

网络出版时间:2019-03-07 13:33 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.09.014
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190307.1332.028.html

茶枝柑叶总黄酮纯化工艺研究

汪金玉,张秋霞,陈 康,陶晨璐,武慧雯

(广州中医药大学 中药学院,广东 广州 510006)

【摘 要】 【目的】优化聚酰胺树脂纯化茶枝柑叶总黄酮的工艺,为茶枝柑叶的开发利用提供参考。【方法】以总黄酮吸附量及解吸率为指标,通过静态吸附与解吸试验,确定适合分离纯化茶枝柑叶总黄酮的聚酰胺树脂粒径。通过动态吸附与解吸试验,采用单因素试验与响应面法优化,研究聚酰胺树脂分离纯化茶枝柑叶总黄酮的工艺参数,并对最优工艺条件进行验证。【结果】200~300 目(48~75 μm)聚酰胺树脂较适用于纯化茶枝柑叶总黄酮。茶枝柑叶总黄酮最优纯化工艺为:上样液质量浓度(生药量)15 mg/mL,pH 值为 5,流速为 1.75 BV/h,上样量为聚酰胺树脂质量的 6 倍(湿质量),用 1.3 BV 的 75%(体积分数)乙醇洗脱。在该工艺条件下,所得纯化物中总黄酮得率为 64.17%。【结论】200~300 目(48~75 μm)聚酰胺树脂适用于茶枝柑叶总黄酮的分离纯化,且所得总黄酮纯度较高。

【关键词】 茶枝柑;总黄酮;聚酰胺树脂;纯化工艺

【中图分类号】 R284.2

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2019)09-0120-08

Purification technology of total flavonoids from *Citrus reticulata* ‘Chachi’ leaves

WANG Jinyu,ZHANG Qiuxia,CHEN Kang,TAO Chenlu,WU Huiwen

(School of Pharmaceutical Sciences,Guangzhou University of Chinese Medicine,Guangzhou,Guangdong 510006,China)

Abstract: 【Objective】 This study optimized the purification condition of total flavonoids from *Citrus reticulata* ‘Chachi’ leaves by polyamide resin. 【Method】 The adsorption rate and desorption rate of total flavonoids were used as indicators to determine the type of polyamide for static adsorption and desorption experiments. Through dynamic adsorption and desorption tests,single factor experiments and response surface methodology were used to optimize and determine the process parameters. 【Result】 The optimal conditions were:mesh of polyamide resin 48—75 μm ,mass concentration of the sample solution (raw drug dosage) 15 mg/mL,pH 5,flow rate 1.75 BV/h,sample volume 6 times polyamide resin volume (wet weight),and elution by 75% ethanol for 1.3 BV. Under these conditions,the extract rate of total flavonoids was 64.17%. 【Conclusion】 The 48—75 μm polyamide resin was suitable for separation and purification of total flavonoids from leaves of *Citrus reticulata* ‘Chachi’.

Key words: *Citrus reticulata* ‘Chachi’;total flavonoids;polyamide resin;purification technology

茶枝柑(*Citrus reticulata* ‘Chachi’)隶属芸香科柑橘属,其多个部位如果皮、籽等都有一定的药用价值。其中,茶枝柑的干燥成熟果皮具有悠久的药

食两用历史,也是广东道地药材“广陈皮”的原材料^[1]。目前国内外对于茶枝柑的研究主要集中在果皮的化学成分^[2-3]、药理药效^[4-6]及种质资源^[7-8]等方

【收稿日期】 2018-07-19

【基金项目】 广东省中医药建设专项资金面上项目(20171082);广州中医药大学 2017 年校级大学生创新创业训练计划项目(201710572208)

【作者简介】 汪金玉(1983—),女,安徽无为,人,博士,主要从事中药开发利用及饮片炮制加工研究。
E-mail:wangjinyu@gzucm.edu.cn

面,亦有茶枝柑籽的相关报道^[9],但尚未见有关茶枝柑叶中化学成分分析及开发利用的研究报道。茶枝柑四季常青,每年会在休果期裁剪掉部分枝叶,这些被裁剪的树叶除少量被用于制茶外多被丢弃,造成了资源的浪费,因此研究茶枝柑叶的利用具有重要的实际意义。

黄酮类化合物在抗炎镇痛、免疫调节、抗氧化^[10-13]等方面均有较优异的应用价值。研究表明,广陈皮主含黄酮类成分和挥发油,从中可分离得到10余种黄酮类化合物,其中以橙皮苷含量最高,达3.0%~7.9%,其次为川陈皮素、橘皮素^[14]。茶枝柑同属植物橘叶中总黄酮含量为4.34%~6.59%,其中橙皮苷、川陈皮素、橘皮素3种黄酮类化合物含量为1.26%~2.18%^[15-16]。从植物基原学角度分析认为,茶枝柑叶也可能含有较丰富的黄酮类化合物。

目前用于黄酮类化合物纯化的材料主要有聚酰胺、大孔树脂^[17-18]等,聚酰胺的工作原理是其分子中的酰胺基可与黄酮类化合物分子中的酚羟基形成氢键缔合产生吸附,将黄酮类物质与其他成分分离,从而达到优化黄酮的效果^[19-20]。本试验利用聚酰胺树脂探究了茶枝柑叶提取物中总黄酮的静态、动态吸附与解吸过程,应用星点设计优化^[22-25]聚酰胺分离纯化茶枝柑叶总黄酮的工艺,以期茶枝柑叶总黄酮的纯化制备及其综合开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

茶枝柑叶于2017年3月采摘于广东省新会市,经广州中医药大学中药学院陈康教授鉴定,其基原植物为茶枝柑(*Citrus reticulata* ‘Chachi’),该凭证标本保存于广州中医药大学中药学院中药炮制实验室。

橙皮苷购于广东省食品药品检验所,批号:150912;不同粒径聚酰胺树脂,浙江四甲;氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝、无水乙醇等化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司,UV-5500PC型),分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司,BT125D,精度0.01 mg),恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂,DZWK-S-5),SHA-B型水浴恒温振荡器(金坛市科析仪器有限公司),pH计(上海盛磁仪器有限公司,Model PHS-3C),电子天

平(广州湘仪机电设备有限公司,AUY 120),SHZ-DⅢ循环水式多用真空泵(巩义市英峪予华仪器厂),层析柱(直径2 cm,长30 cm,1 BV=94 mL)。

1.3 方法

1.3.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒质量的橙皮苷对照品5.82 mg,置50 mL容量瓶中,用体积分数50%乙醇加至刻度,摇匀即得对照品溶液(0.114 6 mg/mL)。

1.3.2 供试品溶液的制备 称取茶枝柑叶50 g,切宽丝,置于圆底烧瓶中,以1:10的料液比加入体积分数50%乙醇回流提取2次,每次1 h,合并2次滤液。放在水浴锅上挥至无醇味,用蒸馏水定容至500 mL,即得茶枝柑叶提取液,冷藏保存,备用。

1.3.3 总黄酮含量检测波长的确定与标准曲线的绘制 借鉴同属植物橘叶中总黄酮含量测定方法^[11],取待测茶枝柑叶提取液1 mL,置于25 mL容量瓶中,加质量分数5% NaNO₂溶液1 mL,摇匀,放置6 min;再加入质量分数10% Al(NO₃)₃溶液1 mL,摇匀,放置6 min;加质量分数10% NaOH溶液10 mL,用体积分数50%乙醇定容,摇匀,放置15 min后,在200~800 nm进行全波长扫描,确定检测波长。

梯度量取橙皮苷对照品溶液2,3,4,5,6 mL,按上述显色方法和检测波长测定吸光度。以质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,构建标准曲线方程。

1.3.4 聚酰胺树脂的预处理 将聚酰胺树脂用体积分数95%乙醇浸泡过夜,使其充分溶胀,倾去乙醇漂浮物后湿法装柱,加体积分数95%乙醇洗脱,至流出液经水浴蒸干后无固体残渣为止,用蒸馏水洗脱至无醇味,备用。

1.3.5 聚酰胺树脂对茶枝柑叶总黄酮的静态吸附与解吸 分别称取处理过的粒径分别为30~60目(250~550 μm)、60~100目(150~250 μm)、100~200目(75~150 μm)、200~300目(48~75 μm)的聚酰胺树脂2.0 g,置250 mL具塞锥形瓶中,加入50 mL茶枝柑叶提取液(上样液);置于25℃转速140 r/min的恒温振荡器上,振荡吸附12 h,取出,抽滤,抽滤液(吸附液)保存待测。用蒸馏水清洗树脂,过滤,倒回锥形瓶内;向锥形瓶中加入50 mL体积分数75%乙醇液,于25℃转速140 r/min的恒温振荡器上,振荡解吸24 h,取出,抽滤,保存抽滤液(解吸液)待测。按1.3.3节方法测定上样液、吸附液和解吸液的吸光度,按标准曲线回归方程计算各溶液中的总黄酮质量浓度,并以此计算静态吸附量Q

(mg/g)和解吸率 $J(\%)$ 。重复测试 3 次,取平均值,以筛选适用于吸附茶枝柑叶总黄酮的聚酰胺树脂。

$$Q=(C_0-C_1)\times V/M。(1)$$

$$J=C_2/(C_0-C_1)\times 100\%。(2)$$

式中: V 为溶液体积(mL), C_0 为提取液质量浓度(mg/mL), C_1 为吸附液质量浓度(mg/mL), C_2 为解吸液质量浓度(mg/mL), M 为树脂质量(g)。

1.4 聚酰胺树脂对茶枝柑叶总黄酮的动态吸附单因素试验

1.4.1 上样液质量浓度 称取适宜粒径的聚酰胺树脂 5.0 g(湿质量),湿法上柱。将 13.0,14.0,15.0,16.0,17.0,18.0 mg/mL,pH 为 4 的茶枝柑叶提取液各 150 mL 分别上柱,以 1 BV/h 的流速流过树脂柱,收集流出液,均用蒸馏水定容至适宜体积,测定总黄酮质量浓度,计算树脂的动态吸附率 Q_1 。重复测定 3 次,取平均值,分析上样液质量浓度对聚酰胺树脂吸附茶枝柑叶总黄酮的影响。

$$Q_1=(C_3V_3-C_4V_4)/C_3V_3\times 100\%。(3)$$

式中: C_3 为样品液质量浓度(mg/mL), V_3 为上样液体积(mL), C_4 为流出液质量浓度(mg/mL), V_4 为流出液体积(mL)。

1.4.2 上样液 pH 值 称取适宜粒径的聚酰胺树脂 5.0 g(湿质量),湿法上柱。将 15 mg/mL 的茶枝柑叶提取液,用 NaOH 或 HCl 将 pH 调至 3,4,5,6,7,各取 150 mL,分别以 1 BV/h 流速流过树脂柱,收集流出液。蒸馏水定容至适宜体积,测定黄酮质量浓度,计算吸附率 Q_1 。重复测定 3 次,取平均值,分析上样液 pH 值对聚酰胺树脂吸附茶枝柑叶总黄酮的影响。

1.4.3 上样液流速 称取适宜粒径的聚酰胺树脂 5.0 g(湿质量),湿法上柱。取 5 份质量浓度为 15 mg/mL,pH 为 4 的茶枝柑叶提取液 150 mL,分别以 1.25,1.5,1.75,2,2.25,2.5 BV/h 的流速流过树脂柱,收集流出液。蒸馏水定容至适宜体积,测定黄酮质量浓度,计算吸附率 Q_1 。重复测定 3 次,取平均值,分析上样液流速对聚酰胺树脂吸附茶枝柑叶总黄酮的影响。

1.5 聚酰胺树脂对茶枝柑叶总黄酮动态吸附工艺的响应面法优化

根据 Box-Benhnken 试验设计原理,综合茶枝柑叶动态吸附单因素试验结果,对上样液质量浓度、上样液 pH、上样液流速 3 个因素进行响应面试验设计,方案如表 1 所示。

表 1 茶枝柑叶总黄酮动态吸附工艺响应面优化试验方案
Table 1 Scheme in response surface test of
Citrus reticulata ‘Chachi’ leaves

水平 Level	因素 Factors		
	质量浓度/(mg·mL ⁻¹) Mass concentration	pH	流速/(BV·h ⁻¹) Flow rate
	A	B	C
—1	14	4	1.5
0	15	5	1.75
1	16	6	2

1.6 上样液泄漏曲线考察

称取经预处理的聚酰胺树脂 5.0 g(湿质量),湿法上柱,取 15 mg/mL、pH 为 5 的茶枝柑叶提取液上样,以 1.75 BV/h 的流速通过树脂柱,分段收集流出液,每 10 mL 为一流份,测定各流份中总黄酮的质量浓度,以流份体积为横坐标,总黄酮质量浓度为纵坐标,绘制动态吸附曲线。以流出液中总黄酮质量浓度达到上样液质量浓度的 10%时为泄漏点,总黄酮质量浓度为上样液质量浓度的 100%时为饱和点,从而确定适宜的最大上样体积。

1.7 茶枝柑叶总黄酮的动态解吸工艺优化

1.7.1 洗脱剂体积分数 称取处理过的聚酰胺树脂 5.0 g(湿质量),湿法上柱。取 15 mg/mL、pH 为 5 的茶枝柑叶提取液 30 mL 上样,以 1.75 BV/h 的流速流过树脂柱,吸附 30 min。先用蒸馏水洗去水溶性物质,再分别用体积分数 25%,50%,75%,95%乙醇溶液 2 BV 洗脱,收集洗脱液,定容至相同体积,测定吸光度,计算总黄酮质量浓度。重复测定 3 次,取平均值,分析洗脱剂体积分数对茶枝柑叶总黄酮解吸效果的影响。

1.7.2 洗脱剂用量 称取处理过的聚酰胺树脂 5.0 g(湿质量),湿法上柱。取 15 mg/mL、pH 为 5 的茶枝柑叶提取液 30 mL 上样,吸附 30 min。先用蒸馏水洗去水溶性物质,再用体积分数 75%乙醇洗脱,以 30 mL 为 1 个单位收集流出液,测其吸光度,计算总黄酮质量浓度。重复测定 3 次,取平均值,分析洗脱剂用量对茶枝柑叶总黄酮解吸效果的影响。

1.8 最佳工艺和纯化效果验证

利用 Design-Expert 软件对响应面试验结果进行多元回归拟合,根据模型极值求解结合等高线得到最佳吸附工艺参数。综合单因素结果和实际操作的便利,对工艺参数进行修正并重复试验 3 次,验证工艺的稳定性。分别量取一定体积的纯化前、纯化后溶液进行干燥,结合溶液质量浓度,计算总黄酮在干燥物中的含量,判断纯化效果。

2 结果与分析

2.1 茶枝柑叶总黄酮含量测定标准曲线的建立

按 1.3.3 节方法处理后,橙皮苷和茶枝柑叶提取液在 326 nm 处均有最大吸收,因此选择 326 nm 为茶枝柑叶总黄酮含量测定波长。橙皮苷测定标准曲线回归方程为 $Y=32.47X-0.04$,相关系数 $R^2=0.999\ 2$ 。式中, Y 为吸光度, X 为溶液质量浓度。

2.2 聚酰胺树脂对茶枝柑叶总黄酮的静态吸附与解吸效果

4 种粒径聚酰胺树脂对茶枝柑叶黄酮的静态吸附量和解吸结果如表 2 所示。

表 2 不同粒径聚酰胺树脂对茶枝柑叶总黄酮的静态吸附及解吸效果

Table 2 Static adsorption capacity and desorption rate of polyamide resins with different diameters

树脂粒径/ μm Diameter	吸附量/g Adsorption capacity	解吸率/% Desorption rate
250~550	157.89	62
150~250	81.73	74
75~150	142.85	89
48~75	153.90	95

由表 2 可见,不同粒径树脂的静态吸附量和解吸率存在较大差异,综合考虑认为,200~300 目

(48~75 μm)聚酰胺树脂效果较好,可用于下一步动态吸附试验。

2.3 聚酰胺树脂对茶枝柑叶总黄酮动态吸附的单因素试验结果

2.3.1 上样液质量浓度的影响 图 1-A 显示,茶枝柑叶提取液质量浓度在 13~15 mg/mL 时,聚酰胺树脂对茶枝柑叶总黄酮的吸附率不断增大;但超过 15 mg/mL 后,吸附率呈下降趋势,可能是因为质量浓度增大后黏度增加,不利于树脂的吸附,因此选择 14,15,16 mg/mL 作为上样液质量浓度的 3 个水平进行优化试验。

2.3.2 上样液 pH 值的影响 图 1-B 显示,pH 为 3 时聚酰胺树脂对茶枝柑叶提取液中总黄酮的吸附率最大,但同时溶液出现浑浊。可能是因为偏酸性的黄酮在酸性环境下析出所致,而其吸附率高可能是因为析出的黄酮类物质被拦截在树脂柱上方。综合考虑,选择 pH 值 4,5,6 进行优化试验。

2.3.3 上样液流速的影响 图 1-C 显示,上样液流速为 1.75 BV/h 时,聚酰胺树脂对茶枝柑叶提取液中总黄酮的吸附率最大,此后随着上样液流速的增大,吸附率呈下降趋势,这表明流速过快使得黄酮类物质来不及吸附,已被冲洗下来。因此选择流速为 1.5,1.75,2 BV/h 进行优化试验。

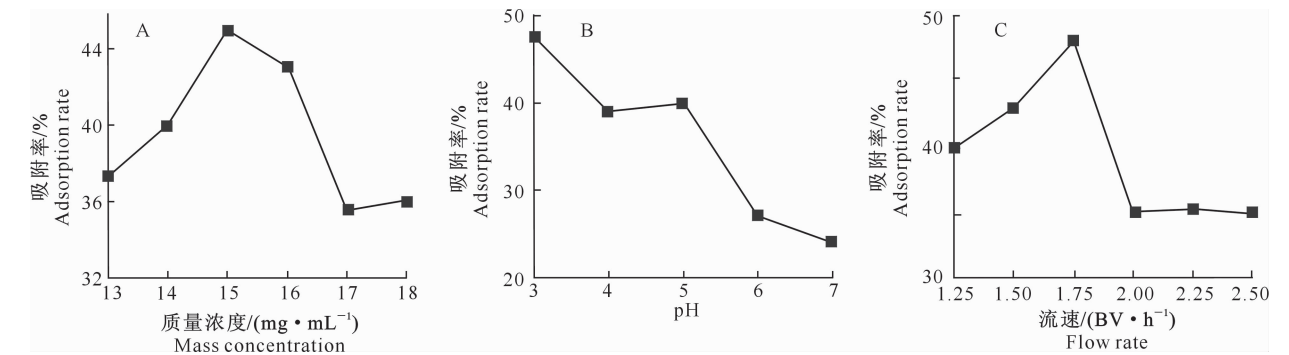


图 1 聚酰胺吸附茶枝柑叶总黄酮的单因素试验结果

Fig. 1 Single factor test of adsorption of total flavonoids by polyamide

2.4 聚酰胺树脂对茶枝柑叶总黄酮动态吸附工艺的响应面优化结果

对表 3 中试验数据进行二次多项式回归,得聚酰胺树脂对茶枝柑叶总黄酮吸附率与 3 个试验因素的回归方程为: $Y=47.03+1.91X_1-4.21X_2+0.025X_3-0.75X_1X_2-3.42X_1X_3-1.23X_2X_3-4.22X_1^2-12.32X_2^2-2.89X_3^2$ 。式中: Y 为吸附率, X_1 、 X_2 、 X_3 分别为上样液质量浓度(A)、pH(B)、流速(C)的编码值。

对回归方程的方差分析结果见表 4。由表 4 可

知,该模型 $P<0.000\ 1$,失拟项 $P>0.05$,表明模型具有较好的拟合性,可用于分析和预测。方程中 A、B 因素的一次项、二次项和 C 因素的二次项,以及交互项 AC 具有极显著($P<0.01$)差异;交互项 BC 具有显著性($P<0.05$)差异;C 因素的一次项和交互项 AB 差异不显著,表明各因素之间不是简单的线性关系。同时,由 3 个因素一次项的 F 值可以推断,其对聚酰胺树脂吸附茶枝柑叶总黄酮的影响排序为:B(上样液 pH)>A(上样液质量浓度)>C(上样液流速)。

从图 2 等高线图亦可以直观看 出,上样液质量浓度和 pH 等高线图 形较圆,说明两项之间的交互效 应较弱,而上样液质量浓度和上 样液流速与 pH 和上样液流速的 等高线图形则呈椭圆形,说明其 交互效应较强;此外,从等高线图 曲面倾斜度可知,上样液质量浓 度和上样液 pH 交互作用对聚酰 胺树脂吸附茶枝柑叶总黄酮的 影响最大,其次为上样液 pH 和 上样液流速,最小为上样液质量 浓度和上样

液流速。
综上可知,该回归模型是可靠 的。结合模型极值和等高线得 到最佳工艺为:上样液质量浓度 15.26 mg/mL,上样液流速 1.72 BV/h, 上样液 pH 4.83,最大吸附率理 论值为 48.27%。综合考虑单因 素试验结果和实际操作的便利, 将最佳工艺条件修正为:上样液 质量浓度 15 mg/mL,上样液流 速 1.75 BV/h,上样液 pH 5。

表 3 聚酰胺树脂对茶枝柑叶总黄酮动态吸附工艺的响应面优化结果(n=3)

Table 3 Design and results of RSM test of total flavonoids from *Citrus reticulata* ‘Chachi’ leaves

试验编号 Test number	上样液质量浓度/(mg·mL ⁻¹) Mass concentration A	pH B	流速/(BV·h ⁻¹) Flow rate C	吸附率/% Adsorption rate
1	15	5	1.75	47.2
2	16	5	1.5	46.1
3	15	5	1.75	47.3
4	15	4	2	38.1
5	14	5	2	40.6
6	15	6	1.5	28.0
7	16	4	1.75	37.0
8	15	6	2	26.9
9	16	5	2	38.0
10	14	5	1.5	35.0
11	15	4	1.5	34.3
12	14	4	1.75	32.1
13	14	6	1.75	25.5
14	15	5	1.75	50.1
15	16	6	1.75	27.4
16	15	5	1.75	46.6
17	15	5	1.75	47.1

表 4 茶枝柑叶总黄酮纯化工艺回归模型的方差分析

Table 4 ANOVA for response surface quadratic model of total flavonoids extraction from *Citrus reticulata* ‘Chachi’ leaves

方差来源 Analysis of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方差 Mean squares	F	P	显著性 Statistical significance
模型 Model	837.15	9	93.02	109.71	<0.000 1	**
X ₁	29.26	1	29.26	34.51	0.002 0	**
X ₂	141.96	1	141.96	167.44	<0.000 1	**
X ₃	0.005	1	0.005	0.005	0.941 8	
X ₁ X ₂	2.25	1	2.25	2.65	0.164 2	
X ₁ X ₃	46.92	1	46.92	55.34	0.000 7	**
X ₂ X ₃	6.00	1	6.00	7.08	0.044 8	*
X ₁ ²	65.65	1	65.65	77.43	0.000 3	**
X ₂ ²	560.12	1	560.12	660.65	<0.000 1	**
X ₃ ²	30.87	1	30.87	36.41	0.001 8	**
残差 Residual	4.23	5	0.85			
失拟项 Lack of fit	3.95	3	1.31	9.19	0.099 7	不显著 No significance
纯误差 Pure error	0.29	2	0.14			
总和 Cor total	841.39	14				

注: * 显著 P<0.05; * * 极显著 P<0.01。
Note: *, Significant at P<0.05; * *, Very significant at P<0.01.

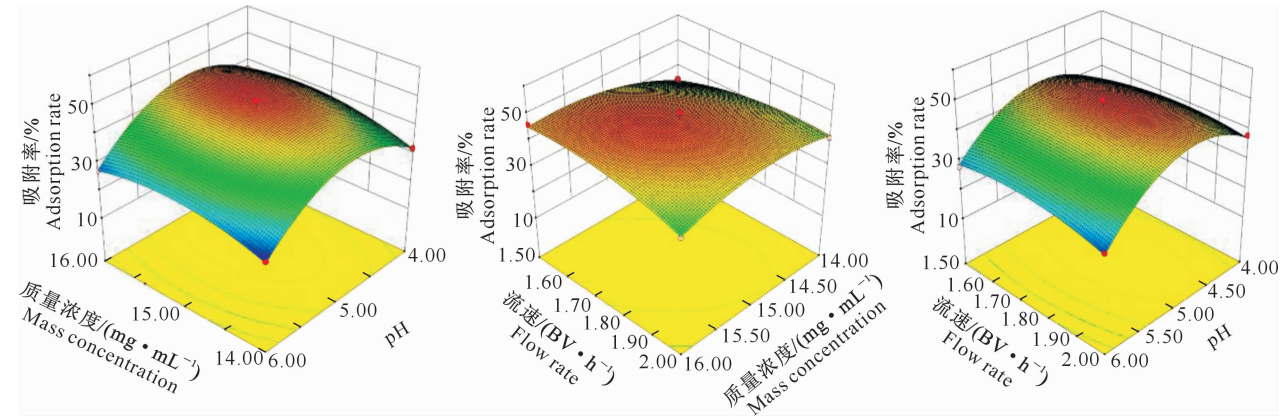


图2 各因素交互作用对聚酰胺树脂吸附茶枝柑叶总黄酮的影响

Fig.2 Effect of factors interaction on adsorption rate of total flavonoids from *Citrus reticulata* ‘Chachi’ leaves

2.5 聚酰胺树脂吸附茶枝柑叶总黄酮的泄漏曲线

图3显示,当流出液体积为30 mL时黄酮开始泄漏,至流出液体积为170 mL时基本不再发生变化,树脂柱达到吸附饱和,即加入170 mL质量浓度为15 mg/mL的茶枝柑叶提取液,可使5 g(湿质量)聚酰胺树脂吸附饱和。故确定该条件下最大上样体积为30 mL,约为树脂湿质量的6倍。

2.6 茶枝柑叶总黄酮的动态解吸

2.6.1 洗脱剂体积分数 图4-A显示,随着乙醇体积分数的增大,洗脱液对茶枝柑叶总黄酮的解吸率逐渐增大。当乙醇体积分数大于75%后,洗脱效果变化不大,综合考虑纯化效果和成本,选用体积分数75%乙醇进行洗脱。

2.6.2 洗脱剂用量 图4-B显示,当洗脱剂用量约为1BV时,流出的总黄酮质量浓度基本不再发生

变化,综合考虑洗脱率和成本,确定洗脱至总黄酮质量浓度基本不再变化,再增加1个洗脱单位(30 mL),即洗脱剂用量约为1.3 BV。

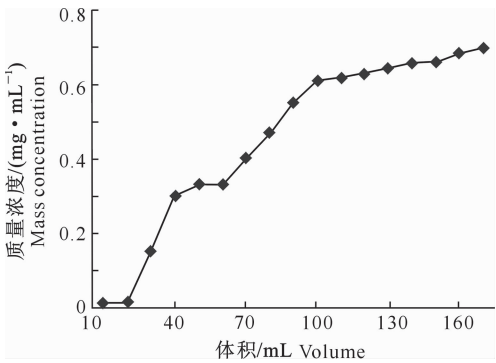


图3 聚酰胺树脂吸附茶枝柑叶总黄酮的泄漏曲线

Fig.3 Leakage curve of total flavonoids by polyamide from *Citrus reticulata* ‘Chachi’ leaves

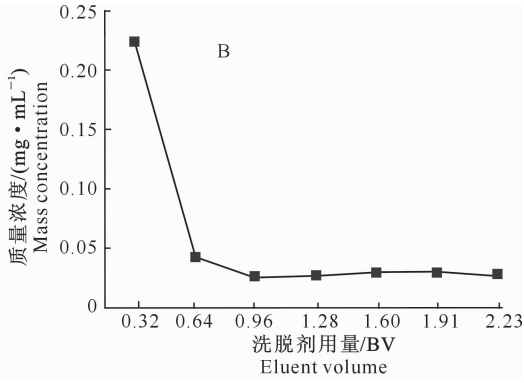
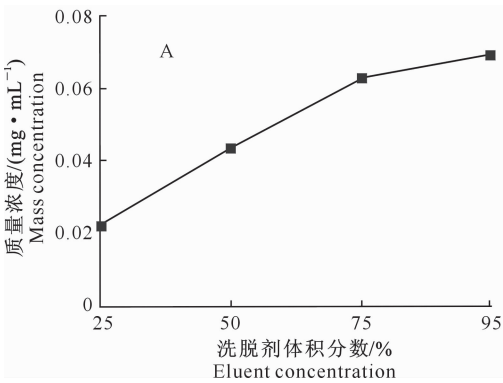


图4 洗脱剂对茶枝柑叶总黄酮解吸率的影响

Fig.4 Effect of eluent on desorption rate of total flavonoids from *Citrus reticulata* ‘Chachi’ leaves

2.7 最佳工艺验证

对所得最佳工艺条件的3次平行验证试验,以及总黄酮含量检测结果显示,纯化前溶液干燥物中总黄酮含量为6.50%,纯化后溶液干燥物中总黄酮含量为64.17%±0.93%(n=3),说明上述最佳工

艺稳定,且能有效纯化茶枝柑叶中的总黄酮。

3 讨论与结论

目前,大孔树脂被广泛应用于黄酮类化合物的纯化,本研究前期就2种常用树脂D101和AB-8对

茶枝柑叶总黄酮的纯化效果进行了初步考察,结果显示,两者虽然对色素类物质均有较好的吸附,但上柱后以水液洗脱时即大量流出,难以与其他大极性物质分离,说明 D101 和 AB-8 大孔树脂不适用于茶枝柑叶总黄酮的纯化。

预试验结果显示,本研究所用茶枝柑叶样品总黄酮含量达 5.69%,与同属植物橘叶总黄酮含量(4.34%~6.59%)^[11]较为接近,提示茶枝柑叶具有良好的研究开发价值。关于茶枝柑叶中黄酮类成分的组分、含量、功效等有待进一步研究。

通过静态吸附和解吸试验发现,纯化茶枝柑叶总黄酮的最适聚酰胺树脂粒径为 200~300 目(48~75 μm),该树脂对茶枝柑叶总黄酮具有较好的吸附和解吸性能,其纯化茶枝柑叶总黄酮的最佳工艺为:取树脂湿质量 6 倍量,质量浓度(生药量)15 mg/mL、pH 为 5 的上样液,以 1.75 BV/h 的流速流过树脂柱,吸附 30 min 后,以 1.3 BV、体积分数 75%的乙醇洗脱。在此条件下,茶枝柑叶醇提物中的总黄酮含量可提升至 64.17%。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:191.
China Pharmacopoeia Committee. The first part of the Chinese pharmacopoeia [M]. Beijing: Medicine Science and Technology Press of China, 2015:191.

[2] 唐 维,叶勇树,王国才,等. 广陈皮水提物的化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(4):30-33.
Tang W, Ye Y S, Wang G C, et al. Chemical constituents from *Citri reticulatae* Pericarpium [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2015, 21(4): 30-33.

[3] 欧小群,王 谨,杨秀梅,等. 新会茶枝柑果皮的挥发油指纹图谱建立和对比研究 [J]. 时珍国医国药,2015,26(4):895-897.
Ou X Q, Wang J, Yang X M, et al. Comparative study on GC-MS fingerprints of volatile oil in *Citrus reticulata* ‘Chachi’ stored less than 3 years and more than 3 years [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2015, 26(4): 895-897.

[4] 傅曼琴,肖更生,吴继军,等. 广陈皮促消化功能物质基础的研究 [J]. 中国食品科学,2018,18(1):56-63.
Fu M Q, Xiao G S, Wu J J, et al. Studies on chemical basis of digestion promoting function of Pericarpium Citri reticulatae (*Citrus reticulata* ‘Chachi’) [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(1): 56-63.

[5] 曹纬国,刘志勤,邵 云,等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展 [J]. 西北植物学报,2003,23(12):2241-2247.
Cao W G, Liu Z Q, Shao Y, et al. A progress in pharmacological research of flavonoids [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2003, 23(12): 2241-2247.

[6] 源瀚祺,黄庆华,张小英,等. 茶枝柑皮提取物中川陈皮素和橘皮素的大鼠肠吸收特性 [J]. 食品科学,2014(15):263-267.
Yuan H Q, Huang Q H, Zhang X Y, et al. Intestinal absorption properties in rats of nobiletin and tangeretin in ethanol extract of *Citrus reticulata* ‘Chachi’ peel by single pass perfusion model [J]. Food Science, 2014(15): 263-267.

[7] 席秀利,黄海波,楼步青,等. SCoT 分子标记对茶枝柑及近缘种遗传多态性分析 [J]. 中草药,2018,49(10):2426-2431.
Xi X L, Huang H B, Lou B Q, et al. Genetic polymorphism analysis of *Citrus reticulata* Blanco cv. *chachiensis* Tanaka and its relatives by SCoT molecular marker [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(10): 2426-2431.

[8] 席秀利,黄海波,楼步青,等. 广陈皮 DNA 提取优化及茶枝柑的 ISSR 分子鉴别 [J]. 江苏农业科学,2017,45(13):27-31.
Xi X L, Huang H B, Lou B Q, et al. Optimization of DNA extract from *Citri reticulatae* Pericarpium and ISSR molecular identification of *Citrus reticulata* Blanco cv. *chachiensis* Tanaka [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(13): 27-31.

[9] 杨春英,刘学铭,池建伟,等. 气相色谱-质谱联用法分析茶枝柑籽油脂肪酸和不皂化物组成 [J]. 食品安全质量检测学报,2017,8(11):4418-4423.
Yang C Y, Liu X M, Chi J W, et al. Analysis of fatty acid and unsaponifiable matter in *Citrus reticulata* cv. *chachiensis* seed oil by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2017, 8(11): 4418-4423.

[10] 甘伟发. 茶枝柑皮提取物中多糖成分的分离纯化及抗氧化活性研究 [D]. 广州:广东药学院,2013.
Gan W F. Studies on the purification and antioxidant activity polysaccharide from *Citrus reticulata* ‘Chachi’ peel extract [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2013.

[11] 杨 杰,沙金丹,高 翔. 黄酮类化合物的免疫调节作用及机制 [J]. 动物营养学报,2017,29(12):4295-4300.
Yang J, Sha J D, Gao X, et al. Immunomodulatory effect and mechanism of flavonoid compounds [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(12): 4295-4300.

[12] 刘程程,张彩云,郑奎玲,等. 甜茶黄酮回收工艺及抗氧化性研究 [J]. 食品工业科技,2017,38(9):201-205.
Liu C C, Zhang C Y, Zheng K L, et al. Study on recycling technology and antioxidant activities of total flavones of sweet tea [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(9): 201-205.

[13] 周 臻,李嘉俊. 龙须藤多甲氧基总黄酮对小鼠的急性毒性及抗胃溃疡作用研究 [J]. 中草药,2018,49(12):2942-2945.
Zhou Z, Li J J. A cute toxicity of total polymethoxyflavones from *Bauhinia championii* in mice and its effects on gastric ulcer [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(12): 2942-2945.

[14] 叶晓岚,宋粉云,范国荣,等. 高效液相色谱法同时测定广陈皮药材中的 11 种化学成分 [J]. 色谱,2015,33(4):423-427.
Ye X L, Song F Y, Fan G R, et al. Simultaneous determination of 11 constituents in *Citrus reticulata* ‘Chachi’ by high performance liquid chromatography [J]. Chinese J of Chromatog-

- raphy, 2015, 33(4): 423-427.
- [15] 汪金玉, 庄满贤, 林 励, 等. 正交设计优选橘叶总黄酮提取工艺 [J]. 食品研究与开发, 2012, 33(4): 72-74, 84.
Wang J Y, Zhuang M X, Lin L, et al. Optimization of the extraction technology of total flavonoids from Folium Citrus reticulatae by orthogonal experiment [J]. Food Research and Development, 2012, 33(4): 72-74, 84.
- [16] 汪金玉, 帅 欧, 林 励, 等. RP-HPLC 法同时测定橘叶中 3 个黄酮类成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(11): 2161-2163.
Wang J Y, Shuai O, Lin L, et al. RP-HPLC simultaneous determination of three flavonoid components in Folium Citri reticulatae [J]. Chin J Pharm Anal, 2011, 31(11): 2161-2163.
- [17] 兰卫, 郭玉婷, 胡江兰, 等. 大孔树脂分离纯化维药洋甘菊中黄酮工艺研究 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(3): 575-578.
Lan W, Guo Y T, Hu J L, et al. The optimal purification technology of flavone in Uygur medicine *Matricaria chamomilla* L. by macroporous resin [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2017, 28(3): 575-578.
- [18] 宋漫玲, 陶俊宇, 杨 剑, 等. 大孔吸附树脂分离纯化辣蓼总黄酮研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(1): 74-78.
Song M L, Tao J Y, Yang J, et al. Study on separation and purification of total flavonoids from *Polygonum hydropiper* Linn. by macroporous resin [J]. Chinese Journal of Information on TCM, 2018, 25(1): 74-78.
- [19] 王晓林, 金龙哲, 钟芳丽, 等. 桂皮总黄酮的纯化工艺及其抗氧化性研究 [J]. 中国食品添加剂, 2018(1): 119-127.
Wang X L, Jin L Z, Zhong F L, et al. Purification technology of total flavonoids in cinnamon with macroporous resin and its antioxidant ability [J]. China Food Additives, 2018(1): 119-127.
- [20] 周光姣, 孙宜坤, 王超群. 鸡血藤中总黄酮的聚酰胺树脂纯化工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12): 34-36.
Zhou G J, Sun Y K, Wang C Q. Optimization of purification technology of total flavonoids from *Spatholobi caulis* by polyamide column chromatography [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2014, 20(12): 34-36.
- [21] 王晓林, 金龙哲, 钟芳丽, 等. 聚酰胺纯化刺玫果总黄酮的工艺研究 [J]. 华中师范大学学报, 2017, 51(2): 189-194.
Wang X L, Jin L Z, Zhong F L, et al. Purification technology of total flavonoids in *Rosa davurica* Pall. with polyamide resin methods [J]. Journal of Central China Normal University, 2017, 51(2): 189-194.
- [22] 赵慧茹, 邹争强, 李 雪, 等. 星点设计-效应面法优化夏枯草总黄酮的富集纯化工艺 [J]. 中成药, 2017, 39(2): 427-430.
Zhao H R, Zou Z Q, Li X, et al. Study on purification of total flavonoids from *Prunella vulgaris* L. with the Box-behnken design [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2017, 39(2): 427-430.
- [23] 叶松华, 冯夏珍, 王晓燕, 等. Box-behnken 设计优化黄刺玫果总黄酮纯化工艺研究 [J]. 中国食品添加剂, 2017(10): 73-79.
Ye S H, Feng X Z, Wang X Y, et al. Study on purification of total flavonoids from fruit of *Rosa xanthina* Lindl with the Box-behnken design [J]. China Food Additives, 2017(10): 73-79.
- [24] 陈丽洁, 吕朝霞, 刘淑萍, 等. 栗毛球黄酮纯化工艺改进及其体外抗氧化性研究 [J]. 中药材, 2018, 41(4): 929-933.
Chen L J, Lü C X, Liu S P, et al. Purification technology of total flavonoids in involucre of *Castanea mollissima* Bl. and its antioxidant ability [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2018, 41(4): 929-933.
- [25] 杨聪颖, 骆亚丽, 郭时印, 等. 响应面优化金柑多酚的提取工艺研究 [J]. 现代食品科技, 2018, 34(5): 1-8.
Yang C Y, Luo Y L, Guo S Y, et al. Optimization of extraction process of polyphenols from kumquat by response surface methodology [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(5): 1-8.