

聚酰胺分离纯化黄栌叶漆黄素工艺研究

Study on separation and purification process of fisetin from *Cotinus coggygia* leaves with polyamide

徐娜 许凯扬 方芳 舒孝顺 李赤翎

XU Na XU Kai-yang FANG Fang SHU Xiao-shun LI Chi-ling

(长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南长沙 410114)

(School of Chemistry and Biology Engineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha, Hunan 410114, China)

摘要:以漆黄素吸附率、洗脱率为指标,研究聚酰胺树脂分离纯化黄栌叶漆黄素的工艺。从静态吸附和动态吸附两个方面,考察上样流速、样品浓度、洗脱剂浓度及用量对漆黄素纯化工艺的影响。确立了聚酰胺分离纯化黄栌叶漆黄素的最佳工艺条件:上样流速 1 mL/min,样品浓度 0.535 8 mg/mL,上样量 2 BV,洗脱剂为 70% 的乙醇,洗脱剂用量 4 BV。黄栌叶粗提物在最佳条件下精制 3 次后漆黄素含量由粗品的 10.30% 升高到了 79.82%,纯度提高了 6.75 倍。

关键词:黄栌叶;漆黄素;聚酰胺;分离纯化

Abstract: To study the separation and purification of fisetin from *Cotinus coggygia* leaves with polyamide by using the adsorption rate and elution rate of fisetin as index. The effects of sample flow rate, sample concentration, concentration of eluent and dosage on purification process were investigated from static and dynamic adsorption. The optimum process conditions were as followed: the sample flow rate was 1 mL/min, the sample concentration was 0.535 8 mg/mL, the sample volume was 2 BV, the eluent was 70% ethanol, and the eluent dosage was 4 BV. Conclusion: The crude extract of *Cotinus coggygia* leaves was refined three times under optimum conditions, which increased from 10.30% to 79.82%, and the purity increased 6.75 times.

Keywords: *Cotinus coggygia* leaves; fisetin; polyamide; separation and purification

黄栌(*Cotinus coggygia scop.*)为漆树科黄栌属植物,

一直被用作保持水土的防护林和园林绿化的景观植物。近代研究表明其具有抑制前列腺素生成、解痉、抗肿瘤及治疗黄疸型病毒肝炎等作用^[1-3],其中,漆黄素为主要有效成分^[4],含量由叶、茎枝、根依次递减^[5]。此外,由于漆黄素化学结构式中 B 环上存在邻苯二酚羟基,故也常用作抗氧化剂^[6],可用于功能性食品、药品的开发。目前对于漆黄素的研究主要集中在提取、应用等方面^[7-8],而有关漆黄素分离纯化的研究,报道较少^[9]。

柱色谱技术是植物功能成分分离的常用方法,发展迅速,已经应用到生物医药工程等各个领域。张伟^[10]、王克勤^[11]、苗建武^[12]等分别对聚酰胺树脂分离山楂提取物中的总黄酮、芹菜黄酮、丹参总酚酸的工艺进行了研究。由于漆黄素富含羟基,可通过分子中的酚羟基与聚酰胺分子中的酰胺基形成氢键络合产生吸附^[11],故本试验拟以黄栌叶粗提物为原料,研究聚酰胺分离纯化黄栌叶漆黄素的工艺条件,旨在为漆黄素的开发和利用提供有益的参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

黄栌叶:购于河南南阳,烘干粉碎后置阴凉干燥处备用;
漆黄素标准品:西安汇林生物科技有限公司;
聚酰胺:80~100 目,武汉立思捷科技有限公司;
氢氧化钠、盐酸、无水乙醇:分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

电热鼓风干燥箱:101A-2 型,天津市泰斯特仪器有限公司;
中草药粉碎机:FW177 型,天津市泰斯特仪器有限公司;
精密电子天平:FA2014 型,天津天马衡基仪器有限公司;

基金项目:湖南省科技计划项目(编号:2013SK3141);国家自然科学基金资助项目(编号:51104024);湖南省科技厅重点研发项目(编号:2017NK2082)

作者简介:徐娜,女,长沙理工大学在读硕士研究生。

通信作者:许凯扬(1971—),男,长沙理工大学副教授,博士。

E-mail: xky2051@163.com

收稿日期:2017-08-07

超声波清洗机:SB3200D型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

旋转蒸发器:RE-52型,巩义市予华仪器有限责任公司;

紫外可见分光光度计:UV-5200型,上海元析仪器有限公司;

层析柱: $\varphi 2\text{ cm} \times 30\text{ cm}$,武汉立思捷科技有限公司;

恒温振荡器:THZ-C型,苏州培英实验设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 聚酰胺树脂的预处理与回收 市售的聚酰胺用乙醇浸泡2 h,用3~4倍体积的乙醇洗至溶液透明后蒸至无残留物。再依次用2倍体积5%的NaOH溶液、1倍体积蒸馏水、2~3倍体积10%的醋酸溶液洗涤,最后用蒸馏水洗至中性,滤取树脂,自然晾干,备用。使用过的聚酰胺一般用5%的NaOH溶液洗涤,洗至NaOH溶液颜色很淡,然后水洗,再用10%的醋酸液洗,最后用蒸馏水洗至中性即可^[13]。

1.2.2 粗提物的制备 称取粉碎后黄栌叶500 g,用60%的丙酮溶液(5 000 mL)超声提取30 min,过滤,重复2次,合并滤液,浓缩至无丙酮味,冷冻干燥,测得漆黄素含量后备用。

1.2.3 漆黄素的测定 采用紫外分光光度法^[14]。

(1) 标准曲线的绘制:精密称取漆黄素标准品2.00 mg,用60%丙酮溶解,定容至100 mL容量瓶中。精确吸取0.00,1.00,2.00,3.00,4.00,5.00,6.00 mL于10 mL容量瓶中,用60%丙酮定容至刻度,在最大吸收峰366 nm处测定其吸光度,所得数据经回归处理,得到标准曲线回归方程为 $A = 0.0759C - 0.0273$,相关系数为 $R^2 = 0.9997$ 。

(2) 样品漆黄素的测定:取一定量样品,按漆黄素标准曲线测定方法测定样品吸光度,带入回归方程得出浓度。

1.2.4 静态吸附试验

(1) 上样量的确定:分别称取聚酰胺0.5,1.0,2.0,3.0,4.0 g,加适量的水充分膨胀后(以下均做此处理),再分别加入漆黄素浓度为0.267 9 mg/mL提取液20 mL,振荡24 h后,吸取上清液测定漆黄素浓度,按式(1)和(2)计算吸附量和吸附率。

$$X_1 = \frac{(C_0 - C_1) \times V}{W}, \quad (1)$$

$$X_2 = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

X_1 ——吸附量,mg/g;

X_2 ——吸附率,%;

C_0 ——初始浓度,mg/mL;

C_1 ——吸附后浓度,mg/mL;

V ——吸附液体积,mL;

W ——树脂质量,g。

(2) 吸附时间的确定:准确称取6 g聚酰胺树脂,加入漆黄素浓度为0.267 9 mg/mL的提取液40 mL,振荡,分别在0.25,0.50,1.00,2.00,3.00,4.00 h取样,测定漆黄素浓度,计算吸附量。绘制静态吸附动力学曲线图。

(3) 洗脱剂浓度的选择:分别称取9份3 g聚酰胺,加入

漆黄素浓度为0.267 9 mg/mL的提取液20 mL,振荡1 h后,滤出树脂,烘干,再分别加入20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,100%的乙醇溶液各100 mL,振荡2 h后,取上清液测定漆黄素浓度,按式(3)和(4)计算解析量和解析率。

$$J_1 = \frac{C_2 \times V}{W}, \quad (3)$$

$$J_2 = \frac{J_1}{X_1}, \quad (4)$$

式中:

J_1 ——解析量,mg/g;

J_2 ——解析率,%;

C_2 ——解析液浓度,mg/mL;

V ——解析液体积,mL;

W ——树脂质量,g。

1.2.5 动态吸附试验

(1) 上样流速的确定:取5 g聚酰胺装入层析柱中,将3份漆黄素浓度为0.267 9 mg/mL的提取液30 mL分别以0.5,1.0,2.0 mL/min的流速通过聚酰胺柱,进行动态吸附,收集流出液,测定漆黄素浓度,计算吸附率。

(2) 样品浓度的选择:取5份5 g聚酰胺装入层析柱中,分别加入漆黄素浓度为0.267 9,0.535 8,1.071 6,1.607 4,2.143 2 mg/mL的提取液30 mL,以1 mL/min的流速通过聚酰胺柱,收集流出液,测定漆黄素浓度,计算吸附率。

(3) 上样量的确定:取5 g聚酰胺于层析柱中,加入漆黄素浓度为0.535 8 mg/mL的提取液100 mL,以1 mL/min的流速通过聚酰胺柱,收集流出液,每10 mL为一管,测定漆黄素浓度,绘制泄露曲线。

(4) 洗脱剂浓度的确定:取5 g聚酰胺于层析柱中,加入漆黄素浓度为0.535 8 mg/mL的提取液40 mL,以1 mL/min的流速通过聚酰胺柱。用水洗至无色后,分别用10%,30%,50%,70%,90%的乙醇进行梯度洗脱,收集洗脱液,测定漆黄素浓度。

(5) 洗脱液用量的确定:取5 g聚酰胺于层析柱中,加入漆黄素浓度为0.535 8 mg/mL的提取液40 mL,以1 mL/min的流速通过聚酰胺柱。用水洗至无色后,用120 mL体积分数为70%的乙醇进行洗脱,收集洗脱液,每10 mL为一管,测定漆黄素浓度,绘制洗脱曲线。

2 结果与讨论

2.1 静态吸附试验

2.1.1 上样量的确定 由表1可知,漆黄素量一定时,吸附率随树脂量的增多而增加。当漆黄素量与树脂量的比值为1:372(g/g)时,吸附基本达到饱和,此时再增加树脂量,吸附率变化较少,为节约成本,宜选择1:372(g/g)为最佳上样量。

2.1.2 吸附时间的确定 由图1可知,吸附量在前1 h内增长较快,1~2 h变化趋于平缓,2 h后基本达到吸附平衡。这是由于吸附初期,树脂表面与漆黄素接触充分,而吸附后期受到孔容的限制^[15]。故选择1 h为静态吸附时间。

表 1 不同上样量的静态吸附测定结果

Table 1 Results of static adsorption of different samples amount

漆黄素量与树脂量比值(g/g)	吸附后浓度/(mg · mL ⁻¹)	吸附量/(mg · g ⁻¹)	吸附率/%
1 : 93	0.249 1	0.752	7.018 0
1 : 186	0.209 8	1.162	21.687
1 : 279	0.140 0	1.279	47.742
1 : 372	0.066 57	1.342	75.151
1 : 465	0.056 82	1.055 4	78.791

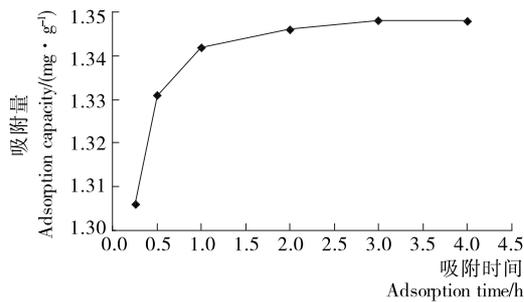


图 1 静态吸附动力学曲线图

Figure 1 kinetics curve diagram of static adsorption

2.1.3 洗脱剂浓度的选择 由图 2 可知,解析率随乙醇浓度的增加而增大,当乙醇浓度为 60%时,解析率最大,此后再增加乙醇浓度,解析率变化不大。考虑效益和成本,宜选择 60%的乙醇为洗脱剂。

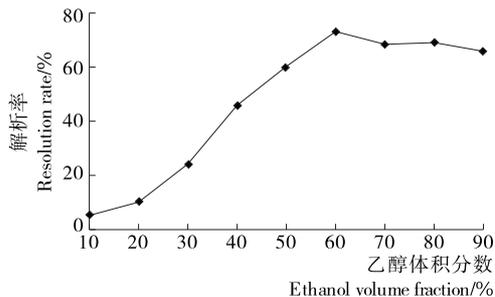


图 2 洗脱剂浓度对解析率的影响

Figure 2 Effect of eluent concentration on analytical rate

2.2 动态吸附试验

2.2.1 上样流速的确定 由图 3 可知,吸附率随上样流速的增加而减小,上样流速过大,样品未被吸附就流出树脂柱;流速过小,试验周期长。从吸附效果与试验周期考虑,选择 1 mL/min 作为上样流速。

2.2.2 样品浓度的选择 由图 4 可知,当漆黄素浓度为 0.535 8 mg/mL 时,吸附率最大,若再加大样品浓度,吸附率反而呈下降趋势。这是由于过高的样品浓度不利于扩散和吸附。故选择 0.535 8 mg/mL 为上样浓度。

2.2.3 上样量的确定 由图 5 可知,从 40 mL 开始,漆黄素开始发生泄露,当上样量为 70 mL 时,流出液中漆黄素浓度达到 0.404 7 mg/mL,接近进样浓度。故选择 40 mL 为最大上样量,约为 2 BV。换算成漆黄素与树脂量的比值约为 1 :

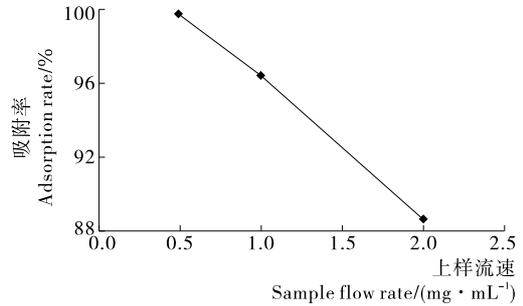


图 3 上样流速对吸附率的影响

Figure 3 Effect of sample velocity on adsorption rate

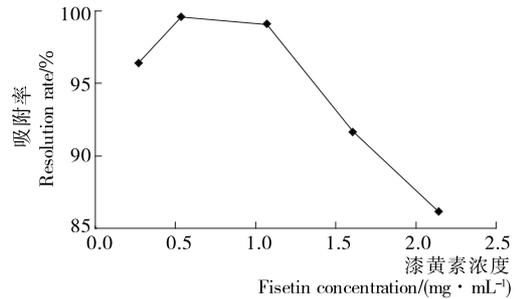


图 4 样品浓度对吸附率的影响

Figure 4 Effect of sample concentration on adsorption rate

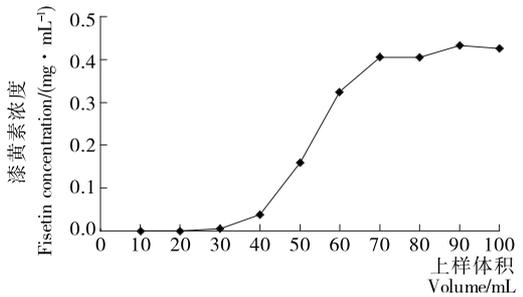


图 5 泄露曲线图

Figure 5 Leakage curve

233 (g/g),与静态吸附上样量 1 : 372 (g/g)相比,动态吸附效率较高。

2.2.4 洗脱剂浓度的确定 由表 2 可知,10%,30%,50%,70%乙醇洗脱混合物漆黄素占全部洗脱所得漆黄素量的 97%,已洗脱出漆黄素的绝大部分,残留的漆黄素量较少,从经济方面考虑,宜选择 70%乙醇作为洗脱剂。

2.2.5 洗脱液用量的确定 由图 6 可知,漆黄素含量随洗脱液用量的增加而增加,第 8 收集管漆黄素浓度较低,此时,可

表 2 不同浓度乙醇洗脱混合后漆黄素含量

Table 2 Mixed fisetin content with different ethanol concentrations eluting

乙醇浓度/%	混合物漆黄素含量/mg	占洗脱得漆黄素比例/%
10	0.088	1.657
10,30	0.874	16.454
10,30,50	4.695	88.385
10,30,50,70	5.178	97.478
10,30,50,70,90	5.312	100.000

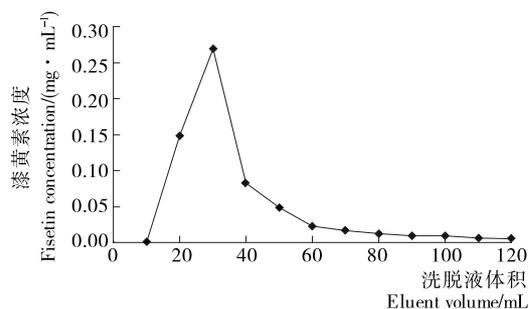


图6 洗脱曲线图

Figure 6 Elution curve diagram

以认为绝大部分漆黄素已被洗脱下来。故选择 80 mL 作为最适洗脱量,约为 4 BV。

2.3 精制次数对漆黄素纯度的影响

将黄栌叶粗提取物配置成浓度为 0.535 8 mg/mL 的溶液,以 2 BV 为上样量,1 mL/min 的流速通过 80~100 目的聚酰胺柱,吸附完成后,水洗至无色,然后用 4 BV 体积分数为 70% 的乙醇洗脱,收集洗脱液,减压浓缩至无乙醇味,冷冻干燥,计算纯化物中漆黄素的质量分数,重复精制 3 次。

表3 精制次数对漆黄素纯度的影响

Table 3 Effects of refined times on purity of fisetin

精制次数	粗品	1	2	3
漆黄素含量/%	10.30	30.51	59.46	79.82

由表 3 可知,黄栌叶粗提取物经过聚酰胺树脂的 3 次吸附和解吸后漆黄素含量由粗品的 10.30% 升高到了 79.82%,纯度提高了 6.75 倍。

3 结论

树脂法具有工艺简单,成本低廉,无有害残留物等优点,广泛应用于有效成分的分离与纯化。而聚酰胺可通过分子中的酰胺羰基与黄酮类化合物中的酚羟基形成氢键缔合而产生吸附作用,故聚酰胺是分离纯化黄酮类化合物较好的吸附剂。本试验考察了聚酰胺分离纯化黄栌叶漆黄素的工艺,确定了最佳条件:上样流速 1 mL/min,样品浓度 0.535 8 mg/mL,上样量 2 BV,洗脱剂为 70% 的乙醇,洗脱剂用量 4 BV,在此工

艺条件下,黄栌叶粗提取物经聚酰胺树脂精制 3 次后漆黄素纯度提高了 6.75 倍,表明此分离纯化方法可行。但本试验仅对聚酰胺树脂分离纯化黄栌叶漆黄素的工艺条件进行了单因素试验,在此基础上对纯化条件进一步优化,可通过正交或响应面法试验探究各影响因素之间关系,为下一步提纯工艺提供参考文献。

参考文献

[1] 王继红. 从木腊树中提取非瑟酮的研究[J]. 实验室科学, 2012, 15(6): 87-89.

[2] 廖洪利, 吴也, 臧志和. 漆黄素抗肿瘤作用研究进展[J]. 天津药学, 2013, 25(6): 44-46.

[3] 李建华, 段丹丹, 马聪玲, 等. 黄栌有效成分漆黄素提取工艺研究[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(7): 1 956-1 958.

[4] 陶峰, 颜仁杰, 周海凤, 等. 黄栌化学成分与药理活性研究进展[J]. 世界临床药物, 2014, 35(2): 109-112.

[5] 王俊杰, 江善青, 王刚, 等. 黄栌植物化学成分、药理作用与临床应用研究进展[J]. 国际中医中药杂志, 2015, 37(3): 283-285.

[6] 陈兴玉, 李萍, 张昌华, 等. 漆黄素与酸、碱、盐反应的动态紫外吸收光谱[J]. 光散射学报, 2013, 25(4): 429-432.

[7] 陈虹霞, 王成章. 漆树黄酮类化合物研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(12): 1 752-1 758.

[8] 刘东锋, 李法庆, 杨成东. 一种漆黄素的提取方法: 中国, 201010500143.0[P]. 2010-10-09.

[9] 龙丽辉, 郭增军. 黄栌中漆黄素提取工艺及含量测定方法的研究进展[J]. 中华临床医学研究杂志, 2006, 12(21): 2 937-2 938.

[10] 张伟, 葛志强, 蒋建兰. 聚酰胺树脂分离纯化复方山楂提取物中总黄酮的研究[J]. 中草药, 2009, 40(1): 63-66.

[11] 王克勤, 严志慧, 罗军武, 等. 聚酰胺树脂分离纯化芹菜黄酮的工艺研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(3): 46-50.

[12] 苗建武, 陈绍民, 王超, 等. 聚酰胺树脂分离纯化丹参总酚酸的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 28-30.

[13] 周林. 桑枝黄酮提取分离及抗氧化活性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2011: 30.

[14] 申庆亮, 李建华, 于盛茂, 等. 紫外分光光度法测定黄栌糖浆中漆黄素含量[J]. 中国中药杂志, 1990, 15(7): 40-41.

[15] 董江涛. 柿黄酮的提取、纯化及抗氧化性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2010: 43.

(上接第 94 页)

(2) 本试验讨论分析了不同外界条件下的橡胶籽所受碰撞力的大小,可结合橡胶籽的破碎力试验中不同情况的破碎力,设计合理的破壳机结构,从而控制高度、角度、初速度等因素,使得橡胶籽进入破壳机后能够更有效地完成脱壳工作。

(3) 后续可在本试验的基础进行更深层次的试验,得出多因素、更加全面、更加符合实际情况的力学模型,如进行有限元分析^[8]等,使橡胶籽脱壳机模型更加趋于高效化和自动化。

参考文献

[1] 潘善甫, 郑联合. 食用橡胶籽油的开发利用研究[J]. 中国油脂, 2000(6): 114-115.

[2] 赵瀛华, 范武平, 范武波. 橡胶籽的全成分开发与利用[J]. 热带

农业工程, 2013, 37(2): 46-49.

[3] 王云. 一种橡胶籽脱壳设备: 中国, CN102160676A[P]. 2011-08-24.

[4] 何焯亮, 王涛, 嵇明志, 等. 橡胶果外壳破碎力试验[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(15): 3 655-3 658.

[5] 何焯亮, 王涛, 嵇明志, 等. 橡胶籽壳破碎试验研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(2): 128-131.

[6] 麦贤豪, 王涛, 林勇, 等. 橡胶果剥壳机设计[J]. 食品与机械, 2014, 30(6): 112-114.

[7] 袁江, 胡明辅, 毕二朋, 等. 橡胶籽的开发利用[J]. 中国农业科技导报, 2012, 14(1): 116-121.

[8] 张新, 王博, 张黎骅. 葵花籽仁力学特性的有限元分析[J]. 食品与机械, 2017, 33(2): 31-35.