, 张康健, 等. 杜仲叶中绿原酸的测定方法比较[J]. 西北林学院学报, 1996, 11(2): 54-57.
 [4] 尉芹, 王冬梅, 马希汉, 等. 杜仲叶总黄酮含量测定方法研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2001, 29(5): 119-123.
 [5] 金继曙, 郁达虎, 种明才. 用大孔吸附树脂分离白芍总甙[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(1): 31.
 [6] 中国医学科学院药物研究所植化室. 大孔吸附树脂在中草药化学成分提取分离中的一些应用[J]. 中草药, 1980, 12(3): 138-141.
 [7] 麻秀萍, 蒋朝晖, 扬玉琴, 等. 大孔吸附树脂对银杏叶黄酮的吸附研究[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(9): 539-541.
 [8] 王冬梅, 尉芹, 马希汉. 大孔吸附树脂在药用植物有效成分分离中的应用[J]. 西北林学院学报, 2002, 17(1): 60-63.
 [9] 李伯廷, 王湘, 李小进. 大孔吸附树脂在天然产物分离中的应用[J]. 中草药, 1990, 21(8): 42-44.