

大孔树脂分离纯化柞树叶总黄酮及其抗氧化活性研究

王林美, 岳冬梅, 孙永欣, 马淑慧, 张波, 李树英* (辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁大连 116023)

摘要 [目的]研究柞树叶总黄酮的纯化工艺及抗氧化活性。[方法]采用静态吸附与解析的方法,通过比较6种大孔树脂的吸附和解析性能,优选适宜的大孔树脂,并优化适合分离柞树叶总黄酮的解析条件。以 V_C 为对照,对其还原力、DPPH自由基(DPPH·)和超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的清除能力进行研究。[结果]D101型大孔树脂纯化柞树叶总黄酮吸附与洗脱效果最好,其纯化最佳工艺条件为粗提液浓度0.55 mg/mL、上样流速1.5 mL/min、洗脱剂40%乙醇(V/V)、洗脱流速1.5 mL/min,柞树叶总黄酮纯度可达65.5%;分离纯化后柞树叶总黄酮具有良好的总还原能力以及清除DPPH自由基和抗超氧阴离子自由基活性,其总还原力大于 V_C 的还原力,当质量浓度为0.03 mg/mL时,对DPPH自由基和抗超氧阴离子自由基的清除率分别为85.9%和65.9%。[结论]D101大孔树脂可用于柞树叶总黄酮的分离纯化,柞树叶总黄酮具有较强的抗氧化活性。

关键词 柞树叶;总黄酮;大孔树脂;分离纯化;抗氧化活性

中图分类号 R285 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)23-0192-06

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.23.054



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Separation and Purification of Total Flavonoids from Tussah Leaves by Macroporous Resin and Its Antioxidant Activity
WANG Lin-mei, YUE Dong-mei, SUN Yong-xin et al (Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Dalian, Liaoning 116023)

Abstract [Objective] To study the purification technology and antioxidant activity of total flavonoids from tussah leaves. [Method] The suitable macroporous resin and the suitable desorption conditions for total flavonoids separation from tussah leaves were optimized by comparing the adsorption and desorption properties of six kinds of macroporous resin through static test. The reducing power, the scavenging ability of DPPH radical (DPPH·) and superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) were studied, as V_C was control. [Result] The adsorption and elution effect of total flavonoids from tussah leaves by D101 macroporous resin was the best. The purity of total flavonoids in tussah leaves could reach 65.5% with the optimum purification conditions: crude extract concentration of 0.55 mg/mL, sample flow rate of 1.5 mL/min, elution agent of 40% ethanol (V/V), elution flow rate of 1.5 mL/min. After separation and purification, the total flavonoids of tussah leaves had good total reducing ability and scavenging DPPH free radical and anti-superoxide anion free radical activity, and its total reducing power was greater than that of V_C . When the mass concentration was 0.03 mg/mL, the scavenging rates of DPPH free radical and anti-superoxide anion radical were 85.9% and 65.9%, respectively. [Conclusion] D101 macroporous resin can be used for the separation and purification of total flavonoids from tussah leaves, and the total flavonoids from tussah leaves have strong antioxidant activity.

Key words Tussah leaves; Total flavonoids; Macroporous resin; Separation and purification; Antioxidant activity

柞树为壳斗科栎属植物的总称,是多年生阔叶植物,我国主要分布在东北和华北地区,其中辽宁省柞树林有182万 hm^2 ,占林地面积的14.7%,资源广泛,野外自然生长,产地天然无污染^[1]。柞树叶主要作为柞蚕饲料而被利用,研究发现柞树叶除了含有粗蛋白、粗脂肪、粗纤维、矿物质元素、维生素等营养成分外,还富含黄酮类生物活性成分^[2],其中柞树叶中黄酮类主要有山奈酚-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷、山奈酚-3-O-(6'-O-没食子酰基)- β -D-吡喃葡萄糖苷、山奈酚-3-O-(6'-O-没食子酰基)- β -D-吡喃葡萄糖苷、芹菜素-4'-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、木犀草素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、黑麦草素- β -谷甾醇葡萄糖苷等^[3]。药理试验已证实柞树叶具有清热利湿、抗炎解毒^[4]、保肝降血糖^[5]等作用,医学研究发现黄酮类化合物具有较高的生理及药理活性,如抗氧化、调节血管渗透性、抗抑郁、抗焦虑、保护神经、提高免疫力、抗肿瘤等功效^[6],这些生理和药理特性使其广泛应用于食品、医药等领域。

大孔吸附树脂是一种有机高聚物吸附剂,具有吸附量

大、选择性强、容易脱附再生、操作简便、成本低等特点^[7-9],被广泛地用于黄酮类、皂苷类和生物碱类等天然产物化学成分的分离纯化^[10-13]。目前对于有效成分总黄酮的分离纯化方法的研究鲜见报道。该研究首次以柞树叶中总黄酮吸附和解析性能为指标,考察不同大孔树脂对其总黄酮的吸附解析性能,从柞树叶中获得较高纯度的总黄酮,并考察其抗氧化活性,为柞树叶资源的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试材。柞树叶来自蒙古栎(*Quercus mongolica*)树种,采自辽宁省凤城市鸡冠山镇柞园,用清水清洗后25℃阴干,粉碎过60目筛,得柞树叶粉,-20℃冰箱保存。芦丁标准样品为中国食品药品检定研究院生产(HPLC \geq 98%);甲醇、乙腈为色谱纯,国药集团生产;硝酸铝、氢氧化钠、亚硝酸钠、无水乙醇、邻苯三酚、过氧化氢、铁氰化钾、维生素C、三氯乙酸,均为国药集团生产(分析纯);抗超氧阴离子自由基测定试剂盒购自南京建成公司;D101、X-5、D4020、AB-8、D1400、DA201大孔树脂(天津市海光化工有限公司),其物理特性如表1所示。

1.1.2 仪器。U3010紫外/可见分光光度计(Hitachi, Japan);SENCO 5 L旋转蒸发仪、98-1-B电热套(上海申生科技有限公司);DZF-6021真空干燥箱、DHG-9070A电热鼓风

基金项目 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-18)。

作者简介 王林美(1966—),女,辽宁大连人,副研究员,从事蚕桑资源综合利用研究。*通信作者,研究员,从事柞蚕资源综合利用研究。

收稿日期 2021-04-06

干燥箱(上海一恒科技有限公司);玻璃层析柱(6.0 cm× 80.0 cm)(勇诚玻璃仪器厂)。

表 1 6 种型号大孔树脂物理特性

Table 1 The physical properties of six types of macroporous resins

树脂名称 Resin name	比表面积 Specific surface area/m ² /g	孔径 Average pore diameter/Å°	极性 Polarity	粒径 Particle size mm	含水量 Water content//%
D101	≥400	100~110	非极性	0.315~1.250	53.60
X-5	500~600	290~300	非极性	0.315~1.250	52.79
D4020	540~580	100~105	非极性	0.315~1.250	59.09
AB-8	480~520	130~140	弱极性	0.315~1.250	57.50
D1400	≥550	120~130	非极性	0.315~1.250	57.08
DA201	≥150	140~170	极性	0.315~1.250	60.75

1.2 试验方法

1.2.1 柞树叶总黄酮粗提物的制备。取柞树叶粉 10 g,用体积分数为 50%的乙醇 200 mL 浸泡 90 min,提取物 4 层纱布过滤,5 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,于 60 °C 水浴下回流提取 3 次,每次 30 min,合并提取液过滤,在旋转蒸发器上浓缩提取液得到浸膏,加蒸馏水稀释成试验所需浓度的柞树叶总黄酮粗提液,备用。

1.2.2 柞树叶总黄酮含量测定^[14]。

1.2.2.1 波长选择。参照娄晓晶等^[14]的方法进行总黄酮含量测定,分别取 2.0 mL 0.2 mg/mL 芦丁标准品溶液和柞树叶总黄酮粗提物的样品溶液 2.0 mL,置于 25 mL 容量瓶中,加水至 6 mL,加 5%的亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加 10%硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加 4%氢氧化钠溶液 10 mL,摇匀,再加水至刻度,摇匀,放置 15 min,以 50%乙醇水溶液为空白对照,在 450~800 nm 扫描,确定最大吸收波长。

1.2.2.2 标准曲线的绘制。分别精密吸取 0.2 mg/mL 芦丁标准溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 置于 10 mL 试管中,加 5% NaNO₂ 溶液 0.6 mL,摇匀,放置 6 min,加 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.6 mL,摇匀,放置 6 min,加入 1.0 mol/L NaOH 溶液 6 mL,摇匀,静置 15 min,再加 60%乙醇溶液至 10 mL,用紫外分光光度计在 510 nm 波长处测定其吸光值(A)。以芦丁浓度(ρ,mg/mL)为横坐标、吸光度(A)为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.2.3 柞树叶总黄酮含量测定。准确称取柞树叶粉 10 g,按照“1.2.1”方法提取柞树叶总黄酮,按“1.2.2.2”方法测定吸光度,根据标准曲线的线性回归方程计算柞树叶总黄酮含量。

1.2.2.4 总黄酮纯度测定。按照贾绍千等^[15]的方法测定总黄酮纯度,将“1.2.1”方法制备的柞树叶粗提物(即为纯化前黄酮)和纯化后的柞树叶总黄酮溶液分别减压浓缩、干燥,得到总黄酮干粉。准确称取纯化前后的总黄酮干粉各 100 mg,分别溶于 60%乙醇溶液并定容至 100 mL。各吸取 2 mL 于 10 mL 容量瓶中,按总黄酮含量测定方法进行测定,再根据公式 $Y = \frac{X}{M} \times 100\%$ 计算提取物中总黄酮纯度(Y),其中,X 为总黄酮含量(mg);M 为称取总黄酮干粉的质量(mg)。

1.2.3 大孔树脂的预处理。取 D101、X-5、D4020、AB-8、D1400、DA201 这 6 种大孔树脂,分别加入体积分数为 95%的乙醇浸泡 24 h 以上,不断搅拌,大孔树脂充分溶胀后,湿法装柱;用 3~4 倍柱床体积的 95%乙醇洗涤树脂,洗至流出液无白色浑浊为止,再用去离子水洗至无醇味为止;然后用 5 倍柱床体积的 2%氢氧化钠和 5%盐酸洗脱,最后用蒸馏水洗至中性,备用。

1.2.4 不同大孔树脂对柞树叶总黄酮静态吸附-解析性能。

1.2.4.1 大孔树脂筛选试验。分别准确称取 5 g 已处理好的 6 种不同型号的大孔吸附树脂(D101、X-5、D4020、AB-8、D1400、DA201),每个大孔吸附树脂重复 3 份,装于 100 mL 具塞锥形瓶中,分别加入 0.55 mg/mL 的样品溶液 50 mL,置于 25 °C 恒温摇床中 100 r/min 吸附 24 h,取出 400 μL 测其溶液的吸光度,按“1.2.2”方法计算相应的总黄酮含量,按公式(1)计算各大孔树脂的吸附率。

$$A = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中,A 为大孔树脂对柞树叶总黄酮的吸附率(%);C₀ 为样品总黄酮吸附前质量浓度(mg/mL);C₁ 为大孔树脂吸附后总黄酮的质量浓度(mg/mL)。

取上述吸附的大孔吸附树脂用蒸馏水洗至洗脱液无色,滤纸吸干树脂表面残留的溶液,置于具塞锥形瓶中,加 50 mL 40%乙醇溶液,置于 25 °C 恒温摇床中 100 r/min 解析 24 h,取出 400 μL 测其溶液的吸光度,按“1.2.2”方法计算相应的总黄酮含量。按公式(2)计算大孔树脂对柞树叶总黄酮的解析率。

$$D = \frac{C_2 V_3}{C_0 V_1 - C_1 V_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中,D 为大孔树脂对柞树叶总黄酮的解析率(%);C₀ 为样品总黄酮吸附前质量浓度(mg/mL);C₁ 为大孔树脂吸附后总黄酮的质量浓度(mg/mL);C₂ 为洗脱液中总黄酮的质量浓度(mg/mL);V₁ 为样品溶液的体积(mL);V₂ 为吸附溶液的体积(mL);V₃ 为洗脱液的体积(mL)。

1.2.4.2 静态吸附解析动力学试验。准确称取 2.0 g 预处理好的 D101 大孔树脂置于 100 mL 具塞锥形瓶,加入浓度为 0.55 mg/mL 的柞树叶总黄酮溶液 50 mL,置于 25 °C 恒温摇床中 100 r/min 条件下振荡吸附 12 h,每小时取出 400 μL 溶液测其吸光度,测定总黄酮含量,直至大孔树脂吸附饱和,待

测液中总黄酮含量变化趋于稳定时,停止取样,计算不同吸附时间大孔树脂吸附量。将吸附饱和的树脂用蒸馏水洗至洗脱液无色,滤纸吸干树脂表面残留的溶液,置于具塞锥形瓶中,加 50 mL 40% 乙醇溶液,置于 25 ℃ 恒温摇床中 100 r/min 解析 12 h,每小时取出 400 μ L 溶液测其吸光度,按“1.2.2”方法计算相应的总黄酮含量,直至解析液中总黄酮浓度变化趋于稳定。

1.2.5 动态吸附-洗脱试验。

1.2.5.1 上样浓度选择试验。将预处理过的 D101 树脂湿法装柱,树脂柱体积 100 mL,分别取总黄酮浓度为 0.15、0.25、0.35、0.45、0.55、0.65 和 0.75 mg/mL 的样液上样 200 mL,设定流速 1.5 mL/min,利用自动部分收集器收集流出液 4 mL/管,测定每管流出液总黄酮含量,当流出液总黄酮浓度与初始上样浓度接近时停止上样,并计算其吸附率。

1.2.5.2 上样液流速选择试验。将预处理过的 D101 树脂湿法装柱,树脂柱体积 100 mL,取浓度为 0.55 mg/mL 的柞树叶总黄酮样品液上样 200 mL,上样流速分别选取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 mL/min,利用自动收集器进行样品流出液收集(4 mL/管),测定每管流出液总黄酮含量,当流出液总黄酮浓度与初始上样浓度接近时停止上样,计算吸附率。

1.2.5.3 洗脱剂浓度选择试验。取 200 mL 浓度为 0.55 mg/mL 的柞树叶总黄酮溶液装入预处理过的 D101 树脂柱。树脂柱体积 100 mL,用 100 mL 的乙醇洗脱,乙醇浓度分别为 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%,流速 1.5 mL/min,利用自动部分收集器进行样品流出液收集(4 mL/管),分别测定每管流出液的总黄酮含量,所有管相加之和即为该乙醇洗脱浓度下的总黄酮含量,计算解析率。

1.2.5.4 洗脱流速选择试验。取 200 mL 浓度为 0.55 mg/mL 的柞树叶总黄酮溶液装入预处理过的 D101 树脂柱。树脂柱体积 100 mL,用 100 mL 40%乙醇洗脱,分别选择 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 mL/min 洗脱流速,利用自动部分收集器进行样品流出液收集(4 mL/管),分别测定每管流出液的总黄酮含量,所有管相加之和即为该流速下的总黄酮含量,计算解析率。

1.2.6 大孔树脂纯化总黄酮工艺验证。取筛选的最佳大孔树脂 D101 进行预处理后,分别湿法装柱,参照筛选的最佳纯化工艺,收集纯化后总黄酮洗脱液,进行减压浓缩,冷冻干燥,按照“1.2.2”方法计算总黄酮含量。

1.2.7 柞树叶总黄酮抗氧化能力研究。

1.2.7.1 柞树叶总黄酮对 DPPH 自由基清除能力的测定^[16-17]。将柞树叶总黄酮和 V_c 分别用蒸馏水配制成 0.01、0.02、0.03、0.04 和 0.05 mg/mL 5 个浓度样品待测液。分别取不同浓度的样品待测液 2 mL 置于试管中,加入 2 mL 0.1 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液,混匀,室温下避光静置 30 min,在波长 517 nm 处测其吸光度(A_1);另取 2 mL 待测样品于试管中,加入无水乙醇 2 mL,混匀,室温避光反应 30 min,在 517 nm 波长处测吸光度(A_2);以 2 mL 浓度为 0.1 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液和 2 mL 无水乙醇反应作

为空白参比,在 517 nm 波长处测吸光度(A_0)。按照公式(3)计算样品对 DPPH 自由基的清除率。

$$\text{清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\% \quad (3)$$

1.2.7.2 柞树叶总黄酮还原力测定。参考向志军等^[18]的方法,将柞树叶总黄酮和 V_c 用蒸馏水分别配制成 0.005、0.010、0.020、0.050、0.100 和 0.200 mg/mL 6 个浓度样品待测液,分别取样品待测液 2.5 mL 于试管中,加入 2.5 mL 浓度为 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液(pH=6.6)和 2.5 mL 质量分数为 1% 的铁氰化钾溶液充分混匀,置于 50 ℃ 水浴 20 min,结束后迅速冰浴冷却并加入 2.5 mL 质量分数为 10% 的三氯乙酸混匀,在 3 000 r/min 条件下离心 10 min,吸取上清液 5 mL 置于另一试管内依次加入 4 mL 蒸馏水和 1 mL 浓度为 1 mg/mL 的三氯化铁溶液,充分混匀,静置 10 min,于 700 nm 波长处测定反应液吸光度,吸光度越大表明还原力越强。

1.2.7.3 超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)清除活性的测定。按照试剂盒说明书进行操作,配制不同质量浓度(0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60 和 0.70 mg/mL)的柞树叶总黄酮提取液和 V_c 作为待测液,备用。用分光光度计选定 550 nm 波长测定其吸光度,利用公式(4)计算超氧阴离子清除率。

$$\text{清除率} = \left(1 - \frac{\text{对照 OD 值} - \text{测定 OD 值}}{\text{对照 OD 值}}\right) \times 100\% \quad (4)$$

1.3 统计学分析 作图软件为 Origin 9.0,数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件进行,所有试验数据均为 3 次重复结果的平均值。

2 结果与分析

2.1 最大吸收波长的确定 由图 1 可知,芦丁标准溶液和柞叶总黄酮粗提液在 450~800 nm 扫描得到最大吸收峰波长均为 500~510 nm。由于柞叶总黄酮粗提液成分较复杂,对其色谱图有一定影响,故最大吸收波长较芦丁略有偏差。所以确定 510 nm 为样品测定波长^[19]。

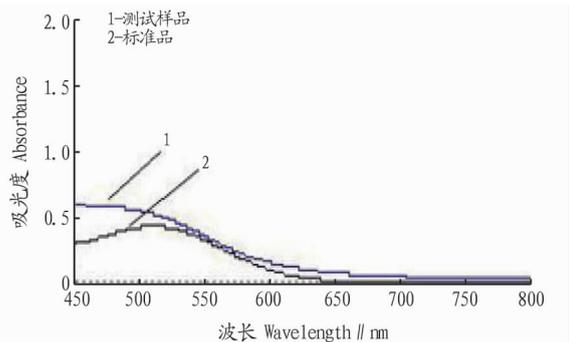


图 1 芦丁对照品与供试品紫外-可见扫描图谱

Fig. 1 The UV-visible scanning maps of rutin reference substance and test substance

2.2 标准曲线的绘制 根据“1.2.2.2”方法,在波长 510 nm 处测定不同浓度芦丁标准品溶液的吸光度,以芦丁标准品的浓度(ρ)为横坐标、吸光度(A)为纵坐标绘制标准曲线。如图 2 所示,用最小二乘法经线性回归,得回归方程 $A = 13.779\rho - 0.0005$ ($R^2 = 0.9995$)。结果表明,溶液浓度控制在 8~48 μ g/mL 时,芦丁对照品溶液浓度与吸光度呈现良好

的线性关系。

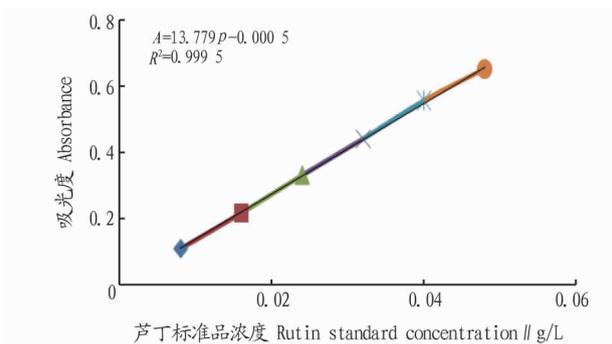
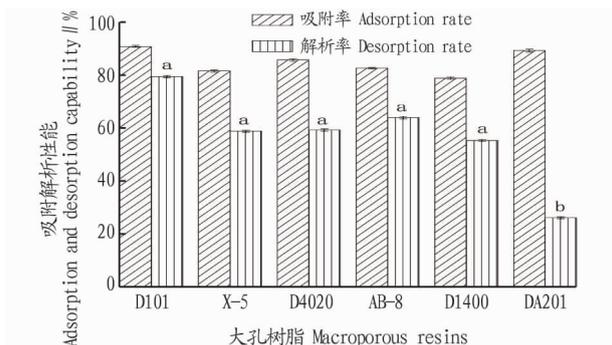


图2 芦丁的标准曲线

Fig.2 Standard curve of rutin

2.3 大孔树脂的筛选 对6种大孔树脂的静态吸附量、吸附率和解析性能的测试结果见图3。从图3可以看出,6种大孔树脂吸附柞树叶中总黄酮化合物均有较高的吸附能力,DA201树脂吸附能力相比之下表现较强,但其解析能力很差,不是理想的吸附树脂。6种树脂吸附能力差别不大,但是解析率差别较大,从大到小依次为D101>AB-8>D4020>X-5>D1400>DA201,且D101、X-5、D4020、AB-8、D1400组显著高于DA201组($P<0.05$)。可能是因为柞树叶总黄酮类化合物中非极性和弱极性化合物含量较高,依据6种大孔树脂对柞树叶总黄酮静态吸附和解析率大小,纯化柞树叶总黄酮优选D101型大孔树脂。



注:不同小写字母代表差异显著($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters represent significant differences ($P<0.05$)

图3 6种大孔树脂对柞树叶总黄酮吸附解析性能比较

Fig.3 Comparison of adsorption and desorption capability of six macroporous resins for total flavonoids from tussah leaves

2.4 D101大孔树脂静态吸附解析平衡时间的确定

2.4.1 D101大孔树脂静态吸附平衡时间。由图4可知,D101大孔树脂对柞树叶总黄酮样液的吸附量在1~5h升高明显,5h吸附率达到最高(90.57%),5h后趋于饱和,基本达到吸附平衡,因此可选择5h为最佳吸附时间。

2.4.2 D101大孔树脂静态解析平衡时间。从图5可以看出,D101大孔树脂对柞树叶总黄酮样液的解析率在5h之前,解析率升高明显,5h后D101大孔树脂基本达到解析平衡状态,随着解析时间延长,解析率变化不明显,5h解析率

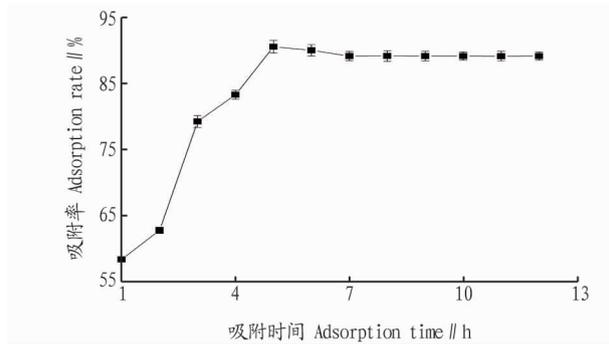


图4 D101大孔树脂静态吸附平衡曲线

Fig.4 Static adsorption equilibrium curve of macroporous resin D101

可以达到79.37%。因此D101大孔树脂的静态解析时间可以选择为5h。

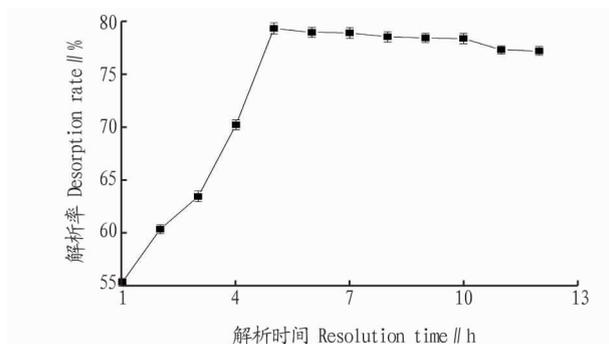


图5 D101大孔树脂静态解析平衡曲线

Fig.5 Static analytical equilibrium curve of macroporous resin D101

2.5 D101树脂对柞树叶总黄酮动态吸附-洗脱单因素考察

2.5.1 上样液浓度对D101大孔树脂吸附率的影响。由图6可见,随着上样浓度的增加,树脂吸附率先升后降,当上样液浓度为0.55mg/mL时,树脂吸附率最高(90.12%),总黄酮的吸附量明显高于其他浓度,故最佳上样浓度为0.55mg/mL。

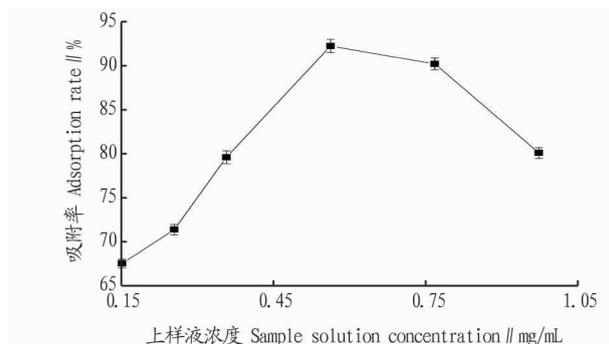


图6 上样液浓度对D101大孔树脂吸附率的影响

Fig.6 Effect of sample solution concentration on the adsorption rate of macroporous resin D101

2.5.2 上样速度对D101大孔树脂吸附率的影响。从图7可以看出,随着上样速度的增加,树脂吸附率小幅度上升后呈现逐渐下降趋势,当上样速度为1.5mL/min时,D101大孔树脂吸附率相对达到最高(89.96%),因此最佳上样速度可

选择 1.5 mL/min。

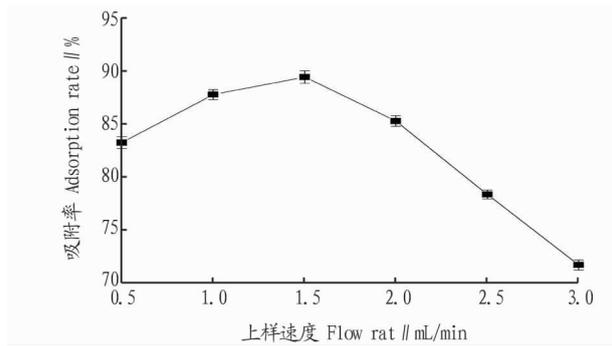


图7 上样速度对D101大孔树脂吸附率的影响

Fig.7 Effect of the flow rate on the adsorption rate of macro-porous resin D101

2.5.3 洗脱剂浓度对柞树叶总黄酮解析率的影响。由图8可知,随着洗脱液乙醇浓度的增大,D101大孔树脂对柞树叶总黄酮解析率显示逐渐上升,当乙醇浓度升高至40%时,其解析率相对最高(79.37%),当乙醇浓度高于40%后,对总黄酮解析率开始降低,由此可选择40%乙醇作为洗脱液。

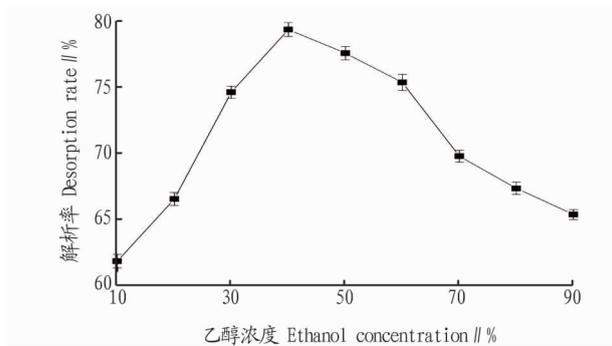


图8 不同浓度乙醇对柞树叶总黄酮解析率的影响

Fig.8 Effect of different concentrations of ethanol on the desorption rate of total flavonoids in Tussah leaves

2.5.4 洗脱流速对柞树叶总黄酮解析率的影响。从图9可以看出,随着洗脱速度的增加,树脂解析率逐渐增大,之后出现下降,当洗脱速度为1.5 mL/min时,D101大孔树脂对柞树叶总黄酮解析率达到最高(79.19%),随着洗脱速度增加解析率开始出现平稳下降,因此最佳洗脱速度可选择1.5 mL/min。

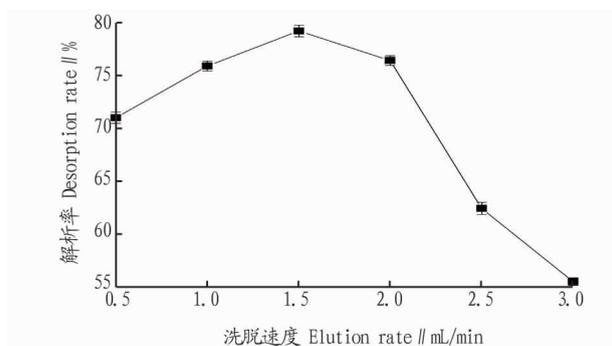


图9 洗脱流速对柞树叶总黄酮解析率的影响

Fig.9 Effect of eluting flow rate on the desorption rate of total flavonoids in tussah leaves

2.6 纯化前后总黄酮的纯度 根据计算得出纯化前、纯化

后的柞树叶总黄酮纯度分别为18.35%和65.50%,经过纯化后,总黄酮的纯度提高2.57倍。

2.7 柞树叶总黄酮抗氧化能力研究

2.7.1 DPPH 自由基清除试验。以 V_c 作为对照,计算不同质量浓度的柞树叶总黄酮和 V_c 对DPPH自由基的清除率,试验结果见图10。在0.01~0.05 mg/L浓度范围内,柞树叶总黄酮和 V_c 对DPPH自由基的清除率都随着浓度的增大而增强,并且在0.01~0.04 mg/L浓度下柞树叶总黄酮对DPPH自由基的清除率大于 V_c ,在浓度为0.03 mg/mL时,柞树叶总黄酮对DPPH自由基清除率已达到85.9%。柞树叶总黄酮和 V_c 清除DPPH自由基半数抑制浓度 IC_{50} 分别为0.019和0.023 mg/L。

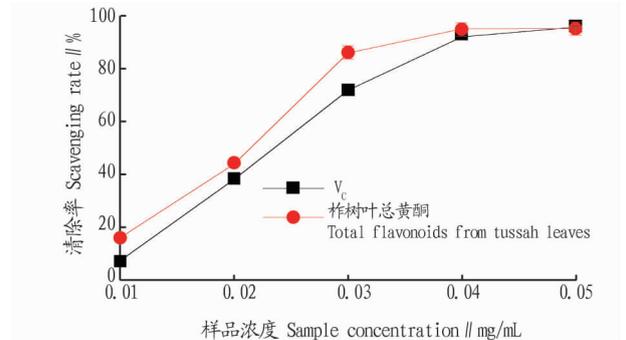


图10 柞树叶总黄酮对DPPH自由基的清除率

Fig.10 Scavenging rate of total flavonoids from tussah leaves on DPPH free radical

2.7.2 柞树叶黄酮总还原能力的测定。从图11可以看出,柞树叶总黄酮具有很强的还原能力,随着浓度的增大其还原能力逐渐增强,柞树叶总黄酮的总还原能力在测定浓度0.005~0.200 mg/mL明显高于 V_c 。

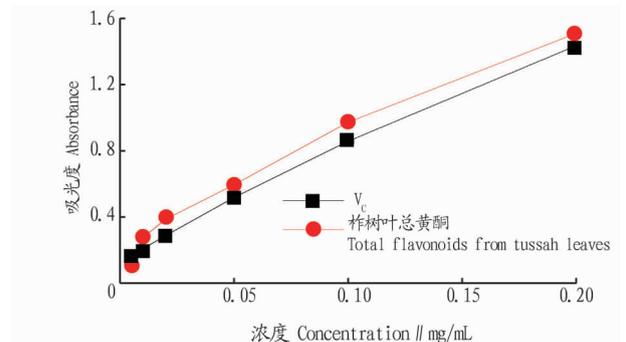


图11 柞树叶总黄酮的还原能力

Fig.11 Reduction ability of total flavonoids from tussah leaves

2.7.3 柞树叶总黄酮对超氧阴离子自由基的清除能力。从图12可以看出,试验在0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.70 mg/mL质量浓度范围内,柞树叶总黄酮对超氧阴离子的清除能力与其浓度呈正相关,随着柞树叶总黄酮浓度增加其清除能力逐渐增强,当试验浓度为0.30 mg/mL时,柞树叶总黄酮对超氧阴离子的清除率为65.9%。

3 讨论与结论

该研究利用静态吸附与解析试验研究了大孔树脂分离纯化柞树叶总黄酮的工艺,对6种大孔树脂(D101、X-5、

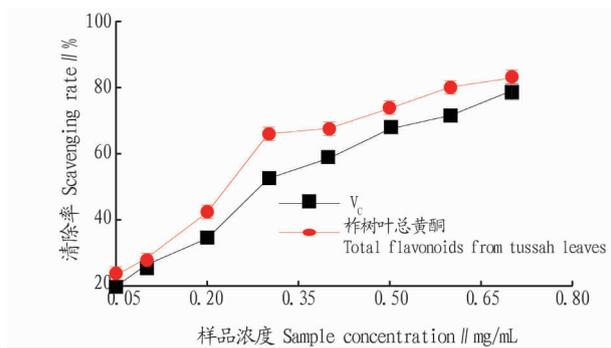


图 12 柞树叶总黄酮抗超氧阴离子能力

Fig. 12 Anti-hyperoxygen anion capacity of the total flavonoids from tussah leaves

D4020、AB-8、D1400 和 DA201) 吸附和解析单因素影响进行筛选, 确定 D101 大孔树脂是分离纯化柞树叶总黄酮较理想的树脂类型, 静态吸附率为 90.82%, 解析率为 79.43%。初步确定其纯化最佳条件为静态吸附时间 5 h、动态吸附最佳上样流速 1.5 mL/min、上样液浓度 0.55 mg/mL、洗脱剂 40% (V/V) 乙醇、洗脱流速 1.5 mL/min, 在此条件下纯化柞树叶总黄酮含量为 65.50%, 比纯化前柞树叶粗提取物中总黄酮含量 (18.35%) 提高 2.57 倍, 该方法能够有效提高柞树叶总黄酮含量, 为进一步开发柞树叶药理作用的活性成分奠定一定物质基础。

在柞树叶总黄酮制备的基础上, 以 V_c 作对照, 对柞树叶总黄酮对其总还原力及 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基清除能力进行评价, 结果表明, 柞树叶总黄酮的含量与抗氧化作用呈正相关。柞树叶总黄酮还原力、DPPH 自由基清除能力和超氧阴离子自由基清除能力都大于 V_c, 作用也随着浓度增大而增强; 且总黄酮对 DPPH 半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 0.019 mg/mL, 浓度为 0.03 mg/mL 时对 DPPH 的清除率为 85.9%, 浓度为 0.30 mg/mL 时其对超氧阴离子自由基清除率为 65.9%。这些结果表明纯化后的柞树叶总黄酮具有较强的抗氧化活性。

柞树叶中黄酮类化合物提取工艺及其抗氧化能力的研究为柞树叶的进一步开发利用提供了理论依据。但要想获

得更高纯度的柞树叶总黄酮, 对于大孔树脂种类的选择、纯化条件等因素的确定有待于进一步深入研究。总之, 大孔吸附树脂能够为天然产物的分离纯化及产品开发提供更多技术支持。

参考文献

- [1] 秦利, 李树英. 中国柞蚕学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
- [2] 岳冬梅, 王林美, 李树英. 五种柞树叶营养成分分析[J]. 北方蚕业, 2017, 38(4): 20-23.
- [3] 张树军, 宋鑫, 姚佳, 等. 柞树叶化学成分研究[J]. 中草药, 2013, 44(6): 665-670.
- [4] 王林美, 岳冬梅, 夏兴宏, 等. 柞树叶提取液的体外抑菌活性试验[J]. 蚕业科学, 2016, 42(2): 331-335.
- [5] 王林美, 岳冬梅, 耿成燕, 等. 柞树叶水提取物对II型糖尿病模型小鼠的治疗作用[J]. 蚕业科学, 2017, 43(4): 677-683.
- [6] 马锐, 吴胜本. 中药黄酮类化合物药理作用及作用机制研究进展[J]. 中国药物警戒, 2013, 10(5): 286-290.
- [7] 陈义磊, 木合塔尔·吐尔洪, 木尼热·阿布都克力木. 大孔树脂纯化牛舌草总黄酮的工艺优化[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2017, 50(6): 85-89.
- [8] 唐岚, 姜燕清, 计燕萍, 等. 大孔树脂纯化秋茄叶总黄酮及其抗氧化活性研究[J]. 浙江工业大学学报, 2016, 44(5): 519-523.
- [9] 吴成强, 边康玲, 杨清. S-8 树脂对苯并三氮唑的吸附性能研究[J]. 浙江工业大学学报, 2014, 42(4): 426-430.
- [10] 谭贻兵. 大孔树脂在天然产物提取分离中的应用[J]. 菏泽学院学报, 2007, 29(2): 81-83, 126.
- [11] 让凤菊, 刘伟, 欧阳艳. 大孔树脂分离纯化伊犁野核桃叶总黄酮的工艺研究[J]. 伊犁师范学院学报(自然科学版), 2017, 11(4): 62-67.
- [12] SUN P C, LIU Y, YI Y T, et al. Preliminary enrichment and separation of chlorogenic acid from *Helianthus tuberosus* L. leaves extract by macroporous resins [J]. Food Chem, 2015, 168: 55-62.
- [13] 胡秩娟, 梁卫青, 张宏建, 等. 土鳖儿总生物碱的提取和纯化工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(1): 57-61.
- [14] 娄晓晶, 李波, 陆婷婷, 等. 大孔树脂纯化铁皮石斛叶中总黄酮的研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(11): 1338-1342.
- [15] 贾韶干, 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.
- [16] HAYAT K, ZHANG X M, CHEN H Q, et al. Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity[J]. Separation and purification technology, 2010, 73(3): 371-376.
- [17] MAKSIMOVIĆ Z, MALEŃČIĆ D, KOVAČEVIĆ N. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts[J]. Bioresource technology, 2005, 96(8): 873-877.
- [18] 向志军, 赵广荣, 元英进, 等. 复方丹参的体外抗氧化活性研究[J]. 中草药, 2006, 37(2): 211-213.
- [19] 柴建新, 万茵, 付桂明, 等. 杜仲叶总黄酮含量测定方法优化[J]. 中国食品学报, 2013, 13(4): 225-230.