

强阴离子交换固相萃取柱分离纯化柚皮苷

宁方刚¹, 许 晨², 许建中^{2,*}, 陈清西¹

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005;

2. 国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘 要:目的: 建立固相萃取分离纯化柚皮苷的方法。方法: 以强阴离子交换(strong anion exchange, SAX)填料为吸附材料, 利用柚皮苷与填料的功能基团之间的静电作用将柚皮苷吸附在填料上, 考察洗脱液离子强度、洗脱液体积, 洗脱流速对洗脱效果的影响。结果: 选用 5 mL 碳酸氢钠溶液(0.1 mol/L, pH9.0)为洗脱液, 以 0.5 mL/min 的流速进行洗脱, 回收率达到 91% 以上。结论: 本方法简单、高效, 选择性好, 可为柚皮苷样品的纯化提供理论依据。

关键词: 固相萃取; 强阴离子交换(SAX); 柚皮苷

Separation and Purification of Naringin by Solid Phase Extraction Using Strong Anion Exchange Cartridge

NING Fang-gang¹, XU Chen², XU Jian-zhong^{2,*}, CHEN Qing-xi¹

(1. College of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: Purpose: A solid-phase extraction procedure for the separation and purification of naringin (NG) was developed using strong anion exchange (SAX) cartridge. Method: Naringin was adsorbed onto the cartridge by electrostatic interaction between naringin and functional groups. Several variables affecting the elution performance of SAX, such as ionic strength of elution, elution volume and elution rate, were studied. Results: The application of 5 mL of sodium bicarbonate solution (0.1 mol/L, pH = 9.0) to elute SAX cartridge at a flow rate of 0.5 mL/min resulted in a recovery rate of 91%. Conclusions: The established method is simple and efficient.

Key words: solid phase extraction; strong anion exchange (SAX); naringin

中图分类号: O657.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)22-0051-04

柚皮苷(naringin)是一种二氢黄酮类化合物, 全称为柚皮素-7-O-新橙皮糖苷, 又称柚苷、柑橘苷、异橙皮苷, 主要存在于柚(*Citrus grandis*)、葡萄柚(*Citrus paradisi*)和酸橙(*Citrus aurantium*)及其变种的果皮及果实中^[1]。柚果皮中柚皮苷的含量(约为 1% ~ 6%)明显高于柚果实, 占柚皮中黄酮类化合物含量的 80% 以上, 分布于柚皮的不同部位, 随果实成熟程度的增加而降低^[2]。柚皮苷的结构如图 1 所示。

柚皮苷在降血脂^[3]、抗动脉粥样硬化^[4-5]、抗炎^[6-8]、抗氧化清除自由基^[9-12]、抗肿瘤抗癌^[13]、抗菌抗病毒^[14-15]、抗过敏作用^[16]、抗骨质疏松^[17]等方面都具有较强的生物活性。

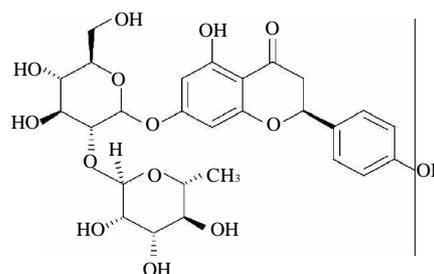


图 1 柚皮苷结构式

Fig.1 Structure of naringin

柚皮苷的分析检测方法多样, 大体有以下 4 种: 高效液相色谱法^[18]、毛细管电泳法^[19]、流动注射双安

收稿日期: 2011-06-03

基金项目: 福建省科技计划重点项目(2010Y0035)

作者简介: 宁方刚(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。E-mail: 15259294026@163.com

* 通信作者: 许建中(1954—), 男, 高级工程师, 本科, 研究方向为生物化工。E-mail: hyss.xjz@163.com

培法^[20]和薄层扫描法^[21]。其中反相高效液相色谱法占绝大多数,一般与固相萃取联用,因为该方法快速、灵敏、准确。

固相萃取法利用固相填料与目标物间的相互作用直接从样品溶液中对目标物进行提取分离,分离效率高,操作简单,可实现自动化,并可通过对固相填料进行表面修饰改性以提高选择性,且在分离的同时还可实现目标物的适度富集,所以应用范围越来越广泛。

在稀碱溶液中,柚皮苷分子中的酚羟基以离子形式存在,为弱酸根离子(NG^-),本实验以强阴离子交换填料为吸附材料,采用固相萃取技术对柚皮苷进行萃取分离。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

福建瑯溪蜜柚(*Citrus grandis* (L.) Osbeck. cv Guansi miyou)购于厦门,经过来源确认。

柚皮苷标准品 中国食品药品检定研究院;甲醇(色谱纯) 韩国SK Chemicals公司;乙酸(色谱纯) 美国Tedia公司;二甲基甲酰胺(DMF,分析纯) 国药集团化学试剂有限公司;NaOH、 CH_3COONa 、 NaHSO_4 、 NaH_2PO_4 、 NaNO_3 、 NaHCO_3 (分析纯) 西陇化工股份有限公司;Milli-Q纯水。

1.2 仪器与设备

Elite 1201型高效液相色谱系统(配有1201型高压恒流泵、1201型UV检测器、ZWII型柱温箱和1201型自动进样器) 大连依利特科学仪器公司;AS10200型超声仪 台湾Auto Science Technology公司;Al-104/01电子天平 瑞士梅特勒-托利多公司;Green ODS-AQ色谱柱(4.6mm \times 250mm, 5 μm)、Green ODS-AQ保护柱(4.6mm \times 10mm, 5 μm) 美国Boston Analytics公司;Cleanert SAX强阴离子交换固相萃取柱(以硅胶为基质,主要功能基团为三甲基胺丙基)(1g, 6mL) 天津博纳艾杰尔科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱:Green ODS-AQ色谱柱(4.6mm \times 250mm, 5 μm);流动相:甲醇-水-乙酸(45:55:0.1, V/V);流速:1.0mL/min;检测波长:283nm;柱温:30 $^\circ\text{C}$;进样量:10 μL 。

1.3.2 标准样品溶液配制

配制柚皮苷对照样品之前,将柚皮苷对照品置于105 $^\circ\text{C}$ 烘箱中干燥5h。精密称取26.5mg的柚皮苷对照品溶解于DMF溶液(DMF:H₂O = 20:80, V/V)中,并定容

于100mL容量瓶中,摇匀。再取该储备液用上述的DMF溶液稀释配成10.6~265.0mg/L工作溶液。

1.3.3 柚皮苷粗品提取

取瑯溪蜜柚果皮的白皮层,切成小块,先自然风干,再置于50 $^\circ\text{C}$ 真空烘箱干燥24h,粉碎,过100目筛网。称取100g粉末,按料液比1:8(g/mL)的比例浸泡在800mL 85 $^\circ\text{C}$ 的热水中1h,并不断搅拌,过滤得浸提液。按此法重复提取两次,合并浸提液,旋蒸浓缩至100mL。置于4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中结晶24h,滤出沉淀并干燥得柚皮苷粗提物。

1.3.4 供试样品配制

精密称取115.33mg柚皮苷粗提物,溶于1L 0.5mmol/L NaOH溶液中,经0.45 μm 过滤膜过滤,储存于4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。

1.3.5 固相萃取步骤与条件

活化:5mL甲醇,5mL纯水,流速为0.5mL/min;平衡:6mL 0.1mol/L乙酸钠溶液,流速为0.5mL/min;上样:0.5mL柚皮苷粗品溶液, pH 6.0,流速为0.5mL/min,然后真空抽干;淋洗:1mL纯水,流速为3mL/min,真空抽干;洗脱:不同洗脱液pH值、洗脱液体积、洗脱流速条件;再生:10mL甲醇,流速为3mL/min。

1.3.6 固相萃取柱的洗脱

分别取3mL相同浓度的硫酸氢钠、磷酸二氢钠、硝酸钠、柠檬酸钠、碳酸氢钠溶液作为洗脱液,以0.5mL/min的流速洗脱吸附有柚皮苷的固相萃取柱,考察洗脱液pH值的影响;确定好最佳洗脱液后,分别取1~7mL该洗脱液以0.5mL/min的流速进行洗脱,考察洗脱体积的影响;确定好最佳洗脱液和洗脱体积后,分别以0.5~12mL/min的流速进行洗脱,考察洗脱流速的影响。

2 结果与分析

2.1 粗提物中柚皮苷含量的测定

柚皮苷测定的标准曲线方程为 $y = 16.908x + 25.776$,结果显示,在给定的色谱条件下,柚皮苷在10.6~265.0mg/L范围内,其质量浓度与峰面积线性关系良好($r > 0.9997$)。

由图2可以看出,柚皮苷粗提物中柚皮苷与杂质的分离度高;杂质极性一般较大,很可能就是柚皮中的有机酸成分。此外,还有一定量的天然色素及其他杂质存在于粗提物中。使用外标法定量计算,柚皮苷的含量大约为75%。

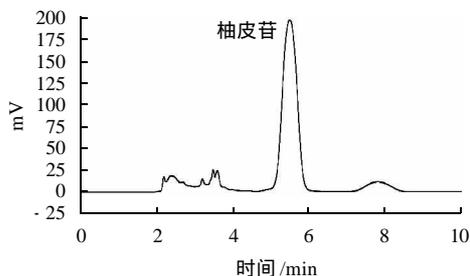


图2 柚皮苷提取物的高效液相色谱图
Fig.2 HPLC chromatogram of naringin extract

2.2 固相萃取洗脱条件

2.2.1 固相萃取柱的活化和平衡

强阴离子交换柱(strong anion exchange, SAX)前期的处理程序比 C₁₈ 柱要复杂一些, 具体步骤是: 甲醇活化 SAX 填料, 使之充分活化; 纯水替换甲醇, 使基质效应降低到尽可能小; 最后用弱酸根离子平衡, 使柱上的活性基团充分替换为弱酸根离子。未经弱酸根离子平衡处理的填料对柚皮苷的吸附率最高为 45% 左右, 而经过平衡处理的填料对柚皮苷的吸附率得到了极大的提高。通过多次试验, 最终选用醋酸钠作为平衡溶液, 平衡处理后的填料对柚皮苷的吸附率接近 100%。

$$\text{吸附率} / \% = \frac{\text{上样量} - \text{渗漏量}}{\text{上样量}} \times 100 = \frac{\text{柱载样量}}{\text{上样量}} \times 100$$

式中: 渗漏量是指上完样后未吸附在柱上的柚皮苷质量与淋洗液中的柚皮苷质量之和。渗漏量的计算是先基于外标法计算出溶液中柚皮苷的质量浓度, 再测定溶液体积, 最后二者相乘即可。

2.2.2 洗脱液离子强度的影响

选择不同 pH 值的盐类化合物配制成相同浓度的洗脱液, 考察不同洗脱液对柚皮苷的洗脱效果的影响, 实验结果见表 1。

从表 1 可知, 用不同 pH 值的洗脱剂洗脱吸附于固相柱上的柚皮苷, 其回收率随洗脱 pH 值的变化规律为: pH1.5 ~ 6.0 时, 随着洗脱液 pH 值的升高, 柚皮

苷的回收率呈下降趋势; 而 pH6.0 ~ 9.0 时, 随着洗脱液 pH 值的升高, 柚皮苷的回收率呈上升趋势。由此可见, 低 pH 值和高 pH 值的条件均有利于柚皮苷的洗脱而不利于柚皮苷的吸附。pH6 的条件最不利于柚皮苷的洗脱。

从离子强度的角度来看, 不同种类的阴离子在离子交换过程中表现出来的优势是不一样的: 类似碳酸氢钠的强碱弱酸盐的电离使溶液呈碱性, 此时它是较为理想的洗脱剂; 硝酸钠这样的强酸强碱盐的电离使溶液接近中性, 因此它不宜用于洗脱柚皮苷。

综上所述, 离子强度和 pH 值对柚皮苷洗脱效果的作用机理复杂, 还需进一步的探讨。

2.2.3 洗脱液体积的影响

选择最佳的洗脱剂种类和 pH 值条件, 即 0.1mol/L 碳酸氢钠溶液(pH9.0), 以不同洗脱液体积洗脱吸附于固相柱上的柚皮苷, 考察洗脱体积对柚皮苷的洗脱效果, 结果见表 2。

表 2 洗脱液体积对柚皮苷洗脱效果的影响
Table 2 Effect of elution volume on naringin desorption

上样量/μg	柱载样量/μg	洗脱液体积/mL	解吸量/μg	回收率/%
43.25	42.94 ± 0.04	1	14.39 ± 0.13	33.26
43.25	42.84 ± 0.10	2	34.64 ± 0.0	80.10
43.25	42.82 ± 0.02	3	35.63 ± 0.09	82.39
43.25	43.01 ± 0.07	4	36.67 ± 0.10	84.79
43.25	43.05 ± 0.02	5	39.40 ± 0.05	91.11
43.25	42.98 ± 0.07	6	39.41 ± 0.01	91.12
43.25	43.04 ± 0.05	7	39.43 ± 0.11	91.17

从表 2 可得: 在一定的洗脱液体积范围内, 随洗脱液用量的增加, 柚皮苷回收率不断升高; 当用量达到 5mL 时, 再增加洗脱液用量对柚皮苷回收率的提高无明显效果。考虑到成本因素, 选用 5mL 0.1mol/L 碳酸氢钠溶液(pH9.0)洗脱剂既经济, 又能达到良好的洗脱效果。在 0.5mL/min 的流速下进行洗脱, 柚皮苷的回收率达到 91% 以上, 洗脱效果良好。

表 1 洗脱液离子强度对柚皮苷洗脱效果的影响
Table 1 Effect of ionic strength on naringin desorption

上样量/μg	柱载样量/μg	洗脱液	洗脱液体积/mL	解吸量/μg	回收率/%
43.25	43.11 ± 0.02	0.1mol/L 硫酸氢钠(pH1.5)	3	33.87 ± 0.11	78.31
43.25	43.13 ± 0.01	0.1mol/L 磷酸二氢钠(pH4.5)	3	34.35 ± 0.09	79.42
43.25	43.12 ± 0.02	0.1mol/L 硝酸钠(pH6.0)	3	30.95 ± 0.11	71.56
43.25	42.48 ± 0.05	0.1mol/L 柠檬酸钠(pH7.5)	3	33.46 ± 0.07	77.36
43.25	42.82 ± 0.02	0.1mol/L 碳酸氢钠(pH9.0)	3	35.63 ± 0.09	82.39

注: 柱载样量 = 上样量 - 渗漏量; 柱载样量和解吸量均以“平均值 ± 绝对误差”表示(n = 3); 回收率/% = 解吸量平均值 / 上样量 × 100。下同。

2.2.4 洗脱流速的影响

根据以上实验结果,固定洗脱剂为0.1mol/L 碳酸氢钠溶液(pH9.0),用量5mL,以不同洗脱流速洗脱吸附与固相柱上的柚皮苷,考察洗脱流速对柚皮苷的洗脱效果,结果见表3。

表3 洗脱流速对柚皮苷洗脱效果的影响
Table 3 Effect of elution flow rate on naringin desorption

上样量/ μg	柱载样量/ μg	洗脱液流速/(mL/min)	解吸量/ μg	回收率/%
43.25	43.05 \pm 0.02	0.5	39.40 \pm 0.05	91.11
43.25	43.06 \pm 0.05	3	37.83 \pm 0.10	87.50
43.25	43.04 \pm 0.04	6	36.68 \pm 0.14	85.09
43.25	43.04 \pm 0.07	9	35.84 \pm 0.20	83.19
43.25	43.06 \pm 0.09	12	34.68 \pm 0.16	80.23

由表3可得,在一定的洗脱流速范围内,随洗脱流速的增大,柚皮苷回收率呈降低的趋势。在洗脱液用量相同情况下,流速越大,洗脱时间越短,有效洗脱接触时间越有限,洗脱效果越差。

综合以上结果,选用5mL 0.1mol/L 碳酸氢钠(pH9.0)溶液,以0.5mL/min的流速进行洗脱,回收率可以达到91%以上,洗脱效果良好。

2.2.5 洗脱液中柚皮苷纯度的检验

为了检测柚皮苷在洗脱液中的纯度,现以1mL 0.1mol/L 碳酸氢钠溶液(pH9.0)为洗脱剂,以0.5mL/min的流速进行洗脱,洗脱液经滤膜过滤,进高效液相色谱仪,测得的色谱图如图3所示。

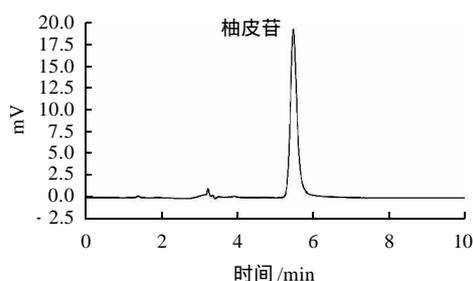


图3 洗脱液高效液相色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram showing naringin purity

通过比较图2、3可以看出,洗脱液中杂质少,柚皮苷纯度高,柚皮苷与杂质的分离度大,基线相当平稳;因此,固相萃取-反相高效液相色谱法分离、检测柚皮苷快速、准确、灵敏。

3 结论

本实验所建立的柚皮苷分离提取的固相萃取方法,

成本低,产品中杂质较少、柚皮苷纯度高,方法操作简便,选择性好。若进一步优化固相萃取条件,柚皮苷的回收率还有提高的空间。固相萃取-反相高效液相色谱法分离、检测柚皮苷快速、准确、灵敏。

参考文献:

- [1] 贾冬英,姚开,谭敏,等. 柚果皮中生理活性成分研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(11): 74-78.
- [2] 周强. 柚皮与柚籽中果胶、柚皮苷和类柠檬苦素的提取研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2007.
- [3] JEON S M, PARK Y B, CHOI M S. Antihypercholesterolemic property of naringin alters plasma and tissue lipids, cholesterol-regulating enzymes, fecal sterol and tissue morphology in rabbits[J]. Clinical Nutrition, 2004, 23(5): 1025-1034.
- [4] LEE C H, JEONG T S, CHOI Y K, et al. Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, associated with hepatic ACAT and aortic VCAM-1 and MCP-1 in high cholesterol-fed rabbits[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 284(3): 681-688.
- [5] LEE C H, HYUN B H, CHOI Y K, et al. Anti-atherogenic effects of citrus bioflavonoids, naringin and naringenin, and their metabolite in high cholesterol-fed rabbits[J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2001, 21(4): 289-289.
- [6] FOTSIS T, PEPPER M, ADLERCREUTZ H, et al. Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and *in vitro* angiogenesis[J]. The Journal of Nutrition, 1995, 125(Suppl 3): 790-797.
- [7] AMARO M I, ROCHA J, VILA-REAL H, et al. Anti-inflammatory activity of naringin and the biosynthesised naringenin by naringinase immobilized in microstructured materials in a model of DSS-induced colitis in mice[J]. Food Research International, 2009, 42(8): 1010-1017.
- [8] RIBEIRO M, BARATEIRO A, VILA-REAL H, et al. Anti-inflammatory effect of naringin and naringenin on TNF- α secretion in cultured cortical astrocytes after stimulation with LPS[J]. New Biotechnology, 2009, 25(Suppl 1): 10-11.
- [9] 贾冬英,姚开,何强,等. 柚皮苷-金属配合物的抗氧化活性研究[J]. 中国油脂, 2005, 30(4): 30-33.
- [10] 李亦翎,俞建,曾亮,等. 柚皮苷对猪肉的抗氧化作用的研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(10): 20-23.
- [11] CAVIA-SAIZ M, BUSTO M D, PILAR-IZQUIERDO M C, et al. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(7): 1238-1244.
- [12] JEON S M, BOK S H, JANG M K, et al. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits[J]. Life Sciences, 2001, 69(24): 2855-2866.
- [13] 马波,李梦龙,周在德. 黄酮体化合物抗肿瘤活性的量子化学研究[J]. 化学研究与应用, 2002, 14(2): 149-152.
- [14] MARTIN M J, MARHUENDA E, PEREZ-GUERRERO C, et al. Anti-ulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rats[J]. Pharmacology, 1994, 49(3): 144-150.
- [15] GAO S, LI P, YANG H, et al. Antitussive effect of naringin on experimentally induced cough in Guinea pigs[J]. Planta medica, 2011, 77(1): 16-21.
- [16] 冯宝民,蒋蓓,贾景明,等. 柚皮苷和新橙皮苷抗过敏作用的研究[J]. 大连大学学报, 2005, 26(4): 63-64.
- [17] WEI Min, YANG Zhonglin, LI Ping, et al. Anti-osteoporosis activity of naringin in the retinoic acid-induced osteoporosis model[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2007, 35(4): 663-667.
- [18] 庞瑞,杨中林. 不同产地不同品种柚皮中总黄酮和柚皮苷的含量比较[J]. 药学与临床研究, 2007, 15(3): 205-207.
- [19] 魏胜华,孟娜,伍和芳,等. 毛细管电泳法测定柚皮中柚皮苷的含量[J]. 光谱实验室, 2011, 28(2): 853-856.
- [20] 孙家娟,刘彬,尚永辉,等. 流动注射双安培法测定柚皮苷[J]. 分析试验室, 2006, 25(12): 29.
- [21] 李晓光,林励,陈志霞. 薄层扫描法测定化橘红中柚皮苷含量[J]. 浙江中医学报, 2003, 27(1): 82.