

## 辽五味子黄酮纯化及定性光谱分析

马涛<sup>1,2</sup>, 毛红燕<sup>2</sup>, 石太渊<sup>1</sup>, 张睿<sup>1</sup>

(1. 辽宁省农业科学院 食品与加工研究所, 辽宁 沈阳 110161; 2. 沈阳农业大学 食品学院, 辽宁 沈阳 110161)

**摘要:** 选用 4 种大孔树脂对辽五味子黄酮进行了静态吸附与解吸附试验。结果表明, HZ-818 型树脂对黄酮的吸附率可达 76.24%, 解吸率达到 67.30%, 与其他 4 种型号树脂相比最适宜于辽五味子黄酮的分离纯化。通过对 HZ-818 树脂动态吸附试验, 确定黄酮加样质量浓度为 1.6 mg/mL 时, 上样体积为 65 mL, 上样流量 1 mL/min, 洗脱流量 1.5 mL/min, 用体积分数 70% 的乙醇进行洗脱, 洗脱液用量为 110 mL, 可达到较好的洗脱效果, 洗脱率可达到 79.57%。提取物经光谱分析, 证实为黄酮类化合物。

**关键词:** 辽五味子; 黄酮; 大孔吸附树脂; 光谱分析

**中图分类号:** Q 657.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)01-0101-05

## Separation Purification and Spectrum of Flavonoids from *Liao Schisandra chinensis*

MA Tao<sup>1,2</sup>, MAO Hong-yan<sup>2</sup>, SHI Tai-yan<sup>1</sup>, ZHANG Rui<sup>1</sup>

(1. Food Processing Institute, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161, China 2. School of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

**Abstract:** This manuscript select four different macroporous resins that were used to static adsorption and desorption attached experiment for flavonoids of *Liao Schisandra chinensis* (*Turcz.*) *Baill.* Among them, the highest adsorption capability of 76.24% and desorption rate of 67.30% were achieved at macroporous resin HZ-818 and was chosen. By using resin HZ-818, the optimum process conditions was determined and listed as follows: sample concentration 1.6 mg/mL, the sample size 65ml, and sample flow rate 1mg/min; 70% ethanol as eluent at 1.5 mL/min, and eluent dosage for 110 mL. Under the optimum conditions, the elution ratio of flavones achieved at 79.57%.

**Key words:** *Liao Schisandra chinensis*, favones, macroporous adsorption resin, spectral analysis

辽五味子(*Liao Schisandra chinensis*), 木兰科植物也称为“北五味子”, 主产地为我国辽宁省, 是药食同源功能性保健食品<sup>[1]</sup>。目前, 我国对辽五味子的化学成分研究比较深入, 已报道的有木脂素、三萜、倍半萜、有机酸、挥发油及多糖等成分<sup>[2-4]</sup>。

但是, 关于辽五味子含黄酮的研究尚未见报道。

大孔吸附树脂是一类吸附分离材料, 由于其自身具有多孔结构, 可根据空隙大小对化学成分进行机械筛分, 同时又带有极性基团, 可通过范德华力和形成氢键对极性相近的化学成分进行选择性地吸

收稿日期: 2011-01-13

作者简介: 马涛(1962-), 男, 新疆喀什人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事粮油食品储藏保鲜与深加工研究。

Email: matao-09@163.com

附<sup>[6]</sup>。它不溶于酸、碱及各种有机溶剂且有较好吸附性能的有机高聚物吸附剂,近年来逐渐被应用于中草药化学成分的提取、分离、纯化和中药新药的开发研制<sup>[6-7]</sup>。为更好地开发利用辽五味子黄酮类物质,作者采用大孔树脂对辽五味子黄酮进行纯化及定性分析,为辽五味子的合理利用提供一定的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

**1.1.1 试验材料** 辽五味子:购于辽宁省桓仁县;试验用水均为蒸馏水;芦丁标准品:中国药品生物制品检定所产品;AB-8、HZ-818、NKA-9、D-101 大孔吸附树脂:安徽三星树脂有限公司产品;亚硝酸钠、硝酸铝、无水乙醇、氢氧化钠、石油醚(60~90℃):均为分析纯。

**1.1.2 试验仪器** DHL-A 电脑恒流泵:上海沪西分析仪器厂产品;DBS-160 电脑全自动部分收集器:上海沪西分析仪器厂产品;DZF-6050 型真空干燥箱:上海一恒科技有限公司产品;JY92-II 超声波细胞粉碎机:宁波新芝生物科技股份有限公司产品;XA-1 型固体样品粉碎机:河南省巩义市光压仪器厂产品;7200 型可见分光光度计:尤尼柯(上海)有限公司产品;TDL-5000B 型离心机:上海安亭科学仪器厂产品;Avatar 330 傅立叶红外分光光度计:美国 Thermo Nicolet 公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 辽五味子黄酮的提取** 辽五味子果实→低温下烘干(50℃)→粉碎机粉碎→过筛→按 1 g:25 mL 的料液质量体积比加体积分数 65% 的乙醇溶剂浸润→超声处理(300 W, 15 min)→离心→提取液旋转蒸发挥发去乙醇,浓缩→石油醚脱脂→旋转蒸发挥发去石油醚→待纯化黄酮液

**1.2.2 黄酮含量测定**  $\text{AlCl}_3$  比色法<sup>[8]</sup>。

**1.2.3 树脂的预处理与再生** 用体积分数 95% 乙醇浸泡 48 h,充分溶胀后用蒸馏水洗至无醇,用质量分数 5% 氢氧化钠溶液浸泡 12 h,蒸馏水洗至中性,再用质量分数 5% 盐酸溶液浸泡 12 h,用蒸馏水洗至中性,备用。

### 1.2.4 静态试验

1)静态吸附量考察<sup>[9]</sup> 用滤纸吸干预处理好

的树脂表面的水分后,准确称取 1.0 g,置于 250 mL 具塞磨口三角瓶中,加入黄酮质量浓度为 1.6 mg/mL 的辽五味子黄酮的待纯化液 30 mL,25℃下,置于摇床(150 r/min)振荡 12 h,然后静置 12 h 使其充分吸附,平行 3 份,测定此时溶液中的总黄酮的含量,按照下式计算吸附量(Q)、吸附率(A)。

$$Q = (C_0 - C_r) \times V / W$$

$$A(\%) = (C_0 - C_r) / C_0 \times 100$$

式中:Q 为吸附量(mg/g); $C_0$  为起始质量浓度(mg/mL); $C_r$  为剩余质量浓度(mg/mL);V 为溶液体积(mL);W 为树脂质量(g);A 为吸附率。

2)静态解吸性能考察 将上述已吸附饱和的大孔吸附树脂滤出,用滤纸吸干药液(用蒸馏水清洗至树脂表面无黄酮溶液残留),置于 250 mL 锥形瓶中,精确加入体积分数 70% 乙醇 30 mL,置于摇床(150 r/min)振荡 12 h,然后静置 12 h,滤液进行含量测定,平行 3 份,测出吸收度值并计算静态解吸率。

$$D(\%) = (50 \times C_r) / (W \times Q) \times 100$$

式中:D 为解吸率;Q 为吸附量(mg/g); $C_r$  为解吸后溶液中总黄酮的质量浓度(mg/mL);W 为树脂干重(g)。

3)静态吸附动力学曲线的绘制 分别准确称取 1.0 g 预处理好的树脂,置于 250 mL 三角瓶中,各加入 30 mL 辽五味子黄酮待纯化液(黄酮质量浓度为 1.6 mg/mL),25℃下振荡(150 r/min)12 h,每隔 1 h 移取 0.1 mL 上清液,用体积分数 80% 乙醇定容至 10 mL,测定其黄酮含量,绘制静态吸附动力学曲线。

**1.2.5 动态试验** 通过静态试验,选择出一种较优的树脂,对上样量、上样流速、洗脱液浓度、解析流速、洗脱体积进行动态吸附实验。将预处理好的树脂湿法装入( $D1.6 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$ )玻璃层析柱中,大孔吸附树脂充分自然沉降,使填装高度为柱高的 2/3。将黄酮提取液上柱,待样品溶液全部通过树脂柱后用 4BV 的去离子水洗至流出液无色,用不同体积分数的乙醇以一定洗脱速度洗脱,收集洗脱液。通过测定总黄酮含量考察各因素对树脂吸附性能的影响,确定最佳吸附工艺条件。

### 1.2.6 定性光谱分析

1)紫外测定 分光光度计法:亚硝酸钠,硝酸铝显色法。

2)红外测定 KBr 压片法。

## 2 结果与分析

### 2.1 辽五味子黄酮的纯化

**2.1.1 大孔吸附树脂的选择** 4种大孔树脂预处理后,对辽五味子黄酮的静态吸附及解析实验,测得各种树脂对黄酮的吸附与解吸结果见表1。结果表明,树脂 HZ-818 吸附黄酮效果最好,其次是 NKA-9 树脂,黄酮吸附量都在 35 mg/g 以上。每种树脂对黄酮的解吸结果分析表明, HZ-818 树脂的黄酮解吸率较大,而 NKA-9 虽然吸附率较大,但是解吸较困难。

表1 不同树脂对五味子黄酮的吸附与解吸结果

Tab. 1 Adsorption capabilities and desorption rates of *Liao Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill flavones

| 树脂型号   | 吸附量/<br>(mg/g) | 吸附率/% | 解析率/% |
|--------|----------------|-------|-------|
| AB-8   | 29.484         | 61.77 | 44.95 |
| HZ-818 | 36.390         | 76.24 | 67.30 |
| NKA-9  | 35.635         | 74.43 | 53.59 |
| D101   | 32.280         | 67.63 | 56.78 |

仅用树脂的平衡吸附量和解吸率来评价其吸附性能是不全面的,合适的树脂不仅要具有较大的吸附量、良好的解吸率,同时应具有较快的吸附速率,所以我们又研究了其静态吸附动力学特征。图1为3种树脂的静态吸附动力学曲线。

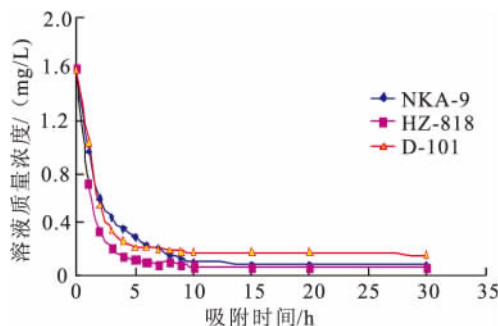


图1 大孔树脂静态吸附动力学曲线

Fig. 1 Static-adsorption dynamic curve of macroporous resins

由图1可知, HZ-818 树脂对辽五味子黄酮的吸附为快速平衡型,起始阶段吸附量较大,5 h已基本接近吸附平衡,而 NKA-9 种树脂起始吸附量虽较大,但到达平衡的时间较长,10 h后才基本接近吸附平衡, D-101 树脂吸附量相对较少。结合树脂

对辽五味子黄酮的吸附与解吸效果,选择 HZ-818 树脂进行动态吸附试验。

### 2.1.2 动态吸附-解析试验结果

1) 上样流量及上样量的确定 通过调节恒流泵的流量对上柱样液进行吸附流量的选择,以泄漏点最迟出现的吸附流量为宜<sup>[10]</sup>。

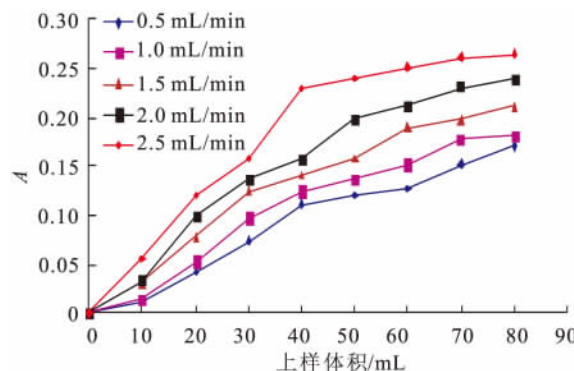


图2 吸附流量与吸光度关系图

Fig. 2 Relationship between adsorption velocity and absorbance

在上样质量浓度均为 1.591 mg/mL, 样液体积均为 80 mL 的条件下,控制流量分别进行动态吸附试验。5种吸附流速下的泄漏情况如图2所示。由计算可知,流量为 0.5、1、1.5、2.0、2.5 mL/min 时,泄漏点依次为 71、67、50、43、40 mL。流量为 0.5 mL/min 时,虽然渗漏点出现的最迟,但因为流速慢,导致循环周期延长,工作效率低。而进样速度为 1 mL/min 时,泄漏点尽管出现得稍早,但工作效率高于 0.5 mL/min。其它条件下泄漏点出现的太早,吸附效率低,而且在试验过程中发现,速度过快容易导致进样管堵塞。因此上样流量定为 1 mL/min,上样量为 65 mL。

2) 洗脱液体积分数的确定 不同体积分数的乙醇极性不同,对黄酮的洗脱能力也不同。取已处理好的大孔吸附树脂柱,将待纯化液以 1 mL/min 流速上样,上样量为 65 mL。用 5 BV 蒸馏水洗脱,除去蛋白质和多糖,然后依次用 6 BV 体积分数 10%、30%、50%、70% 和 90% 的乙醇梯度洗脱,流量定为 2 mL/min,测定各部分洗脱液中总黄酮的含量,计算各部分解吸率。结果如图3所示,用体积分数 70% 乙醇洗脱时不仅能将大部分黄酮洗脱下来,而且最节省乙醇用量。

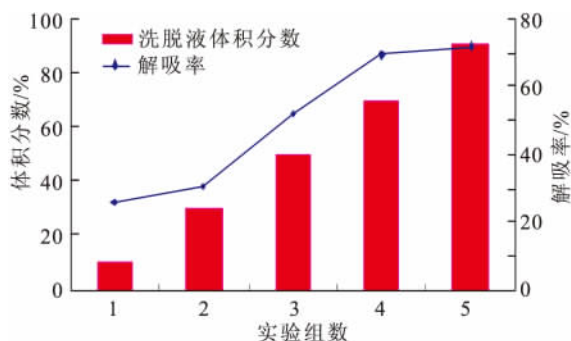


图3 不同洗脱剂体积分数对黄酮纯化的影响

Fig.3 Effect of the concentration of ethanol on Purification

3) 洗脱液流量的影响 洗脱液流量直接影响大孔吸附树脂对总黄酮的洗脱效果。流量过大容易形成拖尾现象且洗脱不彻底, 过小则生产周期明显延长, 成本增加。试验采用吸附黄酮后的树脂柱以体积分数 70% 的乙醇为洗脱液, 洗脱流量分别对应 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min。对解析效果作比较, 结果如图 4 所示。

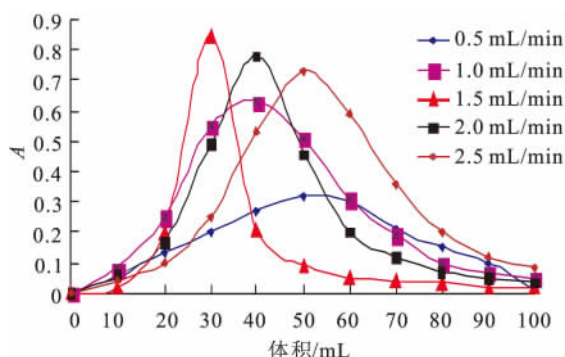


图4 不同解吸流量与吸光度的关系

Fig.4 Relationship between desorption velocity and absorbance

由图 4 可以看出, 以 1.5 mL/min 的流量进行洗脱得到的峰形没有明显拖尾现象, 洗脱时间最短, 效率最高, 而 2.0 mL/min 和 2.5 mL/min 的洗脱峰比 1.5 mL/min 的峰形宽且拖尾比较严重, 表明洗脱不彻底, 效率较低。1.0 mL/min 虽然洗脱率于 1.5 mL/min 时相当, 但是洗脱时的峰拖尾严重, 洗脱时间明显延长, 效率低下, 不利于生产。因此选择解析流量为 1.5 mL/min 为宜。

4) 洗脱液用量的确定 吸附黄酮后的树脂柱以体积分数 70% 的乙醇为洗脱液, 洗脱流量控制为 1.5 mL/min。用部分收集器收集洗脱液, 6 mL/管, 测定其吸光度, 结果如图 5 所示。

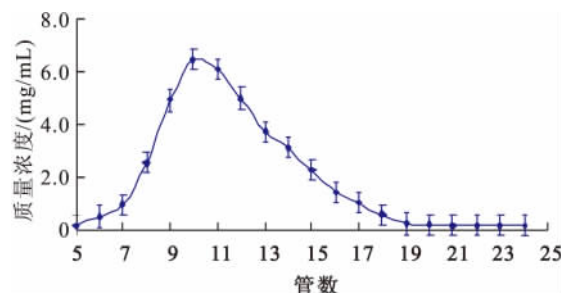


图5 不同洗脱剂用量对异黄酮纯化的影响

Fig.5 Effect of the dosage of ethanol on Purification

由图 5 可知, 随着洗脱液用量的增加, 洗脱液中黄酮质量浓度逐渐增加, 第 10 管洗脱液中黄酮质量浓度最高。随着洗脱时间的延长, 随后各部分洗脱液中异黄酮质量浓度逐渐减少, 至第 19 管时几乎没有所要的黄酮成分可以洗脱下来。因此, 大孔吸附树脂的乙醇洗脱量为 110 mL。

## 2.2 定性光谱分析

2.2.1 辽五味子黄酮的紫外—可见光谱分析 辽五味子黄酮提取物加入  $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  和  $\text{NaOH}$  显色处理后, 经过紫外—可见分光光度计扫描得到图谱 6。由图可知, 紫外—可见光谱中有两个主要的吸收峰组成, 其中之一出现在 430~450 nm (峰带 II), 另一个在 490~500 nm (峰带 I)。一般来说, 峰带 II 是苯甲酰基引起的, 而峰带 I 是由桂皮酰基系统引起。

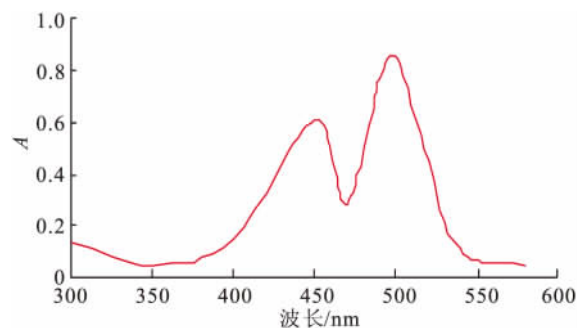


图6 紫外—可见光谱

Fig.6 UV-visible spectrum

2.2.2 辽五味子黄酮的红外分析 取经过干燥的辽五味子黄酮样品 1 g, 与 100~200 mg 经干燥的 KBr 粉末在红外灯下, 于玛瑙研钵研磨均匀, 压成薄片, 进行红外光谱测定<sup>[11]</sup>, 结果如图 6 所示。由图可见, 波数 3 415.76  $\text{cm}^{-1}$  为黄酮类化合物的羟基吸收峰; 2 935.61  $\text{cm}^{-1}$  分子中饱和碳氢伸缩振动产生; 波数 1 735.17  $\text{cm}^{-1}$  的吸收峰是由  $\text{C}=\text{O}$  引

起。 $1\,518.48\text{ cm}^{-1}$ 为芳环振动吸收引起;图中 $1\,074.21\text{ cm}^{-1}$ 为烷烃吸收峰;综上所述,推测提取物为多羟基黄酮类物质。

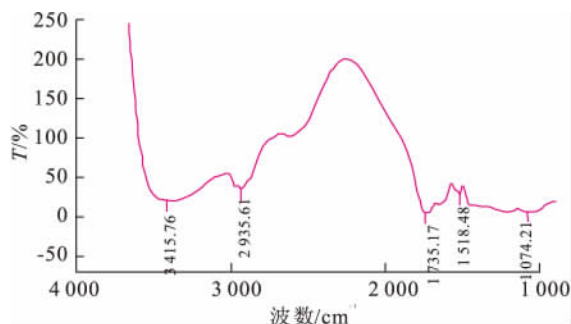


图7 黄酮的红外光谱图

Fig. 7 IR-spectrum of *Ampelopsis gross edentate* flavones

## 参考文献(References):

- [1] 王森,张建国. 五味子的研究概况及期开发前景[J]. 经济林研究, 2003, 21(4): 126—127.  
WANG shen, ZHANG jian-guo. General situation and developmental prospect on *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill[J]. *Current Researching Situation on Forest area*, 2003, 21(4): 126—127. (in Chinese)
- [2] 唐德才. 中药现代研究与临床应用(第一卷)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997.
- [3] 戴好富, 周俊, 彭再刚, 等. 北五味子的水溶性化学成分[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 13(1): 24—26.  
DAI hao-fu, ZHOU jun, PENG Zai-gang, et al. Water - soluble chemical composition of fructus schisandrae[J]. *Nature Product Research and Development*, 2000, 13(1): 24—26. (in Chinese)
- [4] 李恒. 北五味子的现代研究[J]. 中国林副特产, 2008, 96(5): 97—99.  
LI Heng. Current study of northeast schisandra chinensis (Turcz.) Baill[J]. *Forest By-Product and Speciality in China*, 2008, 96(5): 97—99. (in Chinese)
- [5] 曹群华, 瞿伟菁, 李家贵, 等. 大孔树脂吸附纯化沙棘籽渣总黄酮的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29 (3): 225—228.  
CAO Qun-hua, ZHAI Wei-jing, LI Jia-gui, et al. Study on the purification capability of macroreticular resin flavonoids from seed residues of Hippophae rhamnoides (FH)[J]. *Magazine on Medicine of Chinese*, 2004, 29 (3): 225—228. (in Chinese)
- [6] 麻秀萍, 蒋朝晖, 杨玉琴, 等. 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.  
MA Xui-ping, JIANG Cao-hui, YANG Yu-qin, et al. Study on the adsorption capability of macroreticular resin to flavonoids on the leaves of Ginkgo biloba[J]. *Magazine on Medicine of Chinese*, 1997, 22 (9): 539—542. (in Chinese)
- [7] 荣绍丰, 付艳丽, 王涛, 等. 大孔吸附树脂对发酵液中 2-苯乙醇的吸附研究[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(5): 693—697.  
RONG Shao-feng, FU Yan-li, WANG Tao, et al. Study on the adsorption capability of macroreticular resin to fermentation broth of 2 - phenyl ethanol adsorption[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, 29(5): 693—697. (in Chinese)
- [8] 熊浩平. 分光光度法测定显齿蛇葡萄总黄酮含量[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 144—145.  
XIONG Hao-ping. Determination the total flavonoids Ampelopsis content with spectrophotometry[J]. *Food Science*, 2004, 25(2): 144—145. (in Chinese)
- [9] 陈玉琼, 李安琪, 孟燕. 大孔树脂纯化藤茶黄酮及主要成分结构鉴定[J]. 食品科学, 2009, 30(9): 51—55.  
CHEN Yu-qiong, LI An-qi, MENG Yan. Purification flavonoids and major components identification on Ampelopsis[J]. *Food Science*, 2009, 30(9): 51—55. (in Chinese)
- [10] 杨红. 中药化学实用技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [11] 沈秋仙. 槲蕨根茎黄酮类物质提取条件的优化[J]. 丽水学院学报, 2005, 27(5): 64—66.  
SHEN quixian. Optimization of extracting condition of flavonoids from rhizoma of drynaria rhizoma drynariae[J]. *Journal of Lishui University*, 2005, 27(5): 64—66. (in Chinese)

## 3 结 语

通过对所选 4 种树脂辽五味子黄酮的吸附与解吸性能的研究, 筛选出 HZ-818 树脂为理想的分离纯化的树脂, 其吸附率为 76.24%, 解吸率为 67.30%。

HZ-818 树脂对辽五味子黄酮吸附分离的最佳工艺参数为: 上柱量为 65 mL, 上柱流量 1 mL/min, 以体积分数 70% 乙醇为洗脱液控制洗脱液流量 1.5 mL/min, 洗脱液用量为 110 mL。纯化物经光谱分析表明是多羟基黄酮类化合物。