

大孔树脂富集纯化胡芦巴种子总黄酮*

杨仁明^{1,2}, 何彦峰^{1,2}, 索有瑞¹, 王洪伦¹

1(中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001) 2(中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 通过比较 11 种大孔吸附树脂对胡芦巴黄酮类化合物的静态吸附与解吸性能, 筛选出 DM130 型大孔吸附树脂用于分离纯化胡芦巴种子中的黄酮类化合物。采用单因素方法分析该树脂富集纯化胡芦巴总黄酮的适宜工艺条件, 确定优化的工艺条件为: 上样量为 3.64 mg 黄酮/g 树脂, 上样液 pH 值 5.0, 吸附时间 2 h, 体积分数 70% 乙醇洗脱, 洗脱速率 2 mL/min, 洗脱体积为 150 mL, 总黄酮回收率为 85.05%, 提取物中黄酮含量由 7.8% 提高到 26.5%。

关键词 胡芦巴, 大孔吸附树脂, 总黄酮, 富集纯化

胡芦巴(*Trigonella foenum-graecum* L.) 是豆科蝶形花亚科胡芦巴属的一种一年生草本植物, 其干燥成熟种子作为常用中药被收入《中华人民共和国药典》^[1]。研究表明胡芦巴含有多种生理活性物质, 如黄酮^[2-3]、皂苷^[4]、生物碱^[5]、香豆素和多糖^[6]等。其中, 黄酮作为一大类活性物质, 具有降血糖^[7]和抗氧化^[8]等作用。大孔吸附树脂法作为一种简单快速的富集分离纯化方法被广泛用于黄酮分离前的样品处理^[9]和黄酮的分离纯化^[10-12], 对胡芦巴种子中黄酮含量的测定^[13]和分离^[2-3]已有报道。本文以静态吸附与解吸性能为指标从 11 种大孔吸附树脂中筛选出适于富集纯化胡芦巴种子黄酮的树脂, 考察了上样量、pH 值、乙醇浓度、洗脱流速和洗脱体积对吸附和洗脱效果的影响, 并最终确定了优化后的工艺。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料与试剂

胡芦巴种子, 采自青海大通, 晾干后 45℃ 下低温烘 3h, 经粉碎机粉碎后过 40 目筛, 备用。

大孔吸附树脂: D140(中蓝晨光化工研究院), DM301(天津市海光化工有限公司), AB-8(南开大学化工厂), HPD100、HPD 300、HPD 400、HPD 500、HPD 600、D101、DM130、ADS-17, 均购自沧州宝恩吸附材料科技有限公司。

第一作者: 硕士研究生(王洪伦研究员为通讯作者, E-mail: hl-wang@nwipb.cas.cn)。

* 中国科学院生命科学领域优秀青年科技专项(KSCX2-EW-Q-23)

收稿日期: 2011-11-03 改回日期: 2011-12-15

芦丁(上海融禾医药科技发展有限公司); 其他试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器

721 型可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司), EYELA N-1100 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司), ALC-110.4 型电子天平(德国 Acculab 公司), DZF-6030A 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司), DJ1C-40W 增力电动搅拌器(金坛市大地自动化仪器厂), HL-2D 定时数显恒流泵(上海精科实业有限公司), “弘祥隆”CTXNW-100B 超声循环提取机(北京弘祥隆生物技术开发有限公司)。

1.2 黄酮含量的测定

黄酮的含量测定参考文献[14]并略作修改, 在 510 nm 处测定其吸光度值, 以芦丁浓度(c , mg/mL)为横坐标, 吸光度(A)值为纵坐标, 用最小二乘法计算得标准回归方程为 $A = 10.506 C + 0.004 2$, $r = 0.999 4$ 。

1.3 胡芦巴种子粗黄酮的制备

将 100L 体积分数 70% 乙醇加入到超声提取仪, 再加入 14.5kg 干燥粉碎后的胡芦巴种子, 混匀后, 在功率 800W、温度 40℃ 的条件下提取 4 h, 提取液经 2 层纱布过滤, 滤液在 50℃ 下真空旋蒸浓缩得到浸膏, 浸膏于 50℃ 下真空干燥。取 250 g 干燥浸膏, 70% 乙醇溶解后, 体积分数 95% 乙醇醇沉蛋白和多糖, 重复醇沉 3 次后得干燥黄酮粗提物, 黄酮粗提物用石油醚脱脂于 50℃ 下真空干燥, 备用。

1.4 大孔树脂的筛选

1.4.1 大孔树脂预处理

取 11 种大孔树脂各 200 g, 加入 1.5 L 95% 乙醇浸泡 24 h, 待树脂充分溶胀后, 用 95% 乙醇多次洗涤

后至洗涤液加等量水后不浑浊为止,用纯水洗至无醇味,再用 1 L 5% HCl 浸泡 4 h,用纯水洗至中性,最后用 1 L 2% NaOH 浸泡 4 h 后用水洗至中性后用纯水浸泡后备用。

1.4.2 供试液黄酮含量测定

取处理好的干燥胡芦巴种子黄酮粗提物 5.000 g 溶于 100 mL 水溶液中,取 5 mL 溶液于 10 mL 容量瓶,利用 1.2 方法测定黄酮浓度,即总黄酮浓度 C_1 。

1.4.3 不同大孔树脂对胡芦巴黄酮静态吸附的影响

取 2 g 上述各种大孔树脂,分别置于 50 mL 烧杯中,加入 20 mL 供试液,电动搅拌 6 h,滤出上清液,用 60% 乙醇定容到 25 mL,测黄酮浓度 c_2 ,然后将过滤后的树脂转移到 50 mL 烧杯中,加入 70% 乙醇 20 mL,电动搅拌 6 h 后,过滤定容到 25 mL,测黄酮浓度 c_3 。

$$\text{吸附率}/\% = \frac{(c_1 \times 20 - c_2 \times 25)}{c_1 \times 20} \times 100$$

$$\text{解析率}/\% = \frac{c_3 \times 25}{(c_1 \times 20 - c_2 \times 25)} \times 100$$

$$\text{回收率}/\% = \frac{c_3 \times 25}{c_1 \times 20} \times 100$$

c_1 : 粗提物黄酮浓度 (mg/mL); c_2 : 剩余黄酮浓度 (mg/mL); c_3 : 洗脱液中黄酮浓度 (mg/mL)

1.5 DM130 大孔树脂分离纯化胡芦巴总黄酮工艺

1.5.1 上样量对胡芦巴黄酮吸附性能的影响

采用柱长 30 cm 柱内直径 1.0 cm 的层析柱,装入 2 g DM130 大孔树脂后,分别量取 8、12、16、20、24、28 mL 质量浓度为 7.5 mg/mL 的总黄酮溶液上柱,吸附 2 h 后,用 10 mL 的蒸馏水洗脱,再用 20 mL 70% 乙醇洗脱,以 2.0 mL/min 的洗脱流速进行洗脱,收集洗脱液,定容到 25 mL,测总黄酮含量和回收率。

1.5.2 样品 pH 值对胡芦巴黄酮回收率的影响

取抽滤好的 DM130 大孔树脂 2 g 装柱,各取母液 16 mL,用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液分别调黄酮母液 pH 为值 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0,上柱吸附完全后,用 10 mL 的蒸馏水洗柱,再用 20 mL 70% 乙醇以 2.0 mL/min 的洗脱流速进行洗脱,收集洗脱液,定容到 25 mL,测定总黄酮含量并计算回收率。

1.5.3 水洗体积对胡芦巴总黄酮回收率和纯度的影响

取抽滤好的树脂 2 g 湿法装柱,各取 pH 为 5.0 的母液 16 mL 上样,吸附完全后,分别用 5、10、15、20、25 mL 蒸馏水洗脱,再用 20 mL 70% 乙醇以 2.0

mL/min 的洗脱流速进行洗脱,定容到 25 mL,测定总黄酮含量。将各洗脱液减压蒸发,浓缩干燥后称质量,计算总黄酮纯度。

$$\text{总黄酮纯度}/\% = \frac{\text{洗脱液中总黄酮含量}}{\text{烘干固体质量}} \times 100$$

1.5.4 乙醇体积分数对胡芦巴总黄酮回收率的影响

各取总黄酮液 16 mL,在 pH 5.0 条件下,上柱吸附完全,用 15 mL 蒸馏水洗柱后,再分别用体积分数 10%、30%、50%、70%、90% 的乙醇洗脱,以 2.0 mL/min 的洗脱流速进行洗脱,每种醇洗脱液收集 20 mL,收集洗脱液,定容到 25 mL,测定总黄酮含量和计算回收率。

1.5.5 洗脱流速对胡芦巴总黄酮回收率的影响

取 5 份质量浓度 7.5 mg/mL 黄酮粗提液各 16 mL (pH 5.0),分别加入 5 根装有 2 g DM130 大孔树脂的层析柱,以 1.0 mL/min 的流速通过后,各用 20 mL 的 75% 乙醇以 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL/min 进行洗脱,收集各自流出液,定容到 25 mL,测定其中黄酮含量,计算黄酮回收率。

1.5.6 洗脱体积的确定及洗脱曲线的绘制

取 20 g 抽滤干 DM130 大孔树脂,按照确定的条件取 160 mL 浓度为 7.5 mg/mL 吸附平衡后,用 150 mL 纯水冲洗柱子。然后用 250 mL 70% 乙醇洗脱树脂,分部收集洗脱液,每管 10 mL,并测定各管洗脱液中的总黄酮含量,以洗脱液体积为横坐标,洗脱液中总黄酮质量浓度 (mg/mL) 为纵坐标,绘制洗脱曲线。

2 结果与讨论

2.1 不同大孔树脂对胡芦巴总黄酮静态吸附性能比较

本实验共选择非极性、弱极性、中极性和极性树脂 11 种对胡芦巴种子黄酮进行富集,所得的结果如表 1 所示。

从表 1 中可以看出,11 种树脂中吸附率差距不大,都接近或者大于 90%;对解吸率和回收率而言,HPD100、HPD300、HPD400、HPD500、HPD600、AB-8 和 ADS-17 的解吸率和黄酮回收率很低,D101、DM301、DM130 和 D140 三种树脂的解吸率和回收率相对较高,均大于 70%,结合吸附率、吸附量及树脂的孔径和破碎度,最终发现 DM130 具有更好的静态吸附动力学特性,较适宜于胡芦巴种子黄酮的分离。

表1 不同大孔树脂对胡芦巴总黄酮静态吸附性能比较

树脂类型	极性	吸附率/%	吸附量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	解吸率/%	回收率/%
HPD100	非极性	94.19	3.33	64.80	61.05
HPD300	非极性	93.77	3.31	64.32	60.48
HPD400	中极性	93.77	3.31	69.23	65.19
HPD500	极性	94.05	3.33	69.99	65.82
HPD600	极性	95.03	3.36	62.09	58.99
AB-8	弱极性	94.18	3.33	68.79	64.79
D101	非极性	94.40	3.34	76.21	71.94
ADS-17	非极性	87.18	3.09	65.95	57.49
DM130	中极性	92.91	3.29	80.80	75.99
DM301	中极性	85.70	3.03	89.10	76.51
D140	非极性	88.90	3.15	95.60	85.01

2.2 DM130 大孔树脂对黄酮富集纯化条件的优化

2.2.1 上样量的影响

由表2可知,随着上样总黄酮量的增加,洗脱液中总黄酮量随之增加,但总黄酮回收率却逐渐降低,这是由于上样量过大使树脂吸附不完全,洗脱液和水洗液造成总黄酮流失,总黄酮回收率明显降低。当上柱量过少时,虽总黄酮回收率较高但处理的黄酮粗液体太少,纯化效率太低。因此,选择上柱量为16.0 mL即3.64 mg/g树脂时,能得到一个好的纯化效率,总黄酮回收率也可达80%以上。

表2 上样量对DM130大孔树脂纯化胡芦巴种子黄酮的影响

上样总黄酮量/mg	3.64	5.46	7.28	9.1	10.92
上样体积/mL	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0
洗脱液总黄酮量/mg	3.15	4.68	6.18	7.03	8.40
回收率/%	86.64	85.63	84.87	77.25	76.91

2.2.2 上样液pH值的影响

上样液的pH值对树脂吸附有一定的影响,不同pH值的上样液其澄清度差异较大,实验中发现当pH值>7后上样液颜色加深变红并出现沉淀。由图1可知,在pH5左右,大孔树脂对粗提液有较大的回收率,随着pH值的增大回收率逐渐降低。因此,要达到较好的吸附效果和回收率,宜在弱酸性条件(pH5.0)下进行吸附。

2.2.3 水洗体积对胡芦巴种子黄酮回收率和纯度的影响

由表3可以看出,随着水洗体积的增加,水洗液中黄酮量增大,黄酮损失加剧,导致总黄酮回收率下降,但用水量增大多糖洗脱得越彻底,纯度也就随着升高。结合胡芦巴总黄酮回收率和纯度,为了减少洗脱用水,缩短洗脱时间,最终确定以3倍柱体积的水洗

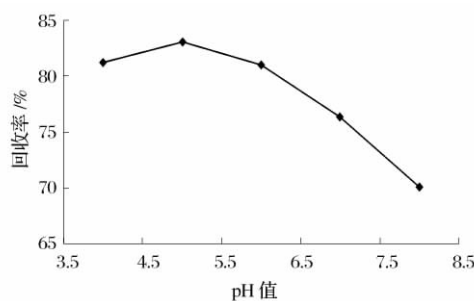


图1 pH值对胡芦巴黄酮回收率的影响

脱,效果较好。

表3 水洗体积对胡芦巴总黄酮和纯度的影响

水洗体积/mL	回收率/%	纯度/%
5	83.21	16.81
10	81.05	19.36
15	79.54	22.54
20	76.37	24.07
25	74.09	26.29

2.2.4 乙醇浓度的影响

从图2可看出,随着乙醇浓度的增大,胡芦巴总黄酮的回收率增加,当乙醇体积分数为70%时,总黄酮回收率最大,说明总黄酮已经基本上被解吸下来,再增大乙醇浓度黄酮回收率反而减少,这是因为胡芦巴中的黄酮类化合物具有多羟基结构和糖苷键,与体积分数约70%的乙醇极性相当,易被70%乙醇从树脂中洗脱出来。当乙醇体积分数太大时,将杂质也一起洗脱出来。因此洗脱剂乙醇的浓度为70%最好。

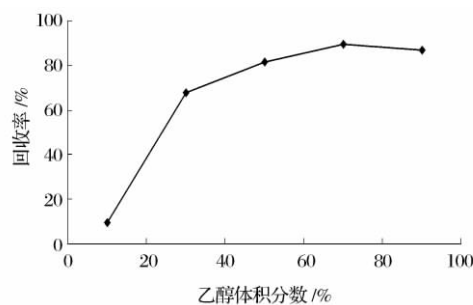


图2 乙醇体积分数对回收率的影响

2.2.5 洗脱流速的影响

由图3可以看出,当洗脱速率1.0 mL/min时洗脱效果好,随后随着乙醇的洗脱速率增大回收率降低,这是因为在洗脱体积一样的情况下,洗脱速率太大,洗脱剂还未充分洗脱树脂上吸附的黄酮就已经流出柱外,因此洗脱流速应比较小,但流速过低将导致整个洗脱过程时间变长,生产周期延长。综合考虑解吸率及时间后确定洗脱速度为2.0 mL/min。

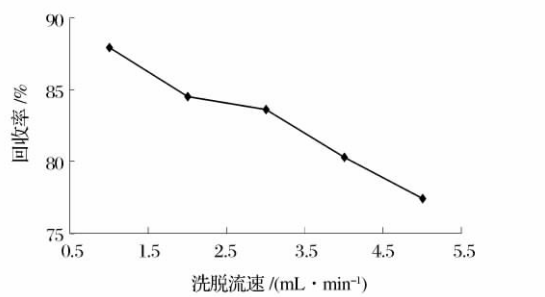


图3 洗脱流速对总黄酮回收率的影响

2.2.6 洗脱体积的确定及洗脱曲线

由图4可以看出,开始洗脱时,洗脱液中黄酮含量随洗脱体积的增加而提高,当洗脱到第8管即洗脱体积达到80 mL左右时,洗脱液中总黄酮含量达到最大值,之后虽然洗脱体积继续增加但总黄酮质量浓度下降,150 mL时洗脱液总黄酮含量很少,说明150 mL的70%乙醇就可将大部分吸附在树脂上总黄酮洗脱下来。因此,用150 mL 70%乙醇洗脱效果很好。

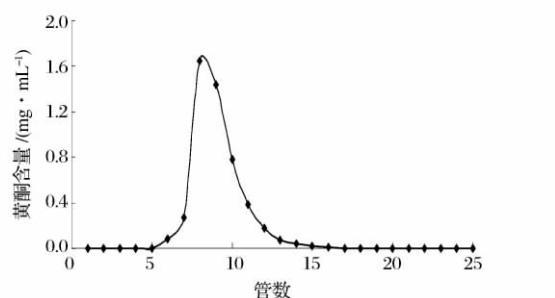


图4 大孔树脂洗脱胡芦巴总黄酮曲线

2.3 DM130 大孔树脂对胡芦巴种子总黄酮的纯化效果

按照最佳上柱和洗脱条件对粗提物进行纯化验证试验,粗提物中总黄酮的纯度为7.8%,经纯化之后总黄酮纯度最大可达26.5%,回收率为85.05%。

3 结论

从11种树脂中筛选出对胡芦巴总黄酮吸附和解吸性能最好的DM130型树脂,同时采用DM130型树脂柱层析纯化胡芦巴总黄酮最佳条件为:上样量为3.64 mg总黄酮/g树脂,上样液pH值5.0,吸附时间2h,体积分数70%乙醇洗脱,洗脱速率2 mL/min,洗脱体积为150 mL,总黄酮回收率为85.05%,黄酮纯度由7.8%提高到26.5%。

参 考 文 献

[1] 国家药典委员会. 中国药典第一部[M]. 北京: 中国医

药科技出版社, 2010: 225 - 226.

- [2] Saleh R, Torgils F, Øyvind M A. Flavone C-glycosides from seeds of fenugreek, *Trigonella foenum-graecum* L[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 7 211 - 7 217.
- [3] Wang G R, Tang W Z, Yao Q Q, et al. New flavonoids with 2BS cell proliferation promoting effect from the seeds of *Trigonella foenum-graecum* L [J]. Journal of Natural Medicines, 2010, 64: 358 - 361.
- [4] Saxena V K, Shalem A. Yamogenin 3-O-β-D-glucopyranosyl(1→4)-O-α-D-xylopyranoside from the seeds of *Trigonella foenum-graecum* [J]. Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Chemical Sciences, 2004, 116(2): 79 - 82.
- [5] Gopu C L, Gilda S S, Paradkar A R, et al. Development and validation of a densitometric TLC method for analysis of trigonelline and 4-Hydroxyisoleucine in fenugreek seeds [J]. Acta Chromatographica, 2008, 20(4): 709 - 719.
- [6] Brummer Y, Cuib W, Wang Q. Extraction, purification and physicochemical characterization of fenugreek gum [J]. Food Hydrocolloid, 2003, 17: 229 - 236.
- [7] 单俊杰, 任晋玮, 武春密, 等. 胡芦巴黄酮苷及其降血糖活性的研究[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(19): 1 457 - 1 460.
- [8] Priyanjali D, Saroj G, Hari M. Antioxidant properties of germinated fenugreek seeds [J]. Phytotherapy Research, 2005, 19: 977 - 983.
- [9] Kuang H X, Yang B Y, Xia Y G, et al. Chemical constituents from the flower of *Datura metel* L. Archives of Pharmacological Research, 2008, 31(9): 1 094 - 1 097.
- [10] 徐清萍, 何培新, 朱广存. 大孔树脂分离怀菊花黄酮的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(4): 103 - 106.
- [11] Zhang Y, Jiao J J, Liu C M, et al. Isolation and purification of four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography [J]. Food Chemistry, 2008, 107: 1 326 - 1 336.
- [12] Fu Y J, Zu Y G, Liu W, et al. Preparative separation of vitexin and isovitexin from pigeonpea extracts with macroporous resins [J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1139(2): 206 - 213.
- [13] 鲁鑫焱, 张超, 赵怀清, 等. 不同产地胡芦巴中总黄酮和槲皮素的含量测定[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(6): 430 - 433.
- [14] Kong K W, Abdul R I, Tan S T, et al. Response surface optimisation for the extraction of phenolics and flavonoids from a pink guava puree industrial by-product [J]. Inter-

Purification of Flavonoids from *Trigonella foenum-graecum* L. Seeds by Macroporous Adsorption Resin

Yang Ren-ming^{1,2}, He Yan-feng^{1,2}, Suo You-rui¹, Wang Hong-lun¹

1(Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

2(Graduate university of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

ABSTRACT Eleven types of macroporous resins were applied to study static adsorption and desorption performances towards *Trigonella foenum-graecum* L. seeds flavonoids, and DM130 was the selected for the separation and purification of the crude flavonoids from *Trigonella foenum-graecum* L. prepared with ultrasonic-assisted extraction. Single factor experiments showed that the optimum purification procedure of total flavonoids from *Trigonella foenum-graecum* L. were determined as follows: sample loading amount 3.64 mg total flavonoids /g macroporous adsorption resin at pH 5.0, adsorption duration 2 h, flow rate 2.0 mL/min, 70% ethanol, desorption volume 3BV. Under the above optimized purification process, the recovery of flavonoids was 85.05% and the purity increased from 7.8% to 26.5%.

Key words *Trigonella foenum-graecum* L., macroporous adsorption resin, total flavonoids, enrichment and purification

欧美统一有机食品贸易认证体系

欧盟官方网站消息及《欧洲之声》报道 欧盟与美国于2012年2月15日签署新的协议,统一双方的有机食品认证体系,进一步消除繁文缛节。该协议将于2012年6月1日开始实施,此后,经其中任何一方认证的有机食品,均可在双方市场上销售。

欧盟与美国是世界最大的有机食品生产和消费市场,约占全球有机食品市场总份额的90%,这一行业每年的总产值超过500亿美元。

在此之前,美国有机食品标准允许有机苹果、梨的果园使用抗生素,而欧盟标准只允许用于受感染的牲畜,因此,大西洋两岸有机食品的生产者(农业种植者和食品企业)不得不分别遵守欧美各自的标准,必须等待获得两方面的认证,承担双重的文件、检验程序和费用。

根据新签署的协议,双方均禁止使用抗生素。欧委会农业委员认为,该协议改善了双方有机食品市场标准的透明度,增强了消费者的信心,也有助于提高对欧盟有机食品的认识。这一协议将帮助农民开拓新的市场和降低成本。(来源:中国国门时报)

卫生部办公厅对拟批准新资源食品公开征求意见

根据《食品安全法》和《新资源食品管理办法》的规定,经新资源食品评审专家委员会审核,拟批准小麦低聚肽粉为新资源食品;拟将肠膜明串珠菌肠膜亚种(*Leuconostoc. mesenteroidessub sp. mesenteroides*)列入卫生部于2010年4月印发的《可用于食品的菌种名单》(卫办监督发(2010)65号);拟公布平卧菊三七[Gynura Procumbens (Lour.) Merr]、大麦苗(Barley Leaves)、抗性糊精(Resistant Dextrin)为普通食品。现公开征求意见,截止时间为2012年3月15日,请将意见反馈至卫生部卫生监督中心。传真:010-84088654 邮箱:zhangxx3961@yahoo.com.cn (来源:卫生部)