

黄莎,陈庆富,黄小燕.大孔树脂分离纯化苦荞麦中总黄酮的工艺[J].江苏农业科学,2016,44(3):303-306.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.087

大孔树脂分离纯化苦荞麦中总黄酮的工艺

黄莎¹,陈庆富²,黄小燕¹

(1. 贵州师范大学生命科学学院,贵州贵阳 550001;

2. 贵州师范大学生命科学学院植物遗传育种研究所/荞麦产业技术研究中心,贵州贵阳 550001)

摘要:以总黄酮为指标,经过动态吸附,探讨提取物溶液浓度、pH 值、流速、树脂类型等因素对总黄酮吸附性能及不同洗脱剂(乙醇)浓度、用量对总黄酮洗脱效果的影响,确定分离纯化苦荞麦中总黄酮工艺的最佳参数。结果表明,大孔树脂 D-101 的最佳吸附条件为荞麦提取液浓度为 0.30 g/mL、pH 值为 5、吸附流速为 4 BV/h;最佳纯化条件为水洗用量 80 mL,洗脱剂浓度为 50%、用量为 90 mL。最佳吸附条件下,荞麦提取液中总黄酮纯度最高为 25.69%。

关键词:苦荞麦;分离纯化;总黄酮;大孔树脂;工艺;参数

中图分类号:S517.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)03-0303-03

苦荞麦属蓼科(Polygonaceae)荞麦属苦荞种(*Fagopyrum tataricum* Gartn.),别称苦荞,性喜冷凉气候,适应能力强,宜在高海拔地区生长,生长周期相对较短,约 70 d,主要分布于我国四川凉山、云、贵、晋、冀等处^[1-4]。我国西南地区是世界苦荞的主产区,具有丰富的栽培品种和野生资源,是遗传育种及开展其他科研工作所需材料的重要原产地^[5-6]。

苦荞麦是一种重要的粮、饲、药兼用的植物资源,营养丰富,对预防心血管疾病、降血糖、增强免疫力、抗癌、抗氧化、护肝、抗炎、抗过敏等具有很好的效果^[7-16]。因此,苦荞麦的消费市场在近几年逐年扩大,其有效成分芸香苷、槲皮素、山奈酚和桑色素等在食品、化妆、医药等行业的需求也越来越大。另外,由于苦荞麦中含有丰富的类黄酮化合物,苦荞米茶、苦荞面食、苦荞醋、苦荞啤酒等苦荞麦加工品也越来越受到人们喜爱。但是,由于苦荞麦类黄酮化合物未能实现高效分离纯化,苦荞麦类黄酮的提取至今未形成大规模的工业化生产。大孔吸附树脂分离纯化总黄酮的工艺已取得显著成效^[17],本试验在采用大孔吸附树脂分离纯化苦荞麦中总黄酮的基础上,研究苦荞麦总黄酮的分离纯化工艺,以期苦荞麦总黄酮的工业化提取提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

四倍体苦荞 1307-1178 的种子,由贵州师范大学荞麦研究所提供,并经陈庆富教授鉴定;树脂分别为非极性 D-101、极性 DA-201、中等极性 DM-301 大孔树脂,由天津市光复

精细化工研究所提供;标准曲线对照品为芸香苷(类黄酮类物质),由中国药品生物制品检定所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 提取液的制备 参考盛华刚等的方法^[18]制备提取液:称取苦荞麦 300 g,粉碎成粗粉;用 3 000 mL 70% 乙醇提取 3 h;用 1 500 mL 70% 乙醇提取 1.5 h,重复 2 次;合并 3 次提取液,回收乙醇,浓缩;定容到浓度为 0.6 g/mL,摇匀,作为上柱溶液。

1.2.2 大孔树脂的处理 用 95% 乙醇浸泡大孔树脂 24 h,装柱;用 95% 乙醇洗涤,至流出液与水的混合液不出现浑浊为止;用蒸馏水反复洗涤至无醇味^[19]。

1.2.3 芸香苷标准曲线的绘制 用 70% 乙醇配制 0.123 mg/mL 芸香苷作为对照品;精确吸取对照品 0、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mL 分别置于 10 mL 试管中,分别加入 2 mL 0.1 mol/L 三氯化铝溶液、3 mL 1 mol/L 乙酸钾溶液,加 70% 乙醇至 10 mL,摇匀,放置 30 min;以试剂作为空白,用分光光度计测定波长为 420 nm 处吸光度^[20]。重复 3 次,3 次测定数据相差均在 0.005 以内。以吸收度为纵坐标、浓度为横坐标,得回归方程: $Y = 29.379X - 0.0105$,相关系数 $r = 0.9993$,线性范围为 0.005 ~ 0.030 mg/mL。

1.2.4 吸附试验

1.2.4.1 大孔树脂型号的选择 分别量取 D-101、DM-301、DA-201、混合型(D-101、DM-301、DA-201,等比例混合)4 种型号的树脂各 18 mL,装柱;加入苦荞麦提取液 40 mL,流速为 0.5 mL/min,过柱;100 mL 水洗,流速为 0.5 mL/min;100 mL 70% 乙醇洗脱,流速为 0.5 mL/min;测定流出液、水洗脱液和乙醇洗脱液黄酮的含量,以黄酮的比吸附量和比洗脱率指标,选择吸附效果较好的大孔树脂。

1.2.4.2 吸附条件的优化 提取液浓度、流速、pH 值等因素对树脂吸附黄酮的影响较大^[21]。试验采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,以考察不同提取液浓度、流速、pH 值(表 1)对总黄酮比吸附量的影响,选出最佳吸附条件。最后均以流速为 2 BV/mL 的 100 mL 水洗,测定流出液、水洗脱液中黄酮的含量,计算比吸附量。

收稿日期:2015-03-22

基金项目:国家燕麦荞麦现代农业产业技术体系专项(编号:CARS-08-A4);贵州省科学技术基金(编号:黔科合 J 字[2012]2268 号);国家自然科学基金(编号:31060207、31171609)。

作者简介:黄莎(1988—),女,贵州大盘水人,硕士,从事植物资源研究。E-mail:huangshasasha@163.com。

通信作者:黄小燕,硕士,教授,从事植物资源研究。E-mail:huangxy666@126.com。

表 1 大孔树脂吸附苦荞麦黄酮 L₉ (3⁴) 试验因素水平

| 水平 | A:上样浓度 (g/mL) | B:吸附流速 (BV/h) | C:空白 | D:pH 值 |
|----|------------------|------------------|------|--------|
| 1 | 0.15 | 2 | | 5 |
| 2 | 0.30 | 4 | | 6 |
| 3 | 0.60 | 6 | | 7 |

1.2.5 纯化条件的选择

1.2.5.1 水洗量的选择 按最优条件吸附。以 10 mL 递增进行水洗,接取水洗脱液;分别取 2 mL 洗脱液检测糖含量,取 8 mL 蒸干,测定干膏质量;以干膏质量、Molish 识别反应判定水洗量。

1.2.5.2 洗脱剂浓度的选择^[22] 按最优条件进行吸附和水洗。分别用 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 的 150 mL 乙醇进行洗脱,流速为 2 BV/h;测定乙醇洗脱液中黄酮含量,计算比洗脱量;确定洗脱剂乙醇的使用浓度。

1.2.5.3 洗脱剂乙醇的用量 按最佳条件进行吸附、水洗。50% 乙醇以 10 mL 递增进行洗脱,收集流出液,测定其总黄酮量。

1.2.6 黄酮纯度测定 参照贾韶千等方法^[23] 进行:将纯化前后的黄酮溶液分别减压浓缩、干燥,得到总黄酮粉末;精确称取纯化前后黄酮粉末各 50 mg,分别溶于 80% 乙醇,定容至 50 mL;测定黄酮含量,计算黄酮纯度;重复 3 次。干膏收率和黄酮回收率计算公式分别为:

表 3 大孔树脂吸附苦荞麦黄酮 L₉ (3⁴) 正交试验结果

| 序号 | A:上样浓度 | B:吸附流速 | C:空白 | D:pH 值 | 总黄酮比吸附量 (mg/L) |
|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 428.783 2 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 359.572 7 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 266.446 7 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 347.659 5 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 390.585 1 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 393.988 9 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 328.749 5 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 303.977 5 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 375.268 0 |
| K ₁ | 1 054.802 6 | 1 105.192 2 | 1 194.636 3 | 1 194.636 3 | |
| K ₂ | 1 132.233 5 | 1 054.135 3 | 1 082.311 1 | 1 082.311 1 | |
| K ₃ | 1 007.995 0 | 1 035.703 6 | 985.781 3 | 918.083 7 | |
| R | 124.238 5 | 18.431 7 | 112.325 2 | 276.552 6 | |

表 4 大孔树脂吸附苦荞麦黄酮 L₉ (3⁴) 正交试验方差分析结果

| 因素 | 离差平方和 SS | 自由度 | F 值 |
|----|------------|-----|--------|
| A | 2 624.633 | 2 | 3.038 |
| B | 863.911 | 2 | 1.000 |
| D | 12 896.548 | 2 | 19.000 |
| 误差 | 863.91 | 2 | |

2.3 纯化条件的选择

2.3.1 水洗量的选择 由表 5 可见,水洗量为 40 mL 时,水洗脱液的 Molish 反应为阴性(-);当用水量为 80 mL 时,干膏质量为 0 mg。因此,水洗量以 80 mL 为最佳。

2.3.2 洗脱剂浓度的选择 由图 1 可知,乙醇浓度为 20%~50% 时,比洗脱量呈上升趋势;乙醇浓度为 50%~60% 时,比

干膏收率 = 干膏质量/净药材投入量 × 100%;
黄酮回收率 = 50% 乙醇洗脱液中黄酮含量/总黄酮上样量 × 100%。

2 结果与分析

2.1 苦荞麦中总黄酮的吸附

由表 2 可见,D-101 大孔树脂的比吸附量和比洗脱量均为最大,可见 D-101 大孔树脂对黄酮有较好的吸附和洗脱效果。因此,采用 D-101 大孔树脂作为吸附树脂。

表 2 4 种大孔树脂比吸附量及比洗脱量

| 树脂型号 | 比吸附量 (mg/L) | 比洗脱量 (mg/L) |
|--------|----------------|----------------|
| D-101 | 273.71 | 422.43 |
| DA-201 | 271.26 | 396.89 |
| DM-301 | 269.74 | 418.79 |
| 混合型 | 270.88 | 396.89 |

2.2 D-101 大孔树脂吸附条件的优化

由表 3、表 4 可见,极差(R 值)大小为 D>A>B,因素 A 和 D 的离差平方和(SS)值较大,这表明 pH 值对黄酮吸附量的影响相对最大,浓度次之,流速最小。由于流速的影响较小,考虑时间问题,因此最佳吸附工艺条件为 A₂ B₂ D₁,即提取液浓度 0.30 g/mL、流速 4 BV/h、pH 值为 5。

表 5 水洗量的确定

| 水洗量(mL) | 干膏质量(mg) | Molish 反应 |
|---------|----------|-----------|
| 10 | 29 | ++ (强) |
| 20 | 17 | + |
| 30 | 6 | + |
| 40 | 4 | - |
| 50 | 2 | - |
| 60 | 1 | - |
| 70 | 1 | - |
| 80 | 0 | - |
| 90 | 0 | - |
| 100 | 0 | - |

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性。

洗脱量达到最高值;60%之后略有下降。对 50%、60%乙醇洗脱液的比洗脱量和干膏质量进行比较,由表 6 可见,50%、60%乙醇洗脱液的干膏质量均为 37 mg,而 50%乙醇洗脱液的比洗脱量高于 60%乙醇。因此,选定洗脱剂浓度为 50%。

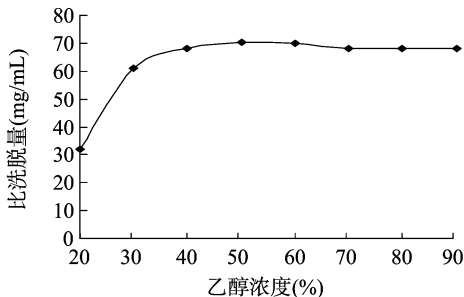


图1 乙醇浓度对比洗脱量的影响

| 表 6 50%、60% 乙醇的比洗脱量和干膏质量 | | |
|--------------------------|--------------|-----------|
| 洗脱剂(乙醇)浓度 (%) | 比洗脱量 (mg/mL) | 干膏质量 (mg) |
| 50 | 70.291 7 | 37 |
| 60 | 70.125 0 | 37 |

2.3.3 洗脱剂用量的选择 由图 2 可见,乙醇量达 90 mL 时,总黄酮基本洗脱完全。因此,确定洗脱剂乙醇的用量以 90 mL 为最佳。

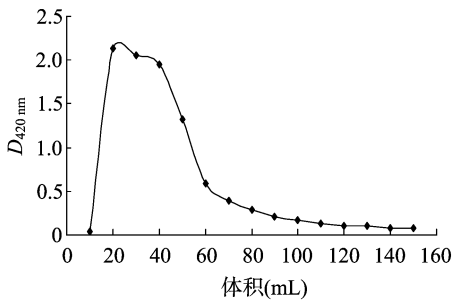


图2 不同洗脱剂用量对总黄酮的洗脱效果

2.4 黄酮纯度测定

由表 7 可见,在优化条件下,黄酮纯度最高可达 25.69%;黄酮洗脱量、干膏收率与其他 2 组相差较小,黄酮回收率较高,优选的纯化工艺稳定可行。

| 表 7 苦荞麦黄酮纯化测定 | | | | |
|---------------|----------|------------|-----------|-----------|
| 序号 | 黄酮纯度 (%) | 黄酮洗脱量 (mg) | 干膏收率 (%) | 黄酮回收率 (%) |
| 验证 1 | 25.69 | 30.427 35 | 0.633 333 | 95.77 |
| 验证 2 | 25.16 | 30.136 32 | 0.654 167 | 94.85 |
| 验证 3 | 24.82 | 30.044 42 | 0.662 500 | 94.57 |

3 结论

试验采用 D-101、DA-201、DM-301、混合型 4 种型号的大孔树脂作为吸附材料,结果表明,混合型吸附效果不如 D-101 理想,D101 大孔树脂是一种非极性吸附剂,苦荞麦中黄酮主要被 D-101 吸附。大孔树脂对苦荞麦中黄酮的最佳分离纯化工艺为:荞麦提取液浓度为 0.3 g/mL、pH 值为 5、吸附流速为 4 BV/h;纯化条件为水洗用量 80 mL,洗脱剂(乙

醇)浓度为 50%、用量为 90 mL。经过该工艺条件分离纯化苦荞麦中黄酮的纯度是纯化前的 2.7 倍,工艺条件温和,分离效果较好,能提高有效成分的相对含量、产品不易吸潮、生产周期较短、树脂可再生、能重复使用。

需要说明的是,苦荞麦乙醇提取液在回收乙醇并用水定容后,有不溶物质的存在,如果直接上柱分离会堵塞树脂,树脂的吸附能力会受到影响。因此,需要对提取液进行处理,将回收乙醇后的提取液进行过滤,将不溶物用热水溶解并继续过滤,直至到定容点。

参考文献:

[1] Tsuji K, Yasui Y, Ohnishi O. Search for *Fagopyrum* species in eastern Tibet [J]. *Fagopyrum*, 1999, 16: 1-6.

[2] 林汝法,王 瑞,周运宁. 苦荞提取物的毒理学安全性[J]. 华北农学报, 2001, 16(1): 116-121.

[3] 徐嘉生,张太生,郭玉刚. 研究四川苦荞麦的保健功能[J]. 中国食品, 2000(6): 38-39.

[4] 陈志奇. 加强“五谷之王”——苦荞麦的开发与利用[J]. 四川粮油科技, 1998(1): 23-24.

[5] Ohnishi O. Search for the wild ancestor of buckwheat [J]. Description of new *Fagopyrum* (Polygonaceae) species and their distribution in China and the Himalayan hills [J]. *Fagopyrum*, 1998, 15: 18-28.

[6] 王 敏,魏益民,高锦明,等. 反相高效液相色谱法测定苦荞中的芦丁和槲皮素[J]. 中国食品学报, 2005, 5(3): 113-117.

[7] 林汝法. 中国荞麦[M]. 北京:中国农业出版社, 1994.

[8] 王秉文,李克喜,冯养生,等. 沙棘总黄酮对豚鼠离体心房肌的作用[J]. 沙棘, 1993, 6(2): 23-27.

[9] Xiao D, Gu Z L, Bai J P, et al. Effects of quercetin on aggregation and intracellular free calcium of platelets [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 1995, 16(3): 223-226.

[10] 祁学忠,吉锁兴,王晓燕,等. 苦荞黄酮及其降血糖作用的研究[J]. 科技情报开发与经济, 2003, 13(8): 111-112.

[11] Corvazier E, Maclouf J. Interference of some flavonoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs with oxidative metabolism of arachidonic acid by human platelets and neutrophils [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1985, 835(2): 315-321.

[12] Chen J, Montanaria M, Widmer W W. Two new polymethoxylated flavones, a class of compounds with potential anticancer activity, isolated from cold pressed dancy tangerine peel oil solids [J]. *Agric Food Chem*, 1997, 45(2): 364-368.

[13] Cao G, Sofic E, Prior R L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships [J]. *Free Radical Biol Med*, 1997, 22(5): 749-760.

[14] 尤玲玲,刘幻幻,李晓雁,等. 苦荞黄酮的纯化及抗氧化活性的研究[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(8): 23-27.

[15] 高学清. 葛根和葛花的解酒护肝作用及其机理研究[D]. 无锡:江南大学, 2013: 1-42.

[16] Corvazier E, Maclouf J. Interference of some flavonoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs with oxidative metabolism of arachidonic acid by human platelets and neutrophils [J]. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, 1985, 835(2): 315-321.

[17] 葛淑兰,陈龙华,李中文. 大孔吸附树脂及其在黄酮类成分分离纯化中的应用进展[J]. 中国药师, 2008, 11(6): 702-705.

何丽平,吴友根,张军锋,等. 广藿香叶片总蛋白双向电泳体系的建立[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):306-309.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.088

广藿香叶片总蛋白双向电泳体系的建立

何丽平, 吴友根, 张军锋, 胡新文

(热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室/海南大学园艺园林学院,海南海口 570228)

摘要:比较 2 种方法提取广藿香叶片总蛋白质的得率与聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白条带,同时对广藿香叶片总蛋白质双向电泳条件进行了优化,利用 MALDI-TOF-TOF 和 Swiss-Prot 软件对部分蛋白点进行质谱鉴定。结果表明:使用 TCA/丙酮法提取广藿香叶片总蛋白,在 10 万 Vhs 聚焦强度下,可获得高分辨率双向电泳图谱,BPP 酚抽法获得的蛋白不适用于双向电泳分析;经质谱成功鉴定了 9 个蛋白点,鉴定成功率 90%。

关键词:广藿香;叶片;双向电泳;蛋白质提取

中图分类号: S567.23⁺9.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0306-04

广藿香[*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.]为唇形科刺蕊草属植物,是我国常用中药,具有芳香化浊、开胃止呕、发表解暑等功效^[1],是著名国家中药保护品种藿香正气丸(胶囊、水)和抗病毒口服液的重要原料,也是其他 30 多种中成药的主要原料^[2]。但是广藿香连作障碍现象十分突出,造成产量和品质明显下降,每茬收获后必须间种其他农作物后方可再种,严重影响了广藿香规范化生产与种植、药农种植积极性和区域经济发展,从而难以保障广藿香药材的质量及其标准化、现代化的实施。据报道,广藿香连作障碍的原因可归结为根系分泌物质的自毒作用^[3]和根际微生物群落多样性变化^[4],但无论何种机制,连作障碍现象都最终在广藿香植株上表现出来。近年来,随着现代系统生物学的快速发展,差异蛋白质组学技术逐渐成为研究连作障碍机理的有力工具,其中蛋白质双向电泳(2-DE)图谱的建立是进行蛋白质组学分析的前提和基础,而蛋白样品的制备则是双向电泳技术的核心与关键。本研究比较不同的广藿香叶片总蛋白提取与分离方法,旨在为广藿香叶片差异蛋白质组学分析奠定基础,进而为揭示广藿香连作障碍机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期:2015-03-11

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360210,81360618);海南省中药现代化专项资金项目(编号:ZY201413)。

作者简介:何丽平(1990—),女,四川内江人,硕士研究生,研究方向为南药植物资源与利用。E-mail:lipinghe18@163.com。

通信作者:吴友根,博士,教授,主要从事南药种质资源、活性成分及其开发利用的教学与科研工作。E-mail:wygeng2003@163.com。

广藿香植物材料于 2014 年 4 月种植于海南大学园艺园林学院广藿香种质资源圃。当年 11 月采集植株叶片,液氮速冻保存,用于总蛋白质提取。

1.2 试剂

三氯乙酸(TCA)、尿素(urea)、硫脲(thiourea)、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、十二烷基磺酸钠(SDS)、二硫苏糖醇(DTT)、硫酸铵、考马斯亮蓝 G-250,购自美国 Sigma 公司。24 cm IPG 胶条(pH 值 4~7)和琼脂糖,购自瑞典 GE Healthcare 公司。丙烯酰胺(Acr)、甲叉双丙烯酰胺(Bis)、交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP),购自美国 Bio-Rad Labs 公司。其他药品均为国产分析纯,购自北京化工厂。

1.3 方法

1.3.1 蛋白质样品的制备 分别称取广藿香叶片 2 份,每份 1 g,分别放于预冷研钵中,加入适量 PVPP,用液氮研磨至粉末,装入离心管,-80℃冰箱中保存待用。广藿香叶片总蛋白提取流程按照 TCA/丙酮法、BPP(四硼酸钠/交联聚乙烯吡咯烷酮/苯酚 Borax/PVPP/Phenol)酚抽法进行。

1.3.1.1 TCA/丙酮法 参照 Wang 等提取顽拗植物组织蛋白的方法^[5],并略有改动。将 1 g 材料粉末加入 10 mL 预冷的含 10% TCA、0.07% 巯基乙醇的丙酮中,充分混匀后,-20℃沉淀过夜,4℃、15 000 g 离心 30 min,弃上清液。加入 10 mL 预冷的含 0.07% 巯基乙醇的丙酮,混匀后-20℃放置 1 h,4℃、15 000 g 离心 30 min,弃上清液。以上步骤重复 2 次。将沉淀用甲醇洗涤 2 次,丙酮洗涤 2 次,室温干燥后溶解于蛋白裂解液(7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,2% CHAPS,13 mmol/L DTT)中,-20℃保存备用。

1.3.1.2 BPP 酚抽法 采用 BPP 法^[6]提取蛋白质。1 g 材料粉末中加入 5 mL BPP 蛋白提取液[100 mmol/L EDTA,

[18]盛华刚,朱立俏,张超,等. 金荞麦提取液的大孔树脂分离纯化工艺研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(15):1832-1835.

[19]盛华刚,林桂涛. 大孔树脂纯化夏枯草总黄酮和总皂苷工艺研究[J]. 山东中医药大学学报,2012,36(5):436-438.

[20]中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2000.

[21]刘斌,石任兵,余超. 影响大孔吸附树脂吸附分离中草药化学成分的因素[J]. 中草药,2002,33(5):475-476.

[22]何泉宇. 大叶蛇葡萄标准提取物制备工艺及其初步稳定性研究[D]. 湖北:湖北中医药大学,2012:1-59.

[23]贾韶千,吴彩娥,杨剑婷,等. 枸杞中黄酮类化合物纯化工艺的研究[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2010,34(2):85-88.