

大孔树脂纯化荔枝核总黄酮工艺研究

冯宇¹, 刘雪梅¹, 罗伟生¹, 陈林², 李志峰^{2,3}, 梁健钦¹, 张国松^{2,3*}, 奉建芳^{1,2,3*}

1. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530200

2. 江西中医药大学, 江西 南昌 330006

3. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

摘要: 目的 筛选适合分离和纯化荔枝核总黄酮的大孔吸附树脂, 并确立其纯化工艺参数, 以期制备出符合中药有效部位要求的荔枝核总黄酮, 为将荔枝核总黄酮开发成中药五类新药奠定基础。方法 采用静态吸附-洗脱试验筛选纯化荔枝核总黄酮的大孔吸附树脂, 在单因素实验基础上, 以吸附率等综合评分为指标, 考察乙醇体积分数、上样液质量浓度、上样液 pH 值、径高比、上样体积、上样体积流量、洗脱液体积分数、洗脱液体积及洗脱体积流量对其纯化工艺的影响, 并确定最佳纯化工艺参数。结果 AB-8 型大孔吸附树脂纯化荔枝核总黄酮的最佳工艺参数为树脂与药材的质量比 3:1, 上样液质量浓度为 4~6 mg/mL, 上样体积流量 1 mL/min, 上样体积 2 BV, 径高比 1:12, 上样液 pH 为 2, 洗脱时先以 20%乙醇 3 BV 除杂, 再用 60%乙醇 3 BV 洗脱, 洗脱体积流量 4 mL/min。结论 AB-8 型大孔吸附树脂可以纯化荔枝核总黄酮, 在所确定的纯化工艺参数下, 荔枝核总黄酮质量分数从 29.22%升至平均 67.37%, 固形物由 1.25 g 减少至 0.40 g, 建立的工艺稳定、可行, 可作为荔枝核总黄酮的纯化工艺条件。

关键词: 荔枝核; 原花青素 A2; 大孔吸附树脂; 纯化工艺; 总黄酮; 单因素实验

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)09-2087-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.09.012

Study on purification of total flavonoids from *Litchi Semen* by macroporous resin

FENG Yu¹, LIU Xue-mei¹, LUO Wei-sheng¹, CHEN Lin², LI Zhi-feng^{2,3}, LIANG Jian-qin¹, ZHANG Guo-song^{2,3}, FENG Jian-fang^{1,2,3}

1. College of Pharmacy, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

3. National Pharmaceutical Engineering Center For Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China

Abstract: Objective To screen the macroporous adsorption resin suitable for the separation and purification of total flavonoids from *Litchi Semen*, and the purification process parameters were established to prepare the total flavonoids of *Litchi Semen* in accordance with the requirements of effective parts of Chinese materia medica, which laid the foundation for the development of the total flavonoids of *Litchi Semen* into five new Chinese medicines. **Methods** The macroporous adsorption resin for purifying the total flavonoids of *Litchi Semen* by static adsorption-elution test was used. Based on the single factor test, the comprehensive score of adsorption rate was used as the index to investigate the volume fraction of ethanol, the mass concentration of the sample, and the sample solution pH, diameter to height ratio, upper column volume, upper column flow rate, eluent concentration, eluent volume and elution flow rate on the purification process, and determine the optimal purification process parameters. **Results** The best process condition for separating the total flavonoids of *Litchi Semen* by AB-8 macroporous adsorption resin were as follows: the mass ratio of resin to medicinal material was 3:1, the concentration of the upper column sample solution was 4—6 mg/mL, sample flow rate was 1 mL/min, and the upper column volume was 2 BV, diameter to height ratio was 1:12, pH of the sample solution was 2, first impurity removal by 20% ethanol 3 BV, and using 60% ethanol 3 BV for elution, elution flow rate was 4 mL/min. **Conclusion** AB-8 macroporous resin can be used to purify the total flavonoids of *Litchi Semen* under the established technological conditions. The mass

收稿日期: 2018-12-21

基金项目: 2017 年广西创新驱动发展专项资金项目 (桂科 AA17202035)

作者简介: 冯宇 (1992—), 女, 硕士研究生, 药剂学专业。E-mail: fengyu0616@hotmail.com

*通信作者 奉建芳 (1966—), 男, 研究员, 博士生导师, 从事中药新型给药系统研究。E-mail: fengjianfang@vip.163.com

张国松 (1981—), 男, 博士, 高级工程师, 从事药物新制剂与新剂型研究。E-mail: zhgs81411@aliyun.com

fraction of total flavonoids in *Litchi Semen* increased from 29.22% to an average of 67.37%, and the solid content decreased from 1.25 g to 0.40 g. It indicates that the established purification process is stable and feasible, and can be used as a purification process condition for total flavonoids of *Litchi Semen*.

Key words: *Litchi Semen*; proanthocyanidin A2; macroporous adsorption resin; purification process; total flavonoids; single factor experiment

荔枝核为无患子科 (Aspindaceae) 植物荔枝 *Litchi chinensis* Sonn. 的干燥成熟种子, 又名荔仁、荔核、大荔核, 在《本草纲目》等古籍中均有记载, 其性温, 味甘, 微苦, 归肝、肾经, 功效行气散结、祛寒止痛。现代研究表明, 荔枝核富含的黄酮类、挥发油类、有机酸和脂肪酸类等化学成分, 具有降血糖、调血脂、止痛、抗炎、抗肿瘤、抗氧化和清除自由基、抑制血小板聚集等多种药理作用^[1-11], 荔枝核黄酮类成分在用于抗肝纤维化、抗肝硬化、抗肝损伤、乳腺增生、子宫肌瘤等纤维性增生疾病的研究中取得了良好的效果^[12-16]。我国的广西、广东、福建、海南等地是具有得天独厚的地理气候条件的荔枝主产区, 本实验以广西产荔枝核为研究对象, 研究其黄酮类成分的纯化工艺, 以期制备出符合中药有效部位要求的荔枝核总黄酮, 为将荔枝核总黄酮开发成中药五类新药奠定基础。

1 仪器与试药

UV-2550 型紫外分光光度仪, 日本 Shimadzu 公司; MS105DU 电子分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; THZ-82A 水浴恒温振荡器, 金坛市白塔新宝仪器厂; RE-5210A 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; 101-3-BS-II 电热恒温鼓风干燥箱, 上海跃进医疗器械厂; 6202 高速粉碎机, 欣镇精密企业有限公司; HPD100、HPD300、HPD600、HPD800、X5、D4006、NKA-II、D101、D3520、HP-20、AB-8 型大孔吸附树脂, 河北沧州宝恩化工有限公司。

荔枝, 2018 年 8 月购于广西农贸市场, 剥离荔枝果肉将其核于 60 °C 烘干。经广西中医药大学药学教授韦松基鉴定为无患子科 (Aspindaceae) 植物荔枝属荔枝 *Litchi chinensis* Sonn. 的干燥成熟种子, 标本 (LZH201809) 保存在中药固体制剂制造技术国家工程研究中心; 原花青素 A2 对照品, 批号 PS010652, 质量分数 > 98.0%, 购于成都普思生物科技股份有限公司; 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 荔枝核总黄酮的含量测定

2.1.1 对照品溶液的配制 取原花青素 A2 对照品

约 10 mg, 精密称定, 用甲醇溶解并定容至 10 mL 棕色量瓶中, 配制成质量浓度为 1.00 mg/mL 的对照品溶液, 再用甲醇稀释, 配制成质量浓度为 0、10、25、50、100、150、200 μg/mL 的系列对照品溶液, 备用。

2.1.2 供试品溶液的配制 取荔枝核粉末 (过一号筛) 约 1 g, 精密称定, 用 50 mL 50% 甲醇 90 °C 回流提取 30 min, 趁热滤过, 取 1 mL 定容至 25 mL 量瓶中, 备用。

2.1.3 显色反应液的配制 10% 硫酸铁铵溶液: 取硫酸铁铵约 10 g, 精密称定, 用 2 mol/L HCl 溶解并定容至 100 mL, 备用^[17]。

显色反应液: 量取正丁醇、浓盐酸、10% 硫酸铁铵溶液以体积比为 83:6:1 混合摇匀, 备用^[17]。

2.1.4 原花青素 A2 标准曲线的绘制 精密吸取不同质量浓度对照品溶液 1.0 mL 于 10 mL 具塞试管中, 加入 9.0 mL 显色反应液, 塞紧塞子并摇匀, 置于沸水浴中加热 40 min 后, 立即取出, 用冰水冷却 5 min, 取出, 恢复至室温后 (大约 15 min), 在 550 nm 处以空白试剂调零, 测定吸光度值 (A_{550})^[17], 绘制 A_{550} 值-原花青素 A2 质量浓度标准曲线 (全程避光操作), 得回归方程 $Y=0.004 X+0.014 2$, $r=0.999 6$, 结果表明原花青素 A2 在 25~200 μg/mL 线性关系良好。

2.1.5 精密度考察 精密吸取供试品溶液 1.0 mL 于 10 mL 具塞试管中, 按“2.1.4”项下方法处理后测定 A_{550} , 平行测定 6 次, A_{550} 值分别 0.190、0.189、0.189、0.189、0.189、0.189, RSD 为 0.216%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性考察 取荔枝核粉末 (过一号筛) 约 1 g, 精密称定, 共 6 份, 用 50% 甲醇 50 mL 于 90 °C 回流提取 30 min, 趁热过滤, 取 1.0 mL 定容至 25 mL 量瓶中, 精密吸取供试品溶液 1.0 mL 于 10 mL 具塞试管中, 按“2.1.4”项下方法处理后测定 A_{550} 值分别为 0.221、0.225、0.222、0.220、0.220、0.207, RSD 为 2.848%, 荔枝核总黄酮质量分数分别为 64.625、65.875、64.938、64.313、64.313、60.250 mg/g, 平均质量分数为 64.052 mg/g, RSD 为 3.046%, 表

明方法重复性良好。

2.1.7 稳定性考察 精密吸取 1.0 mL 供试品溶液于 10 mL 具塞试管中,按“2.1.4”项下方法处理后,测定 10 h 内 A_{550} ,前 3 h 每隔 30 min 测定 1 次 A_{550} ,3 h 后,每小时测定 1 次 A_{550} ,共测定 14 次,计算 RSD 为 1.381%,表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率考察 取荔枝核粉末(过一号筛)约 0.5 g,精密称定,共 6 份,分别加入以 50%甲醇溶解配制的原花青素 A2 对照品(质量浓度为 1.077 mg/mL)溶液 50 mL 于 90 °C 回流提取 30 min,趁热过滤,取 1.0 mL 定容至 25 mL 量瓶中,按照“2.1.4”项下方法处理后测定 A_{550} ,计算平均回收率为 96.31%,RSD 为 2.33%,结果表明本方法回收率良好。

2.2 上柱液的制备

经过前期荔枝核总黄酮提取工艺确定的参数,取荔枝核粉末(过一号筛)约 200 g,精密称定,加入 12 倍量 60%乙醇,90 °C 下回流提取 2 次,每次 0.5 h,合并 2 次滤液,趁热过滤,减压回收乙醇并浓缩至无醇味,用 20%乙醇复溶于 1 000 mL 量瓶中,配制成含生药质量浓度为 0.2 g/mL 的荔枝核提取液,复溶前经定量测定,荔枝核提取液中总黄酮质量为 12.59 g,复溶后总黄酮质量为 10.52 g,转移率为 83.56%,质量浓度为 10.52 mg/mL,后续实验根据具体情况调整样品溶液质量浓度。

2.3 大孔吸附树脂的预处理

将 11 种不同型号的树脂在 95%乙醇中浸泡 24 h,使其充分溶胀,将浸泡 24 h 后的树脂装柱,用 95%乙醇以 5 mL/min 的体积流量冲洗,直至流出液澄清,蒸干无残留物为止,之后用 2 倍体积的 4%盐酸溶液浸泡 3 h,用纯净水以 5 mL/min 的体积流量冲洗至中性,再用 2 倍体积的 5%氢氧化钠溶液浸泡 3 h,用纯净水以 5 mL/min 的体积流量冲洗至中性后,用 95%乙醇浸泡储存,临用前用纯净水以 5 mL/min 的体积流量冲洗至中性,即可使用^[18]。

2.4 静态吸附行为考察

2.4.1 大孔吸附树脂的筛选 取预处理后的 HPD100、HPD300、HPD600、HPD800、X5、D4006、NKA-II、D101、D3520、HP-20、AB-8 型大孔吸附树脂约 1 g(湿质量),精密称定,共 11 份,置于 50 mL 具塞磨口锥形瓶中,加入质量浓度为 5.45 mg/mL 的荔枝核总黄酮提取液 20 mL,在水浴 25 °C

条件下振荡 24 h,滤过,吸取续滤液测定,计算各树脂在 25 °C 下的荔枝核总黄酮吸附量和吸附率,然后将上述吸附饱和的大孔树脂,用超纯水清洗后,分别加入 80%乙醇 20 mL,在水浴 25 °C 条件下振荡 24 h,对其进行静态解吸,计算其解吸率,结果见表 1。

$$\text{吸附量} = V(C_0 - C_e)/m$$

$$\text{吸附率} = (C_0 - C_e)/C_0$$

$$\text{解吸率} = V_1 C_1/[V(C_0 - C_e)]$$

C_0 、 C_e 、 C_1 分别为荔枝核总黄酮的加入质量浓度、平衡质量浓度、解吸后质量浓度, V 和 V_1 分别为吸附液及解吸液体积, m 为大孔树脂质量

表 1 不同类型大孔树脂对荔枝核总黄酮的吸附量及吸附率
Table 1 Adsorption capacity and rate to total flavonoids from *Litchi Semen* by different macroporous resins

树脂型号	吸附量/ (mg·g ⁻¹)	吸附率/%	解吸量/ (mg·g ⁻¹)	解吸率/%
HPD100	80.53	73.88	56.94	70.71
HPD300	74.28	68.15	56.51	76.07
HPD600	71.35	65.46	42.80	59.98
HPD800	84.66	77.67	51.27	60.56
X-5	52.98	48.61	39.17	73.92
HP-20	88.51	81.20	59.16	66.84
D3520	69.73	63.97	48.73	69.89
D4006	74.48	68.33	56.08	75.29
NKA-II	25.94	23.80	7.72	29.77
AB-8	92.76	85.10	64.19	69.20
D101	60.67	55.66	45.27	74.62

影响大孔树脂吸附性能的因素包括孔径和比表面等,孔径大小影响被吸附物质的扩散,比表面积大小影响吸附物质的量,通过静态吸附和解析试验比较,由表 1 可知在 11 种类型的树脂中,AB-8 型树脂和 HP-20 型树脂对荔枝核总黄酮的吸附性能相当,吸附率分别为 85.10%、81.20%,AB-8 型树脂与 HP-20 型树脂解吸率分别为 69.20%、66.84%,表明 AB-8 型树脂解吸性能更好,因此选择 AB-8 型大孔吸附树脂用于荔枝核总黄酮的分离纯化。

2.4.2 静态吸附曲线的绘制 取预处理后的 AB-8 型大孔吸附树脂约 1 g(湿质量),精密称定,共 24 份,分别置于 50 mL 具塞磨口锥形瓶中,加入质量浓度为 5.43 mg/mL 的荔枝核总黄酮提取液 20 mL,在水浴 25 °C 条件下以 120 r/min 的速率振荡 24 h,

每隔 1 h 取出 1 个磨口锥形瓶,测定其总黄酮质量浓度,绘制其静态吸附动力学曲线,结果见图 1。在吸附的 0~6 h 内,AB-8 大孔吸附树脂对荔枝核总黄酮的吸附量随着时间的延长而增多,在 6 h 以后,树脂对荔枝核总黄酮的吸附量趋于平衡,AB-8 大孔吸附树脂对荔枝核总黄酮的最终吸附率为 86.17%,综上分析可知,AB-8 大孔吸附树脂对荔枝核总黄酮具有较好的吸附性能,在吸附 12 h 时基本达到吸附饱和。

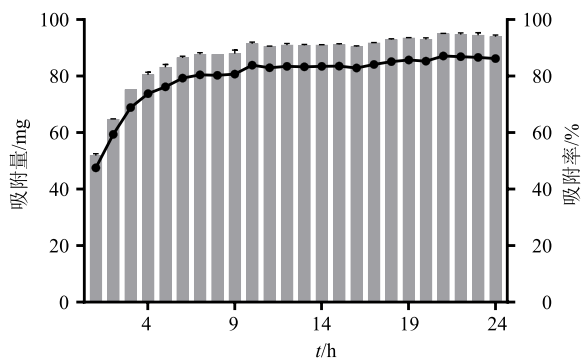


图 1 AB-8 大孔树脂的静态吸附曲线

Fig. 1 Static adsorption curve of AB-8 macroporous resin

2.4.3 吸附液 pH 值对吸附率和解吸率的影响 取预处理好的 AB-8 型大孔吸附树脂约 1 g (湿质量),精密称定,共 7 份,分别置于 50 mL 具塞磨口锥形瓶中,分别加入质量浓度为 16.87 mg/mL,并用 0.1 mol/L 的盐酸和 0.1 mol/L 的氢氧化钠调节 pH 值为 2、3、4、5、6、7、8 的荔枝核总黄酮提取液 20 mL,在水浴 25 °C 条件下以 120 r/min 的速率振荡 12 h,测定吸附液中的荔枝核总黄酮质量浓度,计算吸附率,结果见表 2。荔枝核总黄酮提取液的 pH 值对荔枝核总黄酮的吸附率及吸附量有显著影响,当 pH 为 2 时,AB-8 大孔吸附树脂对此质量浓度下的荔枝

表 2 pH 值对荔枝核总黄酮吸附率及吸附量的影响

Table 2 Effects of pH on adsorption rate and adsorption quantity of total flavonoids from *Litchi Semen*

pH 值	吸附量/ (mg·g ⁻¹)	吸附率/%	解吸量/ (mg·g ⁻¹)	解吸率/%
2	241.98	71.72	110.17	45.53
3	211.25	62.61	93.94	44.47
4	190.26	56.39	91.13	47.90
5	149.74	44.38	90.80	60.64
6	142.48	42.23	86.74	60.88
7	157.73	46.75	76.12	48.26
8	175.25	51.94	70.50	40.23

核总黄酮吸附率最大为 71.72%,故吸附液 pH 值确定为 2。

2.4.4 温度对荔枝核总黄酮吸附量的影响 取预处理好的 AB-8 型大孔吸附树脂约 1 g (湿质量),精密称定,共 21 份,置于 50 mL 具塞磨口锥形瓶中,分别加入质量浓度为 0.68、2.84、5.43、7.46、10.59、12.87、18.43 mg/mL 的荔枝核总黄酮提取液各 20 mL,分别在 25、30、35 °C 下的恒温振荡器中以 120 r/min 的速率振荡 12 h,达到吸附平衡时,测定吸附液中荔枝核总黄酮含量,确定荔枝核总黄酮最佳吸附温度,结果见表 3。随着温度的升高,AB-8 大孔吸附树脂的吸附能力逐渐下降,当吸附温度为 25 °C 时,荔枝核总黄酮吸附量最大,所以 25 °C 为 AB-8 大孔吸附树脂的最佳吸附温度。

表 3 不同温度下 AB-8 树脂对荔枝核总黄酮的吸附量

Table 3 Adsorption of AB-8 resin on total flavonoids from *Litchi Semen* at different temperatures

平衡质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	吸附量/(mg·g ⁻¹)		
	25 °C	30 °C	35 °C
0.68	13.59	13.22	13.13
2.84	55.61	54.47	37.50
5.43	89.19	86.40	60.00
7.46	99.50	90.43	73.75
10.59	104.10	96.98	92.49
12.87	107.80	101.70	92.75
18.43	120.63	111.88	93.50

2.5 动态吸附行为的考察

2.5.1 泄露曲线的绘制 取预处理后的 AB-8 大孔吸附树脂约 20 g (湿质量,柱床体积约 35 mL),精密称定,以湿法缓慢装入 (1.5 cm×40 cm) 吸附柱中,径高比为 1:12,室温下将配制成 5.43 mg/mL 并调节 pH 值为 2 的荔枝核总黄酮液,在 550 nm 波长处测得 A_{550} ,以 1.0 mL/min 体积流量加入树脂柱中,分段收集流出液,流出液每 10 毫升收集 1 份,测定 A_{550} ,计算总黄酮含量,并绘制泄露曲线。当流出液中总黄酮质量浓度为上样液总黄酮质量浓度的十分之一时,到达泄露点,认为此时为最佳上柱体积^[11],结果见图 2。在第 2 份流出液中,荔枝核总黄酮开始泄露,在第 7 份流出液中总黄酮质量浓度为 0.519 mg/mL,达到了上样质量浓度的十分之一,因此选择上样体积为 70 mL,即 2 BV。

2.5.2 上样液质量浓度对动态吸附性能的影响 取

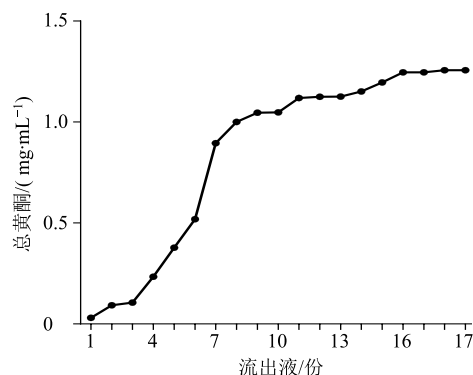


图2 荔枝核总黄酮在 AB-8 大孔树脂上的泄露曲线

Fig. 2 Leakage curve of total flavonoids from *Litchi Semen* on AB-8 macroporous resin

预处理后的 AB-8 大孔吸附树脂约 20 g (湿质量, 柱床体积约 35 mL), 精密称定, 共 7 份, 以湿法缓慢装入 (1.5 cm×40 cm) 吸附柱中, 径高比为 1:12, 配置 pH 值为 2 的质量浓度分别为 0.68、2.84、5.43、7.46、10.59、12.87、18.43 mg/mL 的荔枝核总黄酮溶液各 70 mL (2 BV), 以 1.00 mL/min 的体积流量上柱, 分别收集流出液, 测定 A_{550} , 计算各质量浓度条件下的吸附率, 确定最佳上样质量浓度, 结果各上样质量浓度下的吸附率分别为 99.00%、95.50%、94.00%、90.50%、79.50%、76.50%、70.50%。结果表明 AB-8 大孔吸附树脂对荔枝核总黄酮的吸附率随着上样液质量浓度的加大而减小, 当质量浓度为 0.68 mg/mL 时吸附率最大, 质量浓度为 18.43 mg/mL 时吸附率最小, 质量浓度太低会延长生产周期, 质量浓度太高则会造成溶剂的浪费, 当上样液质量浓度在 5.43 mg/mL 时, 吸附率为 94.00%, 故选择上样质量浓度控制在 4~6 mg/mL 即可。

2.5.3 上样体积流量对动态吸附性能的影响 取预处理后的 AB-8 大孔吸附树脂约 20 g (湿质量, 柱床体积约 35 mL), 精密称定, 共 4 份, 以湿法缓慢装入 (1.5 cm×40 cm) 吸附柱中, 径高比为 1:12, 将 5.43 mg/mL 并调节 pH 值为 2 的荔枝核总黄酮溶液 70 mL (2 BV) 分别以 1.0、2.0、3.0、4.0 mL/min 的体积流量通过树脂柱, 分别收集流出液, 测定 A_{550} , 计算此质量浓度下的吸附率, 确定最佳上样体积流量, 结果各上样体积流量下的吸附率分别为 95.43%、91.03%、84.12%、75.20%。当上样体积流量为 1 mL/min 时, AB-8 大孔吸附树脂对荔枝核总黄酮的吸附率最大, 为 95.43%, 故上样体积流量选择为 1 mL/min。

2.5.4 径高比对动态吸附性能的影响 取预处理后

的 AB-8 大孔吸附树脂约 12、15、20、25 g (湿质量, 柱床体积约 19、25、35、40 mL), 精密称定, 共 8 份, 以湿法缓慢装入 (1.5 cm×40 cm) 吸附柱中, 分别设置径高比为 1:7、1:9、1:12、1:15, 将 5.43 mg/mL 并调节 pH 值为 2 的荔枝核总黄酮溶液 70 mL (2 BV) 分别以 1.0 mL/min 的体积流量通过树脂柱, 分别收集流出液, 测定 A_{550} , 计算不同径高比下的吸附率, 确定最佳径高比, 结果各径高比下的吸附率分别为 77.94%、89.11%、93.54%、88.92%。径高比对荔枝核总黄酮的吸附率有影响, 当径高比为 1:7、1:9、1:12 时, AB-8 大孔树脂对荔枝核总黄酮的吸附率不断上升。当径高比为 1:7 时, 树脂与上样液接触时间短, 柱中上层树脂先吸附, 下层树脂吸附时间过短, 使得吸附率不完全, 而当径高比为 1:15 时, 吸附率开始下降, 可能由于其树脂床层太高, 上样液穿透能力较差, 综合考虑, 最佳径高比选择为 1:12。

2.5.5 洗脱剂体积分数对 AB-8 大孔树脂洗脱荔枝核总黄酮效果的影响 取预处理后的 AB-8 大孔吸附树脂约 20 g (湿质量, 柱床体积约 35 mL), 精密称定, 以湿法缓慢装入 (1.5 cm×40 cm) 吸附柱中, 径高比为 1:12, 将 5.45 mg/mL 并调节 pH 值为 2 的荔枝核总黄酮 70 mL (2 BV) 以 1 mL/min 体积流量上样, 待吸附饱和后, 依次用超纯水及 20%、40%、60%、80%、95%乙醇溶液各 3 BV 梯度洗脱, 分别收集洗脱液, 测定其 A_{550} , 确定最佳洗脱剂体积分数。结果超纯水及 20%、40%、60%、80%、95%乙醇的洗脱率分别为 1.30%、3.31%、48.54%、40.13%、4.83%、0.52%。可见 40%、60%乙醇对荔枝核总黄酮的洗脱率影响较大, 分别为 48.54%、40.13%, 故选择 60%乙醇对荔枝核总黄酮进行洗脱。

2.5.6 洗脱剂用量对洗脱效果的影响 取预处理后的 AB-8 大孔吸附树脂约 20 g (湿质量, 柱床体积约 35 mL), 精密称定, 按“2.5.5”项下方法上样除杂, 再用 60%乙醇溶液 280 mL (8 BV) 以 1 mL/min 体积流量梯度洗脱, 分段收集洗脱液, 测定其 A_{550} , 计算洗脱率, 确定最佳洗脱剂用量, 结果洗脱剂用量 1、2、3、4、5、6、7、8 BV 时的洗脱率分别为 48.91%、12.90%、3.99%、2.96%、1.71%、1.26%、1.05%、0.84%。当洗脱剂用量为 1、2 BV 时, 总黄酮洗脱率分别为 48.91%、12.90%, 当洗脱剂用量为 3、4 BV 时, 总黄酮洗脱率分别为 3.99%、2.96%, 且差异不大, 表明此时树脂上吸附的总黄酮类成分

已充分洗脱,因此没有必要再增加洗脱剂用量,故选择洗脱剂用量为 3 BV。

2.5.7 洗脱剂体积流量对洗脱效果的影响 取预处理后的 AB-8 大孔吸附树脂约 20 g (湿质量,柱床体积约 35 mL),精密称定,共 4 份,按“2.5.5”项下方法上样除杂,再用 60%乙醇溶液 105 mL (3 BV) 以 1.0、2.0、4.0、8.0 mL/min 的体积流量洗脱,分别收集洗脱液。测定其 A_{550} ,计算洗脱率,确定最佳洗脱剂体积流量,结果各体积流量下的吸附率分别为 64.67%、69.49%、77.29%、60.12%。荔枝核总黄酮的洗脱率随着洗脱体积分流量的加大先升高后减小。当洗脱体积分流量为 1、2 mL/min 时,洗脱率比较低,分别为 64.67%、69.49%,而当洗脱体积分流量为 8 mL/min 时,洗脱率减少至 60.12%,可能由于体积分流量过快,导致洗脱不充分,故选择最佳洗脱体积分流量为 4 mL/min,此体积分流量下的洗脱率为 77.29%。

2.5.8 最佳工艺及验证试验 根据上述单因素实验考察结果,确定纯化荔枝核总黄酮的最佳工艺条件为选用 AB-8 型大孔吸附树脂,树脂与药材的质量比为 3:1,上柱药液质量浓度为 4~6 mg/mL, pH

值为 2,上柱体积为 2 BV、上样体积分流量为 1 mL/min,径高比为 1:12,洗脱时先以 20%乙醇 3 BV 除杂、再用 60%乙醇 3 BV 洗脱、洗脱体积分流量为 4 mL/min。

称取 4 份预处理后的 AB-8 大孔吸附树脂约 20 g (湿质量,柱床体积约 35 mL),精密称定,以湿法缓慢装入 (1.5 cm×40 cm) 吸附柱中,径高比为 1:12,将 5.22 mg/mL 并调节 pH 值为 2 的荔枝核总黄酮溶液 70 mL (2 BV,总黄酮质量为 365.23 mg,质量分数 29.22%,固形物 1.25 g),以 1 mL/min 体积分流量上样,待吸附饱和后,用 20%乙醇 105 mL (3 BV) 除杂,再用 60%乙醇溶液 105 mL (3 BV) 以 4.0 mL/min 的体积分流量洗脱,分别收集洗脱液,按照荔枝核总黄酮定量测定方法,计算总黄酮洗脱量及洗脱率,结果见表 4。由纯化工艺验证结果可见,经过 4 次验证试验,60%乙醇洗脱荔枝核总黄酮的平均洗脱率为 74.60%,RSD 值为 2.46%,荔枝核总黄酮固形物由 1.25 g 减少至平均 0.4 g,质量分数从 29.22%升至平均 67.37%,RSD 值为 1.32%,表明建立的纯化工艺对荔枝核中的总黄酮类成分有较好的分离纯化效果。

表 4 纯化工艺验证结果

Table 4 Verification results of purification process

编号	加入量/mg	纯化前		洗脱量/mg	洗脱率/%	纯化后			
		固形物/g	质量分数/%			固形物/mg	质量分数/%	平均质量分数/%	RSD/%
1	365.23	1.25	29.22	262.49	71.87	391.30	67.08	67.37	1.32
2	365.23	1.25	29.22	276.93	75.82	413.10	67.04		
3	365.23	1.25	29.22	274.84	75.25	412.10	66.69		
4	365.23	1.25	29.22	275.55	75.45	401.20	68.68		

3 讨论

近年来,金属离子络合法是测定荔枝核总黄酮含量的最普遍的方法,其原理主要是黄酮类成分与金属离子发生络合反应,形成不同颜色的螯合物,再采用比色法测定 A 值计算其总黄酮含量,目前 $\text{NaNO}_2\text{-AlNO}_3\text{-NaOH}$ 、 AlCl_3 、 HCl-Mg 为常用的显色方法。

在预试验中发现,使用以芦丁为对照品的显色方法 $\text{NaNO}_2\text{-AlNO}_3\text{-NaOH}$ 法,在滴加完 NaOH 后,溶液会产生絮状沉淀,导致测定的结果不准确,再尝试不同显色、萃取、稀释、离心、过滤荔枝核提取液等方法后再次测定,结果仍不理想。在经过文献调研及前期预试验研究后,发现荔枝核黄酮类成

分中花青素类成分较多^[19],且原花青素 A2 含量最大,可作为荔枝核总黄酮的质量控制指标,因此,采用紫外分光光度法结合铁盐催化显色法测定其含量,结果表明建立的荔枝核总黄酮含量测定方法(以原花青素 A2 计)稳定、可行,对于全面评价荔枝核药材指标成分控制方面有重要意义。

大孔吸附树脂是一种具有多孔立体结构和选择性吸附功能的高分子材料,目前已广泛用于中药活性成分如黄酮、皂苷、生物碱、苷类等成分的分离与纯化^[20],影响大孔树脂的分离纯化有多方面的因素,在选择合适的大孔树脂时,应综合考虑各种影响因素,例如树脂参数极性与否、比表面积、以及上样液的质量浓度、洗脱液浓度等,以求取得最佳

的分离效果^[21-24]。本实验通过对 11 种不同型号的大孔树脂的吸附和解吸试验, 确定了 AB-8 型大孔树脂分离纯化荔枝核黄酮的最佳工艺条件为 AB-8 型大孔吸附树脂与药材的质量比为 3:1, 上柱药液质量浓度为 4~6 mg/mL、pH 值为 2、上样体积流量为 1 mL/min、上柱体积为 2 BV、径高比为 1:12、以 20%乙醇 3 BV 除杂、60%乙醇 3 BV 洗脱、洗脱体积流量为 4 mL/min, 并通过 4 次验证试验, 得到荔枝核总黄酮的质量分数从 29.22% 升至平均 67.37%, 固形物由 1.25 g 减少至平均 0.4 g, 证明 AB-8 大孔树脂对荔枝核总黄酮的富集纯化有效, 该工艺为今后的荔枝核提取物纯化工艺及产品开发提供了实验基础。

参考文献

- [1] 袁 红. 荔枝核多糖提取物对四氧嘧啶致糖尿病小鼠降糖作用 [J]. 健康研究, 2010, 30(4): 252-255.
- [2] 郭洁文, 廖惠芳, 潘竞镨, 等. 荔枝核皂苷对地塞米松致胰岛素抵抗糖尿病大鼠血糖血脂的影响 [J]. 广东药学, 2003, 13(5): 32-35.
- [3] 徐 婷, 吴 青, 高骏伟. 荔枝核提取物及其阳离子树脂分离物体外降血糖作用 [J]. 食品与机械, 2012, 28(4): 113-116.
- [4] 陈建清, 林穗金, 郑 妮. 荔枝核总黄酮对急性肺损伤大鼠胆碱能抗炎通路的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(23): 2051-2054.
- [5] Zhang J, Zhang C. Research progress on the antineoplastic pharmacological effects and mechanisms of *Litchi* seeds [J]. *Chin Med*, 2015, 6(1): 20-26.
- [6] Lin C C, Chung Y C, Hsu C P. Anti-cancer potential of *Litchi* seed extract [J]. *World J Exp Med*, 2013, 3(4): 56.
- [7] 罗 威, 钟 萍, 胡 杰. 超声辅助提取荔枝核黄酮工艺的影响面优化及抗氧化性研究 [J]. 保鲜与加工, 2017, 17(4): 49-56.
- [8] Sung Y Y, Yang W K, Kim H K. Antiplatelet, anticoagulant and fibrinolytic effects of *Litchi chinensis* Sonn. extract [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(3): 721-724.
- [9] 徐列明. 中医药抗肝纤维化疗效评价的探索 [J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(5): 825-828.
- [10] 王宪波, 孙 乐. 肝纤维化的中西医结合诊治 [J]. 临床肝胆病杂志, 2015(1): 38-41.
- [11] 姜振国. 荔枝核的化学成分及降血糖活性研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2011.
- [12] 林 妮, 吕俊华, 潘竞镨, 等. 荔枝核提取物抑制乳腺增生模型大鼠乳腺组织 ER 和 PR 表达及促进乳腺细胞凋亡作用研究 [J]. 中国药房, 2010, 21(11): 975-977.
- [13] 罗伟生, 欧士钰, 靳雅玲, 等. 荔枝核总黄酮抗肝纤维化作用的实验研究 [J]. 重庆医学, 2013, 42(4): 373-375.
- [14] 黄 莎, 莫 婵, 曾 婷, 等. 23 种岭南中药抗肝纤维化有效部位的高通量筛选 [J]. 今日药学, 2018, 28(10): 655-660.
- [15] 赵永忠, 肖绪华, 漆志平, 等. 荔枝核总黄酮对大鼠肝纤维化 TGF- β 1 及 CTGF 表达的影响 [J]. 河北医药, 2010, 32(10): 1194-1196.
- [16] 肖柳英, 潘竞镨, 饶卫农, 等. 荔枝核对小鼠肝炎动物模型的实验研究 [J]. 中国实用医药, 2006, 1(1): 11-12.
- [17] 李 华, 肖付才, 袁春龙, 等. 铁盐催化比色法测定葡萄籽超微粉中的原花青素 [J]. 食品研究与开发, 2007, 28(9): 114-117.
- [18] 荆常亮. 紫花苜蓿总黄酮的提取、纯化及其抗氧化活性研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [19] 刘 新, 韩 琴, 徐 洁. 荔枝核中原花青素超声波提取工艺研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(6): 3282-3285.
- [20] 宋晓光, 李秉润, 王少平, 等. 水蛭活性肽的纯化工艺 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(23): 2322-2325.
- [21] 王 妍, 梁志强. 大孔吸附树脂纯化荔枝核总皂苷的工艺研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8): 22-24.
- [22] 汤建萍, 周春山, 丁立稳. 大孔吸附树脂分离纯化荔枝核黄酮类化合物的研究 [J]. 离子交换与吸附, 2006, 22(6): 551-558.
- [23] 任 珅, 赵 岩, 王 梓, 等. 荔枝核总黄酮的提取分离工艺优化及体外降血糖活性测定 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(12): 2834-2837.
- [24] 熊何健, 郭倩倩, 乔小瑞. 荔枝多酚柱层析纯化工艺条件研究 [J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(6): 1274-1278.