

D-101 大孔树脂分离纯化葛根异黄酮的工艺探讨

张玉超^a, 李娜^a, 乔东东^a, 尤新军^a, 王俊儒^b

(西北农林科技大学 a. 生命科学院, b. 理学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 【目的】探索 D-101 大孔树脂分离纯化葛根异黄酮的最优工艺。【方法】采用紫外分光光度法测定异黄酮质量浓度,以异黄酮损失率、洗脱率、收率、纯度等为指标,评价 D-101 大孔树脂分离纯化葛根异黄酮工艺中,上样液用量、上样液质量浓度、吸附流速、洗脱剂蒸馏水用量、洗脱剂乙醇体积分数及其用量对吸附和解吸效果的影响,从而确定最优工艺。【结果】D-101 大孔树脂对葛根异黄酮有较好的分离效果,其最优工艺条件为:葛根异黄酮饱和吸附量为 3.3 倍树脂体积,上样液质量浓度 7.20 mg/mL,吸附流速为 2 mL/min,洗脱剂蒸馏水和体积分数 30%乙醇的用量均为 4 倍树脂体积。利用该工艺精制后葛根异黄酮纯度、收率分别达 80.74% 和 63.62%。【结论】采用 D-101 大孔树脂分离纯化葛根异黄酮简单可行,精制效果好,适于工业化生产。

【关键词】 葛根;异黄酮;分离纯化;大孔树脂

【中图分类号】 R284.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)11-0161-07

Discussion on technique for separation and purification of *Radix Puerarise* isoflavonoids by D-101 macroporous resin

ZHANG Yu-chao^a, LI Na^a, QIAO Dong-dong^a, YOU Xin-jun^a, WANG Jun-ru^b

(a. College of Life Sciences, b. College of Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study was to investigate the optimal technological parameters of the separation and purification process of *Radix Puerarise* isoflavonoids by D-101 macroporous resin. 【Method】 UV spectrophotometry was used to determine the content of isoflavonoids, and the effect of the work solution volume, the work solution concentration, the absorption velocity, the volume of distilled water and ethanol, the concentration of ethanol on the absorption and desorption of D-101 macroporous resin by the losing rate, eluting rate, recovery rate, purity of isoflavonoids were evaluated. 【Result】 The D-101 macroporous resin had the best separating efficiency under the following technological conditions: the maximum absorption capacity of isoflavonoids was 3.3 times to the volume of macroporous resin; the work solution concentration was 7.20 mg/mL; the absorption velocity was 2 mL/min; the volume of distilled water was 4 times to the volume of macroporous resin; the concentration of ethanol was 30% (4 times to the volume of macroporous resin). The purity and recovery rate of the refined isoflavonoids was 80.74% and 63.62% respectively. 【Conclusion】 This method is simple and feasible with good purification effect, which can meet industrial requirements.

Key words: *Radix Puerarise*; isoflavonoid; separation and purification; macroporous resin

* 【收稿日期】 2009-03-09

【基金项目】 2005 年教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-05-0855)

【作者简介】 张玉超(1983—),女,山东淄博人,在读硕士,主要从事药用植物资源化学和分离纯化工艺开发研究。

E-mail: mingxin3608@163.com

【通信作者】 王俊儒(1966—),男,陕西杨凌人,教授,博士,主要从事植物资源化学和环境生物学研究。

E-mail: wangjr07@163.com

葛根是豆科植物野葛 (*Pueraria Lobata* (Willd.) Ohwi) 的干燥根, 始载于《神农本草经》, 2000 年正式被国家卫生部批准为药食两用植物。葛根的生物活性成分主要有异黄酮、皂苷、生物碱等, 葛根异黄酮主要含有葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木素等, 其具有降低心肌耗氧量、改善局部循环障碍、降血糖、抗氧化、解酒等重要药理功能^[1-3]。随着对其药理功能的深入研究, 葛根异黄酮的提取工艺和分离纯化技术, 日益受到人们的重视。

目前, 已经报道的葛根异黄酮分离纯化方法较多, 如铅盐沉淀法、萃取法、柱层析法等^[4-5]。大孔树脂吸附法是近年来发展起来的较新的分离纯化方法, 与传统的铅盐沉淀法、萃取法、硅胶柱层析法相比, 具有吸附性能好、效率高、再生简便、成本低、洗脱剂毒性小、使用周期长等优点, 因而广泛应用于天然产物的富集和分离^[6-8]。

葛根异黄酮苷是碳苷, 极性葡萄糖基和非极性异黄酮母核通过 C 键结合使其总体极性弱、水溶性差, 理论上利于弱极性、非极性树脂的吸附。目前, 关于大孔树脂分离纯化葛根异黄酮的研究, 主要集中在 AB-8 大孔树脂的应用方面^[9-10], 而非极性大孔树脂 D-101 分离纯化葛根异黄酮的报道较少。徐刚等^[11]研究表明, AB-8 大孔树脂在吸附葛根素的同时, 也吸附了较多的杂质 4'-甲氧基葛根素, 增加了目标产物葛根素的纯化难度; 并且在相同的分离和结晶条件下, AB-8 大孔树脂分离后的产品纯度和收率都低于 D-101 大孔树脂。郭艳艳等^[12]用 D-101 大孔树脂结合甲醇-乙酸重结晶的方法, 制得大豆苷的纯度为 96.4%。因此, 本试验拟研究 D-101 大孔树脂分离纯化葛根异黄酮的动态吸附-解吸条件, 并进行工艺验证及定性检测, 综合确定最优工艺参数, 为葛根异黄酮工业化生产提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

葛根, 采自秦岭山区, 经西北农林科技大学植物组陈铁山副教授鉴定, 晾干粉碎。

葛根素标准品, Sigma 公司; 大豆苷、大豆苷元标准品, 自制; D-101 大孔树脂, 西安蓝晓科技有限公司; 薄层层析硅胶 GF₂₅₄, 青岛海洋化工厂; 其他化学试剂均为国产分析纯。

SP-2100 型紫外-可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; KQ-1500 型超声波清洗器, 昆山超声仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 供试液的制备及树脂预处理。(1)供试液的制备。称取葛根粉末 500.0 g, 用 6 倍体积分数 70% 乙醇 50 ℃ 下超声提取 3 次, 每次 30 min。回收提取液乙醇, 加蒸馏水静置 24 h, 抽滤, 滤液浓缩, 定容, 备用。

(2)树脂预处理。参照潘见等^[13]的方法并有所改进。先用体积分数 70% 乙醇浸泡, 使树脂充分溶胀, 再用体积分数 70% 乙醇, 洗至流出液加适量蒸馏水无白色浑浊, 用蒸馏水洗尽乙醇, 最后转入酸碱处理步骤。

1.2.2 D-101 大孔树脂动态吸附-解吸影响因素的考察 (1)上样液用量。将葛根提取液(异黄酮质量浓度为 11.20 mg/mL)以 2 mL/min 流速通过 15 mL D-101 大孔树脂进行动态吸附, 收集每一树脂流出液体积, 共收集 10 份。测定异黄酮溶液的质量浓度, 以流出液体积为横坐标, 流出液质量浓度为纵坐标, 绘制泄漏曲线, 根据泄漏点(即流出液质量浓度是上样液质量浓度 10% 时的上样液用量)^[14]确定上样液用量。

(2)上样液质量浓度。用 D-101 大孔树脂饱和吸附质量浓度分别为 3.2, 5.2, 7.2, 9.2 和 11.2 mg/mL 的葛根提取液, 以吸附量占总量的百分数作为吸附率, 根据树脂对异黄酮的吸附率确定最佳上样液质量浓度。

(3)吸附流速。将葛根异黄酮溶液分别以 1, 2 和 3 mL/min 的流速通过 D-101 大孔树脂, 收集每一树脂流出液体积, 测定异黄酮质量浓度, 根据泄露点及泄露率的大小确定吸附流速。

(4)洗脱剂蒸馏水用量。用 D-101 大孔树脂(树脂体积 30 mL)饱和吸附葛根异黄酮溶液, 分别用 30, 60, 90, 120, 150, 180 mL 蒸馏水洗脱, 根据多糖反应及异黄酮损失率的大小确定最佳用水量。

(5)洗脱剂乙醇的体积分数。用 D-101 大孔树脂(树脂体积 30 mL)饱和吸附葛根异黄酮溶液, 先用 4 倍树脂体积的蒸馏水洗脱, 然后分别用体积分数 10%, 30%, 50%, 70%, 90% 的乙醇洗脱, 测定异黄酮质量浓度, 根据洗脱率大小确定乙醇最佳体积分数。

(6)洗脱剂乙醇的用量。用 D-101 大孔树脂(树脂体积 30 mL)饱和吸附葛根异黄酮溶液, 先用 4 倍树脂体积的蒸馏水洗脱, 然后分别用 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 mL 体积分数 30% 的乙醇洗脱, 收集每一树脂流出液体积, 计算异黄酮

洗脱率,依据累积洗脱率确定乙醇用量。

1.2.3 不同类型树脂精制异黄酮的比较试验 在上述试验确定的最佳吸附、解吸条件下,进行 D-101、LSA-40、LSD-001 3 种不同类型树脂精制异黄酮的比较试验。收集体积分数 30%乙醇洗脱液,测定异黄酮的质量浓度,然后减压浓缩至膏状,取出并在 105℃烘箱中烘干,称量干膏质量。重复 3 次,测量平均值,计算收率、纯度。

1.2.4 D-101 大孔树脂精制葛根异黄酮的工艺验证 在上述试验确定的最佳吸附、解吸条件下,进行 D-101 大孔树脂精制葛根异黄酮试验。收集体积分数 30%乙醇洗脱液,测定异黄酮的质量浓度,然后减压浓缩至膏状,取出并在 105℃烘箱中烘干,称量干膏质量。重复 3 次,测量平均值,计算收率、纯度。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 异黄酮质量浓度 参照文献[15]的方法,以葛根素标准品为对照,利用紫外分光光度法在 250 nm 波长处测定吸光度,平行测定 3 次,取平均值。以吸光度值(A)为纵坐标,葛根素质量浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $A = 76.24C + 0.0034, r = 0.9997$ 。

1.3.2 异黄酮收率 异黄酮收率采用以下公式计算:

异黄酮收率/% = $(C \times V) / (C_1 \times V_1) \times 100\%$ 。
式中:C 和 V 分别为洗脱液中的异黄酮质量浓度和洗脱液体积,C₁ 和 V₁ 分别为吸附前溶液的异黄酮质量浓度和溶液体积。

1.3.3 异黄酮纯度 异黄酮纯度采用以下公式计算:

异黄酮纯度/% = $(C \times V) / W \times 100\%$ 。
式中:C 和 V 分别为洗脱液中的异黄酮质量浓度和洗脱液体积,W 为干膏质量。

1.3.4 异黄酮损失率 用异黄酮损失率考察洗脱用水量,并采用以下公式计算:

异黄酮损失率/% = $(C_2 \times V_2) / (C_1 \times V_1) \times 100\%$ 。
式中:C₁ 和 V₁ 分别为吸附前溶液中异黄酮质量浓度和溶液体积,C₂ 和 V₂ 为水洗脱液中的相应指标。

1.3.5 异黄酮洗脱率 异黄酮洗脱率采用以下公式进行计算:

异黄酮洗脱率/% = $(C \times V) / (C_3 \times V_3) \times 100\%$ 。
式中:C 和 V 分别是洗脱液中异黄酮质量浓度和洗脱液体积,C₃ 和 V₃ 分别是吸附溶液的异黄酮质量浓度和溶液体积。

1.3.6 TLC 定性分析 将上述 D-101 大孔树脂精

制后的洗脱液进行定性分析。采用 GF254 薄层硅胶板,以 V(氯仿):V(甲醇):V(乙酸乙酯):V(蒸馏水)=3:1:3:0.1 为展开剂,冷风吹干。检识方法:紫外灯下 365 nm 和 254 nm 处观察展开情况,氨气熏后斑点荧光加强,用质量分数 1%的三氯化铝溶液喷后斑点显黄色。

2 结果与分析

2.1 影响 D-101 大孔树脂吸附-解吸葛根异黄酮的单因素分析

研究表明,不同有效成分(生物碱、黄酮、酚性成分、无机物)在同一型号大孔树脂上的吸附-解吸能力具有差异^[16]。故选择最佳的葛根上样液用量、上样液质量浓度、流速、洗脱剂及其用量,可提高大孔树脂的吸附、解吸能力,促进葛根异黄酮的富集与分离。

2.1.1 上样液用量对吸附效果的影响 D-101 大孔树脂吸附葛根异黄酮的泄漏曲线见图 1。由图 1 可见,对于 D-101 大孔树脂,其泄露时间较长,并较长时间保持低浓度泄露。当葛根异黄酮流出液体积达到 50 mL,即上样液用量为 3.3 倍树脂体积时,树脂对应的流出液质量浓度达到原液质量浓度的 10%,此时葛根异黄酮已经透过,因此确定上样液用量为 3.3 倍树脂体积。

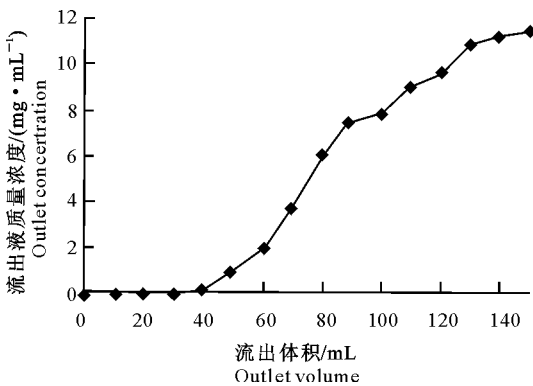


图 1 D-101 大孔树脂吸附葛根异黄酮的泄漏曲线
Fig. 1 Leaking curve of *Radix Puerarise* on the absorption of D-101 macroporous resin

2.1.2 上样液质量浓度对吸附效果的影响 上样液质量浓度是影响大孔树脂吸附效果的重要因素之一。由图 2 可见,D-101 大孔树脂对葛根异黄酮的吸附率随上样液质量浓度的增大呈先逐渐上升后明显下降的趋势。当上样液质量浓度为 7.20 mg/mL 时,大孔树脂对异黄酮的吸附率达到最大值(99.35%);当上样液质量浓度提高到 9.20,11.20

mg/mL 时,大孔树脂对异黄酮的吸附率明显下降,分别为 94.20%和 88.88%。试验中葛根提取液质量浓度为 11.20 mg/mL,树脂对异黄酮的吸附率最低,因此应将其质量浓度稀释至 7.20 mg/mL 进行后续试验。

2.1.3 吸附流速对吸附效果的影响 吸附流速对吸附效果的影响,表现为其对溶质在树脂表面扩散

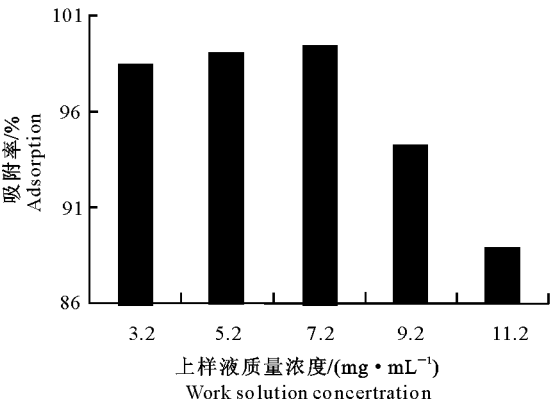


图 2 上样液质量浓度对 D-101 大孔树脂吸附效果的影响
Fig. 2 Effect of work solution concentration on the absorption of D-101 macroporous resin

2.1.4 洗脱剂蒸馏水用量对解吸效果的影响 糖类物质与异黄酮都是非离子型化合物,但因糖分子量明显小于异黄酮且易溶于水,所以在大孔树脂中易被水洗脱,进一步提高了异黄酮的纯度。由表 1 可见,对于 D-101 大孔树脂,当蒸馏水用量是树脂体积 1~3 倍时,多糖反应呈阳性,说明多糖未被完全洗脱。当蒸馏水用量达到 4 倍树脂体积时,多糖反应开始呈阴性,说明多糖基本被完全洗脱,此时异黄酮损失率为 5.72%;蒸馏水用量为树脂体积的 5、6 倍时,异黄酮损失率 7.00%和 9.55%。综上可以确定,洗脱剂蒸馏水的用量以 4 倍树脂体积为宜。

2.1.5 乙醇体积分数对解吸效果的影响 为保护葛根异黄酮的活性成分、减小毒性,本研究没有选用碱液、甲醇和丙酮等溶剂洗脱,而用毒性较小、价格

的影响,若流速过高,溶质分子来不及扩散到树脂表面而发生漏过。由图 3 可见,吸附流速为 3 mL/min 较 2 mL/min 时更早出现泄漏现象。同时流经相同树脂体积时,流速为 3 mL/min 条件下收集的流出液中,异黄酮质量浓度高于流速为 2 和 1 mL/min,说明此时泄漏率明显加大。综合考虑选择吸附流速为 2 mL/min。

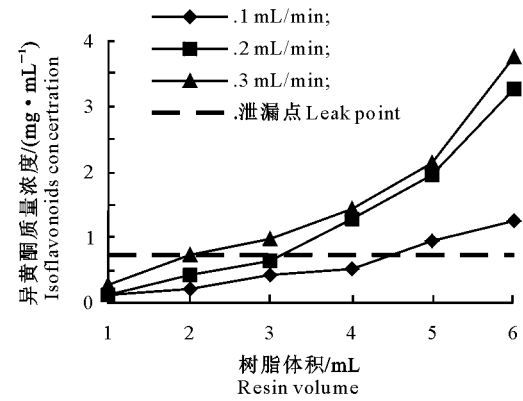


图 3 吸附流速对 D-101 大孔树脂吸附效果的影响
Fig. 3 Effect of absorption velocity on the absorption of D-101 macroporous resin

适中的乙醇作为洗脱剂。由表 2 可见,对于 D-101 大孔树脂,不同体积分数乙醇对葛根异黄酮的洗脱能力不同。异黄酮洗脱率随乙醇体积分数的增大呈先增大后减小的变化趋势。体积分数 30%的乙醇,能将大部分异黄酮洗脱下来,其洗脱率为 69.71%;体积分数 70%和 90%乙醇的异黄酮洗脱率均明显减少,仅为 8.52%和 4.04%,说明乙醇体积分数过高并不利于葛根异黄酮的解吸。观察洗脱液颜色发现,体积分数 30%乙醇的洗脱液颜色最深,呈现棕褐色;体积分数 10%,50%乙醇的洗脱液颜色呈金黄色;体积分数 70%,90%乙醇的洗脱液颜色较浅。综上可以确定,以体积分数 30%的乙醇作为洗脱剂最佳。

表 1 洗脱剂蒸馏水用量对 D-101 大孔树脂解吸效果的影响

Table 1 Effect of volume of eluting reagent distilled water on the desorption of D-101 macroporous resin			
树脂体积/mL Volume of macroporous resin	蒸馏水用量/mL Volume of water	异黄酮损失率/% Isoflavonoids losing rate	多糖反应 Amylose reaction
30	30	3.51	+
30	60	4.83	+
30	90	4.86	+
30	120	5.72	-
30	150	7.00	-
30	180	9.55	-

注:+,多糖反应阳性;- ,多糖反应阴性。
Note: +, amylase reaction masculine, - , amylase reaction negative.

表 2 洗脱剂乙醇体积分数对 D-101 大孔树脂解吸效果的影响

Table 2 Effect of eluting reagent ethonal concetration on the desorption of D-101 macroporous resin

乙醇体积分数/% Ethonal concetration	异黄酮洗脱率/% Isoflavonoids eluting rate	乙醇体积分数/% Ethonal concetration	异黄酮洗脱率/% Isoflavonoids eluting rate
10	54.04	70	8.52
30	69.71	90	4.04
50	50.44		

2.1.6 洗脱剂体积分数 30%乙醇用量对解吸效果的影响 由表 3 可以看出,用体积分数 30%乙醇溶液洗脱葛根异黄酮,随着乙醇用量的增加,洗脱率呈现先逐渐上升后大幅度下降的趋势。当体积分数 30%乙醇用量是树脂体积 4 倍时,洗脱率累积达到 64.44%,说明此时大孔树脂吸附的异黄酮已基本被

洗脱下来,并且在其用量为 3 倍树脂体积时,洗脱率为 22.40%。当体积分数 30%乙醇用量为树脂体积 5~10 倍时,异黄酮洗脱率的累积值较小,说明 30%乙醇用量大于 4 倍树脂体积得到的异黄酮量少,因此确定体积分数 30%乙醇的最适宜用量为 4 倍树脂体积。

表 3 洗脱剂体积分数 30%乙醇用量对 D-101 大孔树脂解吸效果的影响

Table 3 Effect of volume of 30% eluting reagent ethonal on the desorption of D-101 macroporous resin

树脂体积/ mL Volume of macroporous resin	体积分数 30% 乙醇用量/ mL 30 % ethonal volume	异黄酮洗脱率/% Isoflavonoids eluting rate	树脂体积/ mL Volume of macroporous resin	体积分数 30% 乙醇用量/ mL 30 % ethonal volume	异黄酮洗脱率/% Isoflavonoids eluting rate
30	30	9.60	30	180	0.47
30	60	19.55	30	210	0.55
30	90	22.40	30	240	0.63
30	120	12.89	30	270	0.70
30	150	1.46	30	300	0.76

2.2 不同类型树脂精制异黄酮的比较试验

根据单因素试验结果,确定纯化工艺条件为:上柱液用量为 3.3 倍树脂体积,上柱液质量浓度7.20 mg/mL,吸附流速 2 mL/min,洗脱剂蒸馏水和体积分数 30 %乙醇的用量均为 4 倍树脂体积。利用该

纯化条件进行不同类型树脂 (D-101、LSA-40 和 LSD-001)的精制异黄酮比较试验,结果见表 4。由表 4 可知,非极性 D-101 型树脂精制的异黄酮纯度、收率,均高于中等极性树脂 LSA-40 和极性树脂 LSD-001。

表 4 不同类型树脂精制异黄酮的纯度及收率比较

Table 4 Purity and recovery rate of the refined isoflavonoids by different macroporous resin

大孔树脂类型 Type of macroporous resin	干膏质量/mg Samples weight	纯度/% Purity	收率/% Recovery rate
D-101	561.7	80.74	63.62
LSA-40	540.6	71.54	55.23
LSD-001	521.4	65.85	40.36

2.3 D-101 大孔树脂精制葛根异黄酮的工艺验证试验

利用 2.2 中的最佳条件进行工艺验证试验,结果见表 5。由表 5 可知,纯化后葛根异黄酮的纯度、

收率平均值分别达到 80.74%和 63.62%,说明 D-101 大孔树脂动态吸附-解吸葛根异黄酮工艺的重现性良好。

表 5 D-101 大孔树脂精制葛根异黄酮的纯度及收率

Table 5 Purity and recovery rate of the refined isoflavonoids by D-101 macroporous resin

编号 Number	干膏质量/mg Samples weight	纯度/% Purity	收率/% Recovery rate
1	562.3	80.66	63.63
2	560.8	80.90	63.65
3	561.9	80.66	63.59
平均 Average	—	80.74	63.62

将前面经 D-101 大孔树脂精制后的洗脱液进行薄层层析定性检测,结果见图 4。由图 4 可知,纯化后样品中含有大豆苷、大豆苷元和葛根素 3 种对照

品异黄酮成分,其中大豆苷和葛根素在紫外灯下(365 nm 和 254 nm)荧光较强,大豆苷元荧光稍弱,但是氨气熏后荧光均明显加强,且在喷布质量分数

1%三氯化铝溶液后斑点呈现黄色。上述试验中 D-101 大孔树脂精制葛根异黄酮后,得到的异黄酮的纯度为 80.74%,收率为 63.62%(以葛根素计),可知此时能够洗脱下来的异黄酮已经洗脱完全。结合薄层层析检测结果,说明 D-101 大孔树脂分离纯化葛根异黄酮,不会影响其主要活性成分如葛根素等的化学结构,并且能将上柱液中主要异黄酮成分洗脱下来。这说明 D-101 大孔树脂吸附-解吸工艺中的上样液用量、浓度、吸附流速、洗脱剂的选择及用量等条件合理,工艺稳定可行。

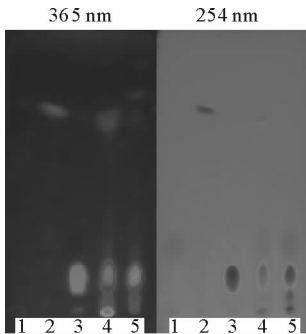


图 4 葛根异黄酮样品与标准品的薄层层析结果

1. 大豆苷;2. 大豆苷元;3. 葛根素 4. 粗提物;5. 纯化品

Fig. 4 Thin layer result of the sample and the standard of isoflavonoids

1. Daidzin;2. Daidzein;3. Puerarin;

4. Crude extracts;5. Purified sample

3 讨 论

3.1 影响 D-101 大孔树脂吸附性能的因素

本试验发现,影响 D-101 大孔树脂吸附性能的因素,如上样液质量浓度和用量、吸附流速等,直接影响着异黄酮类成分的富集效果。李剑君等^[17]用 AB-8 大孔树脂分离葛根素时发现,上样液质量浓度对吸附行为影响显著。李岂凡等^[18]考察 AB-8 大孔树脂分离纯化质量浓度分别为 6.693,5.355 和 4.016 mg/mL 的葛根提取液时发现,上样液质量浓度为 6.693 mg/mL 时,树脂对总黄酮的吸附量达到最大(26.66 mg/mL)。本试验中,上样液质量浓度过低(3.20 mg/mL),大孔树脂处理量减小;上样液质量浓度过高(9.20 和 11.20 mg/mL),异黄酮溶解量减少并且损失较大(吸附率分别为 94.20%和 88.88%),故确定上样液质量浓度为 7.20mg/mL,此时大孔树脂对异黄酮的吸附率达到最大值 99.35%,可以最大程度地富集葛根异黄酮。

适宜的上样液用量,是有效、经济地纯化目标成分的重要因素,既可保证有效成分不流失,又能保证

大孔树脂不浪费。何宇新等^[19]考察 D-100 大孔树脂对粉葛总黄酮吸附容量,结果表明,50 mL D-100 大孔树脂可处理 4 倍树脂体积,总黄酮质量浓度为 3.0 mg/mL(以葛根素计)的葛根提取液不发生泄露,此时树脂共吸附总黄酮 600 mg。本试验确定的上柱液用量是 3.3 倍树脂体积,不到 4 倍树脂体积,推测可能是所用树脂不同、药材品种不同造成的差异;但本试验中,50 mL D-101 大孔树脂吸附的黄酮量为 1 186.35 mg,说明葛根异黄酮得到充分吸附,而且吸附的黄酮量较大。

3.2 洗脱剂及其用量的选择

大孔树脂的纯化原理是吸附作用和分子筛作用,吸附作用是由于范德华力或氢键的作用;而分子筛作用则是由于其多孔结构减弱了自身的吸附力,使得有机溶剂易洗脱有效成分。因此,用蒸馏水预洗除杂时应考察其用量,不致使目标成分损失。本试验发现,用 4 倍树脂体积的蒸馏水洗脱葛根异黄酮的损失率较小,故 4 倍树脂体积的蒸馏水量为适宜用量。本试验中,用体积分数 30 %乙醇洗脱的葛根异黄酮洗脱率最高,达到 69.71%,异黄酮收率达到 63.62%,故确定以体积分数 30%乙醇作洗脱剂。且 4 倍树脂体积体积分数 30 %乙醇可基本将目标成分洗净,大孔树脂冲洗较干净,有利于大孔树脂再生。

3.3 工艺的优化性

陈最鹏^[10]等用 AB-8 大孔树脂纯化葛根总黄酮,得到总黄酮和葛根素的纯度分别可达 65%和 27%。李岂凡等^[18]比较了静态、动态吸附和脱附,从 5 种国产大孔树脂中优选出了 AB-8 型大孔树脂,利用其对葛根总黄酮粗液进行分离纯化,纯化后的葛根总黄酮产品纯度可达 70%。本试验选用 D-101 大孔树脂分离纯化葛根异黄酮,所得的葛根异黄酮纯度、收率分别达到 80.74%和 63.62%,纯度明显提高。

3.4 葛根素和大豆苷的同时制备

葛根素和大豆苷是葛根异黄酮的主要药理活性成分。陈斌^[20]利用 AB-8 大孔树脂分离纯化葛根水提液中的异黄酮研究结果表明,不同体积分数乙醇解吸液可实现葛根素和大豆苷的初步分离,获得结晶率为 77.7%、纯度为 97.44%的葛根素。本研究中,纯化后的葛根异黄酮样品中,含有大豆苷、大豆苷元和葛根素。因此,利用 D-101 大孔树脂同时制备葛根素和大豆苷,更好地开发利用葛根植物资源,其工艺还有待于进一步研究。

4 结 论

本试验以葛根素为指标测定异黄酮含量,通过动态吸附、解吸的方法,以异黄酮吸附率、解吸率为评价指标,综合评价动态吸附-解吸各因素对 D-101 大孔树脂分离纯化葛根异黄酮效果的影响,确定的最优吸附条件为:葛根异黄酮饱和吸附量为 3.3 倍树脂体积,上样液质量浓度 7.20 mg/mL,吸附流速 2 mL/min;洗脱最佳条件是:洗脱剂蒸馏水和体积分数 30%乙醇的用量均为 4 倍树脂体积。根据本研究获得参数精制的葛根异黄酮纯度、收率分别为 80.74%和 63.62%,表明 D-101 大孔树脂纯化法能够大幅度富集葛根异黄酮,并且具有吸附容量大、获得异黄酮纯度高等特点,适合于葛根异黄酮的纯化。

[参考文献]

- [1] 王桂霞. 葛根素在心血管病中的应用 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(6): 549-550.
Wang G X. Application of puerarin against cardiovascular disease [J]. Li Shi-zhen Medicine and Materia Medica Research, 2005, 16(6): 549-550. (in Chinese)
- [2] Guerra M C, Speroni E, Broccoli M, et al. Comparison between chinese medical herb *Pueraria lobata* crude extract and its main isoflavone puerarin antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalysed drug metabolism [J]. Life Sciences, 2000, 67: 2997-3006.
- [3] Keung W M, Vallee B L. Kudzu root: An ancient chinese source of modern antidipsotropic agents [J]. Phytochemistry, 1998, 47(4): 499-506.
- [4] 曾祥群. 葛根总黄酮提取工艺 [J]. 食品工业科技, 2000, 21(3): 32-33.
Zeng X Q. Extraction of total flavonoids from *Radix Puerarise* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2000, 21(3): 32-33. (in Chinese)
- [5] 郭建平, 孙其荣, 周 全, 等. 葛根总黄酮不同提取工艺的探讨 [J]. 中草药, 1995, 26(10): 522-539.
Guo J P, Sun Q R, Zhou Q, et al. Discussion on extraction of total flavonoids from *Radix Puerarise* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 1995, 26(10): 522-539. (in Chinese)
- [6] 胡 军, 周跃华. 大孔吸附树脂在中药成分精制纯化中的应用 [J]. 中成药, 2002, 24(2): 127-130.
Hu J, Zhou Y H. Application of macroporous resin in the purification of Chinese herbs [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2002, 24(2): 127-130. (in Chinese)
- [7] 赵淑艳, 呼世斌, 吴焕利, 等. 山茱萸抑菌活性成分的提取分离与检测 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(6): 223-226.
Zhao S Y, Hu S B, Wu H L, et al. Studies on extraction and isolation of bacteriostatic active composition from *Fructus* Corui [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2007, 35(6): 223-226. (in Chinese)
- [8] 吕永海, 杨 赞, 严诗楷, 等. 大孔吸附树脂法富集白薇中总皂苷的工艺研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(12): 1390-1392.
Lv Y H, Yang B, Yan S K, et al. Enrichment of saponins in *Radix et Rhizoma Cynanchi Atrati* with macroporous resin [J]. China Journal of Chinese Medica, 2008, 33(12): 1390-1392. (in Chinese)
- [9] 邹忠梅, 穆红梅, 张宏武, 等. 大孔吸附树脂对葛根总黄酮的吸附研究 [J]. 湖北中医学院学报, 2004, 6(3): 25-26.
Zou Z M, Mu H M, Zhang H W, et al. Adsorption of total flavonoids in the roots of *Pueraria Lobata* by macroporous adsorption resins [J]. Journal of Hubei College of TCM, 2004, 6(3): 25-26. (in Chinese)
- [10] 陈最鹏, 刘志辉, 钱 芳. AB-8 大孔吸附树脂纯化葛根总黄酮 [J]. 医药导报, 2008, 27(5): 585-587.
Chen Z P, Liu Z H, Qian F. Purification of total flavonoids from *Radix Puerarise* by AB-8 macroporous resin [J]. Herald of Medicine, 2008, 27(5): 585-587. (in Chinese)
- [11] 徐 刚, 何照范. 利用大孔吸附树脂分离纯化葛根素 [J]. 山地农业生物学报, 2000, 24(1): 63-66.
Xu G, He Z F. The separation and purification of puerarin by macroreticular resin [J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2000, 24(1): 63-66. (in Chinese)
- [12] 郭艳艳, 王俊儒, 薛亚峰. 葛根中大豆苷的分离纯化工艺研究 [J]. 西北农业学报, 2009, 18(1): 252-254.
Guo Y Y, Wang J R, Xue Y F. The Technology for the separation and purification of daidzin in *Pueraria lobatal* [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2009, 18(1): 252-254. (in Chinese)
- [13] 潘 见, 陈 强. 大孔树脂对葛根黄酮的吸附分离特性研究 [J]. 农业工程学报, 1999, 15(1): 236-240.
Pan J, Chen Q. Performance of absorption and separation of the macroreticular resin for *Pueraria* isoflavones [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 1999, 15(1): 236-240. (in Chinese)
- [14] 董文宾, 徐 颖, 张建华, 等. LSA-10 型树脂纯化大豆黄酮工艺条件的研究 [J]. 粮油加工机械, 2004(7): 43-45.
Dong W B, Xu Y, Zhang J H, et al. Purification technology of soybean isoflavone by macroporous resin LSA-10 [J]. Machinery For Cereals, oil and Food Processing, 2004(7): 43-45. (in Chinese)
- [15] 袁怀波, 赵国华, 李洪军, 等. 利用大孔树脂纯化葛根异黄酮的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2003, 11(2): 62-64.
Yuan H B, Zhao G H, Li H J, et al. Purification of *Pueraria* isoflavones with macroreticular resin [J]. Food and Fermentation Industries, 2003, 11(2): 62-64. (in Chinese)