

大孔树脂纯化玉竹提取物 总黄酮的工艺研究

宁波,于丽颖,王晓林,谭乃迪

(吉林化工学院 化学与制药工程学院,吉林 吉林 132022)

摘要:以玉竹提取物为原料,以总黄酮吸附率及解吸率为指标,采用动态吸附—解吸的方法筛选出大孔树脂的类型。通过单因素实验和正交实验确立了D-101树脂吸附玉竹总黄酮的优化工艺条件,洗脱过程考察了主要影响因素洗脱剂浓度及其用量。优化后的吸附工艺条件为:树脂用量55 g、上柱药液浓度40.54 μg/mL、上柱液pH 6、吸附流速0.5 BV/h。解吸过程解吸液乙醇浓度和用量分别为60%和100 mL。经D-101大孔树脂分离纯化后,玉竹提取物总黄酮的纯度由0.36%提高到2.05%。该纯化方法低廉、安全、操作简单,有较高的应用价值。

关键词:玉竹;总黄酮;大孔吸附树脂;纯化

中图分类号:R 284.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2016)06-0045-05

Research on purification of total flavonoids extracted from polygonatum by macroporous resin

NING Bo, YU Li-ying, WANG Xiao-lin, TAN Nai-di

(School of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Jilin Institute of
Chemical Technology, Jilin Jilin 132022)

Abstract: Taking polygonatum extraction as raw material, the adsorption rate and desorption rate of total flavonoids as the indexes, the type of macroporous resin was screened out by dynamic adsorption - desorption method. The process condition of absorbing the total flavonoids of polygonatum by D-101 resin was established by single factor experiments and orthogonal experiment; the main factors, concentration and dosage of eluent, was discussed. The optimal adsorption process condition was: the amount of macroporous resin 55 g, the concentration of upstream solution 40.54 μg/mL, pH 6, and adsorption velocity 0.5 BV/h. During the process of desorption solution, the concentration of ethanol was 60% and the dosage of ethanol was 100 mL. After being purified by D-101 macroporous resin, the purity of total flavonoids was increased from 0.36% to 2.05%. This purification method is cheap, safety, simple and has a high application value.

Key words: polygonatum; total flavonoids; macroporous resin; purification

玉竹是黄精属植物玉竹的地下根茎,又名葳蕤、萎蕤、女萎,在《神农本草经》、《本草正义》中均有记载,性平、味甘,具有生津止渴、养阴润燥的功能,用于热病口渴咽干、心烦心悸、干咳少痰、糖尿病等^[1]。玉竹的化学成分包括甾体皂苷、黄酮、多糖、生物碱等,其中含黄酮类化合物白屈菜酸、氮杂环丁烷-2-羧酸等,有较强的抗氧化能力,具有抗衰老、

增强机体免疫力的生物活性^[2]。

大孔吸附树脂是一种不溶于酸、碱及各种有机溶剂的有机高分子聚合物^[3],可利用其选择性吸附功能和多孔结构从中药提取液中分离精制有效成分或有效部位。20世纪70年代末大孔树脂逐步应用于天然植物的黄酮类化合物的分离纯化^[4],特点是吸附容量大、再生简单、效果可靠,尤其适用于黄酮类、皂苷类等成分的分离纯化及其大规模生产。

钟方丽等^[5]关于大孔树脂法纯化玉竹总黄酮

收稿日期:2016-04-20

基金项目:吉林省科技厅科技支撑计划项目(201330206021)

作者简介:宁波,1988年出生,男,硕士研究生。

通讯作者:于丽颖,1967年出生,女,教授。

的工艺研究,主要通过静态吸附与解吸实验确定纯化玉竹总黄酮的大孔树脂型号并优化其工艺条件,本文通过动态吸附与解吸附实验确定大孔树脂纯化玉竹总黄酮的优化工艺参数,为更有效利用玉竹、发挥其最大经济效益提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

玉竹:中药饮片,北京同仁堂饮片有限责任公司;芦丁对照品:供含量测定用,成都曼思特生物科技有限公司;大孔吸附树脂:AB-8、LSA21、LX-8、DM130、D-101型;亚硝酸钠:分析纯,天津市永大化学试剂有限公司;硝酸铝、95%乙醇:分析纯,天津市大茂化学试剂厂;氢氧化钠:分析纯,天津市北方天医化学试剂厂。

1.2 主要仪器设备

紫外—可见分光光度计:T6型,北京普析仪器有限公司;电子分析天平:JY2002型,上海精密科学仪器有限公司;高温鼓风干燥箱:CS101-AB型,上海蓝豹试验设备有限公司;旋转蒸发器:SHZ-D型,河南巩义市英峪仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 对照品溶液的配制

精密称取芦丁对照品 10.0 mg,置于 50 mL 容量瓶中,加入 50% 乙醇溶液,超声使之溶解,并用 50% 乙醇溶液定容至刻度,制得芦丁对照品溶液 (0.20 mg/mL)。

1.3.2 供试品溶液的配制

称取干燥玉竹 100 g 于圆底烧瓶中,加入 800 mL 80% 的乙醇热回流 3 次,每次 2 h,过滤,合并以上 3 次滤液,取滤液减压蒸馏回收乙醇,浓缩,80% 乙醇定容于容量瓶中作为供试品溶液,待用。

1.3.3 最大吸收波长的测定

将芦丁对照品、不加供试品的平行样(空白)置于波长 300~600 nm 范围内测定,显色后确定最大吸收波长为 512 nm。

1.3.4 标准曲线的制备

精密吸取芦丁对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 分别置于 25 mL 容量瓶中,加入 5% NaNO_2 溶液 0.4 mL,摇匀,放置 6 min,加入 10%

$\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.4 mL,摇匀,放置 6 min,加入 4% NaOH 溶液 4.0 mL,加入 60% 乙醇溶液定容至刻度,摇匀,放置 15 min。以 60% 乙醇溶液为空白对照,按照紫外分光光度法于 512 nm 波长处测定不同浓度芦丁对照品溶液的吸光度,以吸光度 A 为纵坐标、芦丁对照品溶液的浓度 C 为横坐标,制备标准曲线^[5],回归方程为 $A = 0.0112C - 0.0081$, $R = 0.9995$ 。结果表明,芦丁在 8.0~48.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内呈良好的线性关系(见图 1)。

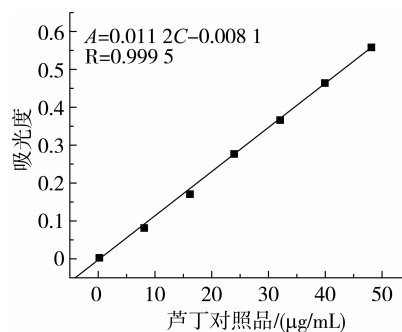


图 1 标准曲线

1.4 总黄酮含量测定方法

1.4.1 玉竹总黄酮药液的制备及含量测定

称取干燥的玉竹粉碎物 100 g 于圆底烧瓶中,加入 800 mL 80% 的乙醇热回流 3 次,每次 2 h,过滤,合并以上 3 次的滤液,取滤液减压蒸馏回收乙醇,浓缩,80% 乙醇定容于容量瓶中作为供试品溶液,待用。吸取相应的玉竹总黄酮样品液 0.5 mL,分别置于 10 mL 容量瓶中,定容至刻度,按 1.3.3 项下方法,于 512 nm 处测定吸光度。

1.4.2 大孔吸附树脂的预处理

按照参考文献^[5-8]所述方法对 5 种大孔吸附树脂(AB-8、LSA21、LX-8、DM130、D-101)进行预处理,处理完毕后,置于密闭容器中备用。

2 结果与分析

2.1 不同型号树脂的选择

取处理好的 AB-8、LSA21、LX-8、DM130、D-101 树脂各 50 g 于柱内,精密吸取玉竹水溶液(总黄酮含量为 43.90 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 mL,分别加于 5 根树脂柱上,缓慢上柱,以 1 BV/h 的流速进行动态吸附,当提取液流至树脂柱底端时,关闭,静置 0.5 h,然后继续过柱,收集流出液,记录体积,测定流出液中总黄酮含量,计算吸附率。用 100 mL 60% 乙醇

洗脱,分别收集过柱液,记录体积,测定流出液中总黄酮含量,计算解吸率,结果见表1。

结果表明,5种树脂中动态吸附率最高的是D-101树脂,同时D-101树脂解吸率也最高,因此选择D-101树脂进行进一步工艺优化研究。

表1 不同型号树脂的选择

树脂种类	AB-8	LSA21	LX-8	DM130	D-101
吸附后药液浓度 $C_1/(\mu\text{g/mL})$	6.64	5.96	7.51	8.76	4.22
吸附率/%	84.87	86.42	82.89	80.05	90.38
解吸液浓度 $C_2/(\mu\text{g/mL})$	29.08	26.79	27.85	29.09	31.12
解吸率/%	46.30	43.31	47.45	45.81	48.62

2.2 动态吸附过程

2.2.1 上样量体积对吸附率的影响

取处理好的D-101树脂50g于柱内,精密吸取玉竹水溶液(总黄酮浓度为 $43.90 \mu\text{g/mL}$)200mL,缓慢上柱,以1BV/h的流速进行动态吸附,当提取液流至树脂柱底端时,关闭,静置1h,然后继续过柱,收集流出液,以2.2cm为一个流份,共收集10个流份。选择不同流份显色后于512nm处测定总黄酮吸光度,以流出液体积为横坐标,吸附率为纵坐标,作动态吸附曲线,结果见图2。

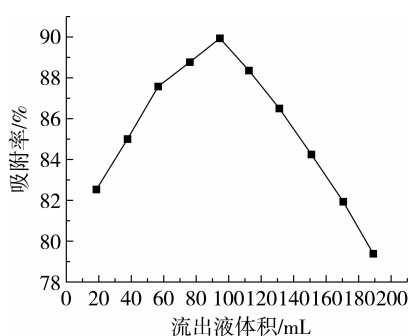


图2 动态吸附曲线

结果表明,随着上样量的增加,吸附率呈现先增后减的趋势。当上样量为100mL时,大孔树脂多孔结构达到饱和,吸附率最高,所以选择上样量为100mL。

2.2.2 树脂用量对吸附率的影响

取玉竹水溶液(总黄酮浓度为 $43.90 \mu\text{g/mL}$)100mL,按树脂量40、45、50、55、60g,以1BV/h的流速进行吸附,当提取液流至树脂柱底端时,关闭,静置1h,然后继续过柱,收集流出液,记录体

积,测定流出液中总黄酮含量,计算吸附率,结果见表2。

表2 树脂用量对吸附率的影响

树脂用量/g	40	45	50	55	60
吸附后浓度 $C_1/(\mu\text{g/mL})$	7.80	5.55	3.97	3.91	3.88
吸附率/%	82.53	87.57	91.11	91.83	91.94

结果表明,随着树脂用量的增加,吸附率呈现增加的趋势,当树脂用量为50g时,吸附率达到91%以上,继续增加,吸附率变化不明显,所以选择树脂用量为50g。

2.2.3 上柱液浓度对吸附率的影响

取D-101树脂5份,各50g,分别加入浓度为6.04、11.57、22.36、44.67、66.50 $\mu\text{g/mL}$ 的玉竹总黄酮提取液,以1BV/h的流速进行吸附,上柱吸附完全后,静置1h,分别收集过柱液,记录体积,测定流出液中总黄酮含量,计算各浓度下的吸附率,结果见表3。

表3 上柱液浓度对吸附率的影响

上柱液 $C_0/(\mu\text{g/mL})$	6.04	11.57	22.36	44.67	66.50
过柱液 $C_1/(\mu\text{g/mL})$	1.11	2.07	3.20	4.30	7.57
吸附液体积/mL	93	93	89	98	99
吸附率/%	82.88	83.33	87.25	90.56	88.75

结果表明,随着上柱药液浓度的增加,吸附率呈现先增后减的趋势,当上柱药液浓度为 $44.67 \mu\text{g/mL}$ 时,吸附率最高,此时大孔树脂利用其选择性吸附功能和多孔结构从玉竹提取液中分离精制的总黄酮含量达到了其最大吸附能力,所以适宜上柱药液浓度为 $44.67 \mu\text{g/mL}$ 左右。

2.2.4 吸附流速对吸附率的影响

取玉竹水溶液(总黄酮浓度为 $44.67 \mu\text{g/mL}$)100mL,共5份,加于5根50gD-101树脂柱上,分别以0.5、1、1.5、2、2.5BV/h的流速进行吸附,上柱吸附完全后,静置1h,分别收集过柱液,记录体积,测定流出液中总黄酮含量,计算各流速下的吸附率,结果见表4。

表4 吸附流速对吸附率的影响

吸附流速/(BV/h)	0.5	1	1.5	2	2.5
吸附后浓度 $C_1/(\mu\text{g/mL})$	6.63	5.41	7.18	8.56	9.07
吸附率/%	85.28	87.76	83.76	81.02	79.06

结果表明,随着吸附流速的增加吸附率呈现减小的趋势,当吸附流速为 1 BV/h 时,吸附率最高。流速过快时,树脂与被吸附物质分子间来不及充分接触,致使分子不能充分扩散到树脂内表面,随着上样液一起流出,所以随着流速的增加吸附量下降。适宜上柱药液流速为 1 BV/h。

2.2.5 上柱液 pH 值对吸附率的影响

取处理好的 D-101 树脂 50 g 于柱内,共 7 根,取总黄酮浓度为 44.67 μg/mL 的上样溶液 100 mL,共 7 份,用 5% HCl 和 5% NaOH 溶液调 pH 值分别为 3、4、5、6、7、8、9,然后全部样液上柱,以 1 BV/h 的流速进行吸附,上柱吸附完全后,静置 1 h,分别收集过柱液,记录体积,测定流出液中总黄酮含量,计算各 pH 值下的吸附率,结果见表 5。

表 5 上柱液 pH 值对吸附率的影响

上柱药液 pH 值	3	4	5	6	7	8	9
吸附后浓度 C ₁ /(μg/mL)	10.77	10.12	7.41	5.49	4.72	6.07	6.94
吸附率/%	76.06	77.51	83.52	87.79	89.51	86.50	84.57

结果表明,随着上柱液 pH 值的增加,吸附率呈现先增后减的趋势,当 pH 值为 7 时,吸附率最高。由于电离平衡的存在,酸性条件抑制黄酮羟基上质子的离子,使得黄酮在酸性体系中以分子的形式存在,不利于大孔树脂的吸附;又因为碱性容易破坏黄酮化合物的母核,从而降低目标产物的含量,所以选择上柱液 pH 为 7。

2.2.6 吸附过程的正交实验

通过吸附过程单因素探索性实验选择树脂用量、上柱液浓度、吸附流速、上柱液 pH 值为考察因素,以吸附率为考察指标,进一步优化 D-101 型大孔吸附树脂纯化玉竹提取物总黄酮的工艺条件,正交实验的因素水平见表 6,结果见表 7。

表 6 因素水平

水平	A	B	C	D
	树脂用量/g	上柱药液浓度/(μg/mL)	吸附流速/(BV/h)	上柱药液 pH 值
1	45	40.54	0.5	6
2	50	44.67	1	7
3	55	48.32	1.5	8

表 7 正交实验结果

实验号	A	B	C	D	吸附率
1	1	1	1	1	0.927
2	1	2	2	2	0.815
3	1	3	3	3	0.783
4	2	1	2	3	0.790
5	2	2	3	1	0.880
6	2	3	1	2	0.901
7	3	1	3	2	0.946
8	3	2	1	3	0.900
9	3	3	2	1	0.938
K1j	0.842	0.888	0.909	0.915	
K2j	0.857	0.865	0.848	0.887	
K3j	0.928	0.874	0.870	0.824	
MAX	0.928	0.888	0.909	0.915	
极差	0.086 3	0.022 7	0.061 7	0.090 7	
优水平	A ₃	B ₁	C ₁	D ₁	

结果表明,D-101 型大孔树脂纯化玉竹总黄酮的最佳实验条件为 A₃B₁C₁D₁,即最佳吸附工艺为:树脂用量 55 g、上柱药液浓度 40.54 μg/mL、上柱液 pH 值为 6、吸附流速 0.5 BV/h。各因素对纯化工艺影响的主要顺序为 D > A > C > B。

2.2.7 吸附工艺验证性实验

为了考察上述优化工艺的稳定性,进行了 3 次验证性实验,吸附率分别为 94.85%、93.96%、94.12%,平均吸附率为 94.31%,RSD=0.5%,具有良好的重现性。

2.3 动态解吸过程

在上述优化的吸附工艺条件下,进行解吸过程洗脱剂浓度及用量的考察。

2.3.1 洗脱剂浓度的考察

取玉竹水溶液(总黄酮含量为 40.54 μg/mL) 100 mL,共 5 份,用 5% HCl 调节 pH 至 6,分别取 55 g D-101 树脂加于 5 根树脂柱上,以 0.5 BV/h 的流速进行吸附,上柱吸附完全后,静置 1 h,分别收集过柱液。然后分别以不同浓度的乙醇各 100 mL 进行洗脱,分别收集过柱液,记录体积,测定流出液中总黄酮含量,计算解吸率,结果见表 8。

表 8 洗脱剂浓度的考察结果

洗脱剂浓度/%	50	60	70	80	90
洗脱后浓度 C ₂ /(μg/mL)	20.09	20.64	20.84	20.95	20.98
解吸率/%	45.99	48.82	48.91	49.12	49.25

实验结果表明,随着洗脱剂乙醇浓度的增加,解吸率呈现增加的趋势,但高浓度洗脱剂时解吸率变化较小,这是因为随着洗脱剂浓度的增加其极性增大,使得洗脱能力变弱。所以选择适宜乙醇浓度为60%。

2.3.2 洗脱剂用量的考察

取玉竹水溶液(总黄酮含量为40.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 mL,共5份,用5% HCl 调节 pH 至6,分别取55 g D-101 树脂加于5根树脂柱上,以0.5 BV/h 的流速进行吸附,上柱吸附完全后,静置1 h,分别收集过柱液。以不同体积的60%乙醇进行洗脱,分别收集过柱液,记录体积,测定流出液中总黄酮含量,计算解吸率,结果见表9。

表9 洗脱剂用量的考察结果

洗脱剂用量/mL	40	60	80	100	120
洗脱后浓度 $C_2/(\mu\text{g}/\text{mL})$	41.92	28.64	23.29	20.64	15.59
解吸率/%	37.65	40.03	43.57	48.82	44.32

结果表明,洗脱剂乙醇浓度相同时,随着乙醇体积用量的增加,解吸率呈现先增后减的趋势,当乙醇体积为100 mL时,解吸率最高,继续增加,解吸率减小,所以选择乙醇体积100 mL。

2.4 供试品中总黄酮含量的测定

按上述优化的工艺进行3次实验,测定经D-101大孔树脂纯化后供试品中总黄酮含量,结果见表10。

表10 纯化玉竹总黄酮工艺验证实验结果

样品	总黄酮浓度 $C_1/(\text{mg}/\text{mL})$	干浸膏质量/g	纯度/%
玉竹样品液	0.357 2	0.100	0.36
供试品1	0.065 3	0.308	2.12
供试品2	0.069 3	0.336	2.06
供试品3	0.065 8	0.333	1.97

实验结果表明,经过D-101大孔树脂纯化后,玉竹提取液中总黄酮的纯度有明显的提高,从原来的0.36%提高到2.05%左右,说明D-101对玉竹

总黄酮有良好的纯化作用。

3 结论

在中药制药工业中,大孔吸附树脂纯化技术是有发展前景的实用新技术之一,纯化工艺主要采用静态纯化和动态纯化,相对而言,动态纯化技术具有富集效率高、成本低、实用性强、易操作等特点。本研究对5种不同型号的大孔树脂进行了玉竹总黄酮纯化实验,在相同实验条件下通过比较吸附率和解吸率的大小,筛选出D-101型大孔树脂对玉竹总黄酮进行分离纯化。通过单因素实验和正交实验确立了D-101树脂吸附玉竹总黄酮的动态纯化优化工艺条件,优化后的动态吸附工艺条件为:树脂用量55 g、上柱药液浓度40.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、上柱液pH值6、吸附流速0.5 BV/h。动态解吸过程解吸液(乙醇)浓度和用量分别为60%和100 mL。经D-101大孔树脂分离纯化后,玉竹提取物总黄酮的纯度由0.36%提高到2.05%,表明D-101型大孔树脂对玉竹总黄酮具有一定的纯化功能。本研究为玉竹总黄酮的工业化生产提供了理论依据。

参考文献:

- [1]刘塔斯,杨先国,龚力民,等.药食两用中药玉竹的研究进展[J].中南药学,2008,6(2):216-219.
- [2]陈地灵,徐大量,林辉.玉竹总黄酮体内外抗氧化作用的实验研究[J].今日药学,2008,18(6):13-14.
- [3]李淑珍,李进,杨志江,等.大孔树脂分离纯化黑果枸杞总黄酮的研究[J].食品科学,2009,30(1):19-24.
- [4]高伟城,蓝晓庆,潘馨.大孔吸附树脂在分离纯化总黄酮化合物中的应用[J].海峡药学,2009,21(7):26-27.
- [5]钟方丽,王晓林,王志敏,等.大孔吸附树脂纯化玉竹总黄酮的工艺研究[J].食品与机械,2013(1):131-134.
- [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.
- [7]阿布力克木·阿布力孜,阿布力米提·阿布都卡德尔,迪丽努尔·塔力甫.新疆野生苍耳叶中总黄酮的超声波提取工艺研究[J].食品科学,2009,30(16):131-134.
- [8]白夺龙,杨开华.大孔吸附树脂分离纯化技术及应用[J].海峡药学,2007,19(9):96-99.