

## 设计柱层析过程从兴安落叶松锯末中分离纯化花旗松素

刘婷婷,袁其朋\*

北京化工大学生命科学与技术学院化工资源有效利用重点实验,北京 100029

**摘要:**以兴安落叶松锯末为主要提取原料,柱层析为基础单元建立了花旗松素的制备工艺。分别以分离和纯化为目的,工艺中联用了 AB-8 型大孔树脂柱层析及制备色谱两个单元。大孔树脂动态吸附中,上样液中花旗松素的浓度 0.5 mg/mL;流速为 4 BV/h;上样体积为 169 mL;床层的径高比为 1/10。洗脱过程中,用 5 BV 去离子水清洗柱子后,用体积比为 20% 乙醇水溶液洗脱含有花旗松素的分离产品。洗脱过程中,在流速为 3 BV/h 条件下,收集 8 BV 的洗脱液。经过分离,花旗松素的纯度从 6.0% 提升至 56.75%,该步骤的回收率为 88.71%。含有 40 mg 花旗松素的分离产品经旋蒸干后,溶解于 10 mL 体积比为 35% 的甲醇水溶液中作为制备色谱单元中的上样液。该步骤中,在洗脱流速为 8 mL/min 条件下,收集得到纯度为 95.02% 的花旗松素。控制收集时间为 33.0~40.5 min,花旗松素的纯度可以被进一步提高到 98.02%,并通过 NMR 确证其结构。在整个研究中,过程设计的思想引入了两个柱单元的操作条件筛选中,结果表明了工艺中确定的操作条件是最优的。

**关键词:**柱层析过程;兴安落叶松锯末;分离;纯化;花旗松素

中图分类号:TQ423

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.7.019

## Separation and Purification of Taxifolin from *Larix gmelini* Sawdust Using Process Planning of Column Chromatography

LIU Ting-ting, YUAN Qi-peng\*

State Key Laboratory of Chemical Resource Engineering, College of Life Science and Technology,  
Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

**Abstract:** In this study, *Larix gmelini* sawdust was used as raw material for the purification of taxifolin with column process as the basic unit. With separation and purification as the purposes of the two units arranged in present technology, respectively, the column packed with AB-8 macroporous adsorption resins (MARs) and the preparative high performance liquid chromatography (prep-HPLC) were combined together. In the dynamic experiments carried out on AB-8 MARs column, the concentration of taxifolin contained in the sample solution was 0.5 mg/mL; the flow rate was 4 BV/h; the volume of the sample solutions was 169 mL, and the ratio of the diameter of the bed to the length of the bed was 1/10. In the eluting process, the flow rate was set at 3 BV/h. Five BV of deionized water was used for washing the adsorption column firstly. Then, 8 BV of 20% (volume concentration) aqueous ethanol was used for eluting the separated products containing taxifolin. Through separation, the purity of taxifolin products was improved from 6.0% to 56.78%, with recovery of 88.71%. After being dried by the rotary evaporator, the separating products, in which the amount of taxifolin was 40 mg, were re-dissolved into 10 mL of 35% (volume concentration) aqueous ethanol to prepare the solutions for prep-HPLC unit. In this step, the eluting rate was 8 mL/min. The purity of taxifolin collected in this step was 95.02%. Setting the collection time range from 33.00 min to 40.50 min in the above method, the purity of taxifolin was further improved to 98.02%.

**Key words:** column process; *Larix gmelini* sawdust; separation; purification; taxifolin

中国东北大小兴安岭 55% 的地区广泛生长着兴安落叶松树种<sup>[1]</sup>。在过去的一些年中,落叶松广泛用于家具的加工,产生的锯末主要用于乡村的燃

料,使落叶松的价值没有最大化地体现出来<sup>[2]</sup>。落叶松锯末中有一种天然活性成分为花旗松素,其化学结构如图 1 所示。

该化合物黄酮类骨架的特征决定了其活性,如扩张血管,改善血液微循环,增加血流量,抑制血小板聚合等<sup>[3]</sup>。作为天然药用成分,花旗松素广泛

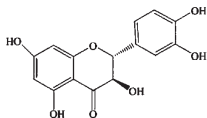


图1 花旗松素的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of taxifolin

用于治疗脑梗塞, 脑血栓, 冠心病以及心绞痛<sup>[4]</sup>。近年来, 花旗松素还被报道具有抗炎、抗氧化、保肝等药用活性<sup>[5]</sup>。发表的论文中虽然有提到关于花旗松素的回流提取<sup>[6,7]</sup>及酶法辅助提取工艺<sup>[8]</sup>, 但这些工艺所获得的花旗松素的纯度并不高。并且关于应用柱过程从落叶松锯末中分离纯化花旗松素的工艺未有报道。

近年来, 大孔树脂柱层析技术广泛应用于天然化合物的分离, 具有环保, 无污染, 成本低等优点<sup>[9]</sup>。在之前的研究中, 本课题组基于静态吸附现象模型机制建立了一个静态吸附平衡时间的预测框架<sup>[10]</sup>, 但并未涉及对 AB-8 树脂柱层析分离过程的设计, 亦未应用 AB-8 大孔树脂柱层析动态分离花旗松素。作为一种快速的、主流的分单元, 制备色谱经常与其他柱层析单元耦合并作为最后的纯化步骤出现在天然产物分离纯化的整个工艺中<sup>[11]</sup>。这种思路不但能够节约成本, 而且能够使制备的产品达到高纯。

在本研究中, 我们以 AB-8 大孔树脂为填充介质的柱层析分离单元与制备色谱联用建立了一条花旗松素的分离纯化工艺。与以往单纯的树脂加制备工艺相比, 该研究通过设计实验节约了操作时间。同时, 该研究中所涉及的过程设计思想夯实了制备高纯度花旗松素的工艺过程中条件筛选的基础。

## 1 仪器与材料

### 1.1 设备

#### 1.1.1 提取及树脂实验相关设备

用于提取的油浴锅购自上海书培有限公司; 用于大孔树脂静态吸附洗脱研究的水浴摇床购自南京普森仪器有限公司; 用于大孔柱层析的玻璃柱(20 cm × 1 cm, ID) 购自北京满仓科技有限公司; 用于大孔树脂柱层析过程中样品注入的蠕动泵购自于保定兰格恒流泵有限公司。

#### 1.1.2 样品分析检测设备

分析型高效液相色谱检测系统是由 Shimadzu LC-20AVP 系统和一个反相 C<sub>18</sub> 柱(250 × 4.6 mm, 5

μm, Diamodsil™)。其中 Shimadzu LC-20AVP 系统包括两个 LC-20AT 型溶剂运输装置、一个 SPD-20A 型紫外检测器、一个 CTO-10ASVP 型柱温箱(Shimadzu, Kyoto, Japan) 以及一个 TP2000 工作站(北京)。核磁共振分析仪(NMR) 400 MHz(Bruker Bio-Spin Corporation, Billerica, MA) 是由北京化工大学分析检测中心提供。

#### 1.1.3 制备型高效液相色谱系统

用于纯化花旗松素的制备型高效液相色谱系统包括一个流体处理单元即两个泵头(GE-200); 一个用来控制流动相配比、流速、排气过程、外部操作条件设定等的控制器; 一个带有预处理单元的 2487 型紫外双波长检测器(Waters, Milford, USA)、一个工作处理站(Waters, USA) 以及一个反相 C<sub>18</sub> 制备型柱子(19 × 300 mm, 7 μm, SymmetryPrep™)。

### 1.2 材料与试剂

落叶松锯末由生长在黑龙江省伊春市的落叶松树干部分粉碎得到; 花旗松素标准品(货号: T4512, 纯度: 94.3%), 购买自上海 Sigma-Aldrich 公司; 甲醇、乙醇、HCl 和 NaOH 均购自于北京化学试剂厂; 色谱甲醇和三氟乙酸购自美国 Dima 公司; AB-8 树脂购自天津南大树脂科技有限公司。

## 2 实验方法

### 2.1 样品溶液的制备

100 g 落叶松锯末用体积例为比 80% 的乙醇水溶液 80 °C 回流提取, 提取时间为 2 h, 提取 2 次, 提取的液固比(mL: g) 为 10: 1, 合并两次提取液旋蒸至剩下整体提取液的 1/100。加入去离子水 500 mL, 即一次提取所用的体积比例为 80% 乙醇水溶液体积的一半后, 进行第二轮回流提取。提取的时间依然为 2 h, 提取温度为 100 °C, 提取次数依然为 2 次。合并第二轮回流提取得到的两次提取液后, 抽滤即得到样品溶液。

### 2.2 分析型液相色谱检测

分析型高效液相色谱的流动相分别为色谱甲醇(A) 和 0.02% 三氟乙酸水溶液(B), 检测的样品为第二次回流后得到的样品溶液。紫外检测波长确定为 288 nm, 进样量 10 μL。等度洗脱的流动相中甲醇体积配比分别设置为 43%、39%、35%、31% 以及 27%。

### 2.3 AB-8 型大孔树脂实验

#### 2.3.1 AB-8 型大孔树脂静态吸附解吸试验

静态实验在水浴摇床中进行, 摇床转数为 120

rpm。每个锥形瓶中装入 50 mL 样品溶液和湿重为 2 g(干重约为 0.58 g)的 AB-8 大孔吸附树脂。静态吸附平衡时间是根据之前工作中提到的计算框架得到的<sup>[10]</sup>。在实际操作中,为了回避实验和模拟间的误差,真实的静态吸附操作时间大于计算得到的吸附平衡时间的 5%。达到平衡后,用抽滤漏斗分离 AB-8 树脂以及吸附后的溶液。用 50 mL 的去离子水冲洗吸附后的 AB-8 大孔树脂。随后将每组吸附后大孔树脂移入装有 50 mL 洗脱溶剂的锥形瓶中,在 25 °C 的水浴摇床中 180 rpm 解吸 4 h。而洗脱溶剂为含有不同体积配比的乙醇水溶液,洗脱溶剂的洗脱力变换是通过体积比为 5% 的乙醇实现的。分别在 25、35、45 °C 及 55 °C 下,控制上样液中花旗松素浓度分别为 0.45、0.50、0.55 mg/mL 及 0.60 mg/mL 形成 16 组摇床实验设计。并对应于这 16 组实验重复做 9 个批次,这些批次摇床实验达到平衡后,饱和吸附的 AB-8 大孔吸附树脂水洗后分别依次用体积比为 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45% 等 9 种洗脱剂分别进行静态洗脱实验。洗脱时间到达后取样测其洗脱液中花旗松素的浓度,40 °C 下旋干洗脱液,通过烘干后称重空锥型瓶和旋干后的锥形瓶重量差测得浸膏质量。公式(1)是用来计算加权后的洗脱量,公式(2)用来计算洗脱液中花旗松素的纯度,公式(3)用来具体折算花旗松素洗脱率。

$$D = \text{Weight} \times C_{\text{elution}} \times V; \text{Weight} = C_0 \quad (1)$$

$$P = \frac{C_{\text{elution}} \times V}{W_{\text{elution}}} \times 100\% \quad (2)$$

$$DY = \frac{D/\text{Weight}}{Q_e \times W_{\text{dryresins}}} \quad (3)$$

式中  $Q_e$  (mg/g) 为树脂在吸附平衡点的吸附能力,  $C_0$  (mg/mL) 和  $C_{\text{elution}}$  (mg/mL) 分别是静态吸附样本溶液中花旗松素的初始浓度和静态洗脱液中的花旗松素的浓度;  $V$  (mL) 是洗脱溶液体积;  $\text{Weight}$  是为了数据可视化表达鲜明所加的权重;  $W_{\text{elution}}$  (g) 是洗脱液旋干后的重量;  $D$  (mg) 是加权表达的洗脱量;  $P$  (%) 是静态洗脱液中花旗松素的纯度;  $W_{\text{dryresins}}$  (g) 是干的树脂的重量;  $DY$  (%) 是花旗松素的静态洗脱率。

### 2.3.2 AB-8 型大孔树脂动态吸附解吸实验

AB-8 型大孔树脂动态吸附解吸实验是在一个 10 mL 的玻璃层析柱 (20cm × 1cm, ID) 中进行的。样品通过蠕动泵注入到层析柱中。动态吸附试验

中,主要考虑了上样液中花旗松素的浓度  $C_0$  (mg/mL), 上样流速  $V_s$  (BV/h) 对吸附效果的影响。动态解吸实验主要考查了洗脱流速  $v_e$  (BV/h) 以及洗脱体积  $V_e$  (mL) 对该柱层析单元预纯化效果的影响。表 2 和表 3 中分别列出了具体关于动态吸附和解吸过程中操作条件。对应于 5% 穿透点处的花旗松素吸附量计算是根据以下公式(4)。

$$Q_b = \frac{C_0 \times V_s}{W_{\text{columnresin}}} \quad (4)$$

$Q_b$  (mg/g) 为动态吸附柱层析过程中达到 5% 穿透点的时候花旗松素的吸附量;  $V_s$  (mL) 是动态吸附过程中上样液的体积;  $W_{\text{columnresin}}$  (mg) 是大孔树脂柱中含有的树脂的干重; 在此的  $C_0$  (mg/mL) 为大孔树脂柱层析前上样液中花旗松素的浓度。在动态洗脱结果表达中,回收率和纯度是分别根据公式(5)和公式(6)进行统计。

$$R = \frac{C \times V_e}{C_0 \times V_s} \times 100\% \quad (5)$$

$$P = \frac{C \times V_e}{W_{\text{pre-pur}}} \times 100\% \quad (6)$$

$C$  (mg/mL) 为大孔树脂动态解吸洗脱液中花旗松素的浓度;  $V_e$  (mL) 为大孔树脂柱层析解吸液的全部体积;  $W_{\text{pre-pur}}$  (mg) 是大孔树脂动态解吸洗脱液旋干后浸膏的质量;  $P$  (%) 是动态洗脱液旋干后花旗松素的纯度;  $R$  (%) 为该预纯化单元动态解吸分离阶段的回收率。

### 2.4 制备色谱纯化花旗松素及鉴定

制备色谱的实验中,主要考虑了流速、上样浓度、样品收集时对应的时间范围这三方面因素。表 4 中列出了该纯化阶段所有考虑的操作条件。制备色谱操作条件为:检测波长依然是 288 nm; 流动相为色谱甲醇和超纯水; 在每次实验结束前设置一个色谱条件即在 2 min 内洗脱溶剂变换为纯色谱甲醇冲洗制备柱子 20 min。样品收集后在 40 °C 下旋转蒸发得到白色的花旗松素粉末并用分析型色谱检测其纯度。在该纯化步骤中花旗松素的回收率  $R$  (%) 及纯度  $P$  (%) 与大孔树脂柱层析阶段的计算思路一致。纯化后的花旗松素产品经核磁共振分析仪 (NMR) 进行表征。

## 3 结果与讨论

### 3.1 分析型色谱检测实验结果

当洗脱溶剂从 43% 变换到 27% 的时候,保留时

间分别为 12.0231、14.1542、21.9270、33.2473 min 及 49.2552 min; 分离度 ( $R_s$ ) 分别为 1.2011、1.4142、2.0721、2.9210 以及 4.6591。为保证花旗松素的分离度大于 1.5 的同时尽可能缩短检测时间, 建立了一个花旗松素的梯度洗脱检测方法: 0 ~ 14 min, 39% A; 14 ~ 19 min, 35% A; 19 ~ 31 min, 39% A。从图 2a 可见, 花旗松素实现了基线分离,

其分离度 ( $R_s$ ) 为 1.6312, 保留时间为 14.71 min。提取部分得到的花旗松素的纯度为 6.0%。对应于以上的几个等度洗脱条件, 保留因子 ( $k'$ ) 分别为 3.1231、4.3865、6.7881、10.5614 及 16.4135。制备型色谱单元中, 我们选择体积比为 35% 的甲醇水溶液为流动相是因为该条件对应的选择因子小于 10 并且分离度大于 2。

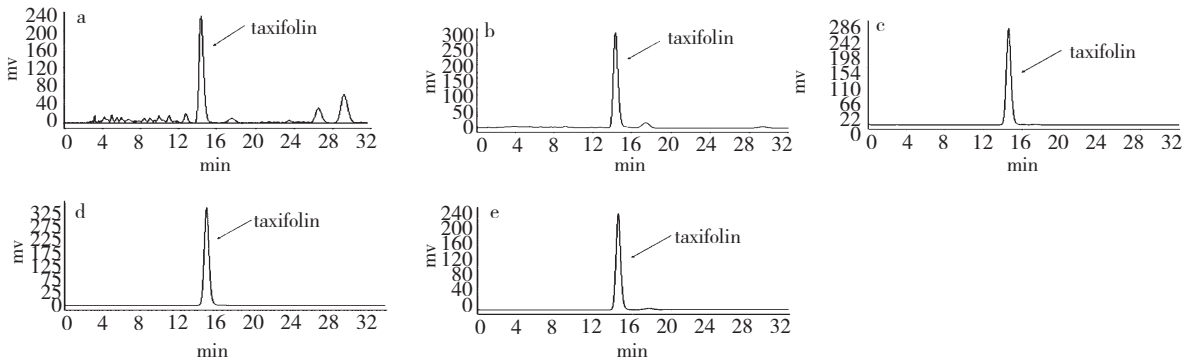


图 2 花旗松素提取液 (a)、AB-8 型大孔树脂柱层析预纯化后得到的样本溶液 (b)、制备色谱纯化后花旗松素产品 (c)、考虑了样品收集时间时纯化得到样品 (d) 及花旗松素标准品 (e) 的分析型 HPLC 色谱图

Fig. 2 The analytical HPLC chromatograms of taxifolin crude extract (a), sample separated by the column packed with AB-8 resins (b), sample purified by prep-HPLC (c), sample purified by prep-HPLC with restricted collection time period (d) and taxifolin standard (e)

### 3.2 AB-8 大孔吸附树脂实验结果

#### 3.2.1 AB-8 大孔吸附树脂静态吸附实验结果

根据表 1 中的结果可以发现, 在四个温度下, 吸附平衡时间  $t_e$  (min) 随着花旗松素在样品溶液中的初始浓度  $C_0$  (mg/mL) 的增大而增大。当浓度确定的时候, 该参数随着温度的升高而降低。在前两个温度下, 对比表 1 中的对应于相邻浓度下的吸附平衡时间, 可以发现在每个温度下当花旗松素在样品溶液中的初始浓度  $C_0$  (mg/mL) 从 0.45 mg/mL 到 0.50 mg/mL 变化时, 对应的吸附平衡时间变化是最大的, 分别为 21.24、7.92 min。温度为 45、55 °C 时, 当花旗松素在样品溶液中的初始浓度  $C_0$  (mg/mL) 从 0.50 mg/mL 到 0.55 mg/mL 变化时, 对应的吸附平衡时间变化是最大的, 分别为 8.72 min、5.18 min。这一数值现象再次体现的是温度升高缩短吸附平衡时间  $t_e$  (min)。当温度一定时, 随着花旗松素在样品溶液中的初始浓度  $C_0$  (mg/mL) 增大, 吸附平衡能力  $Q_e$  (mg/g) 越接近于最大吸附平衡力  $Q_{max}$  (mg/g), 剩余在吸附废液中的花旗松素的浓度  $C_R$  (mg/mL) 也会增大。根据摇床实验基本信息, 在筛选确定条件的时候有三方面因素需要考虑: 1、吸附

平衡速度快速到达; 2、平衡能力尽可能接近最大吸附能力; 3、花旗松素在吸附后的废液中含量尽可能低即节约分离成本。最后, 大孔树脂上样液的浓度初步推断为 0.50 mg/mL, 吸附温度为 25 °C。

#### 3.2.2 AB-8 大孔吸附树脂静态洗脱实验结果

静态洗脱实验是用来研究花旗松素洗脱液中乙醇的最佳体积配比。根据图 3 中的四个图片分别表达了加权后花旗松素洗脱量  $D$  (mg) 以及洗脱液中花旗松素的纯度  $P$  (%) 随洗脱液中乙醇体积比变化的规律, 可发现, 当静态吸附阶段的样品溶液中花旗松素的初始浓度  $C_0$  (mg/mL) 一定时, 不同温度下这个两个参数随洗脱液中乙醇的体积变化规律是分别相同的。温度一定时, 静态吸附阶段样品溶液中花旗松素的初始浓度  $C_0$  (mg/mL) 变化不影响这两个关键参数随着洗脱剂中乙醇的体积比的变化规律。在每条加权后的洗脱量随洗脱溶液中乙醇体积变化的曲线上, 体积比为 20% 这个数据算是一个拐点。图 3 中所有关于花旗松素纯度  $P$  (%) 随洗脱液中乙醇体积比例变化的曲线上均表明, 在所选择的静态洗脱剂中, 体积比例为 20% 乙醇水溶液能够最好地分离富集花旗松素。

表1 不同静态条件下平衡时间预测及其相关参数的计算

Table 1 The prediction of equilibrium time and the calculation of the relative parameters under different statistic conditions

实验组数 No.	温度 Temperature $T(^{\circ}C)$	花旗松素 初始浓度 Initial concentration of taxifolin $C_0$ (mg/mL)	花旗松素 剩余浓度 Residual concentration of taxifolin $C_R$ (mg/mL)	平衡吸附能力 Adsorption capacity at adsorption equilibrium point $Q_e$ (mg/g)	二级动力 学指数 Second-order rate index $k_2 Q_e$	内部质子扩散 模型初始吸 附因子 Initial adsorption factor of the intra- particle diffusion model $R_i$	吸附平衡时间 Adsorption equilibrium time $t_e$ (min)
1	25	0.45	0.09	31.37	0.3262	0.3908	36.15
2	25	0.50	0.13	32.04	0.2121	0.3795	57.39
3	25	0.55	0.17	32.53	0.1958	0.3685	64.18
4	25	0.60	0.22	32.77	0.1911	0.3653	66.40
5	35	0.45	0.1	30.11	0.3436	0.4042	33.10
6	35	0.50	0.15	30.48	0.2748	0.4074	41.02
7	35	0.55	0.19	30.79	0.248	0.3873	48.03
8	35	0.60	0.24	31.05	0.2462	0.3803	49.34
9	45	0.45	0.14	26.84	0.4492	0.3826	26.87
10	45	0.50	0.18	27.59	0.3869	0.3782	31.58
11	45	0.55	0.22	28.22	0.3084	0.3723	40.30
12	45	0.60	0.27	28.75	0.2835	0.3768	43.28
13	55	0.45	0.16	24.68	0.4665	0.376	26.36
14	55	0.50	0.2	25.53	0.5036	0.3345	27.70
15	55	0.55	0.25	26.26	0.4091	0.346	32.88
16	55	0.60	0.28	26.88	0.3578	0.3595	36.08

### 3.2.3 AB-8 大孔吸附树脂动态实验结果

通过 AB-8 大孔树脂的动态实验结果,进一步确定最佳上样浓度、流速、上样体积、洗脱剂是否合适。结果如表 2 所示,上样液中花旗松素的浓度为 0.45~0.60 mg/mL 时,上样流速为 5 BV/h 时不易于保证流动状态下的上样液中花旗松素有效吸附在 AB-8 大孔树脂层析柱中。上样流速为 3 和 4 BV/h 时,到达 5% 穿透点时候的吸附量  $Q_b$  (mg/g)、上样时间以及动态相对饱和和吸附程  $Q_b/Q_e$  三个指标作为选择动态吸附过程操作条件的基本参考。表 2 中,第 1、2、5、6 组实验条件下动态相对饱和和吸附能力  $Q_b/Q_e$  大于 90%,并且到达 5% 穿透点时候的吸附量  $Q_b$  (mg/g) 大于 28.50 mg/mL。分析这四组数据后,可发现相比于 5、6 两组数据,第 1、2 两组上样时间偏长。对比第 5、6 两组数据,第 6 组操作条件下操作时间较短且到达 5% 穿透点时候的吸附量  $Q_b$  (mg/g) 较大。表 2 可得出上样液中花旗松素浓度设为 0.50 mg/mL 较为合适,上样速度为 4 BV/h 易

于节约操作时间。

在动态洗脱实验中,洗脱流速及其对应的动态吸附条件是主要考虑的因素。表 3 中列出了所有需讨论的操作条件,花旗松素的纯度  $P(\%)$  以及其在动态吸附分离过程的回收率  $R(\%)$  作为筛选最佳洗脱条件的标准。第 5 组条件既满足了花旗松素的动态过程回收率大于 87% 也使得纯度在所选的条件下最佳。表 3 中的前 3 组操作条件说明了当动态吸附变化的时候,洗脱结果会略有不同。第 5 组操作条件获得的花旗松素的富集物的纯度高于第 4 组条件下获得的花旗松素纯度 3 个百分点。体现的是第 5 组操作条件中的动态吸附条件更为合适。图 2b 即为该条件下获得的分析型高效液相色谱图。对比图 2a 与图 2b 明显地发现了位于图 2a 中的最后两个色谱峰被明显地分离出去即留在树脂柱上。表 3 中后 6 组实验结果整体说明,当洗脱流速加快的时候,即使花旗松素的回收率保持相同,花旗松素富集物的纯度会随着流速的加大受到较大的影响。

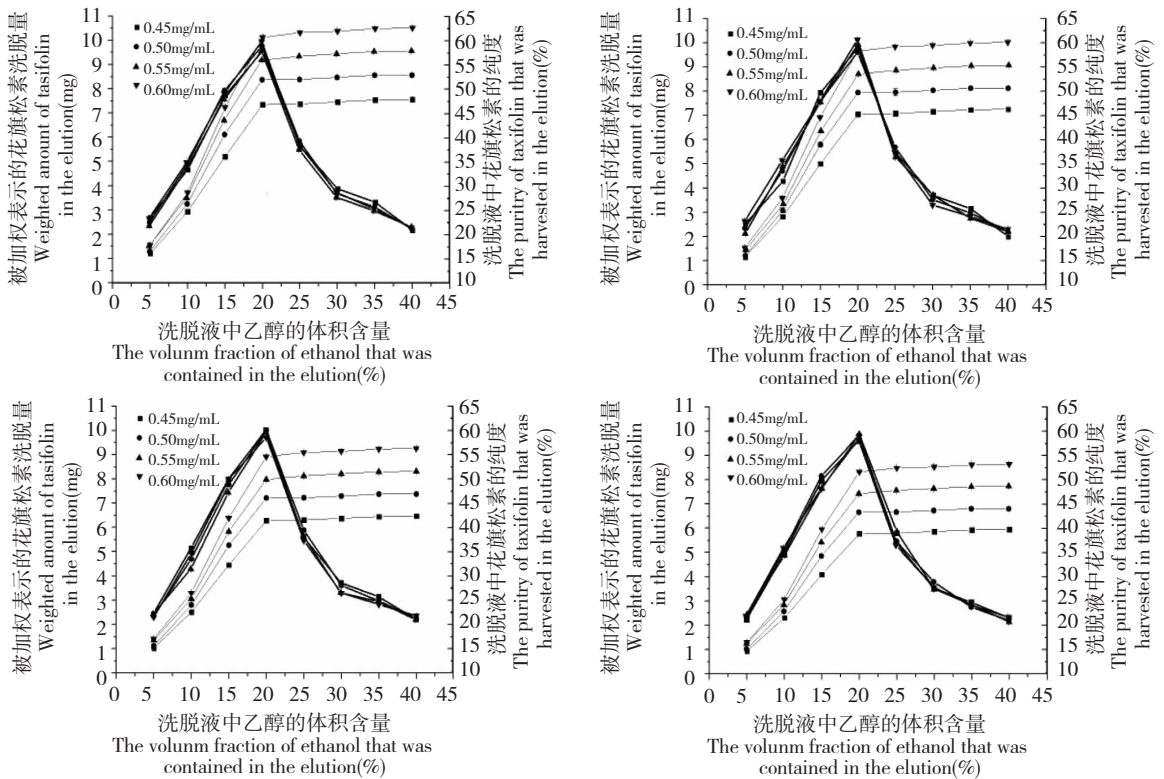


图3 25 °C (a)、35 °C (b)、45 °C (c)、55 °C (d) 操作条件下静态洗脱实验结果

Fig. 3 Experimental results regarding the static elution under 25 °C (a), 35 °C (b), 45 °C (c) and 55 °C (d)

表2 不同操作条件下动态吸附结果

Table 2 The adsorption results of the dynamic process under the different operating conditions

实验组数 No.	上样浓度 $C_0$ (mg/mL)	上样流速 $v_s$ (BV/h)	上样液体积 $V_s$ (mL)	上样时间 Loading time (h)	在5%穿透点处花旗松素的吸附量 $Q_b$ (mg/g)	相对吸附能力 $Q_b/Q_c$
1	0.45	3	186	6.2	28.78	0.9173
2	0.5	3	170	5.67	29.18	0.9106
3	0.55	3	151	5.03	28.57	0.8782
4	0.6	3	135	4.5	27.74	0.8464
5	0.45	4	185	4.63	28.63	0.9125
6	0.5	4	169	4.23	29.04	0.9063
7	0.55	4	145	3.63	27.36	0.8412
8	0.6	4	124	3.1	25.62	0.7819
9	0.45	5	181	3.62	28.05	0.8848
10	0.5	5	151	3.02	26.04	0.8127
11	0.55	5	125	2.5	23.54	0.7235
12	0.6	5	99	1.98	20.34	0.6206

表3中所有的操作条件下,花旗松素的动态回收率均能达到87%即接近我们在静态洗脱现象研究中所获得的静态洗脱效果。树脂预纯化目的就是最大

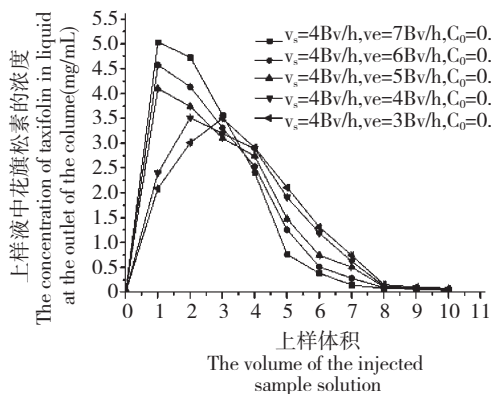
回收率富集花旗松素。由此,从数值上说明了体积比20%乙醇水溶液被证明合适于直接用作动态洗脱溶剂。这一结果与静态试验得到的推断一致。

表 3 不同操作条件下动态解吸结果

Table 3 The desorption results of dynamic process under different operating conditions

实验组数 No.	上样浓度 $C_0$ (mg/mL)	上样流速 $v_s$ (BV/h)	洗脱流速 $v_e$ (BV/h)	洗脱体积 $V_e$ (BV)	回收率 $R$ (%)	产品纯度 $P$ (%)
1	0.45	3	3	9	87.03	54.56
2	0.5	3	3	8	88.01	56.02
3	0.55	3	3	8	87.35	55.23
4	0.45	4	3	8	87.43	53.87
5	0.5	4	3	8	88.71	56.75
6	0.5	4	4	8	88.23	52.32
7	0.5	4	5	8	88.7	51.47
8	0.5	4	6	8	87.31	49.23
9	0.5	4	7	7	88.23	46.23

由图 4 可见,洗脱速度慢会使花旗松素的洗脱曲线变得较为衰弱,这一现象具有色谱洗脱的特征。当吸附方式变化的时候,洗脱曲线的变化幅度不大,但是整体构型有变化,从色谱角度解释,可以被理解为不同上样方式会导致吸附过程中花旗松素在流过



的 AB-8 的树脂床层中传质速度饱和位置不同。最后,花旗松素在 AB-8 大孔树脂填充柱上所有动态吸附解吸实验结果再次证明了通过摇床实验部分所获得的指导信息是可靠的,对设计 AB-8 大孔树脂分离花旗松素这个过程有预测作用。

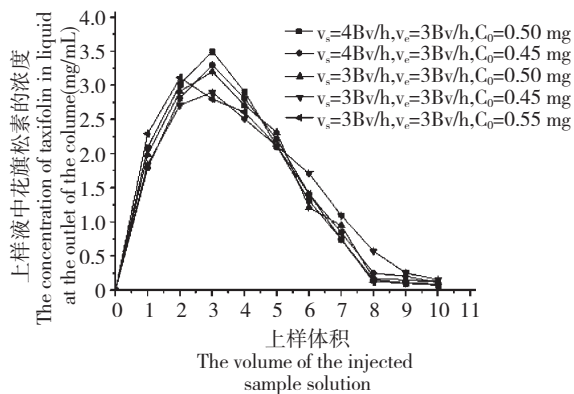


图 4 不同操作条件下花旗松素在 AB-8 大孔树脂柱中的动态洗脱曲线

Fig. 4 Dynamic desorption curves of taxifolin on the column packed with AB-8 resin under the different operating conditions

### 3.3 制备色谱纯化实验结果及花旗松素的鉴定结果

根据表 3 中第 5 组操作条件得到的 AB-8 大孔树脂柱层析得到含有花旗松素富集物溶于体积比 35% 色谱甲醇水溶液得到预纯化产品。制备色谱洗脱过程中的流速以及制备色谱样品收集时间对最后花旗松素产品纯度,回收率两方面因素的影响结果列在表 4 中。对于获得大于纯度为 94.30% 的花旗松素产品来说,前 7 组实验条件中第 3 组操作条件较为合适即花旗松素的上样量为 40 mg,制备色谱

的流速为 8 mL/min。

图 5 为第 3 组实验条件下获得的制备色谱图。表 4 中的后 3 组实验用来和第 3 组实验共同表明了样品收集时间确实对花旗松素纯度有一定的影响。两组实验条件下纯化花旗松素,最后得到的花旗松素产品纯度能够达到 98% 以上。当以制备高于标准品纯度的花旗松素为目标时,第三组实验条件是最佳的,对应的注入样品溶液中含有的花旗松素为 40 mg。仅以 98% 纯度的花旗松素作为最后的纯化目标,表 4 中第 9 组操作条件是最佳的。表 4 中的

表 4 不同操作条件下得到的制备纯化结果

Table 4 Purification results obtained from the preparative HPLC under the different operating conditions

实验组数 No.	上样量 Loading amount (mg)	上样流速 Injecting velocity (mL/min)	峰中心切割 对应保留时间 Retention time corresponding to the middle of the peak (min)	收集样品时间 Time range used for collecting the purified taxifolin (min)	纯化过程回收率 Recovery (%)	产品纯度 Purity (%)
1	10	8	36.03	32.05 ~ 40.01	88.31	96.12
2	20	8	36.52	32.30 ~ 40.74	90.21	95.97
3	40	8	37	32.50 ~ 41.50	91.26	95.02
4	60	8	38.8	33.26 ~ 44.34	92.73	92.01
5	40	7	43.66	39.03 ~ 48.29	88.42	94.31
6	40	9	36.52	32.75 ~ 40.29	91.37	93.99
7	40	10	33.02	30.01 ~ 36.03	92.34	93.61
8	40	8	37	32.50 ~ 41.00	85.23	95.72
9	40	8	37	33.00 ~ 40.50	80.23	98.02
10	40	8	37	33.50 ~ 40.00	65.32	98.21

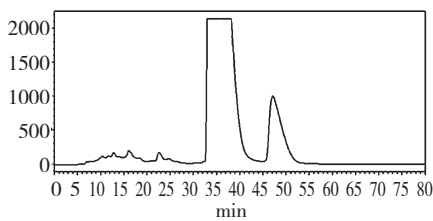


图 5 最适操作条件下花旗松素的制备色谱图(最适操作条件:表 4 第三组操作条件)

Fig. 5 Preparative HPLC chromatogram regarding taxifolin under the most appropriate operating conditions(The most appropriate operating conditions: The third group in Table 4)

第 3 组实验条件下的得到的花旗松素产品和第 9 组实验条件下得到花旗松素产品都旋转蒸发溶剂后,这两组实验条件下得到的产品经分析型色谱检测的图分别列在图 2c 和图 2d 中。同时,在图 2e 中我们也列出来了花旗松素标准品对应的分析型液相色谱图。

柱层析工艺到此为止,花旗松素纯度从最初的 6.0% 经 AB-8 大孔树脂的预纯化分离达到 56.75% 同时尽可能保证最高回收率的情况下再经制备色谱的纯化最后能够达到 95.02%,若考虑样品收集时间能够使其纯度达到 98% 以上。核磁表征是在以表 4 中第 3 组实验条件下得到的花旗松素做样品的情况下实施的。核磁数据为  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400

MHz)  $\delta$ : 5.01 (1H, d,  $J = 11.4\text{Hz}$ , H-2), 5.97 (1H, s, H-6), 6.01 (1H, s, H-8), 6.89 (1H, d,  $J = 8.0\text{Hz}$ , H-5'), 6.94 (1H, d,  $J = 7.5\text{Hz}$ , H-6'), 7.05 (1H, s, H-2')。  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz)  $\delta$ : 198.3 (C-4), 168.9 (C-7), 165.3 (C-5), 164.5 (C-9), 147.1 (C-3'), 145.6 (C-4'), 129.9 (C-1'), 120.9 (C-6'), 116.1 (C-2'), 115.9 (C-5'), 101.8 (C-10), 97.4 (C-6), 96.3 (C-8), 85.1 (C-2), 73.7 (C-3)。

## 4 讨论与结论

本研究基于柱层析的特征,设计了一个工艺过程从兴安落叶松锯末中分离纯化花旗松素。吸附平衡时间预测框架被引用来计算不同静态吸附条件下吸附平衡时间,进而,通过平衡时间的数值趋势初步判定 AB-8 大孔吸附树脂动态柱层析的最佳上样浓度。通过变换静态吸附条件我们判断了静态洗脱实验中相对稳定的洗脱剂。花旗松素在 AB-8 大孔树脂填充柱上的动态吸附解吸实验用来验证之前静态预测结果的正确性。两条思路结果吻合,说明了所确定的 AB-8 大孔树脂柱层析分离兴安落叶松锯末提取液中的花旗松素的最佳操作条件是合适的。在该操作条件下花旗松素的纯度从最初的 6.0% 提高到了 56.78%,同时该分离单元的回收率为 88.71%。制备色谱技术作为第二个柱层析单元耦合在 AB-8 大孔树脂柱层析后纯化花旗松素。而制



备色谱操作条件中最佳洗脱溶剂筛选是根据分析型液相色谱等度洗脱分离参数判断得到的,该步骤体现了色谱柱层析放大的规律性。两种柱层析单元联用后,在考虑制备色谱单元花旗松素的上样量尽可能大并且该单元花旗松素的回收率大于90%的条件下,花旗松素纯度可达到95.02%。若同时考虑制备色谱峰切割收集,最终花旗松素纯度可以达到98%以上。核磁分析证明了制备化合物的正确性。整个工艺的最优化效果是通过设计思想体现出来,工艺的价值在于最大化实现了落叶松资源的综合利用。

#### 参考文献

- Sun YJ, Zhan J, Han AH, *et al.* Biomass and carbon pool of *Larix gmelini* young and middle age forest in Xingan Mountains Inner Mongolia. *Acta Ecol Sin*(生态学报), 2007, 27:1756-1762.
- Cui XX(崔晓霞), Zhang XL(张小丽), Luo SQ(罗书勤), *et al.* Study on extraction technique of proanthocyanidins from larch bark. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24:127-130.
- Landolfi R, Mower RL, Steiner M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflaonoids: Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol*, 1984, 33: 1525-1530.
- Tzeng SH, Ko WC, Ko FN, *et al.* Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb Res*, 1991, 64:91-100.
- Shikov AN, Pozharitskaya ON, Miroshnyk I, *et al.* Nanodispersions of taxifolin: Impact of solid-state properties on dissolution behavior. *Int J Pharm*, 2009, 377: 148-152.
- Prommuak C, De-Eknamkul W, Shotipruk A. Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts. *Sep Purif Technol*, 2008, 62: 444-448.
- Huang W, Xue A, Niu H, *et al.* Optimised ultrasonic assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems *in vitro*. *Food Chem*, 2009, 114:1147-1154.
- Wang Y, Zu YG, Long JJ, *et al.* Enzymatic water extraction of taxifolin from wood sawdust of *Larix gmelini* (Rupr.) Rupr. and evaluation of its antioxidant activity. *Food Chem*, 2011, 126:1178-1185.
- Tsyurupa MP, Malsova LA, Andreeva AI, *et al.* Behavior of organic polymers in drinking water purification. *Reac Polym*, 1995, 25:69-78.
- Liu TT, Yang M, Wang TX, *et al.* A prediction strategy of adsorption equilibrium time based on equilibrium and kinetic results to isolate taxifolin. *Ind Eng Chem Res*, 2012, 51:454-463.
- Sticher Otto. Natural product isolation. *Nat Prod Rep*, 2008, 25:517-554.
- Jiang WW(姜巍巍). Effects of transglutaminase on surface hydrophobicity and viscosity of soy protein. Harbin: North-east Agricultural University(东北农业大学), MSc. 2009.
- Liu J(刘娟). Study of casein-dextran conjugate modification. Wuxi: Jiangnan University(江南大学), MSc. 2008.
- Sun P(孙鹏), Cheng JJ(程建军), Zheng CX(郑存汐), *et al.* Effect of drying methods on properties of different degree of soybean protein isolate-maltodextrin grafted polymers. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2012, 33:157-160.
- Church FC, Swaisgood HE, Porter DH, *et al.* Spectrophotometric assay using ophthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J Dairy Sci*. 1983, 66:1219-1227.
- Zhang JC(张佳婵), Li XP(李小鹏), Li HY(李赫宇). Optimization of extrusion-assisted extraction of protein from oat bran using response surface methodology. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2012, 33(12):11-15.
- Saleem MM, Somá A. Design of experiments based factorial design and response surface methodology for MEMS optimization. *Microsyst Technol*, 2015, 21:263-276.
- Xu F(许凤), Wang CY(王长远). Optimization of physical force-assisted alkaline extraction of rice bran protein. *Food Sci*(食品科学), 2014, 35(20):11-16.
- He W(何为), Xue WD(薛卫东), Tang B(唐斌). Optimize Experimental Design and Data Analysis. Beijing: Chemical Industry Press, 2012. 306-313.
- Zhang B(章宝), Shan Y(单杨), Li GY(李高阳). Optimization of processing parameters for extraction of peanut protein isolate by response surface methodology. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2012, 270-274.

(上接第 1127 页)