



柯春山, 吴少福, 彭鹏, 等. 大孔树脂纯化裸花紫珠总三萜工艺研究[J]. 江西农业大学学报, 2021, 43(5): 1178-1187.
KE C S, WU S F, PENG P, et al. Purification of the total triterpenes extracted from *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. by macroporous resins[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2021, 43(5): 1178-1187.

大孔树脂纯化裸花紫珠总三萜工艺研究

柯春山¹, 吴少福¹, 彭 鹏¹, 李 麟^{2*}, 李书飞¹, 洪艳平^{1*}

(1. 江西农业大学 食品科学与工程学院/江西省天然产物与功能食品重点实验室, 江西 南昌 330045; 2. 江西农业大学 动物科学技术学院/江西省畜禽疫病诊断与防控重点实验室, 江西 南昌 330045)

摘要:【目的】从多种大孔树脂中优选出纯化裸花紫珠总三萜的最适工作树脂, 研究最适工作树脂 AB-8 纯化裸花紫珠总三萜的最佳工艺条件。【方法】通过测试静态条件下树脂的吸附率和解吸率, 从多种树脂中筛选出最适工作树脂; 以总三萜浓度为指标, 通过静态和动态吸附-解吸试验, 优选出纯化裸花紫珠总三萜的最佳工艺条件。【结果】筛选出 AB-8 为最适工作树脂, 纯化裸花紫珠总三萜的最佳工艺条件: (1) 静态吸附: 吸附 pH 5、吸附温度 35 ℃、吸附时间 8 h; (2) 静态解吸: 洗脱时间 4 h、洗脱温度 55 ℃、pH 2 的无水乙醇; (3) 动态吸附: 浓度 1.5 mg/mL 40% 的乙醇溶液、流速 3 mL/min; (4) 动态解吸: 流速 3 mL/min 的无水乙醇洗脱。【结论】在最佳工艺条件下静态纯化所得固形物总三萜含量(28.11%)较纯化前提高了 3.96 倍, 动态纯化所得总三萜含量(31.33%)较纯化前提高了 4.42 倍。

关键词: 裸花紫珠; 总三萜; 大孔树脂; 纯化

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2021)05-1178-10

Purification of the Total Triterpenes Extracted from *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. by Macroporous Resins

KE Chunshan¹, WU Shaofu¹, PENG Peng¹, LI lin^{2*}, LI Shufei¹, HONG Yanping^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Jiangxi Key Laboratory of Natural Products and Functional Food, Nanchang 330045, China; 2. College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Jiangxi Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Control, Nanchang 330045, China)

Abstract: [Objective] The optimum resin for purifying total triterpenoids from *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. was selected from kinds of resins, and the optimum purification conditions for total triterpenoids, which derived from *callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. through AB-8 resin, were investigated. [Method] The optimum operating resin was chosen from kinds of resins based on the static adsorption rate and static desorption rate of total triterpenoids. Utilizing the concentration of total triterpenes as reference, the optimal static/dynamic adsorption-desorption conditions for purification of total triterpenes were achieved. [Result] Among of the resins, AB-

收稿日期: 2021-01-08 修回日期: 2021-03-25

基金项目: 江西省自然科学基金项目(20192BAB204022)

Project supported by the Foundation of Natural Science of Jiangxi(20192BAB204022)

作者简介: 柯春山, orcid.org/0000-0001-7386-0405, 1640690178@qq.com; *通信作者: 李麟, 副教授, 主要从事动物疾病防治研究, orcid.org/0000-0002-1556-9289, 1492805488@qq.com; 洪艳平, 教授, 博士, 主要从事食品科学研究, orcid.org/0000-0002-5133-5703, xyqcxj@163.com。

8 was determined as the optimum operating resin, the best conditions were as follows: (1) static adsorption: pH was 5, temperature was 35 °C, adsorption time was 8 h; (2) static desorption: desorption time was 4 h, desorption temperature was 55 °C, and anhydrous alcohol with pH 2; (3) dynamic adsorption: concentration of the sample solution ($V_{\text{ethanol}}:V_{\text{water}}=2:3$) was 1.5 mg/mL, velocity of flow was 3 mL/min; (4) dynamic desorption: anhydrous alcohol at the flow rate of 3 mL/min. **[Conclusion]** Under the gained conditions, the percentage of total triterpenes (28.11%) obtained by static purification was 3.96 times higher than that before purification. Further, the percentage of total triterpenes (31.33%) obtained by dynamic purification was 4.42 times higher than that before purification.

Keywords: *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn.; total triterpenes; macroporous resins; purification

【研究意义】裸花紫珠(*Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn.)为马鞭草科紫珠属植物,常为灌木或小乔木,国内主要分布于海南、广西、广东等地,国外主要分布在新加坡、中南半岛、马来半岛和印度等地,是一种海南大宗性地道药材,同时也是海南黎族医生常用药材之一^[1]。据《本草拾遗》记载,裸花紫珠以干燥入药,具有止血镇痛、散瘀消肿、抗菌消炎和驱风等功效而用于治疗痈疽、喉痹和毒肿等病症,主治急性传染性肝炎、呼吸道及消化道出血、创伤出血以及化脓性炎症等,外用治疗外伤出血及烧、烫伤等^[2-3]。三萜是由30个碳原子组成的萜类化合物,这些化合物广泛分布于自然界中的蕨类植物、真菌、双子叶植物、单子叶植物、动物以及海洋生物中。三萜类化合物根据分子结构的差异分为五环三萜、四环三萜、三环三萜、双环三萜、单环三萜以及链状三萜等。三萜类化合物具有抗病毒、防治疾病、抗癌、抗过敏和降血糖等重要的生物活性^[4-5],因此被广泛应用于功能性食品和药品之中。迄今为止,对裸花紫珠所含单体成分的研究显示,其主要化学成分为黄酮和三萜及其苷、环烯醚萜和苯丙素苷等。其中,三萜化合物以齐墩果烷型和乌苏烷型三萜为基本骨架的五环三萜酸及其苷类较多^[6-9],如齐墩果酸、熊果酸、科罗索酸、 $2\alpha,3\alpha,19\alpha$ -三羟基-乌索烷-12-烯-28-酸、乌苏-12-烯- 3β -醇、 $2\alpha,3\alpha,24$ -三羟基-齐墩果烷-12-烯-28-酸、 $2\alpha,3\alpha,19\alpha$ -三羟基-乌索烷-12-烯-28- $O-\beta-D$ -葡萄糖苷、 $2\alpha,3\alpha,19\alpha,23$ -四羟基-齐墩果烷-12-烯-28- $O-\beta-D$ -葡萄糖苷等。**【前人研究进展】**近年来,大孔吸附树脂成为实验室和工业上中草药粗提物分离纯化的热点分离材料,被广泛应用于黄酮、多酚及三萜等天然活性化合物的分离纯化^[10]。大孔吸附树脂属高分子吸附剂,是一类不带离子交换基团而且具有大孔结构的多孔性交联聚合物,有良好的网状结构及较高的比表面积,它通过分子间作用力或者氢键等作用实现被分离活性成分的选择性吸附,然后在一定条件下洗脱而达到分离纯化的目的^[11-12]。大孔吸附树脂具有吸附容量大、有效成分损失少、成本低、杂质去除率高、吸附速度快、选择性强、易再生、机械强度大等优点^[13-14]。**【本研究切入点】**目前,文献调研显示,有裸花紫珠中化学成分及药理作用^[15]和裸花紫珠总黄酮分离纯化^[16]以及裸花紫珠总皂苷的提取工艺^[17]等方面的研究,但针对裸花紫珠总三萜的分离纯化研究却鲜有报道;大孔树脂用于分离纯化天然产物时可用静态、动态吸附解吸进行,且二者的分离纯化效果有明显差异。本试验借鉴课题组前期开展的天然活性成分分离纯化的工作经验,通过考察多种大孔树脂静态吸附及解吸率大小,筛选确定纯化总三萜的最适工作树脂;利用筛选的最适树脂进行裸花紫珠总三萜静态分离纯化工艺研究,确定AB-8大孔树脂分离纯化裸花紫珠总三萜的最佳工艺条件。**【拟解决的关键问题】**大孔树脂被广泛应用于天然产物的分离纯化,在实际的应用过程中,树脂的纯化效果常因树脂自身性质、使用条件不同及被纯化成分性质的差异而受到影响,因此合适工作树脂的优选并获得其最佳的纯化工艺条件对于裸花紫珠总三萜的潜在应用具有一定的理论参考价值。

1 材料与方法

1.1 仪器设备与试验材料

裸花紫珠叶为江西农业大学培育。试验药品:氢氧化钠、盐酸、高氯酸、冰醋酸、香草醛、无水乙醇皆

为分析纯,齐墩果酸标准对照品(纯度为98%,上海金穗生物科技有限公司),D-101、DM-21、HPD725、DM-2、X-5、AB-8、DM-21D、DM130、HPD-1000、DM-20、聚酰胺等树脂(天津波鸿树脂科技有限公司),可见分光光度计(上海卓光仪器科技有限公司),电子天平(季尔国际贸易(上海)有限公司),数显水浴锅(国华电器有限公司),旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司),pH计(上海勇懿仪器仪表有限公司),高速粉碎机(上海烨昌食品机械有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 裸花紫珠总三萜粗提液的制备 将裸花紫珠放入烘箱以70℃干燥一定时间,用高速粉碎机粉碎。准确称取一定量的粉碎的裸花紫珠叶于圆底烧瓶中,以料液比1:14加入无水乙醇,在80℃下水浴3h,浸提2次。收集浸提液,减压浓缩,干燥,备用。

1.2.2 裸花紫珠总三萜含量测定方法 (1)标准曲线的绘制。

精确称取4.0 mg齐墩果酸标品,无水乙醇定容至50 mL(质量浓度为0.08 mg/mL)。分别准确移取一定量对照品溶液于试管中,加入0.2 mL新鲜配制的5%香草醛-冰乙酸溶液和0.8 mL高氯酸充分摇匀,与试管架一并置于恒温水浴锅中60℃水浴加热15 min,待冷却至室温后加入冰乙酸并定容至5 mL摇匀待测^[18]。分光光度计扫描显示齐墩果酸最大吸收波长在560 nm处^[19]。而后分别准确移取0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL对照品溶液于试管中按上述方法处理,空白对照为不加对照品溶液的平行试管,分光光度计设定560 nm并分别测定各试管溶液吸光度,分别以吸光度(A)和齐墩果酸质量(mg)为横坐标和纵坐标绘制标准曲线。得线性回归方程为: $y=0.1046x+0.0068$,相关系数 $r=0.9998$,齐墩果酸在0.016~0.096 mg质量范围内与吸光度呈现良好的线性关系。

(2)总三萜含量的计算。

按下列计算公式称取m克裸花紫珠提取化合物用40%乙醇溶液定容至100 mL,精确量取V mL按1.2.2(1)中方法显色,在560 nm处测定其吸光度A,根据回归方程计算三萜含量。

$$\text{三萜化合物} = \frac{(0.1046A + 0.0068) \times 100}{m \times V \times 1000} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.3 不同型号大孔树脂吸附解吸性能研究 (1)树脂的预处理。将大孔树脂D-101、HPD-725、AB-8、DM-21、DM-130、DM21D、HPD-1000、DM-2、X-5、聚酰胺和DM20用体积分数为95%乙醇浸泡24 h后用蒸馏水冲洗直至无醇味。然后经5%的氢氧化钠溶液浸泡后用蒸馏水洗至中性,再用4%的盐酸溶液浸泡并用蒸馏水洗至中性,备用。

(2)最佳实验树脂的选择。分别称取活化处理后的大孔树脂(D-101、HPD-725、AB-8、DM-21、DM-130、DM21D、HPD-1000、DM-2、X-5、聚酰胺、DM20)4 g置于250 mL具塞锥形瓶中,加入pH 4.0吸光值 A_0 裸花紫珠粗提液20 mL盖紧瓶塞。在摇床中放置24 h,吸取上清液测定其吸光值 A_1 。将充分吸饱的树脂抽滤至干,各称取5 g置于250 mL具塞锥形瓶中,加入20 mL pH 4.0的体积分数为60%乙醇溶液在摇床中解吸24 h,吸取上清液测定其吸光值 A_2 ,按下列公式计算各树脂的静态吸附率和解吸率。

$$\text{吸附率} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{解吸率} = A_2 / (A_0 - A_1) \times 100\% \quad (3)$$

1.2.4 AB-8型大孔树脂静态纯化工艺研究 (1)静态吸附。称取4 g AB-8树脂于250 mL具塞三角瓶中,加入20 mL浓度相同的三萜粗提液,在不同温度和不同pH条件下,在摇床中放置不同时间后测定溶液中的三萜含量,按1.2.3(2)中方法计算吸附率。通过单因素实验分别研究温度、pH以及吸附时间对AB-8树脂静态吸附效果的影响。

(2)静态解吸。称取吸附饱和的AB-8树脂4 g于250 mL具塞三角瓶中,加入20 mL不同浓度乙醇溶液,在不同温度和pH条件下,置于摇床中静态解吸不同时间后测定溶液中的三萜含量,计算解吸率。通过单因素实验分别研究温度、pH、解吸时间以及乙醇浓度对AB-8静态解吸效果的影响。

(3)正交试验。在上述单因素试验基础上按 $L_9(3^3)$ 设计进行正交试验,优选出AB-8吸附总三萜的工艺条件,因素水平分别见表1和表2。

表 1 总三萜静态吸附正交试验因素水平
Tab.1 Factors of the orthogonal test applied in static adsorption of total triterpenes

水平 Level	因素 Factor		
	A 温度 Temperature	B pH	C 时间 Time
1	30	5	4
2	35	6	6
3	40	7	8

表 2 总三萜静态解吸正交试验因素水平
Tab.2 Factors and levels of orthogonal test applied in static desorption of total triterpenes

水平 Level	因素 Factor		
	A 温度 Temperature	B pH	C 时间 Time
1	50	2	4
2	55	3	6
3	60	4	8

1.2.5 AB-8 大孔树脂动态纯化工工艺研究 (1) 动态吸附。称取 10 g AB-8 树脂湿法装柱,在室温下以不同浓度及不同流速的裸花紫珠三萜溶液上样吸附,定量收集三萜流出液,并测定三萜流出液浓度,通过单因素试验分别研究上样液浓度、流速对 AB-8 树脂动态吸附效果的影响。

(2) 动态解吸。称取 10 g 吸附饱和的 AB-8 树脂湿法上柱,在室温下用不同浓度的乙醇溶液以不同流速进行解吸,定量收集解吸液,并测定解吸液浓度,当前后解吸液浓度基本不变时定为洗脱终点。通过单因素实验分别研究乙醇浓度和流速对 AB-8 树脂动态解吸效果的影响。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

分光光度计扫描显示齐墩果酸最大吸收波长为 560 nm,线性回归方程为: $y=0.1046x+0.0068$,相关系数 $r=0.9998$,齐墩果酸在 0.016 ~ 0.096 mg 内与吸光度呈现良好的线性关系(图 1)。

2.2 最佳树脂的选择

由表 3 可知 11 种树脂对三萜均有一定的吸附性能,其中 AB-8 和 DM-21 相对其他树脂而言,其吸附率较高,但综合考虑其解吸率,AB-8 树脂对三萜的解吸率高于 DM21,故选择 AB-8 为本试验的最佳吸附树脂。

2.3 AB-8 型树脂对裸花紫珠三萜静态吸附与解吸特性

2.3.1 静态吸附 由图 2 可知,随着时间的延长三萜吸附率不断增大,在 6 h 后吸附率基本不变,由此可知大孔树脂已基本达到吸附饱和状态,故选择 6 h 为较适合的吸附时间。

大多数五环三萜苷元因其结构骨架中含有羧基而呈现出一定的酸性,因此随着 pH 的上升,三萜类化合物在水中的溶解性增大,物质在溶液中以不同的形式(中性分子或离子)存在最终影响其在大孔树脂中的扩散速度,从而导致吸附效果产生变化^[20]。结果如图 3 所示,在 pH 低于 7 的范围内,随着 pH 的增大,AB-8 型树脂对三萜的吸附率呈先上升后下降的趋势,在溶液 pH=6 时达到较佳吸附,故确定溶液 pH=6 时为较佳吸附 pH 值。

图 4 结果表明,在一定温度范围内,适当地升高温度有利于树脂对三萜的吸附,但温度过高时反而降低树脂对三萜的吸附性能,原因可能为:其一,较高温度下皂苷分子的运动加剧,导致分子难以吸附在树脂表面而使三萜吸附下降;第二,温度升高相应地增大了溶液中三萜的溶解度,从而导致树脂对三萜的吸附效果下降。因此,在本试验的吸附过程中,在 35 ℃ 吸附效果较好。

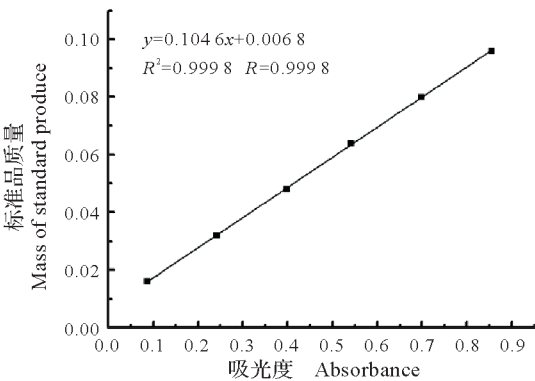


图 1 齐墩果酸对照品的标准曲线
Fig.1 Standard curve of the reference oleanolic acid

表3 11种树脂对裸花紫珠总三萜静态吸附和解吸特性
Tab.3 Static adsorption and desorption characteristics of 11 kinds of resins
for the total triterpenes of *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn.

树脂种类 Resins	吸附 Adsorption			解吸/ A_2 Desorption	吸附率/% Adsorption rate	解吸率/% Desorption rate
	A_0	A_1	ΔA			
D101	1.45	1.218	0.232	0.100	16.33	43.10
DM21	1.45	0.877	0.573	0.216	39.52	37.70
HPD725	1.45	1.021	0.429	0.219	29.59	51.05
DM-2	1.45	1.035	0.415	0.117	28.62	28.19
X-5	1.45	1.221	0.229	0.146	15.79	63.76
AB-8	1.45	0.834	0.626	0.508	43.17	81.15
DM21D	1.45	1.144	0.306	0.253	21.10	82.67
DM130	1.45	0.901	0.549	0.280	37.86	51.00
HPD-1000	1.45	0.906	0.544	0.223	37.52	40.99
聚酰胺 Polyamide	1.45	1.037	0.413	0.257	28.48	62.23
DM20	1.45	1.021	0.429	0.181	29.59	42.19

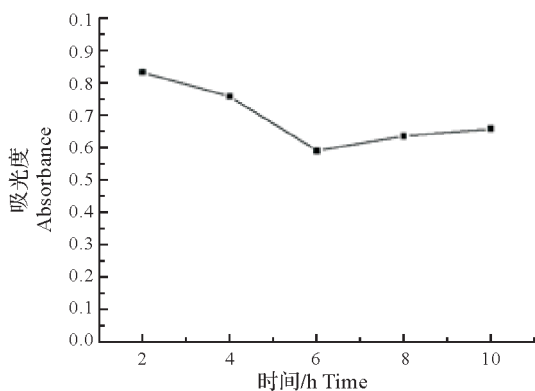


图2 吸附时间对吸附效果的影响

Fig.2 Effect of adsorption time on adsorption of total triterpenes

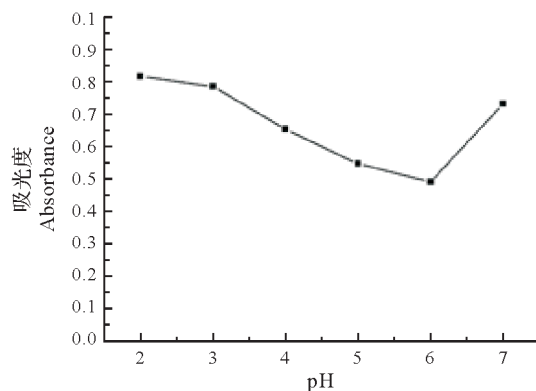


图3 溶液 pH 对吸附效果的影响

Fig.3 Effect of pH on adsorption of total triterpenes

2.3.2 静态解吸 如图5结果显示,随着解吸时间的增加,解吸液的吸光度不断增大,当解吸时间超过6 h后,吸光度有微弱的下降。由此可知,解吸6 h时已达最大解吸率,故选择解吸最佳解吸时间为6 h。

由图6可知,解吸液的吸光度随解吸温度的升高而增大,但当温度超过55℃时,解吸液吸光度呈下降趋势。原因可能是温度的升高使吸附在树脂上非三萜成分被解吸,导致单位体积溶液中三萜含量降低,使得吸光度呈下降趋势。由此认为55℃为最佳解吸温度。

如图7所示,随着溶液pH的增大,吸光度逐渐减小,说明随着pH的增大解吸效果减弱。因此确定最佳解吸液pH为2。

由图8结果表明,解吸液吸光度与乙醇浓度呈正相关,说明乙醇浓度的升高有利于醇溶性三萜化合物的解吸,也说明裸花紫珠中三萜化合物的存在形式主要为油溶性较好的三萜皂苷元。故确定最佳解吸液乙醇浓度为100%。

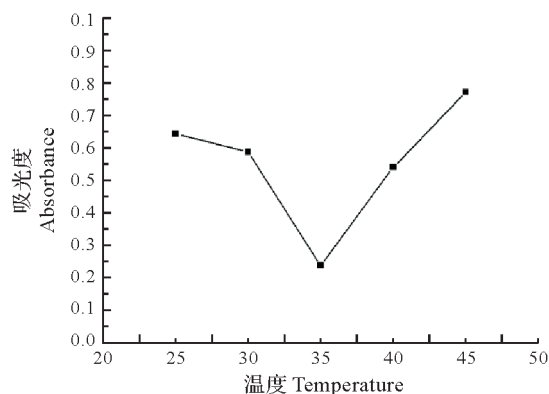


图4 吸附温度对吸附效果的影响

Fig.4 Effect of temperature on adsorption of total triterpenes

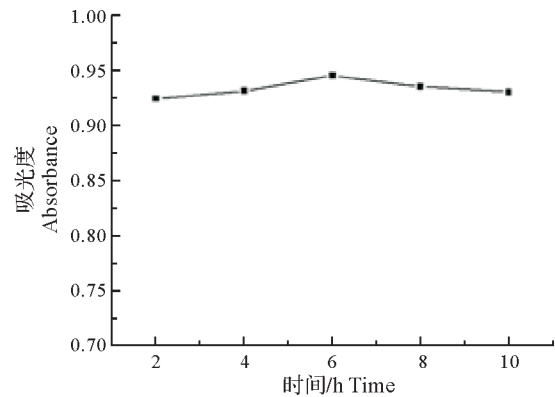


图5 解吸时间对解吸效果的影响
Fig.5 Effect of time on the desorption of total triterpenes

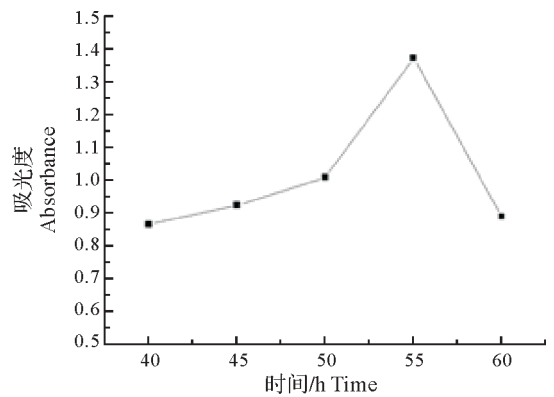


图6 解吸温度对解吸效果的影响
Fig.6 Effect of temperature on the desorption of total triterpenes

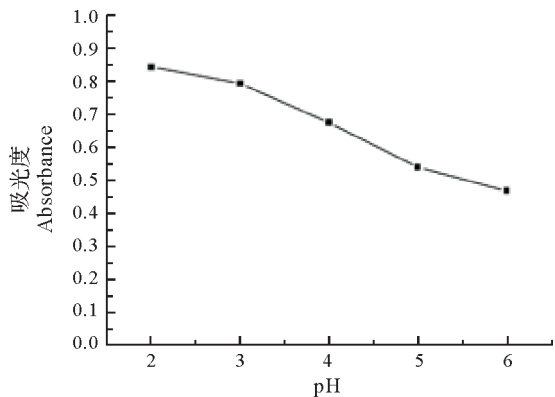


图7 pH对解吸效果的影响
Fig.7 Effect of pH on the desorption of total triterpenes

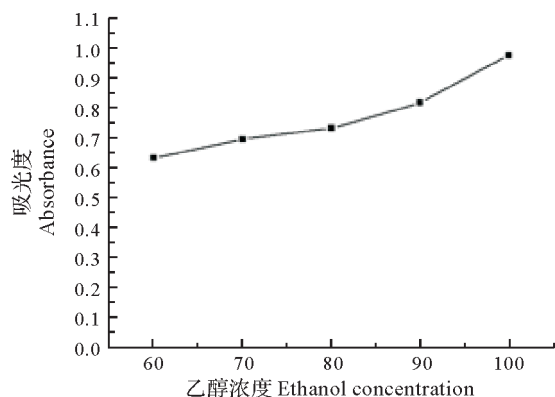


图8 乙醇浓度对解吸效果的影响
Fig.8 Effect of ethanol concentration on the desorption of total triterpenes

2.3.3 正交试验 (1) 静态吸附正交试验。由表4极差分析可知,各因素对树脂吸附效果影响程度由大

表4 静态吸附正交试验设计与数据处理

Tab.4 Orthogonal experimental design and data processing of static adsorption

处理号 Number	因素/Factor			吸附率 adsorption rate
	A 温度 Temperature	B pH	C 时间 Time	
1	1	1	1	0.653 308
2	1	2	2	0.640 101
3	1	3	3	0.554 255
4	2	1	2	0.482 277
5	2	2	3	0.556 896
6	2	3	1	0.626 894
7	3	1	3	0.626 894
8	3	2	1	0.632 177
9	3	3	2	0.650 006
K_{1j}	1.550 0	1.825 0	1.457 0	
K_{2j}	1.679 0	1.578 0	1.575 0	
K_{3j}	1.452 0	1.664 0	1.716 0	
$\bar{K}_{1j}$	0.516 7	0.608 3	0.485 7	
$\bar{K}_{2j}$	0.559 7	0.526 0	0.525 0	
$\bar{K}_{3j}$	0.484 0	0.554 7	0.572 0	
R_j	0.122 7	0.034 7	0.088 0	

($\bar{K}_{1j}$ 、 $\bar{K}_{2j}$ 、 $\bar{K}_{3j}$ 表示因素的每个水平的平均皂苷含量,极差 R_j =同因素的 $\bar{K}_{1j}$ 、 $\bar{K}_{2j}$ 、 $\bar{K}_{3j}$ 中最大值-最小值)。
($\bar{K}_{1j}$ 、 $\bar{K}_{2j}$ or $\bar{K}_{3j}$ shows the factors of each level of the average content of anthocyanins, R_j is the same factor of the maximum and the minimum from $\bar{K}_{1j}$ 、 $\bar{K}_{2j}$ 、 $\bar{K}_{3j}$).

到小依次为温度,时间和溶液 pH,表 5 方差分析结果表明,各因素之间差异不显著,综合极差分析、方差分析分析结果,AB-8 对裸花紫珠总三萜的最佳吸附条件为 $A_2B_1C_3$ 。由此综合考虑,确定 AB-8 型树脂最佳静态吸附条件时间 8 h,溶液 pH 为 5,温度 35 ℃。

表 5 静态吸附正交设计方差分析

Tab.5 Variance analysis of static adsorption based on the orthogonal design

源 Source	III 型平方和 Sum of squares	df	均方 Mean square	F	显著性 Significant
校正模型 Correction model	0.017a	6	0.003	0.588	0.740
截距 Intercept	3.267	1	3.267	664.464	0.002
A	0.011	2	0.005	1.082	0.480
B	0.001	2	0.001	0.104	0.906
C	0.006	2	0.003	0.578	0.634
误差 Error	0.010	2	0.005		
总计 Total	3.295	9			
校正的总计 Total adjusted	0.027	8			

$P<0.01$ 表示差异极显著; $P<0.05$ 表示差异显著。

$P<0.01$ shows extremely significant difference; $P<0.05$ shows significant differences.

(2) 静态解吸正交试验。由表 6、7 分析可知,各因素对树脂解吸效果影响的程度由大到小依次为解吸温度,溶液 pH 和解吸时间。综合极差分析、方差分析结果可知,AB-8 对裸花紫珠总三萜的最佳吸附条件为 $A_2B_1C_3$,但考虑解吸时间对总三萜解吸的影响最小,同时缩短时间有利于分离效率的提高,由此确定 AB-8 型树脂最佳静态解吸条件为 $A_2B_1C_1$,即:解吸时间 4 h,解吸溶液 pH 为 2,解吸温度 55 ℃,乙醇浓度 100%。

表 6 静态解吸正交试验设计与数据处理

Tab.6 Orthogonal experimental design and data processing of static desorption

处理号 Number	因素 Factor			吸光值 Absorbance
	A 温度 Temperature	B pH	C 时间 Time	
1	1	1	1	0.650
2	1	2	2	0.565
3	1	3	3	0.704
4	2	1	2	0.795
5	2	2	3	0.776
6	2	3	1	0.585
7	3	1	3	0.777
8	3	2	1	0.567
9	3	3	2	0.641
K_{1j}	1.919	2.222	1.802	
K_{2j}	2.156	1.908	2.001	
K_{3j}	1.985	1.289	2.257	
$\bar{K}_{1j}$	0.640	0.741	0.601	
$\bar{K}_{2j}$	0.719	0.636	0.667	
$\bar{K}_{3j}$	0.213	0.430	0.752	
R_j	0.505	0.311	0.152	

($\bar{K}_{1j}$ 、 $\bar{K}_{2j}$ 、 $\bar{K}_{3j}$ 表示因素的每个水平的平均总皂苷含量,极差 R_j =同因素的 $\bar{K}_{1j}$ 、 $\bar{K}_{2j}$ 、 $\bar{K}_{3j}$ 中最大值—最小值)。

($\bar{K}_{1j}$ 、 $\bar{K}_{2j}$ or $\bar{K}_{3j}$ shows the factors of each level of the average content of anthocyanins, R_j is the same factor of the maximum and the minimum of $\bar{K}_{1j}$, $\bar{K}_{2j}$ and $\bar{K}_{3j}$).

表 7 静态解吸正交设计方差分析
Tab.7 Variance analysis of static desorption based on orthogonal design

源 Source	III 型平方和 Sum of squares	df	均方 Mean square	F	显著性 Significant
校正模型 Correction model	0.065a	6	0.011	5.021	0.175
截距 Intercept	4.080	1	4.080	1 887.036	0.001
A	0.010	2	0.005	2.306	0.302
B	0.020	2	0.010	4.736	0.174
C	0.035	2	0.017	8.020	0.111
误差 Error	0.004	2	0.002		
总计 Total	4.150	9			
校正的总计 Total adjusted	0.069	8			

$P<0.01$ 表示差异极显著; $P<0.05$ 表示差异显著。
 $P<0.01$ shows extremely significant difference; $P<0.05$ shows significant differences.

2.4 AB-8型树脂对裸花紫珠总三萜动态吸附与解吸特性

2.4.1 上样液浓度对 AB-8 型树脂动态吸附性能的影响 由表 8 可知,不同浓度的总三萜乙醇溶液($V_{乙醇}:V_{水}=2:3$)以 2 mL/min 流速流过树脂柱后,泄漏点分别在 18、32、54、90、180 mL 处。随着上样液浓度升高,泄露时间逐渐变短,且上样液浓度较低时,泄露时间较长,树脂吸收效果越好。但若上样液浓度过高,泄露过早,会使上样液处理量减少,不利于树脂吸收;而当上样液浓度过低则导致工作效率下降。当上样液浓度为 1.5 mg/mL 时,吸附泄漏点和泄露时间较为合理,故确定最佳上样液浓度为 1.5 mg/mL。

表 8 上样液浓度对 AB-8 型树脂动态吸附性能的影响
Tab.8 Effect of sample concentration on the dynamic adsorption of total triterpenes on AB-8 resin

溶液浓度/(mg·mL ⁻¹) Concentration	泄漏点/mL Leakage point	泄露时间/min Leakage time
0.5	180	90
1.0	90	45
1.5	54	27
2.0	32	16
2.5	18	9

2.4.2 上样液流速对 AB-8 型树脂动态吸附性能的影响 由表 9 可得,上样流速为 1 mL/min 时,泄漏点出现最晚,处理量最大;流速为 2、3 和 4 mL/min 时,泄漏点和处理量居中;流速为 5 mL/min 时,泄漏点出现最早,处理量最小。这是由于流速小时,原液能够更充分地与树脂接触,从而有利于树脂吸附,提高吸附效果,因此流速较慢的上样流速更有利于树脂吸附,但流速过小则导致工作时间过长,分离效率低,综合考虑吸附效果与工作效率,故选定 3 mL/min 为最佳上样流速。

表 9 上样液流速对 AB-8 型树脂动态吸附性能的影响
Tab.9 Effect of sample flow rate on dynamic adsorption of total triterpenes on AB-8 resin

流速/(mL·min ⁻¹) Velocity of flow	泄漏点/mL Leakage point	泄露时间/min Leakage time
1.0	70	70
2.0	52	26
3.0	48	16
4.0	44	11
5.0	30	6

2.4.3 乙醇浓度对 AB-8 型树脂动态解吸性能的影响 由图 9 可知,当洗脱剂乙醇浓度为 100% 时,洗脱效果最好,随着洗脱剂乙醇浓度的下降,洗脱效果逐渐减弱,当乙醇浓度下降至 60% 时,洗脱能力较弱,洗脱中后期所得三萜洗脱液浓度基本不变。故选用 100% 的乙醇为最佳洗脱剂。

2.4.4 洗脱剂流速对 AB-8 型树脂动态解吸性能的影响 由表 10 所示,洗脱剂流速的变化对洗脱终点的影响并非十分显著,洗脱剂流速过大使洗脱剂不能充分与树脂吸附的三萜化合物发生物质交换,从而使洗脱终点提前,解吸效果减弱;流速过小会导致洗脱时间过长、工作效率降低,且对洗脱效果的提升并不显著。综合考虑洗脱效果与工作效率,确定 3 mL/min 为最佳洗脱剂流速。

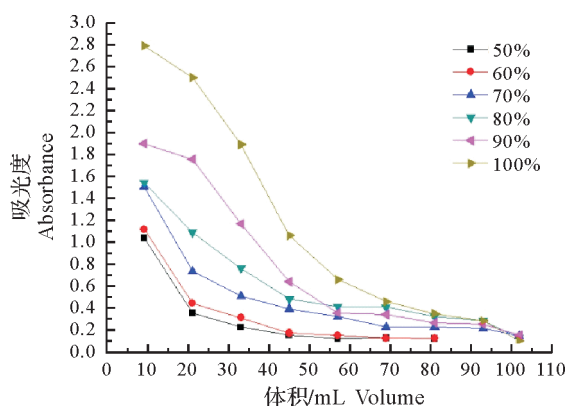


图 9 洗脱剂乙醇浓度对 AB-8 型树脂动态解吸性能的影响
Fig.9 Effect of ethanol concentration on dynamic desorption of total triterpenes from AB-8 resin

表 10 洗脱剂流速对 AB-8 型树脂动态解吸性能的影响

Tab10 Effect of eluent flow rate on dynamic desorption of total triterpenes from AB-8 resin

流速/(mL·min ⁻¹) Velocity of flow	洗脱终点/mL Elution terminal	洗脱时间/min Elution time
2	90	45
3	81	27
4	80	20
5	75	15
6	72	12

3 结 论

通过对所选 11 种树脂对裸花紫珠三萜吸附与解吸性能进行优选,筛选出最适于裸花紫珠三萜化合物吸附与解吸的树脂为 AB-8,静态吸附率为 43.17%,静态解吸率为 81.15%。在优选出影响 AB-8 树脂静动态吸附与解吸裸花紫珠三萜单因素条件下进行正交试验,确定 AB-8 树脂纯化裸花紫珠三萜的最佳工艺条件为:(1)静态吸附:吸附 pH5,吸附温度 35 ℃、吸附时间 8 h;(2)静态解吸:洗脱时间 4 h,洗脱温度 55 ℃,pH2 的无水乙醇;(3)动态吸附:浓度 1.5 mg/mL 40% 的乙醇溶液,流速 3 mL/min 上样;(4)动态解吸:流速 3 mL/min 的无水乙醇洗脱。在此条件下纯化,静态纯化后所得固形物中总三萜含量(28.11%)较纯化前提高 3.96 倍,动态纯化后所得固形物中总三萜含量(31.33%)较纯化前提高 4.42 倍,且纯化前后溶液由浑浊变为澄清(图 10)。说明 AB-8 型大孔树脂对裸花紫珠三萜具有一定的纯化作用,具备一定的应用前景。

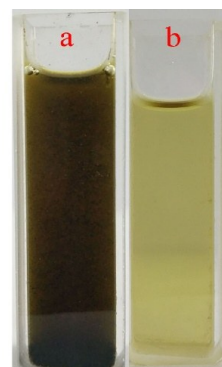


图 10 三萜溶液纯化前(a)及纯化后(b)的颜色对比

Fig.10 Color of untreated triterpene solution(a) with respect to the purified one(b)

参考文献 References:

- [1] 蔡金平,董琳,关薇薇,等.裸花紫珠的研究进展[J].现代药物与临床,2012,27(1):60-64.
CAI J P, DONG L, GUAN W W, et al. Research progress of *Callicarpa nuiiflora* [J]. Drugs & clinic, 2012, 27(1): 60-64.
- [2] 刘小芬,李顺祥.裸花紫珠研究进展[J].中南药学,2015,13(4):396-402.
LIU X F, LI S X. Research progress of *Callicarpa nuiiflora* [J]. Central south pharmacy, 2015, 13(4): 396-402.
- [3] 王艳.裸花紫珠的临床应用研究进展[J].现代中西医结合杂志,2014,23(35):3983-3985.
WANG Y. Research progress on clinical application of *Callicarpa nudiflora* [J]. Modern journal of integrated traditional Chinese and western medicine, 2014, 23(35): 3983-3985.

- [4] 张光杰,杜磊,袁超,等.三萜类化合物生物活性及应用研究进展[J].粮食与油脂,2017,30(10):1-5.
ZHANG G J, DU L, YUAN C, et al. Research progress on bioactivity and application of triterpenoids [J]. Cereals & oils, 2017, 30(10): 1-5.
- [5] 孙丽超,李淑英,王凤忠,等.萜类化合物的合成生物学研究进展[J].生物技术通报,2017,33(1):64-75.
SUN L C, LI S Y, WANG F Z, et al. Research progress in the synthetic biology of terpenoids [J]. Biotechnology bulletin, 2017, 33(1): 64-75.
- [6] 冯世秀,张旻,易博,等.裸花紫珠化学成分与药理活性研究进展[J].中草药,2017,48(5):1015-1026.
FENG S X, ZHANG M, YI B, et al. Research progress on chemical constituents in *Callicarpa nudiflora* and their pharmacological activities [J]. Chinese traditional and herbal drugs, 2017, 48(5): 1015-1026.
- [7] 王祝年,韩壮,崔海滨,等.裸花紫珠的化学成分[J].热带亚热带植物学报,2007,15(4):359-362.
WANG Z N, HAN Z, CUI H B, et al. Chemical constituents from *Callicarpa nudiflora* [J]. Journal of tropical and subtropical botany, 2007, 15(4): 359-362.
- [8] 张洁,李宝泉,冯锋,等.裸花紫珠的化学成分及其止血活性研究[J].中国中药杂志,2010,35(24):3297-3301.
ZHANG J, LI B Q, FENG F, et al. Chemical constituents from *Callicarpa nudiflora* and their hemostatic activity [J]. Chinese journal of Chinese materia medica, 2010, 35(24): 3297-3301.
- [9] 周志强.裸花紫珠化学成分的研究[D].南昌:南昌大学,2013.
ZHOU Z Q. Studies on the chemical constituents from *Callicarpa nudiflora* Hook [D]. Nanchang: Nanchang university, 2013.
- [10] 王亚红,周明,戴开武,等.大孔吸附树脂纯化瓦松总三萜成分的工艺[J].分子植物育种,2017,15(11):4654-4658.
WANG Y H, ZHOU M, DAI K W, et al. Purification technology of total triterpenoids in *Orostachys fimbriatus* (Turcz.) Berger. with macroporous resin [J]. Molecular plant breeding, 2017, 15(11): 4654-4658.
- [11] 吴海霞,吴彩娥,李婷婷,等.大孔树脂纯化银杏叶黄酮的研究[J].现代食品科技,2013,29(12):2964-2969.
WU H X, WU C E, LI T T, et al. Purification of flavones from *Ginkgo biloba* leaves by macroporous resin [J]. Modern food science and technology, 2013, 29(12): 2964-2969.
- [12] 曾臻,刘后根,洪艳平,等.大孔树脂纯化桃花总黄酮工艺及抗氧化性研究[J].江西农业大学学报,2017,39(1):182-189.
ZENG Z, LIU H G, HONG Y P, et al. A study on purification of total flavonoids from *Prunus persica* by macroporous resin and their antioxidant activity [J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2017, 39(1): 182-189.
- [13] 朱家庆,唐婷范,刘新梅,等.葛根多糖纯化工艺及其抗氧化性能研究[J].食品工业科技,2020,41(24):131-136.
ZHU J Q, TANG T F, LIU X M, et al. Study on purification technology of *Pueraria* polysaccharide and its antioxidant [J]. Science and technology of food industry, 2020, 41(24): 131-136.
- [14] 兰海,刘欣妍,余玲,等.大孔树脂纯化淫羊藿中朝藿定与淫羊藿苷工艺研究[J].中草药,2020,51(17):4473-4481.
LAN H, LIU X Y, YU L, et al. Purification process of epimedin and icariin from *Epimedium Folium* by macroporous resin [J]. Chinese traditional and herbal drugs, 2020, 51(17): 4473-4481.
- [15] 宋潇,黄胜,袁莉,等.裸花紫珠资源、化学成分及药理作用研究近况[J].中国医药导报,2017,14(6):45-48.
SONG X, HUANG S, YUAN L, et al. Research progress in resources, chemical composition and pharmacological effects of *Callicarpa nudiflora* [J]. China medical herald, 2017, 14(6): 45-48.
- [16] 刘勇,张鹏威,苏文琴,等.大孔吸附树脂纯化裸花紫珠总黄酮的工艺优选[J].医药导报,2015,34(5):640-643.
LIU Y, ZHANG P W, SU W Q, et al. Optimization of purification technology for total flavonoids from *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. by macroporous adsorption resin [J]. Herald of medicine, 2015, 34(5): 640-643.
- [17] 袁琦,侯林,刘相文,等.裸花紫珠总皂苷提取工艺研究[J].西部中医药,2017,30(4):27-30.
YUAN Q, HOU L, LIU X W, et al. Study on extracting methods of total saponins from *Callicarpa nudiflora* [J]. Western journal of traditional Chinese medicine, 2017, 30(4): 27-30.
- [18] 李国章,于华忠,卜晓英,等.分光光度法测定湘产苦丁茶中熊果酸含量[J].光谱实验室,2006,23(2):401-404.
LI G Z, YU H Z, BU X Y, et al. Determination of ursolic Acid in *Ilex Kudingcha* C. J. Tseng by Spectrophotometry [J]. Chinese journal of spectroscopy laboratory, 2006, 23(2): 401-404.
- [19] 李成刚,张永忠,迟玉杰,等.齐墩果酸分光光度法测定大豆异黄酮粉中总皂苷含量[J].东北农业大学学报,2008,161(7):13-16.
LI C G, ZHANG Y Z, CHI Y J, et al. Determination of saponin in soybean isoflavone by oleanolic acid spectrometry [J]. Journal of northeast agricultural university, 2008, 161(7): 13-16.
- [20] 陈朋,隋月红,刘丹,等.大孔树脂纯化枣叶中三萜类化合物的研究[J].食品工业,2015,36(6):212-215.
CHEN P, SUI Y H, LIU D, et al. Purification of total triterpenes from the leaves of *Ziziphus jujuba* Mill. Baill with macroporous resin [J]. The food industry, 2015, 36(6): 212-215.