

# 木蝴蝶总黄酮的大孔吸附树脂纯化工艺

李帅, 吴鸣建\*

(郑州大学化工与能源学院, 郑州 450001)

**[摘要]** 目的: 优选木蝴蝶总黄酮的大孔吸附树脂分离纯化工艺, 并确定最佳工艺参数。方法: 采用静态与动态吸附-洗脱相结合的方法, 以吸附率与洗脱率为指标, 考察了 5 种树脂对木蝴蝶总黄酮的纯化能力。结果: HPD100 型树脂的吸附率与解吸率均较高。动态吸附-洗脱的最佳条件: 上样液质量浓度  $4.618 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 吸附流速  $3.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 溶液 pH 2.0, 3 BV 水洗, 解析剂为 5 BV 90% 乙醇。结论: 在最佳工艺条件下, HPD100 型大孔吸附树脂纯化效果良好, 所得木蝴蝶纯化物中总黄酮质量分数  $> 80\%$ 。

**[关键词]** HPD100 树脂; 分离纯化; 黄酮

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0051-03

## Purification Technology of Total Flavones from *Oroxylum indicum* by Macroporous Resin

LI Shuai, WU Ming-jian\*

(School of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize separation and purification technology of total flavones from *Oroxylum indicum* by macroporous resin, and establish optimum technology parameters. **Method:** Purification capacity of 5 different macroporous resins for total flavones from *O. indicum* with absorption ratio and desorption ratio as indexes by combining static and dynamic adsorption-desorption method. **Result:** HPD100 resin possessed good adsorption capacity and desorption rate by comparing with other resins. Optimized conditions of dynamic adsorption-desorption experiment were: concentration of sample was  $4.618 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (pH 2.0) at absorption flow speed of  $3.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , washed with 3 BV water and eluted with 5 BV of 90% ethanol. **Conclusion:** Under this optimized technology, HPD100 macroporous resin could be used to purify total flavones of *O. indicum*, the content of total flavones was more than 80%.

**[Key words]** HPD100 macroporous adsorption resin; separation and purification; flavonoids

木蝴蝶原名千张纸, 是紫葳科植物木蝴蝶的成熟种子, 主要分布在我国广东、广西、云南、贵州等地区和尼泊尔、印度等国家, 临床上用于治疗肺热咳嗽、喉痹、音哑、肝胃气痛、疮口不敛<sup>[1-2]</sup>。黄酮类化合物是木蝴蝶的主要活性成分, 已经鉴定出的有白杨黄素、黄芩素、木蝴蝶苷 A、木蝴蝶苷 B 等 22 种化

合物<sup>[3-5]</sup>。对木蝴蝶黄酮类化合物的分离纯化未见报道。

大孔吸附树脂是一种具有大孔网状结构和较大比表面积的有机高聚物, 可有选择地从溶液中吸附有机物, 从而达到分离纯化的目的, 广泛应用于污水处理、抗生素提纯、天然产物的分离纯化等<sup>[6]</sup>。本文在以往研究的基础上, 考察了 5 种大孔吸附树脂对木蝴蝶黄酮的吸附解析特性, 并对动态吸附解析过程进行系统研究, 旨在获得高纯度的木蝴蝶黄酮类化合物, 以满足医药和食品工业的要求, 同时也为同类化合物的研究提供研究思路。

**[收稿日期]** 20110707(001)

**[第一作者]** 李帅, 硕士研究生, 从事化学工艺研究, Tel: 15038286569, E-mail: lishuai198746@163.com

**[通讯作者]** \* 吴鸣建, 教授, 博士, 从事天然产物提取、分离纯化, 结构鉴定等研究, E-mail: wumj68@126.com

## 1 材料

752N 型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),HZQ-F160A 型气浴恒温震荡培养箱(上海一恒科技有限公司),FW-100 型高速万能粉碎机(天津市华鑫仪器厂),木蝴蝶种子购自河南省医药公司,黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 121967-41-9),D101,HP20,SP825 型大孔树脂(日本三菱化工),HPD100,D301 型大孔树脂(西安蓝晓树脂有限公司),其他试剂均为分析纯,树脂吸附柱自制。

## 2 方法与结果

### 2.1 木蝴蝶总黄酮含量测定<sup>[7]</sup>

**2.1.1 方法学考察** 精密称取在 60 °C 减压干燥的黄芩苷对照品 8 mg 置于 50 mL 量瓶中,60% 乙醇溶液定容至刻度,摇匀。准确移取 0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL 置于 50 mL 量瓶中,60% 乙醇溶液稀释至刻度,摇匀。以 60% 乙醇溶液做空白对照,278 nm 处测定吸光度。以溶液质量浓度( $C$ )为横坐标,吸光度( $A$ )为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为  $C = 13.800 5A + 0.253 2$  ( $r = 0.999 5$ ),线性范围 1.6 ~ 16  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。经方法学考察,稳定性、重复性、精密度等均符合规定,其中平均加样回收率为 101.15%,RSD 1.06%。

**2.1.2 样品溶液的制备及含量测定<sup>[8]</sup>** 精密称取过 40 目筛的木蝴蝶干燥粉末 5.0 g,按 1:30 的比例加入 60% 乙醇水溶液 150 mL,40 °C,28 kHz 超声 50 min,抽滤,等体积的石油醚萃取 3 次除去叶绿素、油溶性脂质等杂质,取乙醇提取液,减压回收乙醇至无醇味,滤过,放入棕色瓶冷藏备用。准确移取 0.5 mL 于 100 mL 量瓶中,60% 乙醇溶液定容至 100 mL,278 nm 处测定吸光度,根据标准曲线回归方程计算样品溶液中木蝴蝶总黄酮的质量浓度为 4.618  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 2.2 大孔吸附树脂的筛选

**2.2.1 静态吸附-解吸试验** 以比吸附量和静态解吸率为树脂考察指标,准确称取经预处理的 D301, D101, SP825, HP20, HPD100 型树脂各 2.0 g,置于 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 25 mL 2.1.2 项下样品溶液,25 °C 恒温震荡 8 h,充分吸附后,测定吸附平衡浓度,按式(1)计算比吸附量分别为 58.9,30.8,42.8,32.3,38.6  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。过滤得饱和吸附树脂,分别加入 95% 乙醇溶液 25 mL,25 °C 恒温震荡解析 8 h,测定溶液质量浓度,按式(2)计算解吸率分别为 27.9%,88.5%,81.6%,94.5%,95.7%。

$$Q_e = (C_0 - C_e) V / M \quad (1)$$

$$D = C_1 V_1 / (C_0 - C_e) V \times 100\% \quad (2)$$

$Q_e$ —树脂比吸附量; $M$ —干树脂质量; $D$ —静态解吸率; $C_1$ —解吸液质量浓度; $C_0$ —原料液质量浓度; $C_e$ —吸附平衡质量浓度; $V$ —吸附液体积; $V_1$ —解吸液体积。

结果表明弱极性树脂 D301,SP825 型对木蝴蝶黄酮的比吸附量较大,因为弱极性树脂与黄酮类化合物之间的范德华力和形成氢键的能力较强;非极性树脂相对较弱。同时吸附作用力强,解吸相对较难,故 D301,SP825 型树脂的解吸率相对较低。D101 型树脂为非极性树脂,解吸率较高,但其比表面积较小,故比吸附量比其他 4 种树脂都小,不适合应用于分离。综上所述,根据静态吸附与解吸计算结果比较,选择 SP825,HP20,HPD100 型树脂做进一步的动态吸附试验。

**2.2.2 动态吸附-洗脱试验** 准确称取 10.0 g(约 15 mL) SP825,HP20,HPD100 型湿树脂装入树脂吸附柱中,量取一定体积的样品溶液,流速 5  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,3 BV 水洗,合并流出液定容到 100 mL,测定溶液质量浓度,按式(3)计算动态吸附率分别为 64.5%,61.8%,60.5%。取 45 mL 95% 乙醇以 5  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  流速过柱,收集流出液定容至 100 mL,按(4)计算动态解析率分别为 71.6%,91.1%,95.7%。

$$E_1 = (C_0 V_0 - C_2 V_2) / C_0 V_0 \times 100\% \quad (3)$$

$$E_2 = C_1 V_1 / (C_0 V_0 - C_2 V_2) \times 100\% \quad (4)$$

$E_1$ ——动态吸附率; $E_2$ ——动态洗脱率; $C_2$ ——吸附后流出液黄酮质量浓度; $V_2$ ——吸附后流出液黄酮体积。

结果表明 SP825,HP20,HPD100 型树脂对木蝴蝶总黄酮的吸附率相差不大,但 SP825 型树脂的洗脱率却远低于 HP20,HPD100 型树脂。综合考虑静态吸附-洗脱与动态吸附-洗脱试验结果,选择 HPD100 树脂做进一步工艺研究。

**2.3 HPD100 型分离纯化工艺优化** 对影响 HPD100 型树脂吸附-洗脱性能的样品质量浓度、pH、流速、水洗液用量、洗脱剂浓度、洗脱剂用量进行系统研究,以确定了最佳吸附-洗脱条件。

**2.3.1 上样质量浓度对树脂吸附性能的影响** 称取 HPD100 型树脂(10 g)装柱,将 5 份木蝴蝶样品溶液分别稀释成生药质量浓度 4.618,3.436,2.309,1.154,0.577  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液上样,结果表明随着上样液质量浓度的增加,吸附率明显增加(分别

为 69.6% ,65.9% ,50.0% ,40.0% ,27.2% )。当质量浓度为  $4.618 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时,吸附率最高,若上样液质量浓度继续增加,上样液中明显有沉淀析出,故选择质量浓度为  $4.618 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的样品溶液直接上样。

**2.3.2 pH 对树脂吸附性能的影响** 称取样品溶液 HPD100 型树脂 10 g 装柱,将  $4.618 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  木蝴蝶样品溶液调节成不同 pH(1,2.5,3.5,5.5,6.5,7.5),考察 pH 对树脂吸附性能的影响,结果总黄酮吸附率分别为 74.5% ,76.3% ,70.8% ,68.5% ,53.5% ,41.6% ,pH 2 左右时,HPD100 型树脂对木蝴蝶黄酮的吸附率达到最大。之后随 pH 增大,吸附率逐渐减小,且当 pH 7 时,上样溶液颜色明显加深,吸附率仅为 41.6%。综合考虑试验选择将溶液调节至 pH 2 左右进行上样。

**2.3.3 吸附速率对树脂吸附性能的影响** 称取 5 份 HPD100 型树脂 10 g 装柱,将 5 份等量木蝴蝶样品溶液以不同速率( $3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )过柱,结果吸附率分别为 76.1% ,71.8% ,68.9% ,67.3% ,63.7%。流速越慢,吸附率越高,可能是因为流速过快,树脂与黄酮溶液接触时间较短,黄酮溶液很快流出。但吸附速率过慢,生产周期较长,效率较低,综合考虑效率与吸附率,选择  $3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  流速进行动态吸附。

**2.3.4 水洗液用量的确定** 称取 HPD100 型树脂 10 g 装柱,将木蝴蝶样品溶液 25 mL 按已优选工艺上样过柱。吸附完全后蒸馏水洗杂质。水洗量为 1,2,3,4,5 ~ 10 BV,结果质量浓度分别为  $0.3, 0.9, 0, 0, 0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,水洗液用量为 3 BV,洗脱液经紫外检测,吸光度接近于 0,表明树脂表面的黄酮溶液以及多糖已基本除尽。

**2.3.5 洗脱剂的选择** 称取 7 份 HPD100 型树脂装柱每份 10 g,将木蝴蝶样品溶液 25 mL 按已优选工艺上样过柱,水洗除杂后,用体积分数分别为 30% ,50% ,70% ,80% ,90% ,95% ,100% 的乙醇 3 BV 洗脱吸附树脂柱,结果累计解析率分别为 40% ,48% ,73% ,92.6% ,94% ,94%。90% 乙醇洗脱率为 92.6% ,继续提高乙醇体积分数,洗脱率几乎不再变化,综合考虑选择 90% 乙醇溶液作为洗脱剂。

**2.3.6 洗脱剂用量的考察** 称取 HPD100 型树脂 10 g 装柱,将木蝴蝶样品溶液 25 mL 按已优选工艺上样过柱,水洗除杂后,90% 乙醇洗脱,按 1 BV/份

分段收集洗脱液,共收集 10 BV。结果每段洗脱液中黄酮的质量浓度分别 0.57, 1.86, 0.57, 0.27, 0.11, 0.05, 0.01, 0.01, 0.01, 0.00。5 BV 时,洗脱液中黄酮质量浓度趋近于 0,综合效率与成本考虑,选择 5 BV 为最佳。

**2.3.7 验证试验** 按上述优选后的纯化工艺进行 3 次试验,结果表明木蝴蝶黄酮乙醇粗提液经树脂纯化处理,纯度明显提高,3 次试验提取物中总黄酮质量分数分别为 85.2% ,84.2% ,84.6% ,说明具有良好的重复性。

### 3 讨论

HPD100 型大孔吸附树脂是苯乙烯型非极性共聚体,具有较大的比表面积,适于富集天然药物中的有效成分。本研究选择 5 种大孔吸附树脂进行静态-动态吸附解析试验,筛选出 HPD100 型树脂为较理想的黄酮吸附剂,适用于木蝴蝶黄酮的分离纯化。优选的最佳纯化工艺为上样液质量浓度  $4.618 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,pH 2.0 左右,流速  $3.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,3 BV 水洗除杂,5 BV 90% 乙醇洗脱,收集洗脱液即可。在优化条件下,纯化后木蝴蝶黄酮纯度有很大提高,且工艺稳定,重复性好,适合进一步扩大生产研究。

### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2005:46.
- [2] 中国药科大学.中药辞海[M].北京:中国医药科技出版社.1996.807.
- [3] Nair A G, Joshi B S. Oxindin-a new flavone glucuronide from *Oroxylum indicum* Vent. [J]. Proc Indian Acad Sci SectA, 1979, 88 (A) :323.
- [4] Li J Chen, David E G, Jonathan J. Isolation and identification four flavonoid constituents from the seeds of *Oroxylum indicum* by high-speed counter-current chromatography [J]. Chromatogr, 2003, 98(8) :95.
- [5] 陈亮亮,宋晓凯,侯文彬,等.木蝴蝶化学成分的研究[J].中草药,2007,38(2) : 186.
- [6] 于智峰,王敏.大孔吸附树脂在黄酮类化合物分离中的应用[J].中药材,2006,29(12) :1380.
- [7] 严赞开.紫外分光光度法测定植物黄酮含量的方法[J].食品研究与开发,2007,28(9) :164.
- [8] 胡殿丽,吴鸣建.木蝴蝶总黄酮超声提取工艺研究[J].时珍国医国药,2010,21(8) :35.

[责任编辑 全燕]