



铁皮石斛叶总黄酮的大孔树脂纯化工艺及抗氧化活性

高海立, 郁吉锋, 黄路瑶, 钱央央, 徐 涛

(浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018)

摘 要: 研究铁皮石斛叶总黄酮(Total flavonoids of *Dendrobium officinale* leaf, TFDL)的 D101 型大孔吸附树脂纯化工艺及其抗氧化活性。以动态吸附率、解吸率和总黄酮含量为指标,对影响大孔吸附树脂纯化效果的因素进行分析,确定最优的吸附-解吸附工艺条件;以抗坏血酸(Vc)和乙二胺四乙酸(EDTA)为阳性对照,采用 1,1-二苯基-2-苦肟基自由基(DPPH)法、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐阳离子自由基(ABTS⁺)法和菲洛嗪(Ferrozine)法测定 TFDL 对 DPPH 和 ABTS⁺ 的抗氧化活性以及对金属离子(Fe²⁺)的螯合能力。结果表明:总黄酮的最佳纯化工艺为上样液浓度 2.2 mg/mL、上样液体积 16 倍床体积(Bed volume, BV)、上样液 pH 值 2.4、洗脱液 80%乙醇、洗脱体积 3.25 BV(解吸率达到 90.83%),室温,总黄酮含量可达到 193.95 mg/g;在 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除以及 Fe²⁺ 的螯合 3 种抗氧化体系中,TFDL 抗氧化活性具有浓度依赖性,清除 DPPH、ABTS⁺ 和 Fe²⁺ 的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 0.1123、0.7845 mg/mL 和 0.6434 mg/mL,其中对 DPPH 的清除能力最强,即 TFDL 具有较强的提供氢原子的能力。D101 大孔吸附树脂适用于对 TFDL 的分离纯化,铁皮石斛叶总黄酮类化合物具有较强的抗氧化活性,有进一步开发的價值。

关键词: 铁皮石斛叶;总黄酮;D101 大孔吸附树脂;纯化;抗氧化活性

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2019)05-0380-07

Study on total flavonoids purification by macroporous adsorption resin and antioxidant activity of *Dendrobium officinale* leaf

GAO Haili, YU Jifeng, HUANG Luyao, QIAN Yangyang, XU Tao

(College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: It aims to study the purification process by D101 macroporous resin and antioxidant activity of total flavonoids of *Dendrobium officinale* leaves. Analyses were made on the factors influencing the purification effect of macroporous adsorption resin from the aspect of dynamic adsorption ratio, desorption ratio and total flavonoid content as evaluation factors, to determine the optimum purification-desorption process conditions. The antioxidant activity of TFDL to DPPH and ABTS⁺ and its chelating ability to metal ion (Fe²⁺) were measured via DPPH, ABTS⁺ and ferrozine methods with Vc and EDTA as positive control. The results indicate that the optimal purification conditions of total flavonoids are: loading buffer of concentration of 2.2 mg/mL, 16 bed volume (BV), and of 2.4 pH value, 80%-ethanol-contained eluent of elution volume of 3.25 BV (desorption rate up to 90.83%), and room temperature, under which the content of total flavonoids can reach 193.95 mg/g. In the three antioxidant systems of DPPH and ABTS⁺ radicals scavenging and Fe²⁺ chelating, the antioxidant activity of TFDL depends on concentration, the half inhibitory concentrations (IC₅₀) for DPPH, ABTS⁺ and Fe²⁺ scavenging were 0.1123 mg/mL, 0.7845 mg/mL and 0.6434 mg/mL respectively; the DPPH radical scavenging capacity was strongest, namely TFDL

收稿日期: 2018-12-13 网络出版日期: 2019-03-05

作者简介: 高海立(1991-),男,山东菏泽人,硕士研究生,主要从事天然药用植物资源开发方面的研究。

通信作者: 徐 涛, E-mail: xutao1998cn@163.com

has a strong ability to provide hydrogen atoms. D101 macroporous adsorption resin is suitable for separation and purification of TFDL, and the compounds of TFDL are of strong antioxidant activity. It is worth further development.

Key words: *Dendrobium officinale* leaf; total flavonoids; D101 macroporous resin; purification; antioxidant activity

0 引言

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo),属多年生草本植物,传统名贵中药材,常取茎部入药;迄今为止,有关石斛茎成分分析和药理药效研究已有大量报道^[1-2],但对其他部位的药用成分研究仍有不足。铁皮石斛叶属于非药用部位,在石斛植株中占很大比例,其中黄酮类化合物为其主要有效成分^[3]。黄酮类化合物一种普遍存在于高等植物中的次生代谢产物,具有广泛的药理活性,如抗氧化、抗肿瘤、抗感染和抗病毒等,保护身体免受由氧化应激所诱发的诸多慢性病的侵害^[4-7]。

黄酮类化合物的纯化方法主要有大孔吸附树脂、硅胶柱、聚酰胺、葡聚糖凝胶和高速逆流色谱等^[8-9]。其中大孔吸附树脂利用其多孔结构和选择性吸附功能从天然药物中分离纯化有效成分,具有花费少、纯化效率高、溶剂用量少、易再生等优点,目前已经广泛应用于中药成分研究^[9-11]。不同的树脂由于其极性、粒径、表面积范德华力和氢键相互作用等物理特性的差异,可以用来富集不同的成分^[8]。另外,大孔吸附树脂主要以乙醇-水体系用作洗脱溶剂来解吸目标化合物,无论是对纯化目标产物还是环境都是安全友好的^[12]。

本文选用 D101 大孔吸附树脂对铁皮石斛总黄酮进行分离纯化,通过 DPPH 法、ABTS⁺ 法和 Ferrozine 法对 TFDL 类化合物进行抗氧化活性评价,探讨其对 DPPH、ABTS⁺、Fe²⁺ 的清除能力,为铁皮石斛叶的深度开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

铁皮石斛叶干品,由浙江省湖州市德清牧歌石斛有限公司提供,经粉碎机粉碎,过 60 目筛,备用。

D101 型大孔吸附树脂(Cat # M0041),购于北京索莱宝科技有限公司。

1.2 实验主要仪器与试剂

KQ-250DE 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);721 紫外-可见分光光度计(上海菁

华科技仪器有限公司);纯水仪 Heal Force NW15UV(上海康雷分析仪器有限公司);真空干燥箱(宁波扬辉仪器有限公司);旋转式蒸发器 RE-52 A 型(上海亚容生化仪器厂);DU800 型紫外-可见分光光度计(Beckman, USA);普通层析柱(16×200 mm, Sangon Biotech)。

芦丁标准品(产品编号:SR8250,北京索莱宝科技有限公司);木瓜蛋白酶(2000 U/mg, Sangon Biotech);纤维素酶(110 U/mg, Worthington Biochemical Corporation);DPPH(阿拉丁生化科技股份有限公司);ABTS(北京索莱宝科技有限公司);菲洛嗪(Sangon Biotech)。试剂均为分析纯。

1.3 芦丁标准曲线绘制

参照 Jia 等^[13]的方法并稍加改进。称取 10 mg 芦丁标准品,用 80% 乙醇溶液溶解并定容至 50 mL,配成浓度为 0.2 mg/mL 的标准液。分别取芦丁标准液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 和 6.0 mL,加水至 10 mL;分别加入 1.5 mL 亚硝酸钠(5%),充分摇匀,静置 6 min,加入 1.5 mL 硝酸铝(10%),充分摇匀,静置 6 min;最后加入 4 mL 氢氧化钠(4%),摇匀,并放置 20 min。在 510 nm 波长处测定吸光度,以吸光度(A)为纵坐标,芦丁质量浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线。线性回归方程为 $y = 6.9155x - 0.0123$, $R = 0.9988$ 。

1.4 TFDL 干浸膏制备及总黄酮含量测定

由实验室前期工作得到 TFDL 粗提液的最优化提取工艺:液料比 30:1,乙醇浓度 45%,pH 值 6,酶解温度 55 °C,酶解时间 60 min,复合酶比(纤维素酶:木瓜蛋白酶)1.5:1.0,加酶量 1.0%,超声处理时间 10 min,超声功率 100 W。按标准曲线测定方法确定 TFDL 的提取率为 1.81%。将粗提液 4 °C 静置过夜,过滤,滤液用旋转蒸发仪浓缩(-0.1 MPa, 80 °C),再真空干燥箱(-0.1 MPa, 60 °C)干燥至恒重,得干浸膏,4 °C 储存备用。

1.5 大孔吸附树脂的动态吸附-解吸附

1.5.1 大孔吸附树脂预处理

大孔吸附树脂预处理的方法参考文献^[14-15],具体方法如下:取 D101 大孔吸附树脂用 95% 乙醇浸泡

24 h,湿法装柱,以 95%乙醇连续冲柱,收集流出液,测定在 254 nm 处吸光度,直到与 95%乙醇吸光度值一致时,表明树脂处理干净,水洗至无醇味,备用。

1.5.2 影响大孔吸附树脂纯化效果的单因素分析

准确量取湿树脂 20 mL,按 1.5.1 方法预处理。精确称取铁皮石斛叶总黄酮干浸膏 0.5 g 进行过柱纯化,固定过柱条件为上样速率 4 BV/h,水洗脱速率

4 BV/h,水洗脱体积 3 BV,乙醇洗脱速率 1 BV/h,其它过柱条件见表 1(1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节 pH 值)。以树脂吸附率和吸附量为指标,探究不同上样液浓度(系列一)和不同 pH 值(系列二)对纯化效果的影响;以解吸率和纯化样品中总黄酮含量为指标,探究不同乙醇体积分数(系列三)对纯化效果的影响。

表 1 影响大孔树脂纯化效果的单因素分析

实验系列	因子		
	上样液浓度/(mg·mL ⁻¹)	pH 值	乙醇体积分数/%
系列一	0.6、1.0、1.4、1.8、2.2、2.6	3.6	70
系列二	2.2	1.8、2.4、3.0、3.6、4.8、6.0	70
系列三	2.2	2.4	40、50、60、70、80、90

上述所涉计算公式:

$$E/\% = (C_0 - C_1)/C_0 \times 100 \quad (1)$$

$$Q_e = (C_0 - C_1)V_1/M \quad (2)$$

$$D/\% = C_2V_2/(C_0 - C_1)V_1 \times 100 \quad (3)$$

$$C/\% = C_2V_2/M_p \times 100 \quad (4)$$

其中: E 为吸附率,%; Q_e 为吸附量,mg/g; D 为解吸率,%; C 为纯化后总黄酮含量,mg/g; C_0 为上样液黄酮含量,mg/mL; C_1 为过柱后黄酮含量,mg/mL; V_1 为上样液体积,mL; M 为大孔吸附树脂质量(烘干),g; C_2 为洗脱液黄酮含量,mg/mL; V_2 为洗脱液黄酮体积,mL; M_p 为纯化后得到的总黄酮质量,g。

1.5.3 动态泄露曲线考察

称取铁皮石斛叶总黄酮干浸膏 1.5 g,用水配制成 2.2 mg/mL 的上样液,用 1 mol/L HCl 调至 pH 值为 2.4,按 1.5.2 所得条件过柱处理,每间隔 20 min 收集一管流出液(约 4 mL),测定每管中流出液总黄酮浓度,以上样时间为横坐标, (C_1/C_0) 为纵坐标绘制动态泄露曲线。

1.5.4 动态洗脱曲线考察

称取铁皮石斛叶总黄酮干浸膏 0.7 g,配制成 2.2 mg/mL 的上样液,用 1 mol/L HCl 调至 pH 值为 2.4,按 1.5.2 所得条件过柱处理,用 80%乙醇洗脱,每 5 mL 收集一管,测定每管中洗脱液总黄酮浓度,以洗脱液体积为横坐标,洗脱液中 TFDL 浓度为纵坐标绘制动态洗脱曲线。

1.6 紫外吸收光谱测试

称取铁皮石斛叶总黄酮干浸膏和最优工艺得到的叶总黄酮样品,分别用无水甲醇配制成 0.2 mg/mL 和 0.1 mg/mL 溶液。采用 DU-800 型紫外分光光度计检测 TFDL 在 200~600 nm 范围内的吸收光谱变化,选

用无水甲醇为参比液,扫描速度 240 nm/min,扫描间隔 0.2 nm。

1.7 体外抗氧化活性测定

1.7.1 DPPH 自由基清除

DPPH 自由基清除方法参考文献[16-17],具体为:称取铁皮石斛叶总黄酮干浸膏和纯化后样品,分别用水配成不同浓度的样品溶液(50、100、300、500、1000 μ g/mL 和 1500 μ g/mL)。取 1.5 mL 不同浓度的样品溶液,加入 1.5 mL 0.25 mmol/L DPPH 溶液,摇匀,室温下避光反应 30 min,517 nm 处测定吸光度,记为 A_1 (样品组吸光度)。以 1.5 mL 无水乙醇和 1.5 mL 样品溶液测吸光度,记为 A_2 (样品对照组吸光度)。以 1.5 mL 的 0.25 mmol/L DPPH 溶液和 1.5 mL 水为空白对照,记为 A_0 (空白对照吸光度)。Vc 作阳性对照。计算各浓度的清除率及 IC_{50} 值。DPPH 自由基清除率由 $(1 - (A_1 - A_2)/A_0) \times 100\%$ 计算得出。

1.7.2 ABTS⁺ 自由基清除

ABTS⁺ 自由基清除方法参考文献[18],具体方法为:分别取 0.1 mL 不同浓度(100、300、600、1200、1800 μ g/mL 和 2400 μ g/mL)的黄酮干浸膏样品溶液和纯化后样品溶液,加入 3.9 mL ABTS⁺ 溶液,摇匀,室温下避光反应 7 min,在 734 nm 处测定吸光度,记为 A_i (样品组吸光度)。以 3.9 mL 无水乙醇代替 3.9 mL ABTS⁺ 溶液测吸光度,记作 A_j (样品对照组吸光度)。以 0.1 mL 水代替 0.1 mL 样品溶液作为空白对照,记为 A_k (空白对照吸光度)。Vc 作阳性对照。计算各浓度样品溶液的 ABTS⁺ 清除率及 IC_{50} 值。ABTS⁺ 自由基清除率由 $(1 - (A_i - A_j)/A_k) \times 100\%$ 计算得出。

1.7.3 Fe^{2+} 螯合能力测定

Fe^{2+} 螯合能力测定参考文献[19-20], 具体方法为: 试管中分别加入 1 mL 不同浓度(100、200、400、800、1200 $\mu\text{g/mL}$ 和 1600 $\mu\text{g/mL}$) 的黄酮干浸膏样品溶液和纯化后样品溶液, 3.7 mL 水, 0.1 mL 2 mmol/L 的 FeCl_2 溶液, 混和均匀, 5 min 后加入 0.2 mL 5 mmol/L 的菲洛嗪溶液, 室温放置 10 min 后, 于 562 nm 处测定吸收值, 记为 A_m (样品组吸光度)。以 1 mL 样品溶液和 4.0 mL 水测吸光度, 记为 A_n (样品对照组吸光度)。以 1 mL 水代替样品溶液作为空白对照, 记为 A_1 (空白对照吸光度)。以 EDTA 作阳性对照。计算各浓度的清除率及 IC_{50} 值。 Fe^{2+} 螯合能力由 $(1 - A_m - A_n)/A_1 \times 100\%$ 计算得出。

1.8 数据分析

本文所得数据统计分析和单因素 ANOVN 分析(显著性分析 $P \leq 0.05$)均由 Excel 2010 和 IBM SPSS Statistics 22 完成, 绘图由 OriginPro9.0 完成。

2 结果与分析

2.1 单因素考察结果分析

图 1 是不同因素对 D101 大孔吸附树脂纯化效果的影响。图 1(a) 为上样液浓度对总黄酮吸附率和吸附量的影响, 在 0.6~2.2 mg/mL 范围内, 树脂吸附率和吸附量随上样液浓度增加而增大, 2.2 mg/mL 达到最大值, 分别为 60.71% 和 6.37 mg/g; 上样液浓度 1.8 mg/mL 和 2.2 mg/mL 的吸附率和吸附量差异不显著; 上样液浓度 2.6 mg/mL 时, 吸附率和吸附量值骤降, 其原因可能是上样液浓度太高没有完全溶解, 堵塞树脂, 或泄露点出现太早, 造成黄酮类成分损失, 因此上样液浓度范围为 1.8~2.2 mg/mL。图 1(b) 为上样液 pH 对总黄酮吸附率和吸附量的影响, 在酸性条件下大孔吸附树脂对铁皮石斛总黄酮类化合物的更好的吸附性能, 随着 pH 值(2.4~6.0)增加, 树脂吸附率和吸附量逐渐减小; 当 pH 值为 1.8 时, 上样液中有沉淀析出, 可能为黄酮苷类成分形成的, 故最合适的 pH 值为 2.4。图 1(c) 为乙醇浓度对大孔吸附树脂解吸率和纯化样品中总黄酮含量的影响, 在乙醇浓度为 40%~80% 时, 树脂的解吸率和纯化样品中黄酮类化合物含量迅速增大。进一步增加乙醇浓度, 树脂的解吸率和纯化样品中黄酮类化合物含量不升反降。80% 乙醇为最佳洗脱浓度, 本文选择 80% 乙醇作为洗脱剂。

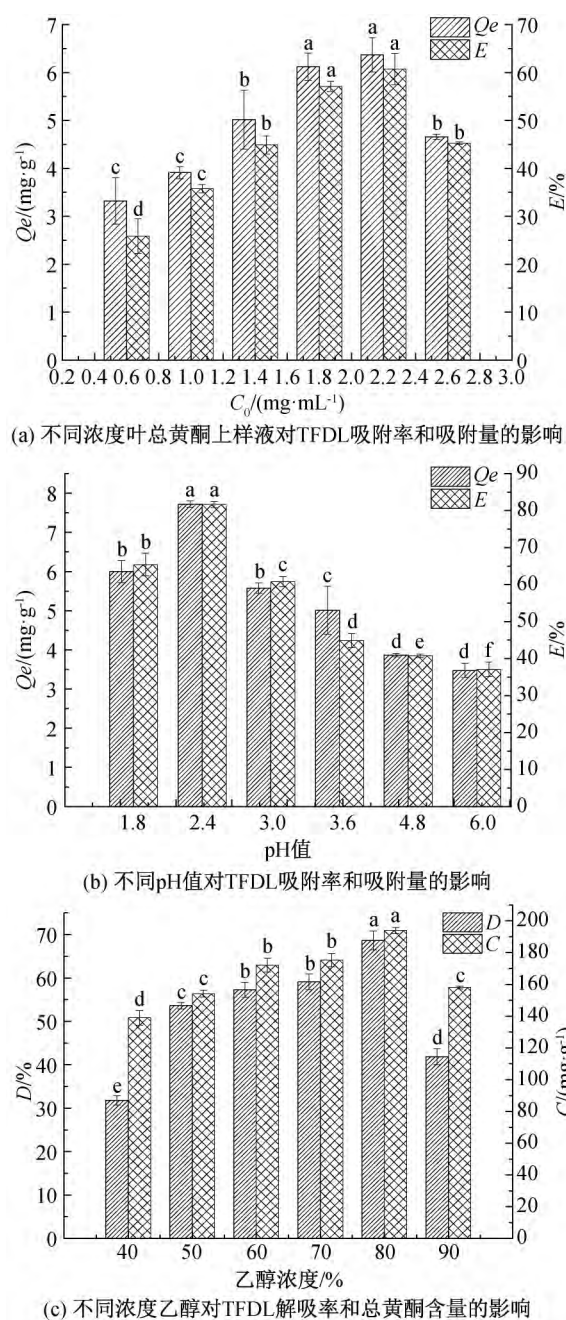


图 1 不同因素对 D101 大孔吸附树脂纯化效果的影响

2.2 动态泄露曲线

为了明确 D101 大孔吸附树脂吸附状态, 确定上样液体积, 对其动态吸附过程进行测定, 结果如图 2 所示。图 2 表明, 160 min 之前有少部分黄酮类成分流出并缓慢增加, 其原因可能是少量极性较大的黄酮类成分不能被非极性的 D101 大孔吸附树脂所吸附。160~280 min 为树脂吸附的稳定期, 280 min 之后, 黄酮类成分的泄露量迅速增加, 280 min 树脂达到饱和和吸附状态。故可以确定上样液体积为 16 倍床体积。

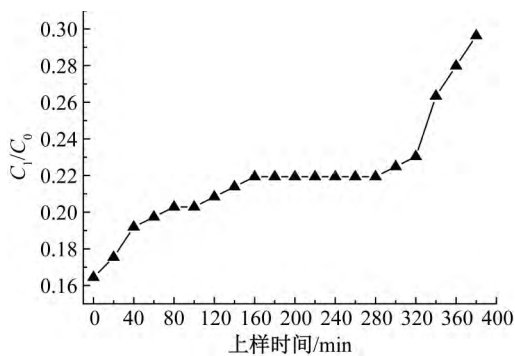


图2 TFDL的动态泄露曲线

2.3 动态解吸附曲线

图3为TFDL的动态解吸附曲线,图3表明:洗脱液中总黄酮含量随着乙醇溶液体积的增加,呈现先增加后减少的趋势。洗脱液中总黄酮含量达到最大值,所需洗脱液体积为20 mL;随着洗脱液体积增加,洗脱液中总黄酮含量迅速降低。洗脱液体积3.25 BV时,解吸率达到90.83%;5 BV时,解吸率达到96.15%。将大部分铁皮石斛叶黄酮类成分从树脂上洗脱下来,至少需要80%乙醇3.25 BV,因此,采用3.25 BV的80%乙醇进行洗脱。

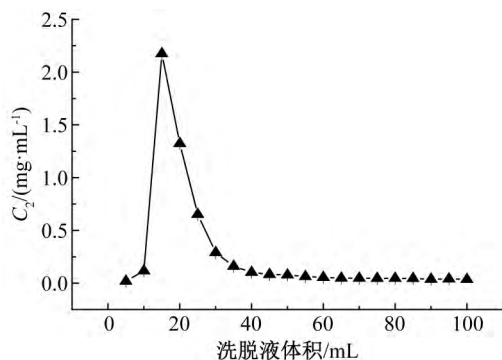


图3 TFDL的动态解吸附曲线

2.4 紫外吸收光谱图

图4为TFDL的紫外吸收光谱图,由图4可知,TFDL在220~280 nm和300~400 nm两个波长范围内,有两个特征峰存在,证明提取和纯化的样品确实为黄酮类成分,且纯化后的TFDL紫外吸光度显著高于纯化前,特征峰更明显,表明纯化过程明显提高目标产物的纯度。

2.5 抗氧化活性分析

图5是不同浓度铁皮石斛叶干浸膏和叶纯化样品黄酮溶液的抗氧化能力。由图5(a)显示,铁皮石斛叶总黄酮对DPPH的清除能力随着浓度升高迅速增加,表现出较强的浓度依赖性。纯化前后铁皮石斛叶总黄酮的半数抑制浓度(IC_{50})分别是245.30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和112.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$,经过初步纯化后

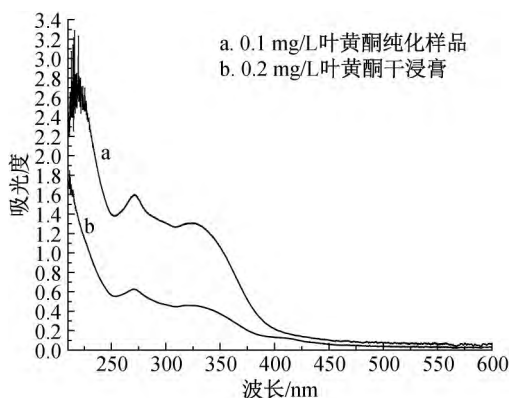
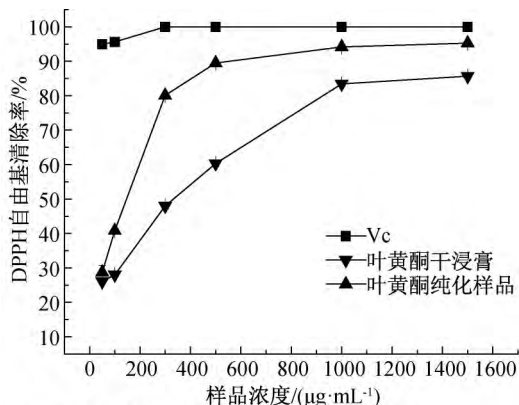
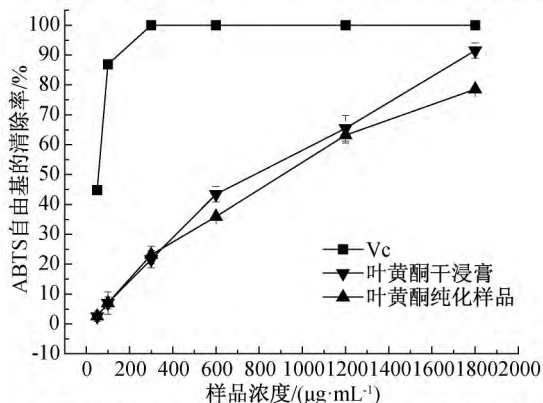


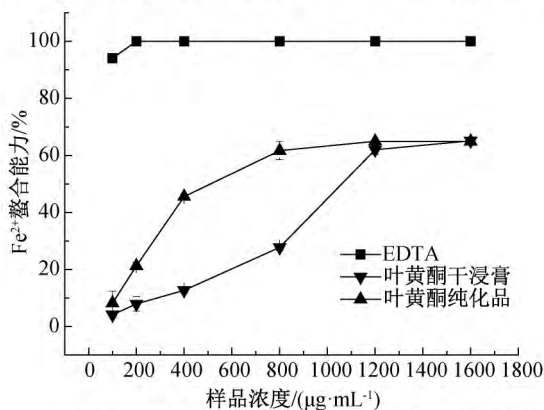
图4 TFDL的紫外吸收光谱



(a) 不同浓度的叶总黄酮溶液对DPPH自由基清除能力的影响



(b) 不同浓度的叶总黄酮溶液对ABTS自由基清除能力的影响



(c) 不同浓度的叶总黄酮溶液对 Fe^{2+} 螯合能力的影响
图5 不同浓度铁皮石斛叶干浸膏和叶纯化样品黄酮溶液的抗氧化能力

的叶黄酮样品对 DPPH 清除能力明显提高。在 1500 $\mu\text{g/mL}$ 时,纯化后样品的清除率达到 95.28%,表明叶黄酮样品对 DPPH 具有较强的清除能力。在图 5(b)中,50~1800 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,TFDL 对 ABTS⁺ 的清除能力随着浓度的增加而逐渐增大。在浓度为 1800 $\mu\text{g/mL}$ 时,铁皮石斛叶粗提液对 ABTS⁺ 的清除率达到 91.51%,而纯化后样品的清除能力却略有降低。结合图 2 动态泄露曲线,从上样开始就有少部分极性较大的黄酮类成分流出树脂,故分析可能是由于这部分黄酮类成分的损失造成的,但具体的原因还有待进一步实验验证。纯化前后 TFDL 的 IC_{50} 分别是 653.08 $\mu\text{g/mL}$ 和 784.49 $\mu\text{g/mL}$ 。图 5(c)显示,在测定范围内(100~1600 $\mu\text{g/mL}$),TFDL 对 Fe²⁺ 螯合能力随着浓度的增大而逐渐增大,TFDL 纯化前后 IC_{50} 值分别为 1106.33 $\mu\text{g/mL}$ 和 643.40 $\mu\text{g/mL}$ 。纯化前后 TFDL 对 Fe²⁺ 离子的最大螯合能力分别达到 65.11%和 64.92%,差异不明显,因此纯化前后黄酮类成分变化不明显,纯化明显提高产品纯度。

3 讨论

大孔吸附树脂是一种表面活性吸附剂,通过物理吸附从中草药及其制剂提取物的水溶液中有选择性地吸附其中的有效成分,去除无效成分的一种分离纯化工艺,可以达到分离、富集的目的^[14]。Zhang 等^[21]利用 D101 大孔吸附树脂纯化鱼腥草黄酮类化合物,在最佳纯化条件下,黄酮类化合物的含量可达 60%以上,总收率达 93.3%。李腾等^[22]对 D101 大孔吸附树脂分离纯化栀子大黄汤有效部位群条件进行研究,发现依次运用 30%乙醇、60%乙醇、70%乙醇可以将总环烯醚萜苷、总黄酮、总异黄酮和总蒽醌分别洗脱完全。汤如莹等^[15]采用正交设计法优选 D101 大孔吸附树脂分离纯化沙苑子总黄酮的工艺,采用优选工艺得到的沙苑子总黄酮含量为 56.24%,工艺转移率为 68.37%。本文研究 D101 大孔吸附树脂分离纯化 TFDL 工艺,采用最佳工艺,得到树脂对 TFDL 的吸附率为 81.64%,解吸率为 68.67%。通过纯化去除了其中大量水溶性非目标成分,如糖类、蛋白质、鞣质等,使得到的黄酮类化合物样品颜色鲜亮,改变黑、大、粗的现象。实验结果表明,D101 大孔吸附树脂适用于对铁皮石斛叶黄酮类化合物的分离纯化,效率高,操作简单,绿色环保。大孔吸附树脂分离纯化效果受多种因素的影响,主要包括树脂本身结构、被吸附化合物结构、上

样液浓度、上样流速、洗脱液、洗脱液的流速、pH、温度等^[23]。上样液浓度是影响大孔吸附树脂纯化效果的重要因素,当上样液浓度过低时过柱时间增加,工作效率降低;当上样液浓度过高时泄露点出现早,目标成分损失严重,树脂利用率低。当上样液浓度在 1.8~2.2 mg/mL 范围内,吸附率和吸附量均达到最大值,且差异不明显。为了使树脂得到最大限度的利用,本文选择 2.2 mg/mL 进行上样。上样液的 pH 值影响溶质的电离程度,是影响大孔吸附树脂吸附量的关键参数^[24]。当 pH 值较高时,黄酮酚羟基分离 H⁺,氢键相互作用减少,从而导致较低的吸附能力^[9]。本文结果表明,随 pH 值(2.4~6.0)的升高,树脂的纯化效果逐渐减弱,pH 值为 2.4 时,纯化效果最好。从安全和环保角度考虑,本文选择一定浓度乙醇作为洗脱剂。图 1(a)—(b)和图 2 显示 D101 大孔吸附树脂进行叶黄酮的分离纯化过程中,吸附率略低,有少部分极性较大的黄酮类成分损失,故可以尝试用弱极性大孔吸附树脂进一步提高其吸附率。

大多数黄酮类化合物分子中具有桂皮酰基及苯甲酰基组成的交叉共轭体系,因此其甲醇溶液在 200~400 nm 波长范围内,会出现两个紫外吸收带,峰带 I(300~400 nm)及峰带 II(220~280 nm)^[25]。纯化前后 TFDL 样品经 DU-800 型紫外分光光度计 200~400 nm 波长范围内扫描验证,出现两个显著的特征峰,进一步说明大孔吸附树脂纯化效果显著。在植物体内存在很多天然的抗氧化剂,例如黄酮类、酚酸类、多糖、鞣质类等^[26]。其中黄酮类化合物通过提供氢原子或电子来清除自由基,自身被转化为苯氧基。本文所获得的 TFDL 纯化样品在 DPPH 清除和 Fe²⁺ 螯合能力上得到明显提高,对 DPPH、ABTS⁺、Fe²⁺ 的半数抑制浓度(IC_{50})分别为 112.28、784.49 $\mu\text{g/mL}$ 和 643.40 $\mu\text{g/mL}$ 。

4 结论

本文通过对 D101 型大孔吸附树脂法在不同因素影响下对 TFDL 纯化效果及 TFDL 的抗氧化活性分析,得到以下结论:

a) 在上样液浓度为 2.2 mg/mL,上样液 pH 值为 2.4,上样量为 16 BV,洗脱乙醇浓度为 80%条件下,最终得到的样品中总黄酮含量达到 193.95 mg/g,是粗提液中总黄酮含量的 10.72 倍,纯化效果明显。这说明 D101 大孔吸附树脂适用于 TFDL 的分离纯化。

b) TFDL 具有良好的抗氧化能力,且呈浓度依

赖性关系。D101 大孔吸附树脂的纯化进一步提高了其在 DPPH 清除和 Fe^{2+} 螯合上的能力,其中对 DPPH 自由基的清除能力最强。TFDL 有望开发成一种天然抗氧化剂。

参考文献:

- [1] Da Silva J A T, Ng T B. The medicinal and pharmaceutical importance of *Dendrobium* species[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2017, 101(6): 2227-2239.
- [2] Tang H, Zhao T, Sheng Y, et al. *Dendrobium officinale* Kimura et Migo: A review on its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and industrialization [J]. Evidence — Based Complementray and Alternative Medicine, 2017, 2017 (5):1-19.
- [3] 周桂芬, 吕圭源. 铁皮石斛不同部位黄酮碳苷类成分及清除 DPPH 自由基能力比较研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11):1536-1540.
- [4] Chandrasekara A, Shahidi F. Inhibitory activities of soluble and bound millet seed phenolics on free radicals and reactive oxygen species[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59(1):428-36.
- [5] Huang Y S, Ho S C. Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel[J]. Food Chemistry, 2010, 119(3):868-873.
- [6] 王晓梅, 王燕, 胡君萍, 等. 新疆蔷薇红景天黄酮提取工艺的研究[J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(4):5-6.
- [7] Machha A, Achike F I, Mustafa A M, et al. Quercetin, a flavonoid antioxidant, modulates endothelium-derived nitric oxide bioavailability in diabetic rat aortas [J]. Nitric Oxide Biology & Chemistry, 2007, 16 (4): 442-447.
- [8] 刘玥. 大孔吸附树脂在中药提取纯化中的应用进展[J]. 世界中医药, 2013, 8(2):232-234.
- [9] 聂超, 赵梓燕, 徐晓丹, 等. 大孔树脂 AB-8 分离纯化伦晚脐橙总黄酮 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(18): 221-225.
- [10] Dong Y, Zhao M, Sunwaterhouse D, et al. Absorption and desorption behaviour of the flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* L. leaf on macroporous adsorption resins[J]. Food Chemistry, 2015, 168(1):538-545.
- [11] Li H, Liu Y, Yi Y, et al. Purification of quercetin-3-O-sophoroside and isoquercitrin from *Poa cynosu hendersonii* leaves using macroporous resins followed by Sephadex LH-20 column chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 2017, 1048(1):56-63.
- [12] Yin L, Xu Y, Qi Y, et al. A green and efficient protocol for industrial — scale preparation of dioscin from *Dioscorea nipponica* Makino by two-step macroporous resin column chromatography [J]. Chemical Engineering Journal, 2010, 165(1):281-289.
- [13] Jia Z, Tang M, Wu J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals[J]. Food Chemistry, 1999, 64(4): 555-559.
- [14] 贾存勤, 李阳春, 屠鹏飞, 等. D-101 型大孔吸附树脂预处理方法的研究[J]. 中草药, 2006, 37(2): 193-196.
- [15] 汤如莹, 王玉杰, 李伟, 等. D101 型大孔吸附树脂分离纯化沙苑子总黄酮工艺研究[J]. 中草药, 2017, 48 (16):3342-3346.
- [16] Zhao G R, Xiang Z J, Ye T X, et al. Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza*, and *Panax notoginseng* [J]. Food Chemistry, 2006, 99 (4): 767-774.)
- [17] Mukti Ram Paudel, Mukesh Babu Chand, et al. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Dendrobium amoenum* Wall. ex Lindl[J]. Journal of Plant Science, 2015, 9(1): 20 — 26
- [18] Gan C Y, Latiff A A. Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2011, 124(3):1277-1283.
- [19] Gülçin I, Elias R, Gepdiremen A, et al. Antioxidant activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania rotunda*: Cepharanthine and fangchinoline[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2010, 25(1):44-53.
- [20] Lin J T, Liu S C, Kuo L C, et al. Composition of phenolic compounds and antioxidant attributes of *Cyclea gracillima* diels extracts[J]. Journal of Food & Drug Analysis, 2018, 26(1):193-200.
- [21] Zhang Y, Shufen L I, Xiwen W U, et al. Macroporous resin adsorption for purification of flavonoids in *Houttuynia cordata* Thunb. [J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2007, 15(6):872-876.
- [22] 李腾, 马鑫, 朱德康, 等. 梔子大黄汤有效部位群分离纯化研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(1):81-83.
- [23] 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.
- [24] Zhao Z, Dong L, Wu Y, et al. Preliminary separation and purification of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Siebold extracts by macroporous resins [J]. Food & Bioproducts Processing, 2011, 89 (4): 266-272.
- [25] 吴立军. 天然药物化学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008: 187-188.
- [26] Shahidi F, Naczsk M. Phenolics in Food and Nutraceuticals[M]. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004:403,421-426.

(责任编辑:唐志荣)