

· 实验研究 ·

大孔树脂吸附层析法提取淡豆豉中总异黄酮的研究

Macroporous resin in extraction of isoflavones from dandouchi

郭文勇¹, 刘彬果¹, 钟 蕾¹, 宓鹤鸣^{1*}, 刘海燕²

(1. 第二军医大学药学院药学分析学教研室, 上海 200433; 2 西双版纳州医院药剂科, 西双版纳 666100)

[摘要] 目的: 研究大孔吸附树脂柱层析分离、纯化淡豆豉中大豆异黄酮的工艺。方法: 以大豆素为指标, 比较 7 种大孔吸附树脂(型号为 D-101、DM-301、DA-201、905、1300、AB-8 和 ZTC-1)对大豆素的吸附性能, 考察温度(10~45℃)、pH 值(3.5~10)、洗脱溶剂(20%~95%乙醇)对大孔吸附树脂的吸附和洗脱性能的影响; 并以优化的条件进行淡豆豉提取液中大豆异黄酮的纯化研究。结果: 型号 905 大孔吸附树脂对大豆素的吸附性能优于其他 6 种树脂; 温度 10~15℃和酸性条件时大孔树脂 905 对大豆素的吸附效果较好, 以型号 905 大孔吸附树脂 pH 5.0 左右、室温条件作为较优的条件进行三批淡豆豉提取液中总异黄酮的富集和纯化, 大豆素得率均大于 8%。结论: 大孔吸附树脂柱层析用于淡豆豉活性成分的提取工艺获得较好的效果。

[关键词] 大孔吸附树脂; 淡豆豉; 大豆素; 大豆异黄酮

[中图分类号] R 282.71

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2004)09-1033-02

* 中药“淡豆豉”是由青蒿、桑叶、大豆 3 味药材经发酵加工而成的特殊药物。中医传统用于清热解表、宣发郁热, 主治感冒、寒热头痛、虚烦不眠等证, 是治疗各种感冒发热配方的主要药味之一, 临床应用广泛。其所含有效成分大豆异黄酮(soybean isoflavone)、大豆皂苷是具有广泛应用价值的天然生物活性物质^[1]。大豆异黄酮主要包括大豆素(daidzein)和染料木素(genistein)等。大孔吸附树脂^[2-4]是一类不含交换基团且具有大孔结构的高分子吸附剂, 它具有较大的比表面积, 可以通过物理吸附从水溶液中有选择地吸附有机物, 具有选择性好、解吸容易、机械强度高、可反复使用和流体阻力小等优点。从问世以来, 已在环保、食品、医药等领域得到了广泛的应用^[5-7]。我们应用大孔吸附树脂柱层析方法对淡豆豉中大豆异黄酮类、大豆皂苷类等化合物进行提取分离和纯化研究。

1 材料

1.1 淡豆豉提取液 依药典方法制备的淡豆豉粉碎后, 经不加改性剂的超临界流体萃取脱脂, 超临界流体萃取方法是: 萃取釜压力为 35 MPa, 温度为 65℃, 萃取时间 4 h。药渣用 70% 的乙醇溶液(V/V)提取大豆异黄酮, 减压浓缩除乙醇后得到提取液。

1.2 大孔吸附树脂 D-101(非极性)、DM-301(弱极性)、DA-201(中性)均购自天津农药股份有限公司, 外观为乳白色不透明球状颗粒, 粒度 20~60 目; 905 和 1300 树脂购自上海医药工业研究院, 外观为乳白色不透明球状颗粒, 非极性, 粒度 20~60 目; AB-8 和 ZTC-1 树脂购自天津南开大学化工厂, 外观为浅黄色不透明球状颗粒, 弱极性, 粒度 20~60 目。

1.3 仪器和试剂 7530G 紫外-可见分光光度计; Waters 高效液相色谱仪: 515 泵, 2487 检测器, 色谱柱为大连依利特公司的 Hypersil ODS2 C₁₈(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); BSZ-

160 自动部分收集器; 乙醇计等。高效液相层析法所用甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 大豆素的含量测定 高效液相层析法^[8]色谱条件: 流动相: 甲醇-水(1:1); 流速 1.0 ml/min; 进样量 20 μl; 柱温: 室温; 检测波长: 250 nm; 灵敏度 1.0 AU.S。大豆素在此条件下的出峰时间约 6.9 min, 大豆素浓度(c, mg/ml)对峰面积积分值(A)回归方程为: $c = 2.154 \times 10^{-5} A + 7.803 \times 10^{-5}$ ($r = 0.9999$) 在 0.02~2.0 mg/ml 之间线性良好。大豆素的最低检测浓度约为 0.3 μg/ml。

2.2 大孔吸附树脂柱层析条件考察

2.2.1 大孔吸附树脂的预处理 以 95% 乙醇湿法装柱, 继而用 95% 乙醇冲洗, 不时检测流出的乙醇, 当流出的乙醇液与水混合不呈白色混浊时, 用大量的蒸馏水洗至无醇味, 备用。

2.2.2 不同型号树脂的比较 分别取上述 7 种大孔吸附树脂依 2.2.1 项处理后, 沥干水分, 称取同样重量的树脂 10 g 于烧杯中, 各加入大豆素水溶液(80 mg/L) 200 ml, 振摇 1 h, 每隔 5 min 取样测定, 以紫外分光光度法^[9]检测大豆素水溶液的光密度变化, 检测波长 240 nm。初始的大豆素溶液的光密度记为 D_0 , 经大孔吸附树脂吸附过的溶液光密度记为 D_1 , 以 D_1/D_0 值作为评价树脂吸附性能的指标。结果表明上述 7 种吸附树脂对大豆素的吸附均在 15 min 即可达到平衡, 其吸附能力的顺序是: 905 > D-101 > 1300 > AB-8 > DM-301 > ZTC-1 > DA-201。

* [基金项目] 上海市科技发展基金(02DZ19111)。

[作者简介] 郭文勇(1970-), 男(汉族), 硕士生。

* Corresponding author. Tel: 021-25070389, E-mail: mh19470718@sina.com

2.2.3 吸附温度、pH 值的考察 取型号 905 的大孔吸附树脂依 2.2.1 项处理后, 沥干水分, 称取同样重量的树脂 10 g 于烧杯中, 加入大豆素水溶液(80 mg/L) 200 ml, 在不同温度(10~ 45 °C)、不同 pH 值(3.5~ 10) 条件振荡 20 min, 分别以 50% 的乙醇溶液进行洗脱, 以 HPLC 检测洗脱结果, 结果显示在 pH 5.0 左右、温度 10~ 15 °C 时大孔树脂 905 对大豆素的吸附效果较好。

2.2.4 吸附容量的确定 称取各大孔吸附树脂 10 g 于烧杯中, 预处理后, 分别加入 100、200、400、1 000、1 200、1 500、2 000 ml 的大豆素水溶液(80 mg/L), 搅拌 10 min 后装柱, 流出液再重复吸附 1 次。后用 50% 乙醇洗脱, 以 HPLC 检测洗脱结果。加入大豆素水溶液体积 1 200 ml 以上, 洗脱液中的大豆素量不再增加, 即在此条件下 905 大孔吸附树脂对大豆素的吸附量在 100 mg/10 g 左右。

2.3 淡豆豉中总异黄酮的分离纯化 从条件考察的结果看, 以大豆素为指标, 大孔吸附树脂柱层析的优化条件是: 型号为 905 的大孔吸附树脂, pH 5.0 左右, 温度 10~ 15 °C。在此条件下进行淡豆豉提取液中总异黄酮的纯化研究。

2.3.1 洗脱溶剂考察 15 kg 的淡豆豉药材制得的提取液加水至 15 L, pH 值为 5.67, 过滤, 室温条件下滤液以 15 ml/min 的流速流过大孔树脂柱(18 cm × 1 m), 流出液重复吸附 1 次, 蒸馏水 30 L 洗去杂质。分别以 20%、50%、80%、95% 乙醇各 30 L 洗脱, 收集洗脱部位, 回收溶剂, 干燥, 称质量, 测定大豆素含量, 结果见表 1。

表 1 不同浓度乙醇的洗脱结果

(n = 3, $\bar{x} \pm s$)			
Solvent	样品量 (m/g)	大豆素 (m/g)	得率 (%)
20% ethanol	24.1	1.60 ± 0.05	6.66 ± 0.20
50% ethanol	66.2	6.22 ± 0.05	9.39 ± 0.07
80% ethanol	1.7	0.02 ± 0.01	1.30 ± 0.61
95% ethanol	0.6	-	-

-: Not detected

从表中可以看出, 大孔吸附树脂吸附的成分基本上在 20%、50% 乙醇洗脱部位解吸, 占 97% 以上, 大豆异黄酮基本存在这一部分中, 80%、95% 乙醇洗脱部位是油膏状物质, 主要是脂溶性杂质, 弃去。因此可以采用 50% 乙醇作为洗脱液进行产品的制备。

2.3.2 样品的制备 简化工艺为: 30 kg 的淡豆豉药材制得的提取液在大孔树脂柱吸附后, 蒸馏水 60 L 洗去杂质后, 50% 乙醇 60 L 洗脱, 回收溶剂, 干燥, 得到产品。其中大豆素含量测定结果见表 2。

3 讨论

市场上的大孔吸附树脂品种繁多, 价格差异较大。从本

表 2 样品制备结果

(n = 3, $\bar{x} \pm s$)				
Batch No.	样品量 (m/kg)	洗脱量 (m/g)	大豆素 (m/g)	得率 (%)
20030920	30	182	15.32 ± 0.09	8.42 ± 0.05
20031017	30	161	15.20 ± 0.07	9.44 ± 0.04
20031113	30	164	15.01 ± 0.06	9.15 ± 0.03

实验结果看, 在所选择的 7 种吸附树脂中, 型号 905 的吸附树脂对大豆异黄酮的分离和纯化的效果较好, 可以作为工业生产使用。

从条件考察结果分析, 酸性条件和较低温度(10 °C 左右) 有利于吸附树脂对大豆异黄酮的吸附, 原因可能是大豆异黄酮是一类多羟基化合物, 酸性条件解离较少, 有利于吸附树脂对大豆异黄酮的吸附, pH 5.0 左右, 室温条件下既能保证 905 大孔吸附树脂对大豆素有较大的吸附量, 且条件较为温和。

在洗脱溶剂考察中, 大豆异黄酮主要存在于 20% 和 50% 乙醇部位中, 80% 乙醇部位虽含有少量的大豆素, 但成分中含较多的亲脂性化合物, 呈黏稠的油膏状。本实验采用 50% 乙醇为单一洗脱溶剂, 相应增加溶剂使用量, 既能保证大豆素的全部洗脱, 又能除去部分脂溶性杂质。

本实验主要考察以大豆素为指标的大豆异黄酮的生产工艺, 3 批样品的大豆素得率均大于 8%, 可以作为保健食品或药品的原料。产品中含有另一组有效成分大豆皂苷类, 有关该成分的研究正在进行中。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会编 中华人民共和国药典(一部) [S]. 北京: 化学工业出版社 2000. 532
- [2] 马振山. 大孔吸附树脂在药学领域中的应用[J]. 中成药, 1997, 19(12): 40-43
- [3] Bautista LF, Plata MM, A racil J, et al. Application of an effective diffusion model to the adsorption of Aspartame on functionalised divinylbenzene-styrene macroporous resins [J]. *J Food Engineer*, 2003, 59(9): 319-325
- [4] Shi Z, Xu MC. Study on the resin adsorption of polyphenolic compounds [J]. *Reactive Polymers*, 2000, 9(1): 34-36
- [5] 杜江, 丁宁, 贾宪生. 大孔树脂吸附法在黄褐毛忍冬总皂苷提取中的应用研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(10): 685-695
- [6] 冯建光, 谷文英. 大孔吸附树脂对大豆异黄酮的吸附与洗脱性能[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(1): 82-85
- [7] 麻秀萍. 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): 539-542
- [8] 毛俊琴, 宓鹤鸣, 姜子洋, 等. HPLC 法测定淡豆豉中的异黄酮的含量[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(10): 955-957
- [9] 张玉梅, 张学斌, 高旭年, 等. 紫外分光光度法测定大豆异黄酮的含量[J]. 中国食品科学杂志, 2000, 12(4): 7-9

[收稿日期] 2004-01-09

[修回日期] 2004-06-17

[责任编辑] 尹 茶