

文章编号:1001-6880(2014)10-1562-06

大孔树脂分离纯化陈皮中多甲氧基黄酮类化合物

刘韶^{1*}, 阳秀娟²¹ 中南大学湘雅医院药学部, 湖南长沙 410008; ² 桂林医学院附属医院临桂院区药剂科, 广西桂林 541100

摘要:以川陈皮素和橘皮素为评价指标,筛选陈皮中多甲氧基黄酮类的大孔树脂纯化工艺。采用高效液相色谱法检测川陈皮素和橘皮素;采用静态和动态吸附、解吸实验筛选大孔树脂种类和工艺参数。D101型大孔树脂对陈皮中多甲氧基黄酮类吸附最好,最佳工艺条件为:洗脱剂为80%乙醇,洗脱剂用量为6倍柱体积(BV),最佳上样液浓度为500 mg/mL;经过处理后川陈皮素和橘皮素的纯度分别提高了3.7倍和3.2倍。大孔树脂能用于陈皮中多甲氧基黄酮类化合物的分离纯化。

关键词:陈皮;大孔树脂;多甲氧基黄酮;川陈皮素;橘皮素

中图分类号:R284

文献标识码:A

Separation and Purification of Polymethoxylated Flavones from Orange Peel Using Macroporous Resin

LIU Shao¹, YANG Xiu-juan²

¹ Department of pharmacy, Xiangya Hospital, Central-south University, Hunan Changsha 410008, China; ² Department of pharmacy, Guilin Hospital of Medical University and Lingui branch, Guangxi Guilin 541100, China

Abstract: The enrichment process of polymethoxylated flavones from dried tangerine or orange peel using macroporous resin were optimized. Based on the contents of nobiletin and tangeretin determined by HPLC, the adsorption capacity and elution ratio of different resins were studied and compared. D101 macroporous resin was most suitable for separation and purification of polymethoxylated flavones from orange peel. The concentration and dosage of eluent, sample concentration were investigated and the optimal conditions were obtained as follows: the eluent was 80% ethanol, dosage of eluent was 6 BV, sample concentration was 500 mg/mL. After processing, the purities of nobiletin and tangeretin were improved 3.7 times and 3.2 times, respectively. The results proved that macroporous resin can be used for separation and purification of polymethoxylated flavones from orange peel.

Key words: orange peel; macroporous resin; polymethoxylated flavones; nobiletin; tangeretin

陈皮是芸香科柑橘属植物橘(*Citrus reticulata* Blaneo)及其栽培变种的干燥成熟果皮^[1],其性温、辛、味苦,归肺、脾经,具有理气健脾、燥湿化痰的功效^[2]。陈皮中含有多种多甲氧基黄酮类成分,其中川陈皮素和橘皮素含量较高。近年来发现多甲氧基黄酮类成分具有抗癌、抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗诱变等生物活性逐渐成为热点^[3-5],因此,对含多甲氧基黄酮陈皮进行纯化研究很有必要。但该类研究报道不多^[6,7],多研究其所含的另一类黄酮,如陈皮苷。大孔树脂是一种多孔的聚合物吸附剂,现已广泛应用于中药中有效部位的纯化研究^[7],本文以川陈皮素和橘皮素为评价指标,筛选陈皮中多甲氧基黄酮

类的大孔树脂分离纯化工艺。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

电子天平(德国 Sartorius 公司);旋转蒸发仪(郑州长城 R-1001N);恒温水浴锅(余姚市亚星仪器仪表有限公司);Agilent-1100 型液相色谱仪器(包括 G1311A 四元梯度泵、G1313A 自动进样器、G1311A 柱温箱、G1313A 二极管阵列检测器,美国安捷伦科技有限公司)。

陈皮(产地:江西,批号:201207061),经中南大学湘雅医院药学部刘韶主任药师鉴定为芸香科柑橘属植物橘(*Citrus reticulata* Blaneo)的干燥成熟果皮;D101型大孔吸附树脂(天津市光复精细化工研究所);DM130型大孔吸附树脂(沧州宝恩吸附材料科

技有限公司);川陈皮素和橘皮素对照品(陕西永健制药有限公司,纯度≥98%);乙腈(色谱纯);乙醇(分析纯);纯化水(自制)。

1.2 川陈皮素和橘皮素的含量测定

1.2.1 色谱条件^[8,9]

色谱柱为XB-C18(5 μm, 4.6 mm × 250 mm);流动相为乙腈-水(50:50);流速为1.0 mL/min;检测波长330 nm;柱温为25 °C;进样量为10 μL。

1.2.2 对照品溶液的制备和标准曲线的绘制

精密量取川陈皮素标准品25 mg,置50 mL容量瓶中,加适量无水乙醇,使之溶解,再加无水乙醇定容至刻度,摇匀、即可。精密量取川陈皮素标准溶液1、2、4、6、8、10 mL分别置10 mL容量瓶中,各加无水乙醇混匀,再定容至刻度、摇匀。用HPLC测定峰面积,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标绘制标准曲线,得线性方程。

精密量取橘皮素标准品12.5 mg,置25 mL容量瓶中,加适量无水乙醇,使之溶解,再加无水乙醇定容至刻度、摇匀,即可。精密量取橘皮素标准溶液0.2、0.5、1.2、3、4 mL分别置10 mL容量瓶中,各加无水乙醇混匀,再定容至刻度、摇匀。用HPLC测定峰面积,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标绘制标准曲线,得线性方程。

1.2.3 样品溶液的制备

称取陈皮药材500 g,以85%的乙醇10倍量提取2次,每次提取1 h,过滤,合并滤液,将滤液旋转蒸发,回收乙醇,再用30%乙醇溶解,并定容至1000 mL作为样品液,放冰箱(4 °C)中备用。

1.2.4 精密度、稳定性、重现性试验

取同一对照品溶液,重复进样6次,测定川陈皮素、橘皮素的峰面积,计算精密度的RSD。取供试品溶液,自溶液配制后分别在0、2、4、8、12、24 h各进样10 μL,测定川陈皮素、橘皮素峰面积,计算稳定性的RSD。精密称定陈皮粉末6份,每份约1 g,按“1.2.3”项下方法处理,进行重现性实验,以峰面积计算,得到川陈皮素、橘皮素峰面积的RSD。

1.3 大孔树脂预处理

将未处理的大孔树脂用适量95%乙醇浸泡过夜,倒出乙醇,用纯化水洗,并湿法装柱,再用纯化水洗至流出液无醇味,备用。

1.4 大孔树脂的种类筛选

将已预处理的D101、DM130型大孔树脂分别称取1 g于带磨口塞的锥形瓶中,各加入适量陈皮样

品液,静置过夜,过滤后得吸附后溶液。往过滤后的树脂中,各加95%乙醇适量,静置过夜,过滤后得解吸后溶液。重复试验3次,用HPLC法测定各样品中的川陈皮素和橘皮素,按下式分别计算吸附量和解吸率。

$$\text{吸附量} = (CV - C1V1)/M$$

$$\text{解吸率} = C2V2/(CV - C1V1) \times 100\%$$

式中:C、V分别是陈皮样品液的浓度(mg/mL)和体积(mL),C1、V1分别是吸附后溶液的浓度(mg/mL)和体积(mL),M是树脂的质量(g),C2、V2分别是解吸液的浓度(mg/mL)和体积(mL)^[6]。

1.5 洗脱剂乙醇浓度的确定

取约20 g已预处理的D101型大孔树脂3份,湿法装柱,取陈皮样品液70 mL上柱,用2 BV水和3 BV 30%乙醇分别洗脱除去杂质,再将第一份树脂柱用6 BV 70%乙醇继续洗脱,第二份树脂柱用6 BV 80%乙醇继续洗脱,第三份树脂柱用6 BV 95%乙醇继续洗脱,分别吸取每份的上样液、流出液和洗脱液测定,按文献方法^[10]计算川陈皮素、橘皮素的吸附量及洗脱率。

1.6 洗脱剂用量的考察

取约20 g已预处理的D101型大孔树脂湿法装柱,取陈皮样品液70 mL上柱,用2 BV水和3 BV 30%乙醇分别洗脱除去杂质,再用6 BV 80%乙醇洗脱,每2 BV一份,共3份。依次吸取上样液、流出液和洗脱液测定,并计算川陈皮素、橘皮素的洗脱率。

1.7 上样液浓度的考察

取约20 g已预处理的D101树脂两份分别湿法装柱,将质量浓度为167 mg/mL和500 mg/mL的陈皮样品液上柱,吸附过夜后,先用2 BV水和3 BV 30%乙醇分别洗脱除去杂质,再用6 BV 80%乙醇洗脱,流速1.5 mL/min。依次吸取上样液、流出液和洗脱液测定并计算川陈皮素和橘皮素的吸附量及洗脱率。

1.8 工艺重复性考察

按确定好的吸附、洗脱条件,重复实验三次,依次吸取流出液和洗脱液测定,计算川陈皮素和橘皮素的吸附量、洗脱量及洗脱率。另取陈皮样品液和三次80%乙醇洗脱液倒入已恒重好的蒸发皿中在70 °C水浴锅上蒸干,再放入105 °C烘箱中烘4 h,再取出,放到干燥器中干燥1 h,称重,计算浸膏得率(浸膏得率=浸膏量/样品液中所含药材的量×100%),并测定浸膏中川陈皮素和橘皮素的含量。

1.9 树脂重复使用次数的考察

取陈皮样品液,按前述条件进行试验,在同一根

柱上重复操作 4 次, 分别测定、计算出川陈皮素和橘皮素的吸附量、洗脱量及洗脱率。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 含量测定方法学考察结果

川陈皮素和橘皮素对照品及样品的色谱图见图 1, 从图中可以看出, 各组分分离度良好。以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标绘制标准曲线, 求得川陈皮素和橘皮素线性方程分别为 $Y = 17721X + 15.763$,

$R^2 = 0.9999$; $Y = 23898X - 14.467$, $R^2 = 0.9997$ 。表明各化合物在相应范围内线性关系良好。精密度试验中川陈皮素和橘皮素峰面积 RSD 分别为 1.2% 和 1.1%, 表明仪器精密度良好。稳定性试验中, 川陈皮素和橘皮素峰面积 RSD 分别为 1.5% 和 0.9%, 表明样品在 24 h 内稳定。重复性试验中, 川陈皮素和橘皮素峰面积 RSD 分别为 1.4% 和 1.6%, 表明该方法重复性良好。

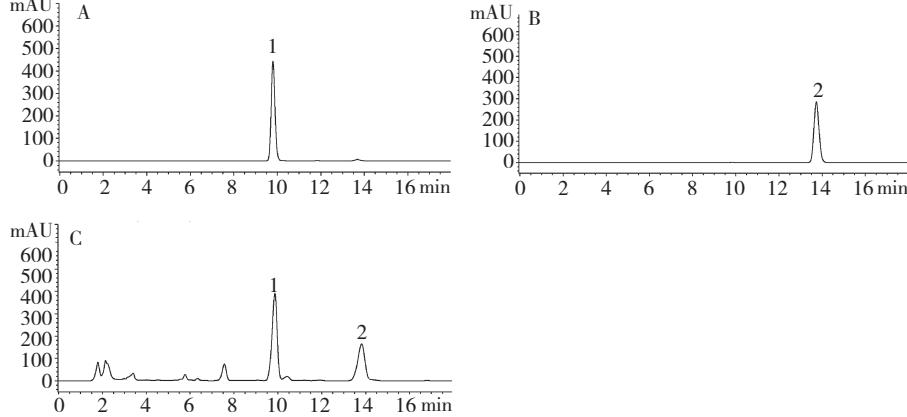


图 1 川陈皮素对照品(A)、橘皮素对照品(B)及陈皮样品(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of nobiletin (A), tangeretin (B) and orange peel sample (C)

1:川陈皮素 nobiletin; 2:橘皮素 tangeretin

2.2 大孔树脂类型筛选结果

D101、DM130 型大孔树脂对陈皮样品液中川陈皮素和橘皮素的吸附量及解吸率见表 1。3 次试验结果基本一致, 2 种树脂对川陈皮素和橘皮素的吸

附量以及解析率的相对标准偏差小于 1.5%。D101 型大孔树脂对川陈皮素和橘皮素的吸附量稍大于 DM130 型树脂, 解吸率也高于 DM130 型树脂, 因此选用 D101 型大孔树脂。

表 1 不同树脂对陈皮样品液中川陈皮素和橘皮素的吸附量及解吸率($n = 3$)

Table 1 The adsorption and desorption rate of different resins for nobiletin and tangeretin ($n = 3$)

树脂类型 Resin type	川陈皮素 Nobiletin		橘皮素 Tangeretin	
	吸附量 Adsorption quantity (mg/g)	解吸率 Desorption rate(%)	吸附量 Adsorption quantity (mg/g)	解吸率 Desorption rate(%)
D101	2.44	92.05	1.19	84.49
DM130	2.42	86.15	1.18	81.84

2.3 洗脱剂乙醇浓度考察结果

不同浓度乙醇的洗脱效果见表 2。从表 2 可知, 80% 乙醇和 95% 乙醇的洗脱效果都比较好。对于川陈皮素, 80% 乙醇和 95% 乙醇的洗脱率接近, 而对于橘皮素, 80% 乙醇的洗脱率则较 95% 乙醇的洗脱率稍低, 但也能达到 85.9% 的洗脱率。因此, 综合因素考虑选用 80% 乙醇。

2.4 洗脱剂用量的考察

从图 2 中可以看出, 第一个 2 BV 80% 乙醇洗脱液中, 川陈皮素洗脱率达到 54.14%, 橘皮素的洗脱率达到 20.00%, 第二个 2 BV 80% 乙醇洗脱液中, 川陈皮素洗脱率达到 39.65%, 橘皮素的洗脱率达到 46.84%, 第三个 2 BV 80% 乙醇洗脱液中, 川陈皮素洗脱率达到 5.34%, 橘皮素的洗脱率达到

表 2 洗脱剂乙醇浓度的考察结果

Table 2 Effects of ethanol concentration on desorption rate of nobiletin and tangeretin

乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	川陈皮素 Nobiletin			橘皮素 Tangeretin		
	吸附量 Adsorption quantity (mg/g)	洗脱量 Desorption quantity (mg/g)	洗脱率 Desorption rate (%)	吸附量 Adsorption quantity (mg/g)	洗脱量 Desorption quantity (mg/g)	洗脱率 Desorption rate (%)
70%	2.83	2.48	87.59	1.32	0.72	54.63
80%	2.83	2.72	96.22	1.32	1.13	85.90
95%	2.83	2.75	97.32	1.31	1.32	100.09

19.06%。即 6 BV 80% 乙醇洗脱后,川陈皮素总的洗脱率达到 96.13%,橘皮素总的洗脱率达到 85.9%,表明当 80% 乙醇用量为 6 BV 时已基本上将这两种多甲氧基黄酮洗脱完全,因此确定树脂的最佳洗脱量为 6 BV。

2.5 上样液浓度的考察

D101 树脂对不同浓度样品溶液中的川陈皮素和橘皮素的吸附量,解吸率见表 3。从表 3 可以看出,500 mg/mL(以陈皮药材计)为较佳的上样浓度。

表 3 上样液浓度的考察结果
Table 3 Effects of sample concentration on desorption rate of nobiletin and tangeretin

样品浓度 Sample concentration (mg/mL)	川陈皮素 Nobiletin			橘皮素 Tangeretin		
	吸附量 Adsorption quantity (mg/g)	洗脱量 Desorption quantity (mg/g)	洗脱率 Desorption rate (%)	吸附量 Adsorption quantity (mg/g)	洗脱量 Desorption quantity (mg/g)	洗脱率 Desorption rate (%)
500	6.04	5.85	96.83	2.90	2.56	88.38
167	2.83	2.72	96.22	1.32	1.13	85.90

2.6 工艺重复性考察

表 4 为重复实验 3 次的结果。三次实验中,川陈皮素和橘皮素的吸附量、洗脱量及洗脱率都接近,说明在同等条件下实验,能达到稳定的吸附和洗脱。陈皮样品液和三次实验中 80% 乙醇洗脱液的浸膏得率及浸膏中川陈皮素和橘皮素的含量见表 5。从

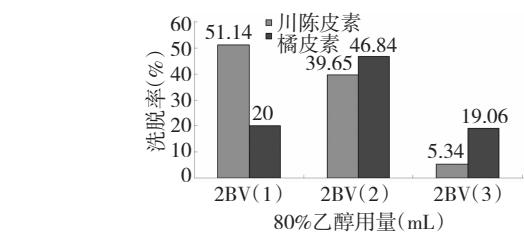


图 2 洗脱剂用量的考察

Fig. 2 Effects of eluent dosage on desorption rate of nobiletin and tangeretin

表 5 的结果能够看出,陈皮样品液通过 D101 型大孔树脂的分离纯化后浸膏得率下降,而浸膏中川陈皮素和橘皮素的含量增加。浸膏中川陈皮素的含量由纯化前 2.54% 到纯化后变为 11.96%,提高了 3.7 倍;浸膏中橘皮素的含量由纯化前 1.22% 到纯化后变为 5.11%,提高了 3.2 倍。

表 4 工艺重复性考察的结果

Table 4 The results of process repeatability

实验次数 No.	川陈皮素 Nobiletin			橘皮素 Tangeretin		
	吸附量 Adsorption quantity (mg/g)	洗脱量 Desorption quantity (mg/g)	洗脱率 Desorption rate (%)	吸附量 Adsorption quantity (mg/g)	洗脱量 Desorption quantity (mg/g)	洗脱率 Desorption rate (%)
1	6.03	5.73	94.95	2.89	2.50	86.28
2	6.04	5.94	98.34	2.90	2.64	91.03
3	6.04	5.87	97.21	2.90	2.54	87.84

表 5 纯化效果考察结果
Table 5 The results of purification effect

样品 Sample	浸膏量 Extract weight (g)	浸膏得率 Extraction rate (%)	川陈皮素含量 Nobiletin content (%)	橘皮素含量 Tangeretin content (%)
陈皮提取液 Orange peel extract	2.38	19.04	2.54	1.22
洗脱液 1 Eluent 1	0.70	0.55	12.08	5.03
洗脱液 2 Eluent 2	0.74	0.59	11.77	5.10
洗脱液 3 Eluent 3	0.71	0.57	12.04	5.19

2.7 树脂重复使用次数的考察

树脂重复使用次数越多,其洗脱量会下降,洗脱率也会降低。本实验结果(表 6)表明:重复使用 3 次,川陈皮素和橘皮素的吸附量、洗脱量及洗脱率都

变化不大。使用第 4 次后,川陈皮素和橘皮素的吸附量、洗脱量及洗脱率都有所下降。因此,树脂重复使用 3 次后,要进行活化处理。

表 6 树脂重复使用次数考察结果
Table 6 The repeated using times of resin

重复使用次数 Repeated times	川陈皮素 Nobiletin			橘皮素 Tangeretin		
	吸附量 Adsorption quantity (mg/g)	洗脱量 Desorption quantity (mg/g)	洗脱率 Desorption rate (%)	吸附量 Adsorption quantity (mg/g)	洗脱量 Desorption quantity (mg/g)	洗脱率 Desorption rate (%)
1	6.04	6.14	101.62	2.90	2.62	90.55
2	6.04	5.85	96.83	2.90	2.56	88.38
3	6.04	5.83	96.50	2.90	2.49	85.91
4	6.04	5.55	92.00	2.90	2.23	77.01

3 结论

本实验的纯化目标成分是川陈皮素和橘皮素等多甲氧基黄酮类成分,紫外光分光光度法、HPLC 法均可以用来测定其含量。本实验采用 HPLC 法测定样品中的川陈皮素和橘皮素,并以它们为评价指标,筛选大孔树脂分离纯化工艺,可信度更高、更能反映纯化工艺的情况。

树脂的类型,洗脱的浓度,洗脱剂的用量,上样液的浓度等对川陈皮素和橘皮素等多甲氧基黄酮类成分的纯化工艺影响较大。本实验首先通过参考文献和预实验,并根据川陈皮素和橘皮素的结构特征和树脂性质,排除了多种树脂,只选用 D101 型和 DM130 型大孔树脂来进行静态吸附、解吸实验。根据影响树脂纯化的因素,本论文还对洗脱的浓度,洗脱剂的用量,上样液的浓度等进行了考察,确定 D101 型大孔树脂为较佳的吸附树脂,最佳工艺条件为:洗脱剂为 80% 乙醇,洗脱剂用量为 6 BV,最佳上样液浓度为 500 mg/mL。经过处理后川陈皮素和橘皮素的纯度分别提高了 3.7 倍和 3.2 倍。

本实验操作简单,实验成本较低,经济环保且能达到较好的分离纯化效果,能用于陈皮中多甲氧基黄酮类化合物的分离纯化。

参考文献

- 1 Zheng GD(郑国栋), Jiang L(蒋林), Yang X(杨雪), et al. Study on the contents of flavonoids in *Citrus reticulata* ‘Chachi’ storaged in different years. *Chin Tradit Patent Med*(中成药), 2010, 32:977-980.
- 2 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People’s Republic of China* (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 57.
- 3 Song JL(宋家玲), Yang YJ(杨永建), Li Q(李强), et al. Advances on research of polymethoxylated flavones. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2012, 18: 308-313.
- 4 Wang L(王磊), Su XS(苏学素), Fu CM(付陈梅), et al. Research progress on biological activities and applications of polymethoxy flavonoids from *Citrus*. *Food Sci(食品科学)*, 2009, 30:285-290.

- 5 Li SM, Pan MH, Lo CY, et al. Chemistry and health effects of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones. *J Functional Foods*, 2009, 1:2-12.
- 6 Liu BF(刘邦夫), Wang HX(王辉宪), Cao YB(曹永兵), et al. Study on separation and purification of flavonoids from citrus. *Che Res App(化学研究与应用)*, 2008, 20:485-489.
- 7 Chen FS(陈复生), Zuo JJ(左锦静), Yao YZ(姚永志). Study on the performance of absorption and separation of macroporous resins for the flavonoids from citrus. *Food Sci Tech(食品科技)*, 2006, 7:121-124.
- 8 Zheng GD(郑国栋), Jiang L(蒋林), Yang DB(杨得坡), et al. HPLC simultaneous determination of contents of five flavonoids in *Citrus reticulata* ‘Chachi’ from various habitats. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2010, 41:652-655.
- 9 Li LW(林乐维), Jiang L(蒋林), Zheng GD(郑国栋). Study on the contents of flavonoids in *Citrus reticulata* ‘Chachi’ from various habitats and different collecting periods. *J Chin Med Mater(中药材)*, 2010, 33:173-176.
- 10 Wu ZC(吴志成), Liu SZ(刘淑芝), Li ML(李曼玲), et al. Study on refine techincs of fufang jingzhiguanxin with macroporous resin. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2011, 17(8):11-14.

(上接第 1556 页)

- 8 Liang CN(梁朝宁), Xiong DD(熊丹丹), Tang SY(唐双焱). A screening method for mutations produce high yield of rare ginsenosides from major ginsenosides. CN201310246807.9, 2013-6-20.
- 9 Meng Q(孟琼), Qian ZM(钱正明), Chen ZY(陈治宇), et al. HPLC characteristics of *Panax quinquefolium*. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2010, 30:791-795.
- 10 Haruyo K, Shuichi S, Yoshiteru I, et al. Studies on the saponins of ginseng IV. on the structure and enzymatic hydrolysis of ginsenoside-Ra₁. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30:2393-2398.
- 11 Bae EA, Choo MK, Park EK, et al. Metabolism of ginsenoside Rc by human intestinal bacteria and its related antiallergic activity. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25:743-747.
- 12 Shoji Y, Kiyoko K, Osamu T. Study on dammarane-type saponins of roots, leaves, flower-buds and fruits of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Chem Pharm Bull*, 1979, 27:88-92.
- 13 Yang XW(杨秀伟). Complete assignment of ¹H and ¹³C NMR chemical shifts of 20(R)-ginsenoside Rg₂ and 20(S)-ginsenoside Rg₂. *Chin J Magn Reson(波谱学杂志)*, 2000, 17:9-15.
- 14 Zeng J(曾江), Cui XM(崔秀明), Zhou JM(周家明), et al. Studies on chemical constituents from rhizomes of *Panax notoginseng*. *J Chin Medi Mater(中药材)*, 2007, 30:1388-1391.
- 15 Song JP(宋建平), Zeng J(曾江), Cui XM(崔秀明), et al. Studies on chemical constituents from rhizomes of *Panax notoginseng* (II). *J Yunnan Univ(云南大学学报)*, 2007, 29:287-290.
- 16 Tanaka O, Yahara S. Dammarane saponins of leaves of *Panax pseudo-ginseng* subsp. *Himalaicus*. *Phytochem*, 1978, 17: 1353-1358.
- 17 Zhai WM(翟为民), Yuan YS(袁永生), Zhou YX(周玉新), et al. HPLC fingerprints identification of *Panax ginseng* C. A. Mey., *P. quinquefolium* L. and *P. notoginseng* (Burk. F. H. Chen). *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2001, 26:481-482.