

· 技术与方法 ·

树脂吸附法纯化橙皮中橙皮苷的工艺研究*

陈竹¹, 张保顺², 叶小利³, 孙胜亮³, 李学刚^{2,Δ}

(1. 重庆医药高等专科学校药理学系 400030; 2. 西南大学药学院, 重庆 400716;

3. 西南大学生命科学学院, 重庆 400716)

摘要:目的 研究大孔树脂吸附法分离纯化橙皮中橙皮苷的最佳工艺条件, 通过熔点、橙皮苷的薄层(TLC)、UV 及 IR 图谱进行结构表征。方法 以橙皮苷的纯度为指标, 比较 HPD826、HPD417、AB-8、HPD722 及 HPD600 大孔树脂对橙皮苷的吸附和解吸附性能。结果 AB-8 大孔树脂对橙皮苷的吸附和解吸附性能较好, 吸附量为 0.37 mg/g, 吸附率为 86.2%; 10% 的乙醇碱溶液(V/V)洗脱, 解吸率为 72.7%。结论 橙皮苷的最佳纯化工艺是选用 AB-8 大孔树脂吸附, pH12 的 10% 乙醇碱溶液(V/V)洗脱, 所得产物纯度达 91.5%, 同时图谱确证了橙皮苷的结构。

关键词:橙皮苷; 大孔树脂; 橙皮; 纯化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.15.018

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)15-1502-03

Purification of hesperidin from *Pericarpium citri reticulatae* with macroporous resin*Chen Zhu¹, Zhang Baoshun², Ye Xiaoli³, Sun Shengliang³, Li Xuegang^{2,Δ}

(1. Department of Pharmacy, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 400030, China;

2. College of Pharmaceutical Science, Southwest University, Chongqing 400716, China;

3. College of Life Science, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Objective To study the optimally purified process of hesperidin extracted from *Pericarpium citri reticulatae* with macroporous resin and to confirm the structure of hesperidin by melting point(M. P.), TLC, UV and IR spectra data. **Methods** For the purity of hesperidin as a main objective, the adsorption and desorption characters of HPD826, HPD417, AB-8, HPD722 and HPD600 macroporous resins were compared. **Results** AB-8 had the best adsorptive property and desorption, the adsorptive content of AB-8 was 0.37 mg/g. The adsorptive and desorptive rates were 86.2% and 72.7%, respectively. The eluted solution was 10% alcoholic and alkaline water solution(pH 12, V/V). **Conclusion** The optimally purified process of hesperidin is using AB-8 macroporous resin, 10% alcoholic and alkaline water solution(pH 12, V/V) as eluant, the purity of hesperidin 91.5%, the spectra data had confirm the structure of hesperidin.

Key words: hesperidin; microporous resin; *Pericarpium citri reticulatae*; purification

橙皮苷, 又名陈皮苷、橘皮苷, 是一种黄烷酮的糖苷, 存在于芸香科柑橘类植物中, 具有抗菌^[1]、消炎^[2]、抗癌^[3]、抗氧化^[4]、促进胃肠动力^[5]、镇定^[6]及防治心血管疾病^[7]等作用, 广泛用于医疗保健、功能食品、食品添加剂及化妆品等领域。目前橙皮苷主要提取自芸香科植物, 其提取分离方法有热提法^[8]、醇提酸析法^[9]、超临界 CO₂ 萃取法^[10]等。热提取法产物杂质多, 纯度低; 醇提酸析法操作复杂, 周期长, 成本较高, 提取率低; 超临界 CO₂ 萃取法生产成本低, 不利于工业化生产; 而树脂吸附法利用混合物中各组分物理化学性质的差异, 使各组分彼此分开^[11], 具有工艺操作简单、成本低、树脂可再生反复使用等优点。因此, 采用大孔树脂吸附法优化橙皮苷最佳的分离纯化工艺, 对实现橙皮苷工业化生产具有重要的意义。

1 材料与方 法

1.1 材料 RE-52 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), UV-1800 型紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司), FA1140 电子天平(上海天平仪器厂), DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(重庆高教玻璃仪器厂), 红外光谱仪(美国 Perkin Elmer 公司), DGX-9143 烘箱(上海福玛实验设备有限公司), ZN-200A 粉碎机(长沙市中南制药机械有限公司), GL-

312B 手提式紫外反射仪(江苏海门麒麟医用仪器厂), 差示扫描量热仪(德国 Netzsch 公司)。

橙皮苷标准品由西南大学药学院药用资源化学研究所自制; 橙皮购自药店, 大孔树脂 AB-8、HPD417、HPD600、HPD722、HPD826 购自沧州宝恩化工有限公司; 氢氧化钠、氢氧化钙、盐酸、乙醇、甲醇、氯仿等常规试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 橙皮苷紫外检测波长的确定 称取橙皮苷标准品 1 mg 于 10 mL 容量瓶中, 用 0.01 mol/L NaOH 溶液定容, 配制 0.1 mg/mL 的橙皮苷溶液。200~500 nm 紫外扫描, 橙皮苷的最大吸收波长为 286 nm 和 330 nm, 见图 1。因 330 nm 处, 样品中存在的杂质有干扰, 故实验中测定橙皮苷含量时选择 286 nm 处为检测波长。

1.2.2 橙皮苷标准曲线的绘制 精密称取 1 mg 橙皮苷标准品, 置于 10 mL 容量瓶中, 0.01 mol/L 的 NaOH 溶液稀释至刻度, 得 100 μg/mL 的标准品贮备液, 吸取贮备液 1、2、3、4、5 mL 分别置于 10 mL 容量瓶中, 0.01 mol/L NaOH 溶液稀释至刻度, 得 10、20、30、40、50 μg/mL 的橙皮苷标准品溶液, 置紫外分光光度计 286 nm 处分别测其吸光度, 绘制标准曲线: A =

* 基金项目: 重庆市医学科研计划项目(2009-2-140); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(XDJK2009C087)。 Δ 通讯作者:

0.021C + 0.066, $r^2 = 0.993$ ($n = 5$), 在 10~50 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 橙皮苷浓度与吸光度呈现良好的线性关系, 见图 2。

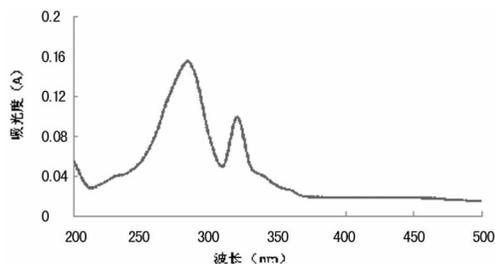


图 1 橙皮苷标准品最大吸收波长

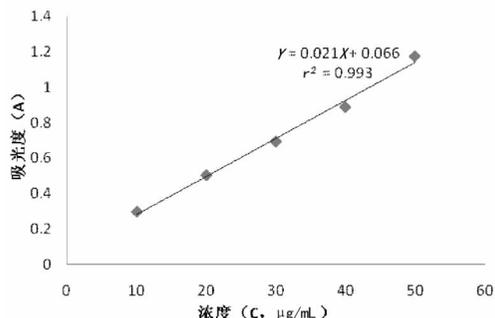


图 2 橙皮苷标准曲线的绘制

1.2.3 样品液的制备及测定 称取 200 g 橙皮, 粉碎成粗粉, 加水 2 L 和饱和石灰水 400 mL, 搅匀, 用 25% 的 NaOH 溶液调节 pH 12~13, 浸泡过夜, 压榨过滤, 所得滤液用盐酸调节 pH 4~5, 60 °C 保温 30 min, 抽滤, 所得沉淀依次用适量氯仿、乙醇、蒸馏水洗涤, 甲醇重结晶 3 次, 60 °C 真空干燥。将所得橙皮苷粗品碾磨成细粉, 准确称取 0.4 g 置于 10 mL 容量瓶中, 0.01 mol/L 的 NaOH 溶液稀释至刻度, 0.01 mol/L 的 NaOH 溶液为对照, 置紫外分光光度计 286 nm 处分别测其吸光度, 代入标准曲线方程计算即可得到样品液的橙皮苷含量。

1.2.4 大孔树脂的预处理^[12] 称取 HPD826、HPD417、AB-8、HPD722、HPD600 各 10 g, 分别用 2 mol/L 的 NaOH 和 2 mol/L 的 HCl 交替反复振荡浸洗各 3 次, 每次 1 h, 酸、碱交替时, 蒸馏水冲洗至中性, 然后以 95% 的乙醇为溶剂振荡浸洗 1 h, 蒸馏水洗至中性, 抽滤至干, 在真空干燥箱中烘干备用。

1.2.5 橙皮苷吸附量及吸附率的测定 称取经预处理的 5 种树脂各 3 g, 分别置于 100 mL 具塞磨口三角瓶中, 将 1.2.3 的样品液, 分别等量加至装有不同树脂的三角瓶中各 50 mL, 置电动振荡仪上振荡 (25 °C, 每分钟 100 次) 24 h, 过滤, 定容, 测定滤液中橙皮苷的浓度, 按下式计算各树脂室温下对橙皮苷的吸附量及吸附率:

$$Q = (C_0 - C_r) \times V / m; D\% = (C_0 - C_r) / C_0 \times 100\%;$$

(式中: Q——吸附量, mg/g; C_0 ——初始浓度, mg/mL; C_r ——剩余浓度, mg/mL; V——溶液体积, mL; m——树脂质量, g; D——吸附率, %)。

1.2.6 橙皮苷解吸率的测定 将按 1.2.5 的方法充分吸附后的树脂, 装入三角瓶中, 精确加入 10% 的乙醇碱性 (0.01 mol/L NaOH) 溶液 50 mL, 置电动振荡仪上振荡 (25 °C, 每分钟 100 次) 24 h 以上, 充分解吸后, 过滤, 定容后测定解吸液中橙皮苷的浓度, 按下式计算其解吸率: $E\% = C_1 \times V / Q_1 \times 100\%$; 式中: C_1 ——解吸液浓度, mg/mL; V——解吸液体积, mL;

Q_1 ——3 g 大孔树脂吸附量, mg; E——解吸率, %。

1.2.7 洗脱溶剂的确定 选用 AB-8 型大孔树脂装柱约 40 mL, 1.2.3 中的样品液上柱 100 mL, 100 mL 纯水分 2 次洗脱, 分别收集洗脱液; 10%、20%、30% 的乙醇碱性 (0.01 mol/L NaOH 溶液) 溶液各 100 mL 依次洗脱, 每种浓度的洗脱液分 2 次洗脱, 分别收集洗脱液, 测定各容量瓶中橙皮苷含量, 以容量瓶编号为横坐标, 橙皮苷含量为纵坐标, 绘制洗脱曲线, 见图 3。

2 结 果

2.1 不同大孔树脂对橙皮苷吸附与解吸作用 不同树脂对橙皮苷的吸附量、吸附率及解析率见表 1。从表 1 可见, AB-8 不仅对橙皮苷的吸附量大, 且解吸率高, 所以选用 AB-8 对橙皮苷进行分离纯化。

表 1 不同大孔树脂对橙皮苷的吸附量、吸附率及解吸率

大孔树脂型号	吸附量(mg/g)	吸附率(%)	解吸率(%)
AB-8	0.37	86.2	72.7
HPD417	0.23	53.5	6.7
HPD600	0.25	57.7	5.3
HPD722	0.37	85.4	68.4
HPD826	0.26	60.0	10.9

2.2 pH 对橙皮苷解吸率的影响 pH 对橙皮苷的解吸率有显著影响, pH 为 12 时橙皮苷的解吸率较高, 达 86.2%; 解吸率为 82.4%; pH 为 10 时次之, pH 为 8 时最低, 仅有 60%。这可能与橙皮苷上的酚羟基有关, 使得橙皮苷易溶于碱性而被洗脱下来。

2.4 橙皮苷熔点图 通过差示扫描量热仪, 利用热分析法测得橙皮苷的熔点为 262.4 °C (文献[13]值为 261~262 °C)。

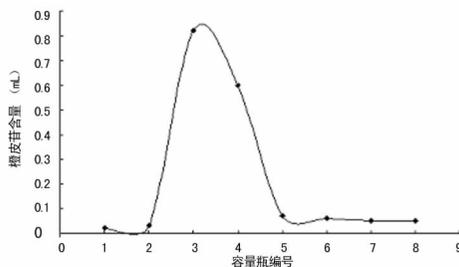


图 3 不同体积分数的乙醇碱溶液对橙皮苷的洗脱作用

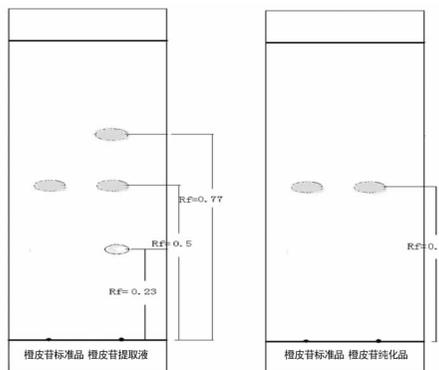


图 4 橙皮苷标准品、提取的原料液、纯化品的薄层图谱

2.3 不同洗脱剂对橙皮苷洗脱作用的影响 从图 3 可见, 橙皮苷含量主要集中在 10% 的乙醇碱溶液中, 随着乙醇体积分

数的增加,橙皮苷含量降低。由于橙皮苷不溶于水,可用纯水洗去可溶性糖、蛋白质等,再用 10% 的乙醇碱性洗脱。

2.5 橙皮苷的薄层(TLC)图谱 将橙皮苷的纯化品用展开剂(甲醇:氯仿=1:1,V/V)进行薄层色谱检测,橙皮苷的 R_f 值为 0.5,与其标准品 R_f 值一致。而橙皮苷提取液中, R_f 为 0.23 和 0.77 处有两个杂质点出现,见图 4。

2.6 橙皮苷纯化品与标准品的红外(IR)图谱 橙皮苷纯化品与标准品红外(IR)图谱通过溴化钾压片法测得,纯化后得到的橙皮苷样品与标准品红外图谱基本一致。IR(KBr, $\nu_{\max} \text{cm}^{-1}$):羟基的伸缩振动位于 $3\ 650 \sim 3\ 200 \text{ cm}^{-1}$ 范围^[14], $3\ 413(\text{OH})$;C-H 伸缩振动吸收出现在 $3\ 300 \sim 2\ 700 \text{ cm}^{-1}$ 范围,饱和和(除三元环以外)C-H 的伸缩振动吸收低于 $3\ 000 \text{ cm}^{-1}$, $2\ 980(\text{CH}_3 \text{ 饱和})$, $2\ 917(\text{CH}_2 \text{ 饱和})$;羰基吸收集中于 $1\ 900 \sim 1\ 650 \text{ cm}^{-1}$, $1\ 648(\text{C}=\text{O})$;苯环的骨架振动 $1\ 650 \sim 1\ 450 \text{ cm}^{-1}$, $1\ 606$, $1\ 519$, $1\ 468$, $1\ 445 \text{ cm}^{-1}(\text{Ar})$;醚的特征吸收为 C-O-C 伸缩振动出现在 $1\ 275 \sim 1\ 060 \text{ cm}^{-1}$, $1\ 276 \sim 1\ 068 \text{ cm}^{-1}(\text{C-O-C})$ 。

3 讨 论

现阶段工业化提取橙皮苷的方法主要以热提取法、醇提取法为主,存在周期长、成本高、能耗高、纯度低等缺陷。本研究表明,树脂吸附法是一种高纯度、低能耗、简便可行的橙皮苷纯化工艺路线,其中 AB-8 大孔树脂对橙皮苷的吸附率和解析率较高,吸附率为 86.2%,用 10% 的乙醇碱溶液(V/V)洗脱,解析率为 72.7%,所制得的橙皮苷纯度为 91.5%,同时,经熔点, TLC, UV, IR 图谱进行结构表征。本文所得橙皮苷熔点为 $262.4 \text{ }^\circ\text{C}$,与 Thomas 和 Wingard^[13] 报道的 $261 \sim 262 \text{ }^\circ\text{C}$ 基本一致。橙皮苷纯化品与标准品结构基本相同。因此,采用 AB-8 大孔树脂吸附法从橙皮中分离纯化橙皮苷,工艺简单可行,有利于橙皮苷的工业化生产。

参考文献:

[1] Bae EA, Han MJ, Lee M, et al. In vitro inhibitory effect of some flavonoids on rotavirus infectivity[J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23: 1122-1124.
 [2] Yeh CC, Kao SJ, Lin CC, et al. The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin in vivo and in vitro[J]. Life Sci, 2007, 80: 1821-1831.

[3] Shen SC, Ko CH, Tseng SW, et al. Structurally related anti-tumor effects of flavanones in vitro and in vivo: involvement of caspase 3 activation, p21 gene expression, and reactive oxygen species production[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2004, 197: 84-95.
 [4] Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, et al. Effect of hesperidin and naringin on the plasma lipid profile and plasma antioxidant activity in rats fed a cholesterol-containing diet[J]. J Sci Food Agric, 2007, 87: 1257-1262.
 [5] 叶文才, 王广基, 唐春山, 等. 橙皮苷和柚皮苷的制药用途[P]. 中国, 200410042658. 5. 2005-12-07.
 [6] Garg A, Garg S, Zanereld LJD, et al. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin[J]. Phytother Res, 2001, 15(8): 655-669.
 [7] 欧仕益. 桔皮苷的药理作用[J]. 中药材, 2002, 25(7): 531-533.
 [8] 李行利, 郭秋月. 陈皮提取工艺研究[J]. 中成药, 1997, 19(1): 6-8.
 [9] 梁开玉, 罗启波, 喻梅. 从陈皮中提取橙皮苷工艺研究[J]. 重庆工商大学学报: 自然科学版, 2004, 21(1): 19-22.
 [10] 朱思明, 于淑娟, 杨连生. 功能性橙皮苷的提取与化学改性研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2005(4): 1-4.
 [11] 张保顺, 李学刚, 叶小利, 等. 采用树脂吸附法纯化何首乌二苯乙烯苷的工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(6): 140-142.
 [12] 中国医学科学院药物研究所植化室. 大孔吸附树脂在中草药化学成分提取分离中的应用[J]. 中草药, 1999, 19(1): 40.
 [13] Thomas SC, Wingard RE. An improved conversion of hesperidin into hesperetin including purity determination by gradient-elution, high-pressure liquid chromatography[J]. J Agric Food Chem, 1978, 26: 278-280.
 [14] 邓芹英, 刘岚, 邓慧敏. 波谱分析教程[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2003: 45-75.

(收稿日期: 2010-10-09 修回日期: 2010-12-29)

(上接第 1501 页)

校人群糖尿病及相关因素调查[J]. 重庆医学, 2009, 38(11): 1281.
 [13] 庞星火, 焦淑芳, 黄磊, 等. 北京市居民营养与健康状况调查结果[J]. 中华预防医学杂志, 2005, 39(4): 269-272.
 [14] 胡蓉, 黄晓波, 罗开良, 等. 2005 年重庆市城乡高血压流行病学调查及相关因素分析[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(4): 1121-1123.
 [15] 吴维群, 李锐, 卢伟. 上海市城乡社区居民高血压患病情况调查[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(7): 858-859.
 [16] 殷晓梅, 徐斐, 赵力, 等. 南京市高血压流行病学特征与相关因素调查[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(8): 970-971.

[17] 余文发. 汕头大学医学院处级及高级职称人员健康状况调查与分析[J]. 高校保健医学研究与实践, 2005, 2(4): 39-40.
 [18] 程朝英, 卢仙娥, 钟朝晖, 等. 重庆市不同职业人群中脂肪肝现状调查与分析[J]. 重庆医学, 2005, 34(12): 1807-1809.
 [19] 张明军. 血脂异常及合并高血压或糖尿病患者的性别、年龄特征及代谢特点分析[J]. 重庆医学, 2010, 39(15): 2038.

(收稿日期: 2010-11-16 修回日期: 2011-03-04)