

离子交换与吸附, 2012, 28(3): 231 ~ 239
ION EXCHANGE AND ADSORPTION
文章编号: 1001-5493(2012)03-0231-09

大孔树脂分离纯化藏药白花龙胆花总黄酮的研究*

矫晓丽^{1,2} 董琦¹ 迟晓峰^{1,2} 冀恬¹ 胡风祖^{1**}

1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要: 考察了 HPD-826、HPD-417、ADS-17、HPD-722、HPD-450、AB-8、HPD-600、D-101, 共 8 种大孔树脂对藏药白花龙胆花总黄酮的吸附和解吸性能, 通过静态吸附量和解吸率及静态吸附曲线的绘制, 筛选出 AB-8 树脂的效果最佳; 以 AB-8 树脂为目标, 进行了动态吸附实验, 考察了上柱液浓度、pH 值、上柱液流速、乙醇浓度、解吸剂流速、解吸体积等对 AB-8 树脂吸附和解吸效果的影响, 确定出 AB-8 树脂动态吸附白花龙胆花总黄酮的最佳条件: 上柱液浓度为 6.5mg/mL, pH 为 3.79, 上柱流速 4BV/h; 最佳洗脱条件: 用 50%乙醇进行洗脱, 解吸流速为 3BV/h, 解吸体积 4BV。在此条件下, 白花龙胆花总黄酮纯度由原来的 22.10%, 变为 65.75%, 产品精制倍数为 65.75%/22.10%=2.97, 表明 AB-8 树脂可用于白花龙胆花总黄酮的分离纯化。

关键词: 白花龙胆花; 总黄酮; 大孔树脂; 吸附; 解吸; 纯化

中图分类号: O647.3 **文献标识码:** A

1 前言

龙胆花被藏医作为“邦见”(藏药名称)使用,《晶珠本草》记载:邦见治毒病,各种热症,喉炎热闭;按花色分为白、蓝和黑 3 类,分别是“邦见嘎保”、“邦见温保”、“邦见那保”^[1]。龙胆属植物有多种生理活性,从各种龙胆属植物中分离出多种化合物,主要为环烯醚萜苷类、多糖类、口山酮、黄酮、三萜类、生物碱等,并进行了抗肝炎、降血糖、抗微生物等多种药理活性研究,从中发现了许多有价值的活性成分^[2-3]。龙胆属植物中含有的黄酮类成分繁多,结构多为异苈草素、异杜荆素及其衍生物。黄酮类化合物多具有治疗心血管疾病、抗炎、抗菌等作用,在医药领域有广阔的应用前景,因此,有效地分离纯化白花龙胆花中的黄酮类物质对充分开发利用白花龙胆资源具有重大意义。

大孔吸附树脂具有稳定性高、容量大、选择性好、再生简便、解吸条件温和、使用周期长、节省费用等优点,在黄酮分离纯化应用中日趋普遍^[4-7]。本文通过大孔树脂静态吸附、

* 收稿日期: 2011 年 11 月 26 日

项目基金: 青海省自然科学基金项目 (2011-Z-922Q)。

作者简介: 矫晓丽(1985-), 女, 山东省人, 硕士研究生。

** 通讯作者: E-mail: hufz@nwipb.ac.cn

解吸实验及 AB-8 树脂动态吸附解吸实验, 对大孔树脂分离纯化白花龙胆花总黄酮的条件进行了优化。通过相关参数的比较, 为分离纯化白花龙胆花黄酮类物质提供理论依据。

2 实验部分

2.1 仪器与材料

AG135 电子天平 (德国 Mettler Toledo 公司); 723PC 可见分光光度计 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司); KQ-100E 型超声波清洗器 (昆山超声仪器科技公司); MOLELEMENT 元素型超纯水机 (上海摩勒生物科技公司)。

白花龙胆购于西藏; 芦丁对照品购自中国药品生物制品检定所; 大孔树脂 HPD-826、HPD-417、ADS-17、HPD-722、HPD-450、AB-8、HPD-600、D-101 均购自沧州宝恩吸附材料科技有限公司; 无水乙醇、氢氧化钠、硝酸铝、亚硝酸钠均为国产分析纯; 去离子水。

2.2 树脂预处理与再生

树脂的预处理: 取适量树脂, 用 95%乙醇浸泡 24h 后, 除去树脂碎片和杂物。以乙醇湿法装柱, 继续用乙醇冲柱, 不时检查流出液, 至与水混合不呈白色浑浊为止, 然后以大量蒸馏水洗至无醇味, 备用。

树脂的再生: 树脂使用一次后, 一般先用 3% NaOH 洗涤或浸泡适当时间, 然后用水洗至中性, 再用 3% HCl 洗涤或浸泡, 蒸馏水洗至中性。最后用 95%乙醇洗脱至无色时, 树脂即已再生, 然后以大量水洗去乙醇, 即可进行下一次的分离。

2.3 样品的预处理及测定方法

2.3.1 白花龙胆花黄酮粗提液的制备

称取 100g 白花龙胆花干燥粉末, 加 70%乙醇回流提取 3 次, 然后用纱布过滤, 滤液再用滤纸抽滤两遍后得乙醇提取液, 合并提取液, 减压蒸馏回收乙醇, 得白花龙胆花黄酮粗提液。

2.3.2 黄酮类物质浓度的测定

2.3.2.1 工作曲线的绘制

白花龙胆花黄酮类物质含量测定采用以芦丁为对照品的 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法^[8], 显色测定吸光度 A , 得到线性回归方程为: $A=0.2359C-0.0025$, $R^2=0.9994$, 说明芦丁浓度 C 在 0.231~1.155mg/mL 浓度范围内与吸光度 A 之间有较好的线性关系。

2.3.2.2 样品测定

取适量黄酮溶液置于 50mL 容量瓶中, 按照芦丁标准曲线绘制方法测定吸光度, 测定时做样品空白, 根据线性回归方程计算出粗提液中黄酮类物质浓度为 9.81mg/mL。

2.4 大孔树脂的静态吸附与解吸

在中药有效成分的纯化中,树脂的选择相当重要,要求所选的树脂不仅对所纯化的成分具有较强的吸附力,而且应当是可逆吸附,易于洗脱。本实验选择8种型号的树脂,通过考察每种树脂对白花龙胆花中总黄酮含量的吸附率和洗脱率,确定适宜的树脂型号。

2.4.1 静态吸附吸附量的测定

选择 HPD-826、HPD-417、ADS-17、HPD-722、HPD-450、AB-8、HPD-600、D-101 等8种树脂进行吸附量的测定。准确称取已处理好的树脂,抽滤至不滴水为止,置于烘箱烘干测水分,根据水分含量换算所要称取的鲜树脂重量。称取一定量的鲜树脂(相当于干树脂1.0g),置100mL磨口三角瓶中,准确加入经过稀释的黄酮含量约为0.54mg/mL的样品溶液50mL,25℃恒温条件下,置于摇床振荡12h,过滤,测定滤液中总黄酮含量,按照下式计算吸附量与吸附率。

$$Q = \frac{(C_0 - C_r) \times V}{m} \quad (1) \quad E\% = \frac{C_0 - C_r}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

式中, Q : 吸附量 (mg/g); C_0 为黄酮初始质量浓度 (mg/mL); C_r 为平衡时总黄酮质量浓度 (mg/mL); V 为溶液体积 (mL); m 为树脂质量 (g); E 为吸附率 (%)。

2.4.2 静态吸附解吸率测定

将上述吸附饱和的大孔树脂用少量水冲洗后,用滤纸吸干树脂表面残留的溶液,精确加入体积分数95%乙醇50mL,浸泡12h,过滤,测定此时溶液中的总黄酮含量,并计算解吸率。

$$D\% = \frac{C \times V}{m \times Q} \times 100 \quad (3)$$

式中, D 为解吸率; C 为解吸液中总黄酮质量浓度 (mg/mL); V 为解吸液体积 (mL); m 为树脂质量 (g); Q 为吸附量 (mg/g)。

2.5 静态吸附动力学曲线的绘制

准确称取已处理好的树脂1g,抽滤至不滴水为止,置100mL磨口三角瓶中,精确加入经过稀释的黄酮含量约为0.54mg/mL的样品溶液50mL,25℃恒温条件下,置于摇床振荡12h,每隔1h测1次吸附液总黄酮的含量,绘制吸附动力学曲线。

2.6 树脂动态吸附分离白花龙胆花总黄酮的工艺参数考察

通过静态吸附实验,将筛选出的理想树脂装入玻璃层析柱,柱床体积35mL。分别考察上柱液浓度、流速、pH值对吸附效果的影响和洗脱剂的浓度、流速、洗脱体积对洗脱效果的影响。

2.7 产品精制倍数的研究

在确定的大孔树脂工艺条件下,对产品的精制倍数进行研究。

3 结果与讨论

3.1 大孔树脂的筛选

3.1.1 不同树脂对白花龙胆花黄酮的静态吸附和解吸实验

本实验分别测定 HPD-826、HPD-417、ADS-17、HPD-722、HPD-450、AB-8、HPD-600、D-101 等 8 种树脂对白花龙胆花黄酮的吸附量和解析率,结果如表 1 所示。

表 1 各树脂对白花龙胆花黄酮的吸附量和解吸率

树脂 型号	粒径 (mm)	比表面积 (m ² /g)	平均孔径 (nm)	极性	含水量 (%)	吸附量 (mg/g)	吸附率 (%)	解析率 (%)
HPD-826	0.3~1.25	500~600	9~10	氢键	63.5%	21.83	80.78	86.89
HPD-417	0.3~1.25	90~150	25~30	氢键	52.3%	16.11	59.61	73.03
ADS-17	0.3~1.25	90~150	25~30	氢键	53.9%	16.74	61.96	71.52
HPD-722	0.3~1.25	485~530	13~14	弱极性	66.2%	23.52	87.06	81.53
HPD-450	0.3~1.2	500~550	9~11	弱极性	65.3%	20.77	76.86	86.22
AB-8	0.3~1.25	480~520	13~14	弱极性	67.1%	23.52	87.06	89.64
HPD-600	0.3~1.2	550~600	8	极性	68.2%	21.83	80.78	84.95
D-101	0.3~1.25	≥400	10~11	非极性	67.7%	22.68	83.92	82.71

影响大孔树脂的吸附性能的因素有很多,一般来说,树脂的极性与被吸附分子的极性相同或者近似时吸附效果好;树脂比表面积大时吸附量更大;树脂孔径是被吸附分子大小的 5 倍时吸附性更好;因此选择树脂要将树脂的极性、比表面积和孔径等因素综合考虑。由表 1 可以看出,比表面积比较大的几种树脂 HPD-826、HPD-722、HPD-450、AB-8、HPD-600、D-101,其吸附率都超过了 76%;而这几种树脂中,又以 HPD-722 和 AB-8 两种弱极性的树脂吸附效果最好。这可能与黄酮类化合物具有多酚结构和糖苷键,在水溶液中极性较弱,有利于弱极性或非极性树脂的吸附有关。AB-8 树脂不仅吸附效果较好,而且解吸附效果也属 8 种树脂中最优,因此综合考虑 8 种树脂的吸附与解吸附能力,选择 AB-8 为分离白花龙胆花中黄酮的最优树脂。

3.1.2 静态吸附动力学特性测定

HPD-826、HPD-417、ADS-17、HPD-722、HPD-450、AB-8、HPD-600、D-101 等 8 种树脂的吸附动力学曲线如图 1 所示。由图 1 可知,吸附时间 3h 后吸附液中黄酮质量浓度随时间的增加变化很小,即树脂已经基本达到吸附平衡。说明这几种树脂对白花龙胆花中黄酮的吸附都属于快速平衡型,快速吸附可以缩短生产周期,这在工业上是非常有利的。

由图 1 可以看出, AB-8 树脂的吸附液中, 黄酮质量浓度下降的速度比其他 7 种树脂快, 说明 AB-8 树脂到达平衡的时间相对较短, 因此其吸附分离的效果更佳。所以, 本实验选择 AB-8 进行分离白花龙胆花中黄酮的进一步研究。

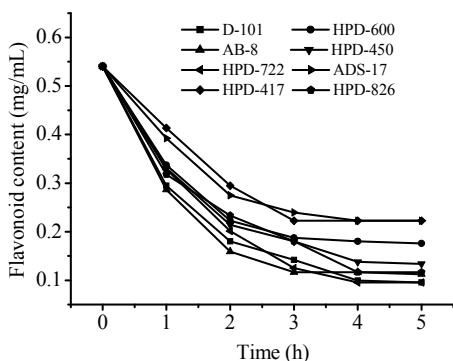


图 1 静态吸附白花龙胆花总黄酮的动力学曲线

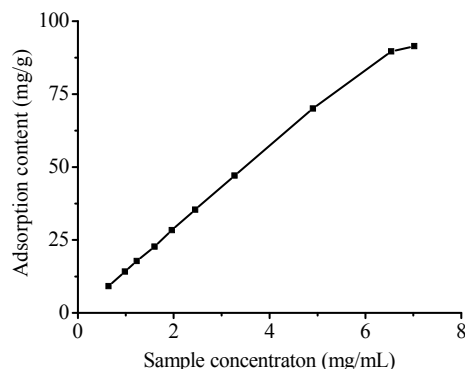


图 2 上样液浓度对 AB-8 树脂吸附效果的影响

3.2 AB-8 树脂对白花龙胆花黄酮的动态吸附实验

3.2.1 上样液浓度对 AB-8 树脂吸附效果的影响

分别将 100mL 浓度为 9.81mg/mL 的白花龙胆花黄酮水溶液加水稀释配置成 0.64mg/mL、0.981mg/mL、1.962mg/mL、1.6mg/mL、1.23mg/mL、2.45mg/mL、3.27mg/mL、4.905mg/mL、6.54mg/mL、7.02mg/mL 等不同浓度的样液, 以 4BV/h 的流速上柱, 进行动态吸附试验, 结果如图 2 所示。由图 2 可以看出, AB-8 树脂对白花龙胆花黄酮类化合物的吸附量随质量浓度的增大而增大, 但达到一定浓度后, 吸附量增加幅度不大。同时, 溶液浓度太大, 溶质的溶解性较差, 易产生树脂堵塞, 造成树脂的使用周期变短, 树脂的再生次数增加; 而溶液浓度太小, 又容易造成树脂的浪费。因此, 权衡各因素, 选择上柱液浓度为 6.5mg/mL 左右较好。

3.2.2 上样液 pH 对 AB-8 树脂吸附效果的影响

用盐酸或氢氧化钠溶液将黄酮水溶液的 pH 值分别调节为 2.89、3.79、4.52 (原液)、5.09、6.08。将不同 pH, 浓度为 6.5mg/mL 的样品溶液 100mL, 以 4BV/h 的流速通过 AB-8 树脂柱, 考察不同 pH 值条件下树脂的动态吸附效果, 结果如图 3。由图 3 可以看出, 溶液 pH 对吸附效果影响较大, pH 为 3.79 时树脂的吸附效果最好。pH 对物质吸附效果的影响主要取决于化合物的酸碱度, 酸性化合物在酸性溶液中较容易吸附, 碱性化合物在碱性溶液中较容易吸附^[9]。黄酮类化合物多为多羟基的酚类化合物, 呈弱酸性, 因此在酸性条件下吸附效果较好。但上柱液酸性太强, 黄酮类化合物容易转变成锌盐, 不易被吸附。

3.2.3 上柱流速对 AB-8 树脂吸附效果的影响

将浓度为 6.5mg/mL, pH 3.79 的样品溶液 100mL, 分别以 1BV/h、2BV/h、3BV/h、4BV/h、

5BV/h、6BV/h、7BV/h 的不同流速通过树脂柱进行动态吸附，考察不同流速对树脂的动态吸附效果，结果如图 4。由图 4 可以看出，吸附量随流速的增大而下降。当流速为 1BV/h 时，吸附量最高，当流速为 4BV/h 时，吸附量仅比流速为 1BV/h 时少 0.4mg/mL，但却可以大大减少循环周期。一般来说，被吸附物质通过树脂柱越慢，越能和树脂充分接触，从而就能更好地被吸附，但是循环周期延长，生产效率就会随之大大下降，不利于工业化生产。因此，考虑到工作效率和吸附效果，控制流速 4BV/h 较理想。

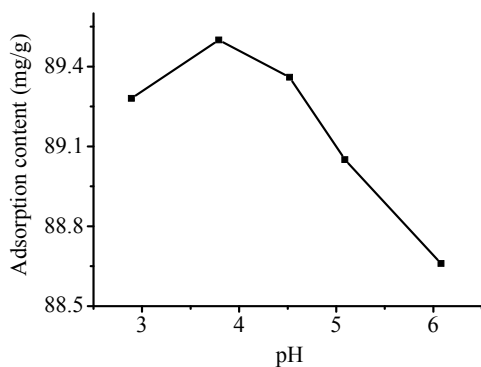


图 3 上柱液 pH 对 AB-8 树脂吸附效果的影响

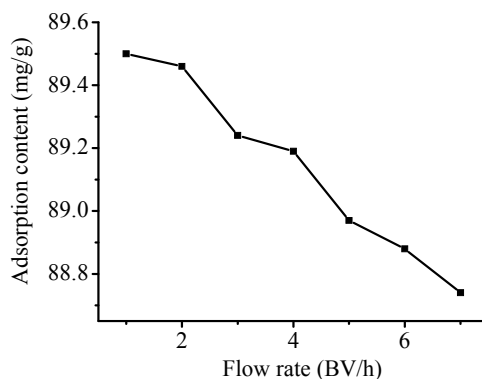


图 4 上柱液流速对 AB-8 树脂吸附效果的影响

3.3 动态洗脱实验

3.3.1 乙醇浓度对洗脱效果的影响

在 pH 3.79 的条件下，将浓度为 6.5mg/mL 的样品液 100mL 以 4BV/h 的流速通过 AB-8 树脂柱，经过树脂吸附后，依次用不同浓度的乙醇 0%、10%、30%、50%、70%、95% 的乙醇进行洗脱（各梯度乙醇溶液洗脱体积均为 4BV），计算不同浓度乙醇的黄酮洗脱率。将不同乙醇浓度洗脱液蒸干，得各部分浸膏，同时将上样液蒸干得上样液总的浸膏质量；计算浸膏得率（浸膏得率=各部分浸膏质量/上样液总浸膏质量），结果见表 2。

表 2 不同乙醇浓度对洗脱率及浸膏得率的影响

乙醇浓度 (%)	洗脱率 (%)	浸膏得率 (%)
0	2.36	16.10
10	4.38	4.28
30	30.93	15.07
50	54.58	15.42
70	3.41	1.20
95	0.35	0.34

由表 2 可以看出，随着乙醇浓度的增加，白花龙胆花中总黄酮的洗脱率增加，当乙醇

浓度为 50% 时, 洗脱率最高, 而当乙醇浓度增加到 70% 时, 基本上洗脱下来的黄酮的量很少。并且, 当乙醇浓度为 50% 时, 浸膏得率也较高。因此, 综合考虑生产成本、黄酮洗脱率和浸膏得率 3 个因素, 选择 50% 乙醇进行洗脱。

3.3.2 洗脱流速对洗脱效果的影响

将质量浓度为 6.5mg/mL 的白花龙胆花黄酮提取液以 4BV/h 的速度通过 AB-8 大孔树脂, 进行充分吸附后, 先用 10% 的乙醇洗去糖及其他杂质, 然后用 4BV 的 50% 的乙醇进行洗脱。控制洗脱流速分别为 1BV/h、2BV/h、3BV/h、4BV/h、5BV/h、6BV/h, 考察洗脱剂流速对洗脱效果的影响, 结果见图 5。

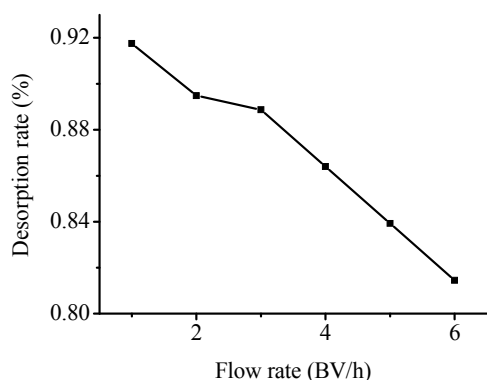


图 5 不同解吸流速对解析率的影响

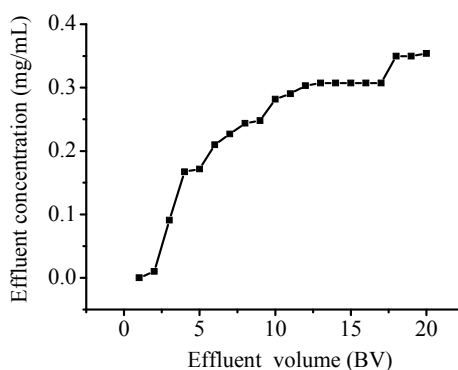


图 6 黄酮动态吸附透过曲线

3.4 动态吸附透过曲线与洗脱曲线

3.4.1 动态吸附透过曲线

根据动态吸附实验确定的工艺, 选择 AB-8 进行大孔树脂吸附曲线研究。将经过稀释的浓度为 1.5mg/mL 的白花龙胆花黄酮提取液通过 AB-8 树脂柱, 流速 4BV/h, 每一个柱体积收集一份, 测定黄酮浓度, 得到动态吸附透过曲线, 结果见图 6。从图 6 可以看出, 流出液体积在 2BV 时就有少量黄酮溶液透过, 当上样量达到 20BV 时, 吸附基本达到饱和。

3.4.2 动态洗脱曲线

将质量浓度为 6.5mg/mL 的白花龙胆花总黄酮供试液缓慢加入装有 AB-8 大孔吸附树脂的树脂柱中, 控制流速为 4BV/h, 进行吸附。吸附后用 10% 乙醇以 3BV/h 流速洗涂树脂, Molisch 反应检测流出液无糖时, 再用 50% 乙醇溶液, 以 3BV/h 的洗脱流速洗脱, 每 5mL 收集一流分, 按照黄酮检测方法检测每一流分所洗脱下来的白花龙胆花黄酮的质量浓度, 以洗脱液流分体积为横坐标, 洗脱下来的白花龙胆花黄酮质量浓度为纵坐标绘制洗脱曲线, 结果见图 7。由图 7 可以看出, 洗脱剂用量达到 10mL 时, 白花龙胆花黄酮开始被洗脱下来, 洗脱剂用量达到 4BV 时, 树脂柱上的白花龙胆花黄酮已基本上洗脱完全。故洗脱剂体积应控制在 4BV。

3.5 AB-8 树脂富集黄酮能力的研究

根据上述各项确定的最佳的吸附和解析条件, 采用 10% 的乙醇洗去糖和杂质, 再用 50% 乙醇进行洗脱, 进而对 AB-8 树脂的黄酮富集能力进行研究。

产品中总黄酮纯度: 经 AB-8 大孔吸附树脂处理后的解吸液减压浓缩干燥, 所得的干燥产品称重为 0.675g, 而干燥前解吸液中所含总黄酮量为 443.81mg, 则产品中黄酮纯度为 $443.81/675 \times 100\% = 65.75\%$ 。

上柱前样液中总黄酮纯度: 粗提物用烘箱低温干燥, 所得干燥产品总质量为 2.335g, 而干燥前所测粗提物中总黄酮量为 516mg, 则粗提物中黄酮纯为: $0.516/2.335 \times 100\% = 22.10\%$ 。

产品精制倍数: 经 AB-8 树脂依次吸附、洗脱后, 黄酮纯度由原来的 22.10% 变为 65.75%, 产品精制倍数为 $65.75\%/22.10\% = 2.97$ 。

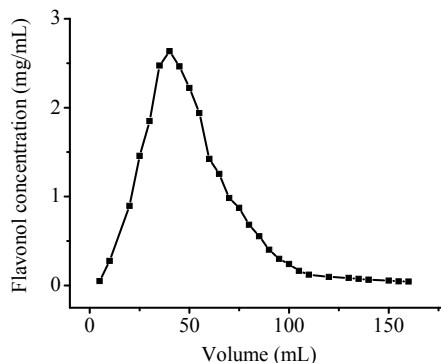


图 7 黄酮动态洗脱曲线

4 结 论

1. 在筛选的 8 种大孔树脂中, AB-8 树脂对白花龙胆花黄酮的吸附量和解析率都较高, 且属于快速平衡型树脂, 是一种较理想的黄酮吸附剂, 适用于白花龙胆花黄酮的分离纯化。
2. AB-8 树脂对白花龙胆花黄酮吸附分离的最佳工艺参数为: 上柱液浓度为 6.5mg/mL, pH 为 3.79, 上柱流速 4BV/h; 最佳洗脱条件: 用 50% 乙醇进行洗脱, 解吸流速为 3BV/h, 解吸体积 4BV。
3. 在最佳的吸附和解析条件下, 先采用 10% 的乙醇洗去糖和杂质, 再用 50% 乙醇进行洗脱。经 AB-8 树脂依次吸附、洗脱后, 产品精制倍数可达到 2.97。

参考文献

- [1] 杨永昌. 藏药志 第一版 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991, p186-189.
- [2] 刘涛, 才谦, 付玉芹, 等. 辽宁中医杂志 [J]. 2004, 31(1): 85-86.
- [3] 刘明韬, 韩志超, 章漳, 等. 沈阳药科大学学报 [J]. 2005, 22(2): 103-104.
- [4] 陈丛瑾, 黄克瀛, 李姣娟, 等. 离子交换与吸附 [J]. 2008, 24(4): 335-344.
- [5] 熊春华, 田华. 离子交换与吸附 [J]. 2007, 23(2): 175-181.
- [6] 周小华, 陈器, 吴方国. 离子交换与吸附 [J]. 2002, 18(1): 36-44.
- [7] 汤建萍, 周春山, 丁立稳. 离子交换与吸附 [J]. 2006, 22(6): 551-558.
- [8] 胡志军, 郝利君, 王南溪, 等. 食品科学 [J]. 2010, 31(8): 65-69.

[9] 叶俭慧, 梁月荣. 茶叶 [J]. 2006, 32(3): 128-132.

SEPARATION AND PURIFICATION OF FLAVONOIDS FROM THE FLOWER OF *Gentiana tizuensis* FRANCH BY MACROPOROUS ADSORPTION RESIN

JIAO Xiaoli^{1,2} DONG Qi¹ CHI Xiaofeng^{1,2} JI Tian¹ HU Fengzu¹

1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: The characteristics of macroporous adsorption resins HPD-826, HPD-417, ADS-17, HPD-722, HPD-450, AB-8, HPD-600 and D-101 on adsorption and desorption of flavonoids in the flower of *Gentiana tizuensis* Franch were investigated. Based on static adsorption and desorption assay, the macroporous resin AB-8 was chosen to be the best. Then the favourite resin AB-8 was chosen to carry out dynamic adsorption experiments. The evaluation indexes included extract concentration, pH, adsorption velocity, eluting reagent, desorption rate and desorption dose. The results indicated that the optimum condition: the extract concentration was 6.5mg/mL, the pH value was 3.79, adsorption velocity was 4BV/h, the eluting reagent was 50% ethanol, the desorption rate was 3BV/h, the dose of the reagent was 4 times as much as the column volume. Under these conditions, the purification of flavonoids was 66.75%, which was 2.97 times higher than before. The results showed that AB-8 resin could be used in separation and purification for total flavone in the flower of *Gentiana tizuensis* Franch.

Key words: *Gentiana tizuensis* Franch; Flavonoids; Macroporous adsorption resin; Adsorption; Desorption; Separation and purification.