利用大孔吸附树脂从葛根中分离与纯化大豆苷

徐　刚,吕迎春

(中国科学院烟台海岸带可持续发展研究所,山东 烟台　264003)

摘要:目的 从葛根中获取高强度的大豆苷样品。方法 用大孔吸附树脂进行分离,反复结晶进一步纯化。结果 D101树脂适宜于大豆苷分离,30%乙醇洗脱液放置析出白色沉淀,以甲醇结晶 2~3次,得针状晶体,该晶体 HPLC测定大豆苷。结论 该方法操作简单易行,成本低,分离大豆苷纯度高,安全性能好。纯度 92.4%,收得率为 3%。

关键词:大孔吸附树脂;　葛根;　大豆苷;　高效液相色谱;　分离纯化

中图分类号:Q949　　**文献标识码**:B　　**文章编号**:1008-0805(2010)06-1408-02

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata*(Willd) Ohwi的根,为常用中药,其提取物总黄酮对高血压病、心绞痛以及突发性耳聋、耳鸣等有确切的疗效,有扩张冠状动脉血管和脑血管、促进血液循环、增强机体的免疫力作用[1,2]。葛根的主要成分为葛根素、大豆苷、大豆苷元。近年来,对大豆提取物大豆异黄酮的研究发现[3,4],大豆异黄酮对心脑血管疾病和激素依赖性肿瘤具有较好的治疗和预防作用,尤其在防癌、抗癌方面引起了各方面的广泛关注。其主要的功能成分之一为大豆苷,因而加大大豆苷研究对合理和充分利用野生葛根资源有着十分重要的现实意义。

对葛根提取物的研究已有大量的报道,主要集中在葛根素[5]的药效、药理、分离纯化等方面,对大豆苷的研究还很少有相关的报道。江和源[6]采用高效逆流色谱法,用醋酸乙酯-醋酸-水(5∶1∶10)为溶剂系统,从大豆异黄酮中提取了纯度为 98.2%的大豆苷。本实验用大孔吸附树脂结合结晶的方法对大豆苷纯化进行了研究。

1　材料与仪器

1.1　材料　葛根异黄酮粗品购于成都双流应天生化厂,其中葛根素含量为 35%,大豆苷含量为 6.33%。大豆苷的标样购于中国药品生物制品检定所,纯度为 98%。大孔吸附树脂 D101、AB-8、NKA-9、D3520、D130均购于西安蓝深吸附材料有限责任公司。

1.2　试剂与仪器　WATERS公司高效液相色谱系统,600型控制器,996型二级管阵列检测器,717型自动进样器,MILLENNIUM32色谱工作站;电子天平(hangping FA1004,精确到万分之一);蒸馏水为实验室自制;95%医用酒精;其它乙醇、甲醇等均为分析纯。

2　方法

2.1　大豆苷、葛根素、大豆苷元的测定方法　按照文献[7]所提供的方法对大豆苷、葛根素、大豆苷元进行了梯度测定。

2.2　大孔吸附树脂的预处理　严格按照产品说明书进行处理。

2.3　大豆苷饱和吸附量的测定　准确称取已经处理过的 6种干树脂各 1份,每份各 1 g然后分别置于 100 ml的三角瓶中,加入葛根样品液 50 ml(HPLC测其浓度为 C_1),在振荡器上振荡 24 h,频率为 120次/min,成分吸附后,过滤,HPLC测定剩余溶液中大豆苷的浓度 C_2,按下式计算各树脂在室温时的吸附量 Q(mg大豆苷/g干树脂)。

$$Q = (C_1 - C_2)V/W$$

Q—吸附量(mg/g);C_1,C_2—吸附前后大豆苷溶液的浓度(mg/ml);V为黄酮溶液的体积(ml);W为树脂的质量(g)。

2.4　大豆苷树脂解吸率实验　通过预实验得知,在梯度洗脱的条件下,30%的乙醇可以把大豆苷洗脱下来。

取已经计算出吸附量的树脂,分别精密加入 30%的乙醇、50%的乙醇各 50 ml,浸泡后振荡 24 h,过滤后,测定滤液中大豆苷的浓度,根据解吸量计算出解吸率(%)。

解吸率(%)=[解吸量/吸附量]×100%

2.5　大豆苷梯度洗脱实验　称取葛根异黄酮粗品 20 g,置于烧杯中,用 200ml的热水溶解,趁热过滤(如果过滤速度慢,可以采用抽滤的方式)。待滤液冷却后上 D101树脂(44 cm×4.5 cm),依次用 1 000 ml的水、1 500 ml的 10%的乙醇、1 000 ml的 30%的乙醇洗脱。在 30%的乙醇洗脱过程中,每 100 ml接一瓶,同时用 HPLC测定每瓶中大豆苷的含量,然后以 HPLC的大豆苷的积分值对洗脱瓶序号做出洗脱曲线。

采用上述实验方法,仅把 30%的乙醇改为 25%的乙醇洗脱,做出洗脱曲线。

比较 30%和 25%乙醇洗脱曲线的异同。

2.6　大豆苷制备实验　实验方法同"2.5"项。30%的乙醇洗脱液每 100ml接一瓶,放置数天,观察溶液的变化。

2.7　大豆苷结晶实验　30%乙醇洗脱液放置析出白色不溶物,HPLC测定大豆苷含量越高的洗脱瓶析出白色不溶物越多,对白色不溶物进行结晶[8]。不溶物过滤烘干后置于烧杯中,然后滴加甲醇,用水浴或加水促溶使其溶解,过滤,放置结晶。

3　结果

3.1　大豆苷饱和吸附量的测定　结果见表 1。

表 1　不同树脂条件下大豆苷的饱和吸附量　mg·g^{-1}

树脂型号	大豆苷的饱和吸附量
D101	36.2
AB-8	32.3
NKA-9	16.8
D3520	25.6
D130	30.5

从表 1可以看出,5种树脂的的饱和吸附量都较小,大约在 30 mg大豆苷/g干树脂,不同树脂对大豆苷的吸附能力为:D101>AB-8>D130>D3520>NKA-9,弱极性的 D101、AB-8、D130大孔吸附树脂对大豆苷有较好的吸附能力,适宜于大豆苷的分离纯化。

3.2　大豆苷解吸率实验　结果见表 2。

结果表明,解吸剂的极性越小,解吸率越高的趋势。D101、AB-8对不同的解吸剂都可以获得 50%以上的解吸率。

3.3　大豆苷梯度洗脱实验　在制备葛根素的实验中发现,通过加大乙醇的浓度,可以分离得到大豆苷。但是由于样品溶液中葛根

收稿日期:2009-05-07;　修订日期:2009-11-05

基金项目:国家海藻工程中心开放基金;

中国科学院烟台海岸带所前沿领域项目(hg-065024)

作者简介:徐　刚(1979-),男(汉族),山东日照人,现任中国科学院烟台海岸带可持续发展研究所助理研究员,博士学位,主要从事天然产物化学研究工作.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

素的含量较高,相反大豆苷的含量却很小。因此分离大豆苷时,必须先去除大部分的葛根素,才能达到富集大豆苷的目的。

表 2　各种饱和吸附树脂在不同乙醇浓度下的解吸率

树脂型号	30% 的乙醇解吸率 (%)	50% 的乙醇解吸率 (%)
D101	54.1	65.2
AB-8	50.3	58.5
NKA-9	49.1	53.2
D3520	42.1	47.8
D130	46.9	55.4

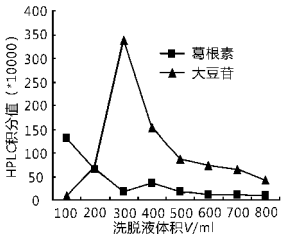

图 1　30% 的乙醇洗脱曲线

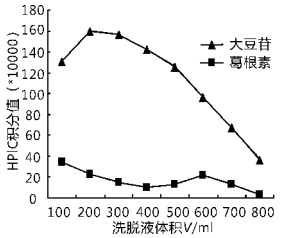

图 2　25% 的乙醇洗脱曲线

一般的,10% 的乙醇对分离葛根素效果是最好的,通过加大 10% 的乙醇的洗脱量 (1 500 ml),可以把大部分葛根素先洗下来。然后用 30% 或 25% 的乙醇洗脱。结果见图 1。

在 30% 的乙醇洗脱液中仍有较多的葛根素存在,并且在葛根素后面有较大的峰,说明还有含量较高的杂质影响大豆苷的纯化。由于二者保留时间相差较长,作了第 2次实验,用 15% 的乙醇洗脱葛根素,用 25% 的乙醇洗脱大豆苷。结果见图 2。

通过比较两图可以看出,用 30% 的乙醇洗脱,大豆苷的洗脱量大,分离效果好,峰形尖锐,大豆苷集中出现第 3瓶中,这样有利于大豆苷的分离纯化;相反的 25% 的乙醇洗脱时,洗脱曲线平缓,大豆苷的分布范围广,比较均匀的出现在洗脱过程中,不利于富集大豆苷。

梯度洗脱时,可以首先用水洗去蛋白质、糖类等水溶性杂质,然后用过量 10% 的乙醇把大部分的葛根素洗去这样有利于大豆苷的富集,再用 30% 的洗脱大豆苷。

3.4　大豆苷结晶实验　白色的不溶物用甲醇结晶,滤液放置 2~3 h有白色的针状晶体析出。晶形良好,甲醇用量大约是:沉淀物 1 g甲醇用 40 ml。不溶物反复结晶 1~2次。实验结果如表 3。

通过比较,过柱分离后的沉淀中含有较多的大豆苷,并且含量很高,用甲醇-水结晶后,纯度反而降低了,这说明甲醇-水不适合作结晶溶剂,直接用甲醇重结晶 2次,大豆苷的纯度为 92.3%。

4　讨论

树脂分离所得的白色不溶物是 30% 的乙醇洗脱下来的,说明大豆苷在 30% 的乙醇中可以达到很高的纯度,因此,结晶的溶剂也可以采用乙醇或乙醇的水溶液。

表 3　不同溶剂对结晶纯度的影响

大豆苷结晶溶剂	大豆苷的纯度	结晶量 m /g	收得率 (%)
沉淀 (未结晶)	86.6%	1.0	5.0
甲醇-水	78.5%	0.5	2.5
甲醇一晶	90.2%	0.8	4.0
甲醇二晶	92.4%	0.6	3.0

葛根素和大豆苷的极性相差较小,从分离的原理上讲,在同一颗柱子通过改变乙醇的极性可以把两种成分分离开,从而实现葛根素和大豆苷的连续分离。但是由于葛根异黄酮粗品中葛根素、大豆苷的含量相差很大,为了能够分离得到大豆苷,上样量相对较大 (20~30 g),影响了葛根素的吸附分离,在实验中 10% 的乙醇洗脱液浓缩后没有结晶析出。因此对葛根素和大豆苷的综合利用有待于进一步的研究。

此外,通过实验得出:用大孔吸附树脂初步分离后,选择合适的结晶试剂,可以实现目标物质分离纯化。

感谢重庆合川葛恩生物科技开发有限公司在数据测定方面的大力支持。

参考文献:

[1] 贾连旺. 葛根素注射液对老年肺心病急性加重期血液流变学影响的观察 [J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(12): 51.

[2] 赖洋林. 葛根的实验研究与临床应用新进展 [J]. 中国中药杂志, 1998, 14(5): 52.

[3] 刘　飞. 大豆异黄酮抗癌与预防心血管疾病的研究进展 [J]. 解放军预防医学杂志, 2003, 21(4): 304.

[4] 张　艳, 田庆伟. 大豆异黄酮抗癌作用研究进展 [J]. 中国食品添加剂, 2004, 11(1): 12.

[5] XianglingHe, Tianweitan, Jan-Christer Janson. Separation and purification of puerarin using β-cyclodextrin-coupled agarose gel media [J]. Journal of Chromatography, 2004, 10(2): 77.

[6] 江和源, 台建祥, 吕飞杰. 高效逆流色谱法分离制备大豆异黄酮中的大豆苷和染料木苷 [J]. 食品科学, 2004, 25(1): 85.

[7] 金文姗, 谈钰元, 陈有根, 等. 高效液相色谱法测定不同产地葛根中葛根素、大豆苷及大豆苷元的含量 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(1): 49.

[8] 王晓玲, 温普红, 杨得锁. 葛根异黄酮水解物的研究 [J]. 化学工业与工程, 2001, 18(6): 411.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net