

正交试验优化葛根素的大孔树脂纯化工艺

李 适^{1,2}, 岳明珠¹, 李银花², 傅冬和^{1,*}

(1. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2. 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 以葛根粗提物为原料, 比较D101、X-5、HD-101、D14、S-8、HC-D301、HD-8、D141、HPD100、HPD500、AB-8及NKA-2共12种大孔吸附树脂对葛根素的吸附与解吸性能。通过单因素试验、正交试验与验证实验, 优化树脂分离纯化葛根素的工艺技术参数。结果表明: NKA-2树脂吸附效果最好, 静态饱和吸附量可达184.9mg/g, 在乙醇体积分数50%时的解吸率达90.86%; 采用NKA-2树脂分离纯化葛根素的最优参数为: 上样液质量浓度18mg/mL, 乙醇体积分数60%, 洗脱速率1BV/h, 此时葛根素的得率可达90.06%, 纯度可达82.18%。该工艺具有较好的实用性与参考价值。

关键词: 大孔吸附树脂; 葛根素; 纯化; 工艺参数

Purification of Puerarin by Macroporous Resins

LI Shi^{1,2}, YUE Ming-zhu¹, LI Yin-hua², FU Dong-he^{1,*}

(1. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;
2. National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128, China)

Abstract: Macroporous resin types D101, X-5, HD-101, D14, S-8, HC-D301, HD-8, D141, HPD100, HPD500, AB-8 and NKA-2 were compared for their adsorption and desorption capacities for the purification of puerarin from a crude extract of *Radix Puerariae*. NKA-2 was found to have the strongest ability to adsorb puerarin with a static saturated adsorption quantity of 184.9 mg/g and a desorption percentage of 90.86% by 50% ethanol. The optimal conditions for purifying puerarin with NKA-2, as determined by orthogonal array design, were 18 mg/mL, 60% ethanol and 1 BV/h for sample concentration, desorbent and desorption flow rate, respectively. Under the optimized conditions, the recovery and purify of puerarin were 90.06% and 82.18%. The optimized process has potential practical applications for the purification of puerarin.

Key words: macroporous resin; puerarin; purification; process parameters

中图分类号: TS202.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)16-0089-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201316018

葛根为豆科植物野葛(*Pueraria lobata* (Willd) Ohwi)的干燥根, 为常用中药, 味甘、辛、性平, 具有解肌退热、生津、透疹、生阳止泻等功能, 属于我国卫生部公布的药食共有资源^[1]。以葛根为原料提取的葛根黄酮和葛根素已经被广泛应用到保健食品领域, 在国外出现的葛根与咖啡、芦笋、芦荟配制而成的饮料, 以及葛根冻罐头、葛根混合品、葛根口服液、葛根红肠等产品深受消费者喜爱; 日本已有葛根口服液、葛根面包、葛根面条、葛根粉丝、葛根冰淇淋、葛根饮料、葛根冻等; 将葛根冻和牛奶配制成管喂流质饮食, 可供特殊病症人食用; 葛根活性成分提取后的残

渣和葛根藤则加工成牲畜和鱼饲料, 实现了葛根资源的综合利用^[2]。葛根黄酮是葛根的有效成分, 而葛根素则是葛根总黄酮中含量最多的黄酮化合物^[3-4]。药理研究表明, 葛根素有降低心肌耗氧量、扩张冠脉和脑血管、改善心肌收缩能力、促进血液循环等作用^[5]; 适用于冠心病、心绞痛、心肌梗塞、视网膜动脉静脉阻塞、突发性耳聋等疾病, 且疗效显著^[5-7]。为更好地提高葛根资源利用的附加值, 解决目前葛根素的提取和纯化成本较高的问题, 本实验采用操作简便、成本低的大孔树脂吸附法, 旨在探索出一套可行性好的高纯度葛根素纯化工艺, 为工业化生产提供参考。

收稿日期: 2012-07-13

基金项目: 湖南省教育厅科研项目(11C0668); “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD10B00)

作者简介: 李适(1981—), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为植物功能成分化学。E-mail: lishidodo@163.com

*通信作者: 傅冬和(1967—), 女, 教授, 博士, 研究方向为植物功能成分化学。E-mail: fu7879@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

40%的葛根异黄酮提取物 长沙市三福生物制品有限公司；葛根素标准品(葛根素对照品，批号：110752-200410) 中国食品药品检定研究院。NKA-2、S-8 陕西蓝深特种树脂有限公司；HPD100、HPD500、AB-8、D101 沧州宝恩吸附材料科技有限公司；HD-101、D14、D141、HC-D301 上海华震科技有限公司；X-5、HD-8 安徽三星树脂科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 葛根素的测定及相关公式计算^[8-9]

精密称取葛根素标准品10.0mg，置于50mL容量瓶中，用蒸馏水溶解定容至刻度，摇匀，待用。精密吸取葛根素标准溶液0.20、0.40、0.60、0.80、1.00、1.50、2.00mL，分别置于25mL容量瓶中，加蒸馏水定容至刻度，摇匀，在250nm波长处测定吸光度。吸光度(A)为纵坐标，葛根素质量浓度(ρ)为横坐标，绘制标准曲线。得到回归方程为 $A=11.952\rho+0.1049$ ， $R^2=0.9993$ 。葛根素的纯度指质量百分比。

$$\text{葛根素得率}/\%=\frac{\rho\times V}{\rho_1\times V_1}\times 100 \tag{1}$$

$$\text{葛根素纯度}/\%=\frac{\rho\times V}{m}\times 100 \tag{2}$$

$$\text{葛根素损失率}/\%=\frac{\rho_2\times V_2}{\rho_1\times V_1}\times 100 \tag{3}$$

$$\text{葛根素洗脱率}/\%=\frac{\rho\times V}{\rho_3\times V_3}\times 100 \tag{4}$$

式中：ρ和V分别洗脱液中葛根素质量浓度和洗脱液体积；ρ₁和V₁分别为吸附前溶液的葛根素质量浓度和溶液体积；ρ₂和V₂为水洗脱液中葛根素质量浓度和洗脱液体积；ρ₃和V₃分别为吸附溶液的葛根素质量浓度和溶液体积；m为干葛质量。

1.2.2 大孔吸附树脂对葛根素的静态吸附-解吸效果研究^[10]

将D101、X-5、HD-101、D14、S-8、HC-D301、HD-8、D141、HPD100、HPD500、AB-8及NKA-2树脂预处理后，用滤纸吸去表面水，各称取3份，每份1.0g，放置于具塞磨口锥形瓶中，加入质量浓度为4mg/mL的葛根异黄酮样品溶液100mL，振荡24h后过滤，测定滤液中葛根素的含量，树脂用蒸馏水洗涤，用滤纸吸干水后，分别加入95%、75%、50%乙醇40mL振荡24h，得到解吸液，测定解吸液中葛根素的含量，计算静态吸附量、解吸量与解吸率。

1.2.3 大孔吸附树脂对葛根素动态吸附-解吸效果研究

1.2.3.1 单因素试验

1)上样液质量浓度及用量的影响

取20、16、12mg/mL的样品溶液，按2mL/min流速分别通过大孔树脂进行动态吸附，测定不同上样体积条件下流出液葛根素的含量，直到吸附饱和出现泄漏点，绘制每个质量浓度样品溶液的泄漏点曲线。

2)洗脱剂乙醇体积分数的影响

用大孔树脂吸附6BV 16mg/mL的样品溶液，先用2BV蒸馏水洗脱，然后采用20%、30%、40%、50%、60%、70%梯度，2BV/h的流速洗脱，固定其他因素，考察乙醇体积分数对洗脱液中葛根素的影响。

3)洗脱剂乙醇用量的影响

用大孔树脂吸附6BV质量浓度为16mg/mL的样品溶液，先用2BV蒸馏水洗脱，然后分别用1、2、3、4BV体积分数50%乙醇溶液，2BV/h洗脱，收集每一份树脂流出液，计算葛根素洗脱率，依据累积洗脱率确定洗脱剂用量。

1.2.3.2 正交试验

根据单因素试验的结果，对上样质量浓度、洗脱速率、乙醇体积分数进行三因素三水平的正交试验，得到葛根素分离纯化的较优工艺参数。

2 结果与分析

2.1 大孔吸附树脂的树脂筛选

表1 不同体积分数乙醇时大孔树脂对葛根素的静态吸附与解吸效果
Table 1 Static adsorption and desorption of puerarin by different types of macroporous resin

树脂名称	95%乙醇				75%乙醇				50%乙醇			
	吸附量/mg	吸附率/%	解吸量/mg	解吸率/%	吸附量/mg	吸附率/%	解吸量/mg	解吸率/%	吸附量/mg	吸附率/%	解吸量/mg	解吸率/%
S-8	68.20	27.85	26.88	39.41	84.15	27.49	49.61	58.95	96.58	39.43	50.7	52.49
HC-D301	132.8	54.01	14.53	10.98	179.7	58.70	89.53	49.81	175.7	71.75	93.94	53.45
D141	72.76	29.71	28.01	38.50	87.50	28.58	78.83	90.09	99.99	40.48	80.52	80.53
HD-8	19.20	7.840	5.352	27.88	19.03	6.22	16.21	85.15	34.44	13.65	22.16	66.27
D14	54.46	22.23	22.12	40.62	55.29	18.06	56.12	101.5	73.84	30.15	61.96	83.92
HD-101	123.5	50.42	51.75	41.91	80.31	26.03	58.94	73.39	76.86	31.38	67.25	86.5
HPD100	146.4	59.78	66.49	45.41	92.46	30.2	66.86	72.31	97.63	39.86	74.75	76.36
HPD500	73.76	60.23	62.60	84.87	101.4	33.13	94.21	92.88	102.5	41.48	77.02	75.17
D101	66.71	54.47	54.37	81.50	90.87	29.68	56.86	62.57	87.82	35.86	61.99	70.59
NKA-2	173.28	70.75	159.02	91.78	184.9	60.64	146.2	79.03	182.7	74.6	166	90.86
AB-8	75.03	61.27	64.91	86.51	104.2	34.05	77.28	74.17	102.2	41.47	74.16	72.54
X-5	75.21	61.42	64.41	85.64	58.4	35.95	81.56	92.61	96.64	39.46	77.17	79.79

由表1可以看出，乙醇体积分数为95%、75%、50%时12种树脂中NKA-2树脂的吸附量和解吸量都较高，粗提物质量浓度为4mg/mL上样，NKA-2树脂的葛根素吸附量分别达173.28、184.9、182.7mg，解吸量分别为159.02、146.2、166mg，吸附率分别为70.75%、

60.64%、74.6%，解吸率分别为91.78%、79.03%、90.86%，D141和D14树脂在75%乙醇体积分数下的解吸率较NKA-2树脂高，但其吸附量明显低于NKA-2树脂，因此，NKA-2树脂为葛根素分离的较优树脂。

2.2 NKA-2树脂的动态吸附效果

2.2.1 单因素试验

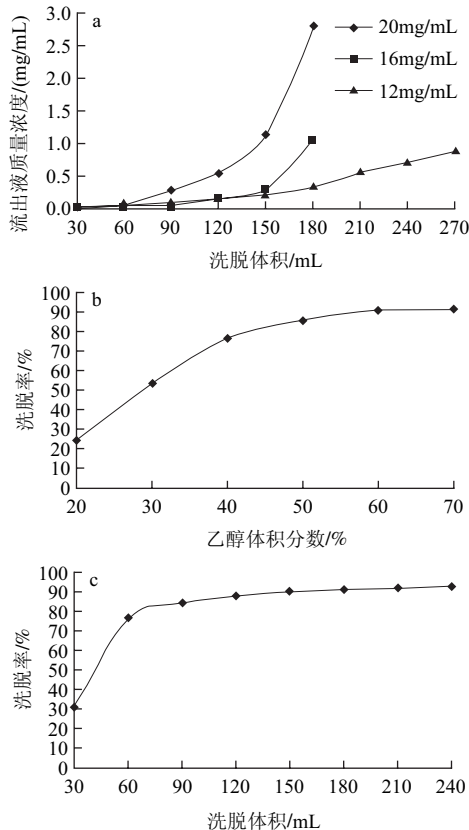


图1 上样质量浓度(a)、乙醇体积分数(b)和乙醇用量(c)对树脂吸附效果的影响

Fig.1 Effect of sample concentration (a), ethanol concentration (b) and desorption volume (c) on puerarin purification

从图1a中可以看出质量浓度为20、16mg/mL的样品溶液均在6BV(180mL)达到泄漏点，12mg/mL在9BV(270mL)达到泄漏点。其中质量浓度为16mg/mL的样品溶液吸附率为94.08%，最高。因此，初步决定最佳上样质量浓度为16mg/mL，上样量为6BV。随着乙醇体积分数增大，葛根素的洗脱率也越来越高，如图1b所示，当乙醇体积分数为50%，洗脱率为85.8%，再增加乙醇体积分数，洗脱率增加相对比较平缓，单因素试验初步确定50%乙醇为较优的洗脱乙醇体积分数。乙醇用量对于洗脱率的影响表现在，洗脱体积越大葛根素的洗脱率越高，达到一定值时这种变化趋于平缓，如图1c所示，当用量达到2BV(60mL)时，洗脱率为91.54%。

2.2.2 正交试验优化分离条件结果分析

正交试验结果见表2，影响对葛根素得率的因素分别

为：乙醇体积分数>洗脱速率>上样质量浓度。柱分离过程中影响葛根素产品纯度因素：上样质量浓度>洗脱乙醇体积分数>洗脱速率。高得率可降低葛根素提取过程中的损失，降低成本，而较高纯度的葛根素产品应用范围更广，售价较高，经济效益明显，本实验综合考虑得率和产品的纯度两个因素，得到较优的葛根素纯化工艺条件为 $A_3B_1C_3$ ，即上样液质量浓度18mg/mL、洗脱速率1BV/h、乙醇体积分数60%，可获得得率90.06%，纯度为82.18%的葛根素产品。

表2 葛根素动态吸附动态吸附-解吸正交试验设计及结果
Table 2 Orthogonal array design and results for optimization of dynamic adsorption and desorption of puerarin

试验号	因素			葛根素得率/%	葛根素纯度/%
	A上样质量浓度/(mg/mL)	B洗脱速率/(BV/h)	C乙醇体积分数/%		
1	1(14)	1(1.0)	1(40)	82.15	57.99
2	1	2(1.5)	2(50)	82.31	58.1
3	1	3(2.0)	3(60)	89.19	63.05
4	2(16)	1	2	83.34	67.40
5	2	2	3	86.87	70.39
6	2	3	1	78.00	70.39
7	3(18)	1	3	90.06	82.18
8	3	2	1	71.23	64.82
9	3	3	2	81.73	74.48
得率	k_1	84.55	85.18	77.13	
	k_2	82.74	80.14	82.46	
	k_3	81.01	82.97	88.71	
	R	3.54	5.00	11.58	
纯度	k_1	59.71	69.19	60.86	
	k_2	65.86	64.44	66.66	
	k_3	73.83	65.77	71.87	
	R	14.12	4.75	11.01	

3 结论

大孔吸附树脂一直以来，由于其具有物理化学性质稳定、吸附选择性独特、不受无机物存在的影响、解吸条件温和、再生简便、使用周期长、节省费用等诸多优点，成为植物功能成分提取、纯化过程中三大绿色与节能技术之一^[11-14]。陈幸苗等^[15]对HPD300、HPD100、HPD400、AB-8、D101、HPD700这6种大孔树脂动态吸附葛根素及总黄酮的能力进行探讨，实验表明HPD300对葛根素及总黄酮吸附效果最佳，通过正交试验优化工艺参数可获得纯度为55.45%的葛根素。在本实验中，所选12种大孔吸附树脂分离纯化葛根素，其中较强的极性的NKA-2树脂对葛根素具有吸附量大、易洗脱的优点。上样液质量浓度18mg/mL、洗脱速率1BV/h、乙醇体积分数60%的工艺参数条件下一次分离可获得得率为90.06%，纯度为82.18%的葛根素产品，本方法获得的葛根素产品纯度较高，具有较好的实用性，可以为工业化生产提供参考。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 213.
- [2] 郑皓. 葛根的研究与开发现状[J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(2): 24-26.
- [3] 王黎. 中药葛根的指纹图谱及几种化学药物的质量控制研究[D]. 西安: 西北大学, 2007.
- [4] 闫莉萍. 葛根素心肌保护调节血脂和舒血管的药理作用机制[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2006.
- [5] 段重高, 徐理纳. 葛根素对金黄地鼠脑微环境的影响[J]. 中华医学杂志, 1991, 71(9): 516-517.
- [6] 朱应磊, 吕欣然. 葛根素的药理学和临床应用研究进展[J]. 中药学, 1997, 28(11): 693-696.
- [7] 杨国君. 葛根素抗冠心病心绞痛疗效观察及对血栓素A₂和前列环素的影响[J]. 中西医结合杂志, 1990, 10(2): 82-84.
- [8] 赵颖, 王然. 葛根素及总黄酮含量测定[J]. 饮料工业, 2012(1): 37-39.
- [9] 付桂明, 罗阳帆, 张娅楠, 等. 大孔吸附树脂对杜仲叶黄酮的富集纯化[J]. 食品科学, 2010, 31(12): 67-70.
- [10] HE Xiangling, TAN Tianwei, XU Bingze, et al. Separation and purification of puerarin using β -cyclodextrin-coupled agarose gel media[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1022(1/2): 77-82.
- [11] 何伟, 李伟. 大孔树脂在中药成分分离中的应用[J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(2): 134-136.
- [12] 王冬梅, 魏芹, 马希汉. 大孔吸附树脂在药用植物有效成分分离中的应用[J]. 西北林学院学报, 2002, 17(1): 60-63.
- [13] 郭永学, 李楠, 杨美艳, 等. 大孔吸附树脂在中草药研究中的应用进展[J]. 药品评价, 2004(5): 378-382.
- [14] 潘五九, 肖小河, 袁海龙, 等. 中药生产关键共性新技术研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(4): 361-367.
- [15] 陈幸苗, 杨中林. 葛根总黄酮和葛根素的纯化工艺研究[J]. 海峡药学, 2006, 18(2): 24-27.