

大孔树脂纯化菊米总黄酮的工艺研究

王 平, 吴金山, 郭 丹, 陶露霞

浙江工业大学药学院 绿色制药技术与装备教育部重点实验室, 浙江 杭州 310014

摘 要: **目的** 探究一种有效分离纯化菊米黄酮的大孔树脂并对纯化工艺条件进行优化。**方法** 以树脂的饱和吸附容量、吸附速率和解吸附率为参考指标, 从 10 种不同的大孔吸附树脂中筛选出综合性能较好的树脂, 并进一步考察此树脂纯化菊米总黄酮的影响因素和分离纯化效果。**结果** HPD-100 树脂的综合性能较好, 饱和吸附容量达到 60.2 mg/g (以湿重计), 且吸附迅速, 解吸附完全。较理想的吸附工艺: 在树脂径高比为 1:10 的条件下, 质量浓度为 4.3 mg/mL 供试液以 15 mL/min 上柱时, 最佳上样量为 5 倍柱床体积 (BV), 静态吸附时间为 2 h; 较理想的洗脱工艺: 先用 6 BV 的纯水洗杂质, 再以 60% 的乙醇为洗脱剂, 洗脱体积流量为 8 mL/min 时, 用量为 3 BV, 所得菊米总黄酮质量分数为 $(81.6 \pm 0.9)\%$ 。**结论** HPD-100 是一种分离纯化菊米黄酮较佳的树脂, 其工艺简单, 具有较好的工业化生产前景。

关键词: 菊米; 总黄酮; 大孔树脂; 吸附; 纯化

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2013)06-0455-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.06.013

Purification technology of total flavonoids from buds of *Chrysanthemum indicum* with macroporous resin

WANG Ping, WU Jin-shan, GUO Dan, TAO Lu-xia

Key Laboratory of Green Pharmaceutical Technology and Equipment of Ministry of Education, College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

Abstract: **Objective** To screen a macroporous resin for effective separating and purifying the total flavonoids from the buds of *Chrysanthemum indicum* (TFBCI) and to further optimize the process conditions. **Methods** Through critical evaluating the absorption and desorption properties of macroporous resins including the absorption capacity, absorption velocity, and desorption rate, a preferable resin was selected from 10 kinds of macroporous resins, and the influence factors and purification effect on TFBCI were investigated further. **Results** HPD-100 resin had outstanding comprehensive performance, maximum static adsorption capacity was 60.2 mg/g (wet resin), and the adsorption was rapid and desorption complete. The optimum adsorption process was: under the condition of the resin's diameter height ratio of 1:10, the sample solution concentration 4.3 mg/mL and flow rate 7 mL/min, the best processing volume was 5 BV, and static adsorption time was 2 h; The optimum elution process was: wash the impurities with 6 BV of pure water, elute product with 60% ethanol at the speed of 8 mL/min. The purity of the final product reached to $(81.6 \pm 0.9)\%$. **Conclusion** HPD-100 is an ideal resin for separating and purifying the TFBCI, and its process is simple and has preferable industrialization prospect.

Key words: buds of *Chrysanthemum indicum* L.; total flavonoids; macroporous resins; adsorption; purification

菊米以菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的花蕾经杀青焙制而成, 形如米粒, 颜色绿中透黄, 有败毒、散疔、祛风、清火明目等功效^[1-2]。现代研究表明, 菊米中含丰富的挥发油^[3]、菊米内酯、黄酮、蛋白质、氨基酸和微量元素等活性成分^[4]。菊米提取液具有抗心律失常、抗氧化、抗炎、抑制

癌细胞生长以及免疫调节等多种药理活性^[5-8]。菊米作为一种饮品在浙江省已有悠久的历史, 菊米的产业化在中国也具有一定的规模, 产品远销国内外, 出口到我国香港地区、比利时、日本和欧洲等地^[9]。菊米黄酮作为菊米中的主要有效成分之一, 具有广阔的研究与开发前景。

收稿日期: 2013-08-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21076191, 21006097, 21276237)

作者简介: 王 平 (1969—), 女, 浙江金华人, 教授, 博士生导师, 主要从事天然产物研究。Tel: 13634108877 E-mail: wangping45@zjut.edu.cn

大孔吸附树脂具有理化性质稳定, 选择性高, 操作简单, 使用周期长等优点^[10], 是目前分离纯化中药提取物的重要途径之一。如大孔吸附树脂在从木豆中纯化木犀草素^[11]、红景天中分离纯化红景天苷^[12]、金银花中分离纯化绿原酸^[13]、乌药叶中纯化总黄酮^[14]等都得到了广泛的应用。本实验从生产效率的角度出发, 以树脂的吸附容量、吸附速率和解吸附率为参考指标对树脂进行选型, 并对后续的纯化工艺进行考察, 以期为大孔树脂法纯化菊米黄酮的工业化生产提供理论依据。

1 仪器与材料

756PC 紫外分析仪 (上海光谱仪器有限公司); R—215 型旋转蒸发仪 (瑞士 Buchi 公司); 3—18K 型冷冻离心机 (德国 Sigma 公司); 85—1 型磁力搅拌器 (上海志威电器有限公司); SHB—III A 型循环水式多用真空泵 (河南省太康科教器材厂); JHBE—50A 型闪式提取器 (北京金鼎科技发展有限公司郑州分公司); Sartorius BS224S 电子天平 (德国赛多利斯集团); 400 mm×24 mm 玻璃色谱柱 (杭州常青化工有限公司)。

菊米 (浙江遂昌利民药业有限公司, 批号 ZYJ-20110921A); 芦丁对照品 (质量分数 98%, 中国医药上海忽而学试剂厂, 批号 100080-200907); 吸附树脂 D101, 聚酰胺, HPD-100A、HPD-100、HPD-417、HPD-450、HPD-5000 (沧州宝恩吸附材料科技有限公司), 树脂 HB-60、HB-160、Ts32 (天津海光化工有限公司); 亚硝酸钠、氢氧化钠、硝酸铝 (天津市永达化学试剂有限公司), 苯酚、浓硫酸 (杭州化学试剂有限公司), 乙醇为工业纯 (杭州佳辰化工有限公司)。

2 方法与结果

2.1 菊米总黄酮的检测方法

菊米总黄酮的检测以芦丁为对照品, 采用紫外-分光光度法检测^[15]。精密称取芦丁对照品 50.10 mg, 加乙醇溶解后, 定容至 100 mL。准确移取 10 mL 对照品溶液至 25 mL 量瓶中, 用乙醇定容, 得芦丁标准液。准确量取标准液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加蒸馏水至 6.0 mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1.0 mL, 摇匀, 放置 6 min。然后, 加 10% 硝酸铝溶液 1.0 mL, 摇匀, 放置 6 min。加 4% 氢氧化钠溶液 10.0 mL, 加蒸馏水至刻度线, 摇匀, 放置 15 min, 在 510 nm 波长处测定吸光度 (A)。参比为空白试剂。以质量 (mg) 为纵坐标,

吸光度为横坐标, 得线性回归方程: $Y=2.164X-0.03$, $R^2=0.9997$ 。

2.2 菊米总黄酮供试液的制备

取过 80 目筛的菊米粉末 20 g 于闪式提取器中, 加入 300 mL 预热至 55 °C 的 60% 乙醇溶液, 调节闪式提取器的工作电压为 110 V, 提取 30 s, 将提取液倒入离心罐中, 4 500 r/min 离心 5 min, 用真空泵抽滤, 得上清液。相同操作重复 3 次, 合并上清液。用旋蒸蒸发仪在 51 °C 蒸干乙醇, 浓缩液加蒸馏水至 700 mL 即得供试液。经检测, 供试液的总黄酮质量浓度为 4.3 mg/mL。

2.3 吸附树脂的筛选^[11-12]

2.3.1 树脂吸附量的考察 将活化处理好的树脂 D101、聚酰胺、HPD-100A、HPD-100、HPD-417、HPD-450、HPD-5000、HB-60、HB-160、Ts32 用布氏漏斗抽滤除去活化剂, 得湿树脂, 再分别准确称取 3.0 g, 置于 100 mL 的具塞磨口锥形瓶中, 加入质量浓度为 7.0 mg/mL 的总黄酮溶液 35 mL。室温条件下, 置于磁力搅拌器上搅拌静吸附 24 h。测定吸附后溶液中总黄酮的残留量, 计算 10 种树脂的饱和吸附容量 (Q)。

$$Q = (C_0 - C_t) \times V / W$$

式中: Q 为饱和吸附容量 (mg/g), 以湿树脂计; C_0 、 C_t 分别是吸附前后溶液中总黄酮的质量浓度 (mg/mL); V 是溶液的体积 (mL); W 为湿树脂的质量 (g)。

在相同实验条件下, 测定 10 种树脂对菊米提取液中总黄酮的最大吸附容量, 结果见表 1。

表 1 10 种不同湿树脂的最大吸附量

Table 1 Maximum adsorption capacity of 10 kinds of wet resins

树脂类型	饱和吸附量/ (mg·mL ⁻¹)	树脂类型	饱和吸附量/ (mg·mL ⁻¹)
HPD-100A	38.95	HPD-450	44.61
D101	53.41	聚酰胺	40.86
HB-160	59.62	HB60	52.04
HPD100	60.16	HPD-5000	50.56
HPD-417	22.00	Ts32	75.49

树脂 Ts32、HPD-100 和 HB-160 对菊米黄酮的吸附容量最大, 而 HPD-417、HPD-100A 和聚酰胺的吸附容量相对较小。这主要是因为不同树脂的极性和结构差别导致对菊米黄酮的吸附能力不同。因此选择饱和吸附量最大的 3 种树脂继续做吸附速率实验。

2.3.2 树脂吸附速率的考察 根据饱和吸附量实验

结果,选择3种吸附量最大的树脂各20.0 g(以湿质量计),于100 mL锥形瓶中,加入7.5 mg/mL的菊米总黄酮上清液。室温条件下,置于磁力搅拌器上静态吸附。每隔1 h取样1 mL,稀释10倍后,按照2.1的方法,进行分光光度法检测。结果见图1。

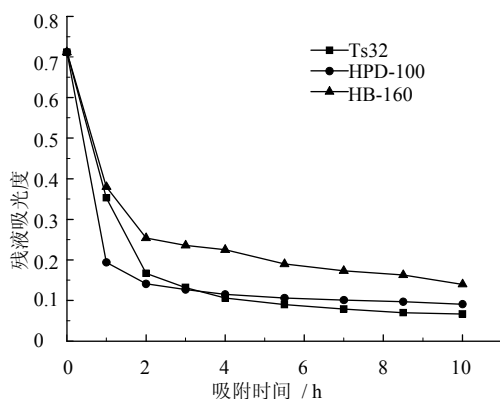


图1 3种树脂的吸附速率曲线

Fig. 1 Adsorption rate curves of three kinds of resins

由吸附树脂的吸附速率曲线可知,随着时间的延长,菊米黄酮上清液的吸光度逐渐降低,说明溶液中的黄酮逐渐被树脂吸附;从树脂的斜率可以看出,随着时间的推移,斜率逐渐降低,即吸附速率逐渐变慢,4 h以后,斜率趋近于0,这主要是因为树脂达到了饱和和吸附所致;比较3种树脂的吸附速率,HPD-100的吸附速度最快,Ts32其次,因此选择这两种树脂继续进行解吸附实验。

2.3.3 乙醇体积分数对树脂解吸附的影响 根据吸附速率实验,将“2.3.2”中吸附速率较快的2种树脂用真空泵抽干,每种树脂取6份于100 mL锥形瓶中,每份3.0 g(以湿质量计),然后在每个锥形瓶中分别加入10%、20%、40%、60%、80%、100%乙醇溶液40.0 mL,解吸附3 h后,按照“2.1”项下的方法,进行分光光度法检测,结果见图2。可以看出,Ts32树脂吸附的黄酮基本属于死吸附,任何体积分数的乙醇溶液都不能将黄酮解吸出来;而乙醇溶液对HPD-100的解吸附效果很好,乙醇体积分数10%~60%时,体积分数越高解吸附效果越好,大于60%以后,解吸附效果略微减少,这可能是由于体积分数太高,乙醇对树脂的渗透作用减弱所致。综合吸附容量、吸附速率和不同乙醇体积分数的解吸附实验,HPD-100综合效果最好。

2.4 树脂纯化工艺的考察

2.4.1 体积流量对树脂吸附效果的考察 选取处理

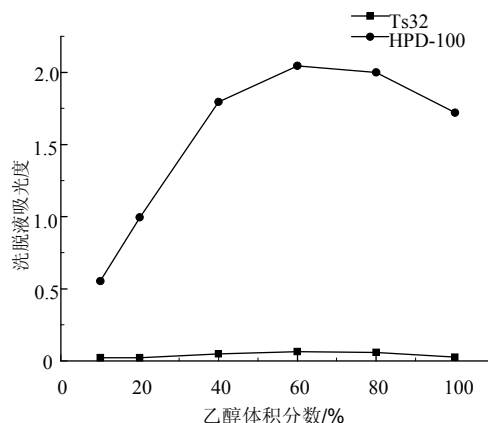


图2 乙醇浓度对树脂静态解吸的影响

Fig. 2 Effect of ethanol at different concentration on static desorption of resin

过的树脂 HPD-100,湿法装柱于400 mm×24 mm的色谱柱中,装填量为径高比1:10。取300 mL的菊米黄酮供试液,分别以3.0、5.0、7.0、9.0、11.0、13.0、15.0、17.0、19.0、21.0、23.0、25.0、27.0、29.0、35.0、40.0、45.0 mL/min的体积流量上样,取上样流出液,测定上样流出液中黄酮的残留率,从而确定较佳的上样体积流量,结果见图3。可知上样体积流量对树脂菊米黄酮的效果有重要的影响。随着上样体积流量的不断加快,在0~20 mL/min,上样流出液中菊米黄酮的残留量较低而且增加缓慢,当上样体积流量超过20 mL/min以后,上样流出液中菊米黄酮的残留量迅速增加,因此上样的体积流量不能超过20 mL/min。

2.4.2 树脂动态吸附量的考察 取1 000 mL供试液,以“2.4.1”考察的较佳的上样体积流量上径高比为1:10的柱子,每隔0.5 BV的时间点接收10 mL左右的样品,检测流出液中黄酮的残留量,据此确定较佳的上样量,结果见图4。可知上样量对黄酮的泄漏率有较大的影响,在上样量为0~5 BV时,泄漏率较低(≤5%)且增长缓慢,当上样量大于5 BV时,泄漏率迅速增加。出于工业化生产经济型原则,菊米黄酮应该尽量地吸附,因此选择5 BV为该条件下的最大上样量。

2.4.3 水洗脱体积对多糖等杂质洗脱效果的影响 将装好柱的树脂,按照“2.4.1”和“2.4.2”项确定较佳条件进行上样,上样后,静态吸附足够的时间(6 h以上)。之后用蒸馏水以20 mL/min的体积流量进行洗脱,去除多糖等杂质。洗脱过程中,每隔3 min(即0.5 BV)取样,样品溶液以杂质中的多糖为指

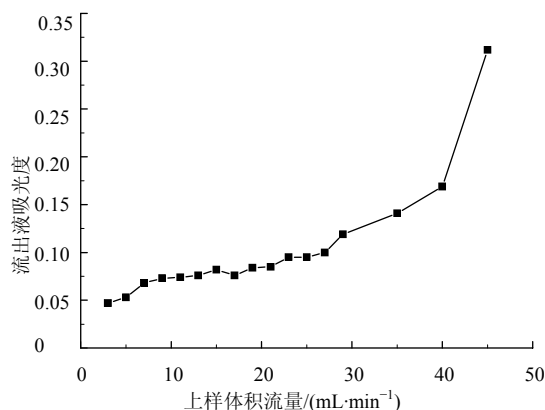


图3 上样速度对树脂吸附效果的影响

Fig. 3 Effect of flow rates on adsorption of resin

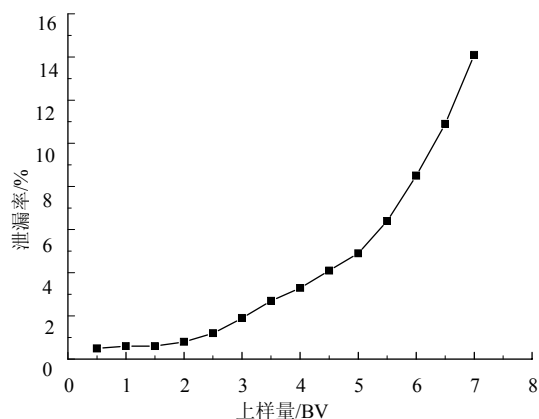


图4 不同上样量的动态泄漏曲线

Fig. 4 Dynamic leakage curve of different flow volumes

标,按照苯酚-硫酸法^[16]进行定性检测,以此确定较佳的水洗脱体积,结果见图5。可知,水洗液中的多糖等杂质随着水洗体积的增加而逐渐减少,说明水洗脱杂质有较好效果;洗脱6 BV之后,吸光度基本不变,说明多糖等杂质基本洗脱干净。吸光度没有降到0可能是水洗液中会洗脱出部分的黄酮苷,苷类物质在苯酚-硫酸法测定时,也有吸光度。

2.4.4 静态吸附时间对水洗杂质时黄酮泄漏的影响 将装好柱的树脂,按照“2.4.1”和“2.4.2”项确定较佳条件进行上样。上样后,静态吸附时间分别设置为0.5、1、1.5、2.0、3.0、4.0 h。之后用蒸馏水以20 mL/min的体积流量进行洗脱,洗脱完毕后,将收集的水洗液取样,检测水洗液中菊米黄酮的泄漏量和静态吸附时间的关系,从而确定较佳的静态吸附时间,结果见图6。可知静态吸附时间对水洗脱杂质时黄酮的泄漏量有较大的影响。随着静态吸附时间的增加,黄酮的泄漏量减少;当时间大于1.5 h

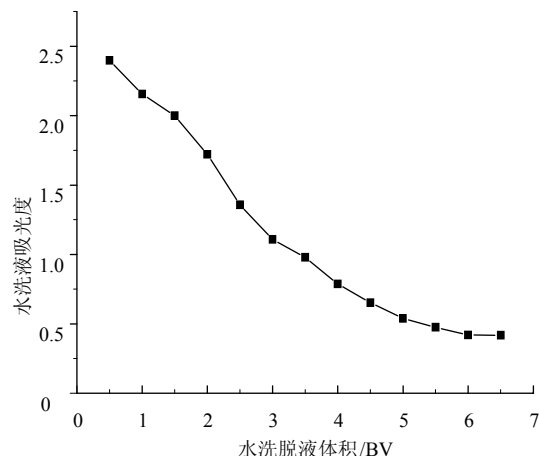


图5 水洗液中多糖吸光度的动态曲线

Fig. 5 Dynamic absorbance curve of polysaccharide in water lotion

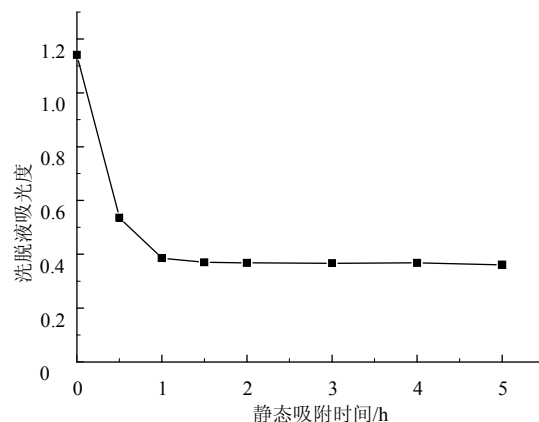


图6 静吸附时间对黄酮泄漏量的曲线

Fig. 6 Curve of static adsorption time to flavonoid leakage

时,泄漏量基本不变,但还有少量的泄漏。因此选择静态吸附时间为1.5 h。

2.4.5 乙醇洗脱体积对产品洗脱效果的影响 将装好柱的树脂,按照较佳的上样体积流量和上样量进行上样;上样后,静态吸附1.5 h,再用蒸馏水以20 mL/min的体积流量洗脱杂质,用量为6 BV;最后配置60%乙醇溶液600 mL,以9 mL/min洗脱产品,检测乙醇洗脱液中菊米黄酮的量,结果见图7。可知60%的乙醇洗脱体积对黄酮的解析效果有较大影响。在选择洗脱体积流量8 mL/min、用量为380 mL左右时,黄酮即洗脱完全;在0~80 mL左右时之所以没有检测到黄酮可能是因为色谱柱中大概残留80 mL的水,前期接收的是残留的水,而非洗脱液。因此,乙醇的洗脱体积为380 mL (3 BV)。

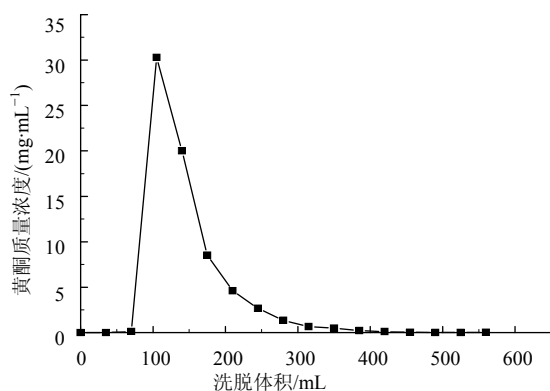


图7 黄酮的动态解吸附曲线

Fig.7 Dynamic desorption curve of flavonoids

2.5 工艺验证

以 HPD-100 作为吸附树脂, 湿法装柱于 400 mm×24 mm 的色谱柱中, 装填量为径高比 1:10。按较佳的工艺条件重复实验 3 次, 结果 3 次实验的总黄酮质量分数为 (81.6±0.9)%。结果表明 HPD-100 树脂分离纯化的工艺稳定可行。

3 讨论

大孔树脂因其理化性质稳定、选择性好、价格低廉而在天然产物分离中得到了广泛的应用, 但是目前国内应用大孔树脂规模化生产的企业却不多。本实验从工业化注重效率的角度, 提出了以树脂的吸附速率作为选择树脂的参考指标之一, 摒弃了传统的以饱和吸附量和吸附率对树脂的重复性筛选指标; 另外, 本实验提出了水洗脱杂质时, 以多糖作为主要的衡量指标的即时监测方法; 最后本实验考察所有工艺条件时都贯穿了效率的思想, 从而确定的工艺比传统工艺的生产效率有较大的提高。以上三点, 对树脂分离纯化的工业化生产具有较大的借鉴意义。在试验中发现, 操作的温度对最终产品的纯度有较大的影响, 以后的实验可以进一步考察。

参考文献

[1] 赵学敏. 本草纲目拾遗 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1998.
[2] 朱育新. 石练菊米香飘四海 [J]. 浙江林业, 2002, 12: 37.
[3] 王丽丽, 陈小梅, 刘文涵, 等. 野菊菊米和野菊花挥发

油化学成分的比较研究 [J]. 浙江工业大学学报, 2006, 34(4): 389-392.
[4] 仲山民, 何 仲, 滕海鹏, 等. 菊米复合保健饮料的研制 [J]. 中南林业科技大学学报, 2008, 28(4): 148-152.
[5] 徐 策, 叶挺梅, 朱 立, 等. 菊米提取液抗实验性心律失常作用的研究 [J]. 中国应用生理学杂志, 2007, 23(4): 399-402.
[6] 叶挺梅, 陈文良, 朱 立, 等. 菊米提取液对抗心肌缺血再灌注损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(12): 2328-2332.
[7] Cheng W M, Li J, You T P, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of the extracts from the inflorescence of *Chrysanthemum indicum* Linn [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 101: 334-337.
[8] Kim W W, Ghimeray A K, Wu J C, et al. Effect of far infrared drying on antioxidant property, anti-inflammatory activity, and inhibitory activity in A549 cells of Gamguk (*Chrysanthemum indicum* L.) Flower [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2012, 21(1): 261-265.
[9] 朱宜根, 李子山, 罗春华, 等. 遂昌菊米无公害栽培技术 [J]. 浙江农业科学, 2003, 25(4): 176-178.
[10] 刘 玥. 大孔吸附树脂在中药提取纯化中的应用进展 [J]. 世界中医药, 2013, 8(2): 232-234.
[11] Fu Y J, Zu Y G, Liu W, et al. Optimization of luteolin separation from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves by macroporous resins [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1137: 145-152.
[12] Ma C Y, Tao G J, Tang J, et al. Preparative separation and purification of rosavin in *Rhodiola rosea* by macroporous adsorption resins [J]. *Sep Purif Technol*, 2009, 9: 22-29.
[13] Zhang B, Yang R Y, Zhao Y, et al. Separation of chlorogenic acid from honeysuckle crude extracts by macroporous resins [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 867: 253-258.
[14] 陈建军, 钱俊青, 范长春. 大孔吸附树脂纯化乌药叶黄酮化合物的研究 [J]. 浙江工业大学学报, 2009, 37(5): 530-534.
[15] Jeffrey B H, Christina A W. Advances in flavonoid research since 1992 [J]. *Phytochemistry*, 2000, 55: 481-504.
[16] 张志军, 刘建华, 李淑芳, 等. 灵芝多糖的苯酚硫酸法检测研究 [J]. 食品工业科技, 2006, 27(2): 193-195.