

大孔树脂分离纯化枳壳中总黄酮的工艺优选

傅华强, 邹建国*, 刘飞, 刘燕燕, 李不悔
(南昌大学环境与化学工程学院, 南昌 330031)

[摘要] 目的: 优选大孔树脂分离、纯化枳壳总黄酮的工艺条件。方法: 通过静态吸附试验比较 7 种不同大孔树脂对枳壳总黄酮的吸附性能, 筛选最佳大孔树脂型号; 采用单因素试验考察大孔树脂的吸附和洗脱条件。结果: AB-8 型大孔树脂最适合用于纯化枳壳中总黄酮; 其最佳分离、纯化工艺参数为上样液质量浓度 $0.408 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 4, 上样速率 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 6 BV 75% 乙醇以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 进行洗脱; 总黄酮纯度由原来的 14.03% 提高到 42.54%。结论: 优选的分离、纯化工艺稳定可行, 可推广于大生产应用。

[关键词] 枳壳; 总黄酮; 大孔树脂; 静态吸附; 动态吸附

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0014-04

Optimization of Separation and Purification Technology for Total Flavonoids from *Citrus aurantium* by AB-8 Macroporous Adsorption Resin

FU Hua-qiang, ZOU Jian-guo*, LIU Fei, LIU Yan-yan, LI Bu-hui

(School of Environment and Chemical Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize separation and purification technology of total flavonoids from *Citrus aurantium* by AB-8 macroporous resin. **Method:** Adsorption property of seven different kinds of macroporous

[收稿日期] 20120628(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31060210)

[第一作者] 傅华强, 硕士, 从事化学工程研究, E-mail: fufelix@foxmail.com

[通讯作者] * 邹建国, 博士, 教授, 从事精细化工研究, Tel: 18970021079, E-mail: Jianguozou@163.com

哈帕昔和肉桂酸^[10], 但通过本实验可知, 不能忽略在炮制过程中会有其他物质转化成哈帕俄昔, 哈帕昔和肉桂酸的情况也是一样。本研究为玄参的炮制质量和临床应用选择提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 张洪利, 刘瑶, 成金乐, 等. 玄参破壁粉粒体内抗菌实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 178.
- [2] 华静, 戚进, 余伯阳. 玄参属植物中的环烯醚萜类化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 233.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 109.
- [4] 施俊辉, 杨军宣, 赵成城, 等. 星点设计-效应面法优化栀子的提取工艺[J]. 时珍国医国药, 2011, 22

(3): 667.

- [5] 张发科, 吕青涛, 张兆旺, 等. HPLC 法研究不同炮制工艺对玄参中哈帕俄昔和肉桂酸含量的影响[J]. 化学分析计量, 2006, 15(6): 51.
- [6] 聂诗明, 孙晓静, 陈璇, 等. 不同干燥方法对玄参品质的影响[J]. 中药材, 2010, 33(1): 33.
- [7] 吴伟, 崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. 国外医学药学分册, 2000, 27(5): 292.
- [8] 苏栢僮, 刘英, 徐佳丽, 等. 应用 Box-Behnken 设计优化地榆皂苷的闪式提取工艺研究[J]. 中草药, 2012, 43(3): 501.
- [9] 李东东, 放茂良, 刘琼, 等. 星点设计-响应面法优化超声提取青竹标多酚[J]. 中药材, 2011, 34(1): 129.
- [10] 龚友兰, 向大雄, 邓长风, 等. HPLC-UV 双波长法同时测定玄参中 5 种主要成分含量[J]. 中南药学, 2008, 6(6): 660.

[责任编辑 仝燕]

resins for total flavonoids from *C. aurantium* was compared by static adsorption test, in order to select optimum macroporous resin; Single factor test was used to investigate adsorption and elution conditions of macroporous resin. **Result:** AB-8 macroporous resin was the most suitable one for purification of total flavonoids in *C. aurantium*; Its optimum separation and purification parameters were as followings: the sample concentration $0.408 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH of 4, sample flow rate $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, eluted with $6 \text{ BV} 75\%$ ethanol at $1 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$; Under this condition, purity of total flavonoids would be increased from 14.03% to 42.54% . **Conclusion:** Optimized separation and purification technology was stable and feasible, it could be extended to industrial production.

[**Key words**] *Citrus aurantium*; total flavonoids; macroporous resin; static adsorption; dynamic adsorption

枳壳具有理气宽中、行滞消胀的功效,主要用于治疗胸胁气滞,食积不化,胃下垂,子宫脱垂等症^[1]。其化学成分包括黄酮类、挥发油及少量生物碱^[2],其中最能体现枳实特征的成分是黄酮类物质。目前对枳壳的研究主要集中于有效成分的药理与药效、提取工艺、提取物应用和新化合物的鉴定方面,而分离纯化方面却少见报道。大孔吸附树脂是20世纪60年代发展起来的一类新型高分子材料,具有良好的吸附性能,尤其在分离、纯化中草药活性成分方面显示出极大的优越性^[3-6]。树脂本身的性质不同程度地影响着分离纯化效果^[7-9],本实验通过不同树脂对枳壳总黄酮吸附性能的比较,筛选较为适合的大孔树脂,并对其分离纯化枳壳总黄酮的工艺条件进行探讨,为枳壳黄酮类产品分离、纯化过程的工业应用提供参考和依据。

1 材料

SHA-C型恒温振荡器(常州国华电器有限公司),玻璃柱($\Phi 1.8 \text{ cm} \times 29 \text{ cm}, \Phi 3.0 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$,上海亚荣生化仪器厂),BT300-1F型恒流泵(上海五相仪器仪表有限公司),TG328G型电子天平(上海天平仪器厂),TU-1901型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),FW100型植物粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司),PHS-2C型数字pH酸度计(上海精密科学仪器厂)。

枳壳购于樟树市医药公司,经本校制药工程教研室蒋以号博士鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥未成熟果实。柚皮苷对照品(批号110722-200610,纯度95.1%,中国药品生物制品检定所),D101,AB-8,X-5型大孔树脂(南开大学化工厂);NKA-II,S-8,NKA-9型大孔树脂(安徽三星树脂有限公司);HPD600型树脂(河北沧州宝恩化工有限公司),其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 枳壳总黄酮样品液的制备 取一定量粉碎的枳壳药材粗粉(40~60目),加15倍量60%乙醇于

300 W 超声提取 30 min,提取液滤过,在旋转蒸发器中浓缩至无醇味,真空冷冻干燥,得枳壳总黄酮的粗制品,将粗制品用水配置成总黄酮质量浓度约 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样液。

2.2 含量测定^[8] 准确称取于 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥至恒重(5 h)的柚皮苷对照品 4.5 mg,于 25 mL 量瓶中,用 95% 乙醇溶解,定容,分别吸取柚皮苷对照品溶液 0,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 mL 于 10 mL 量瓶中,加 95% 乙醇溶液至刻度,摇匀,静置 10 min,以相应的溶液为参比对照,于最大检测波长 284 nm 处测定吸光度(A),平行试验 3 次,以柚皮苷质量浓度为纵坐标,A 为横坐标,得回归方程 $Y = 42.735X - 1.9188$ ($r = 0.9992$),线性范围 $0 \sim 45 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

2.3 大孔树脂型号筛选

2.3.1 大孔树脂吸附率的测定 精密称取预处理好的湿树脂(用滤纸吸干表面水)1.0 g,置于 50 mL 锥形瓶中,加入配制好的样品溶液 20 mL,置于恒温摇床中($30 \text{ }^\circ\text{C}$,100 次/min)振摇 24 h,测定选用树脂的静态吸附效果,按下式计算树脂的吸附量与吸附率。

$$Q = (C_0 - C_t) \times V/W; E = (C_0 - C_t)/C_0 \times 100\%$$

C_0 为吸附前上样液质量浓度, C_t 为吸附后样品液质量浓度, W 为树脂干重, V 为样品液的体积, Q 为树脂吸附量, E 为吸附率。

2.3.2 大孔树脂洗脱率的测定 将上述吸附饱和的大孔吸附树脂用水洗至无色,用滤纸吸干树脂表面残留的溶液,置于锥形瓶中,准确加入 95% 乙醇 20 mL,置于恒温摇床中($30 \text{ }^\circ\text{C}$,100 次/min)振摇 12 h,充分洗脱,过滤,得滤液,测定总黄酮含量,计算各大孔吸附树脂的洗脱率。

$$\text{洗脱率} = (C_2 \times V)/Q \times 100\%$$

C_2 为洗脱液的质量浓度, V 为洗脱液的体积, Q 为树脂总的吸附量。

试验比较了 7 种不同型号大孔树脂对枳壳总黄酮的吸附性能,枳壳总黄酮提取液的质量浓度

0.325 1 g·L⁻¹, 即枳壳总黄酮的上样量 6.502 mg, 结果见表 1。

表 1 大孔树脂对枳壳中总黄酮吸附量和洗脱率

树脂型号	吸附后质量 浓度/g·L ⁻¹	吸附量 /mg·g ⁻¹	洗脱液质量 浓度/g·L ⁻¹	洗脱率 /%
D101	0.113	4.24	0.167	78.82
X-5	0.138	3.74	0.143	76.3
AB-8	0.115	4.20	0.175	83.26
HPD600	0.186	2.78	0.101	72.39
NKA-9	0.207	2.36	0.071	59.8
S-8	0.249	1.52	0.037	49.01
NKA-II	0.203	2.44	0.065	53.2

由表 1 可知,弱极性和非极性的 AB-8, D101, X-5 型大孔树脂的吸附能力较强,其中以 D101 型树脂吸附量最大,但洗脱率相对较低;AB-8 型树脂吸附量比 D101 型树脂低 0.04 mg,但洗脱率却高 5%。综合比较,确定选用 AB-8 型大孔树脂。

2.4 AB-8 大孔树脂吸附条件的优化 选用 1.8 cm × 29 cm 玻璃柱,以 AB-8 型大孔树脂湿法装柱,装柱高度 23 cm,即 1 BV (柱床体积)约 60 mL。

2.4.1 上样液质量浓度考察 确定上样液流速 2 BV·h⁻¹,上样液 pH 5,上样液质量浓度分别为 0.30,0.41,0.53,0.60,0.70 g·L⁻¹,结果 AB-8 型大孔树脂对总黄酮的吸附率分别为 63.39%,70.76%,62.21%,55.47%,43.67%。随上样液质量浓度的增加,与黄酮竞争吸附的杂质随之增加,从而影响黄酮类物质在树脂的内部扩散,使黄酮类物质随吸附液过早流出,从而导致泄露早,处理量小。故确定进样液质量浓度 0.408 g·L⁻¹。

2.4.2 上样流速对吸附的影响 在上样液质量浓度 0.408 g·L⁻¹,pH 5 的条件下,考察上样流速分别为 1,2,3,4,5 BV·h⁻¹ 的影响,结果总黄酮吸附率分别为 70.76%,69.84%,60.97%,53.35%,41.55%。表明随上样液流速的增大,AB-8 型大孔树脂树脂的吸附率下降。由于吸附与脱附是动态平衡过程,在一定的吸附速度下流速加快必使相对吸附时间减少,从而使泄露点提前,流速太慢又费时。故选定 2 BV·h⁻¹。

2.4.3 上样液 pH 对吸附的影响 在上样液质量浓度 0.408 g·L⁻¹,上样液流速 2 BV·h⁻¹ 的条件下,考察上样液 pH 分别为 3.0,4.0,5.0,6.0,7.0 时,AB-8 型大孔树脂对枳壳总黄酮的吸附率影响,结果

分别为 66.16%,72.68%,69.70%,61.47%,52.12%。说明 pH 对吸附的影响主要取决于化合物的酸碱性,酸性介质有利于酸性化合物的吸附^[10-11]。枳壳总黄酮具有酚羟基,显弱酸性,在酸性条件下吸附较好,但 pH 3 时吸附率不升反降,可能是上样液的酸性太强,黄酮类化合物容易转为伴盐而不易被吸附^[12]。故选定 pH 4。

2.5 AB-8 型大孔树脂脱附条件的优化

2.5.1 洗脱剂浓度对解吸的影响 采用乙醇溶液为洗脱剂,在确定洗脱剂流速 1 BV·h⁻¹ 条件下,考察体积分数分别为 30%,45%,60%,70%,95% 的乙醇溶液对吸附树脂洗脱的影响,结果总黄酮的洗脱率分别为 66.62%,75.83%,87.77%,90.59%,81.03%。说明随乙醇体积分数的不断加大,总黄酮的解吸率不断上升,但当体积分数 >60% 时,上述趋势明显放缓,当体积分数 >75% 时,总黄酮解吸率反而有所下降。可能是由于乙醇体积分数的升高减弱了枳壳总黄酮与 AB-8 型大孔树脂分子间的作用力,而乙醇体积分数过高又使得枳壳总黄酮在其中的溶解度减小,这 2 种作用的相互竞争造成了枳壳总黄酮解吸率的先升后降。因此选用 75% 乙醇为洗脱剂较为适宜。

2.5.2 洗脱剂流速对解吸的影响 采用 75% 乙醇为洗脱剂,考察洗脱流速分别为 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 BV·h⁻¹ 对枳壳总黄酮的洗脱率的影响,结果分别为 92.03%,90.86%,86.89%,78.67%,67.53%。说明随洗脱剂流速的加快,总黄酮的洗脱率呈下降趋势。对于一定量的洗脱液,加快洗脱剂的流速,会使洗脱液与 AB-8 型大孔树脂作用的时间相对缩短,从而使解析率下降。但流速过慢时,又会延长生产周期,也不利于工业化生产。因此选择洗脱剂流速 1 BV·h⁻¹。

2.5.3 AB-8 型大孔树脂对枳壳总黄酮的动态吸附及洗脱性能 确定上样液质量浓度 0.408 g·L⁻¹,上样液流速 2 BV·h⁻¹,pH 4;加 75% 乙醇洗脱,洗脱流速 1 BV·h⁻¹。在此条件下,分别得出其动态吸附和洗脱曲线(图 1~2)。

由图 1~2 可知,当上样液体积达到 200 mL 后出现泄露,泄露液的总黄酮质量浓度随上样量的增加逐渐上升,在 15 BV (7.5 h) 之后,吸附量变化逐渐平缓,而当上样量达到 1 200 mL (20 BV) 后,泄露液质量浓度接近于上样液质量浓度,说明此时树脂柱已基本达动态饱和,总饱和吸附量 254.7 mg。用 6BV 75% 乙醇可将枳壳总黄酮基本洗脱完全,枳壳

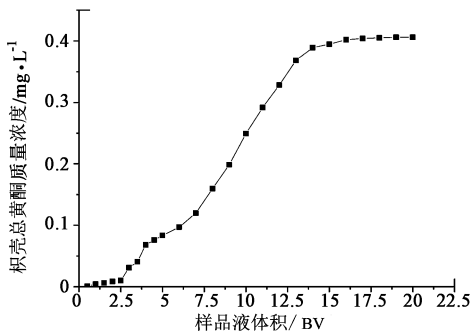


图1 AB-8型大孔树脂对枳壳总黄酮的动态吸附曲线

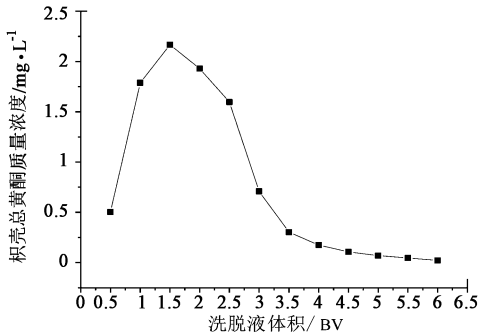


图2 AB-8型大孔树脂对枳壳总黄酮的动态洗脱曲线

总黄酮的回收率达 94.85%。说明 AB-8 型大孔树脂具有良好的解吸性,在分离过程中可同时起到富集和浓缩的作用。

2.6 枳壳总黄酮的纯化 选用 3.0 cm × 60 cm 玻璃色谱柱对枳壳总黄酮进行纯化。选用枳壳总黄酮质量浓度 0.408 g · L⁻¹, pH 4 的提取液以 2 BV · h⁻¹ 流速上样;用 75% 乙醇以 1 BV · h⁻¹ 流速进行洗脱。分别将提取液和洗脱液用旋转蒸发器回收乙醇后冷冻干燥,得到粉状产品,准确称取总黄酮提取物和纯化物粉末各 0.02 g,用 95% 乙醇定容,摇匀,测定,计算总黄酮纯度。结果得到的样品中枳壳总黄酮的纯度由原来的 14.03% 提高到 42.54%。

3 讨论

通过静态吸附试验,比较了 7 种不同型号大孔树脂对枳壳总黄酮的吸附性能,筛选出 AB-8 性大孔树脂为最适宜枳壳总黄酮分离纯化的大孔树脂。在对 AB-8 型树脂动态吸附枳壳总黄酮特性进行研

究的基础上,确定 AB-8 型大孔树脂分离纯化枳壳总黄酮的最佳工艺参数为上样液质量浓度 0.408 g · L⁻¹, pH 4,上样速率 2 BV · h⁻¹;洗脱剂为 75% 乙醇,洗脱流速 1 BV · h⁻¹。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:229.
- [2] 滕建业,孟宪生,韩凌,等. 枳壳中柚皮苷提取工艺的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):34.
- [3] Xaufman D B, Hayes T, Buettner J, et al. Chromatographic resolution of tryptophan enantiomers with L-Leu-L·Leu-L Leupeptide effects of mobile phase composition and chromatographic support [J]. J Chromatogr A,2000,874 (1):21.
- [4] 潘道东,林璐. DA201-C 大孔吸附树脂静态吸附 ACE 抑制肽的研究[J]. 食品科学,2009,30(5):20.
- [5] 邱碧菡,李欢,潘林海,等. 不同大孔树脂组合精制黄连解毒汤复方水提液的吸附-解吸动力学比较研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(15):2056.
- [6] 朱欣婷,刘云. 大孔树脂纯化无花果叶总黄酮[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):13.
- [7] 李俶,倪永年,李莉. 大孔吸附树脂分离纯化槲寄生中黄酮的研究[J]. 食品科学,2008,29(2):68.
- [8] G kmen V, Serpen A. Equilibrium and kinetic studies on the adsorption of dark colored compounds from apple juice using adsorbent resin[J]. J Food Eng,2002,53 (3):221.
- [9] 涂盛辉,邱俊明,邱祖民,等. 大孔吸附树脂精制中药栀子中栀子苷的研究[J]. 南昌大学学报:工科版,2007,29(4):307.
- [10] 傅善权,郑一敏,胥秀英,等. 枳壳总黄酮提取工艺与含量测定研究[J]. 药学实践杂志,2008,26(2):115.
- [11] 金向群,刘永刚. D140 大孔吸附树脂纯化淫羊藿黄酮的研究[J]. 中成药,2004,26(11):872.
- [12] 杜晖,陈晓青,黄冰,等. 大孔吸附树脂分离纯化夏枯草总黄酮的工艺研究[J]. 中成药,2008,30(9):1294.

[责任编辑 仝燕]