

大孔树脂富集纯化木棉花总黄酮的工艺优选

朱锦坤^{1,2}, 张全伟^{1,3}, 张奕丹¹, 曾雪兰¹, 王术玲^{1*}

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 暨南大学药学院, 广州 510632;
3. 汕头大学医学院, 广东 汕头 515041)

[摘要] 目的: 优选木棉花总黄酮的大孔树脂纯化工艺。方法: 采用UV测定总黄酮含量, 以总黄酮吸附率、洗脱率为指标, 通过静态洗脱-洗脱试验筛选树脂类型, 利用单因素试验考察上样液质量浓度、pH、吸附流速、洗脱溶剂、水洗用量、上样量、洗脱剂用量等对木棉花总黄酮纯化工艺的影响。结果: 选用DM-130型大孔树脂, 最佳吸附-洗脱条件为上样液质量浓度4.89 g·L⁻¹, pH 4, 吸附流速3 BV·h⁻¹, 加水5 BV除杂, 加50%乙醇3 BV以2 BV·h⁻¹洗脱; 总黄酮纯度由上样液的13.33%提高至77.68%。结论: DM-130型大孔树脂可用于富集纯化木棉花总黄酮, 该方法操作简单、成本低廉、纯化效果突出, 具有较高的工业生产应用前景。

[关键词] 木棉花; 总黄酮; DM-130型大孔树脂; 富集纯化; 静态吸附-洗脱

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0019-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110019

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140324.1543.006.html>

[网络出版时间] 2014-03-24 15:43

Optimization of Enrichment and Purification Process for Total Flavonoids from Gossampini Flos by Macroporous Resin

ZHU Jin-kun^{1,2}, ZHANG Quan-wei^{1,3}, ZHANG Yi-dan¹, ZENG Xue-lan¹, WANG Shu-ling^{1*}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

[收稿日期] 20130905(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102530); 国家大学生创新创业训练计划项目(AFE112131A41)

[第一作者] 朱锦坤, 在读硕士, 从事中药学研究, Tel: 13502440109, E-mail: zjkschool@foxmail.com

[通讯作者] * 王术玲, 副教授, 硕士生导师, 从事中药质量标准研究, Tel: 020-39358081, E-mail: jingelwang@gzucm.edu.cn

因肠道功能紊乱等原因引发^[9], 本文仅对木香醇提取物油脂类成分的药理作用进行初步研究, 其具体成分及致泻机制尚不明确。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 57.
[2] 魏华, 彭勇, 马国需, 等. 木香有效成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(3): 613.
[3] 王永兵, 王强, 毛福林, 等. 木香的药效学研究[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(2): 146.
[4] 吴秦西, 赖先荣. 均匀设计法优选川木香提取物提取工艺[J]. 中外医疗, 2008(32): 89.
[5] 周广涛, 高鹏, 戴兵, 等. 木香中去氢木香内酯和木香

烃内酯提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 40.

[6] 冯庆华. 玫瑰精油系列产品的提取及工艺研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2010.
[7] 周干南, 胡芝华, 汪亚先, 等. 小鼠腹泻模型的制备与腹泻指数的应用[J]. 中草药, 1994, 25(4): 195.
[8] 曹灵芝, 马利芹, 王丽叶, 等. 建立动物腹泻模型的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(26): 11383.
[9] Moriya R, Shirakura T, Hirose H, et al. NPY Y2 receptor agonist PYY (3-36) inhibits diarrhea by reducing intestinal fluid secretion and slowing colonic transit in mice[J]. Peptides, 2010, 31(4): 671.

[责任编辑 刘德文]

2. College of Pharmacy, Ji'nan University, Guangzhou 510632, China;

3. Medical College, Shantou University, Shantou 515041, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize enrichment and purification technology of total flavonoids from Gossampini Flos with macroporous resin. **Method:** The content of total flavonoids was determined by UV, taking adsorption rate and desorption rate as index, resin type was screened by static adsorption-elution test, single factor tests were adopted to investigate effects of the concentration of sample solution, pH, adsorption rate, desorption solvent, water amounts, the amount of sample solution and other factors on purification process. **Result:** It was proved that DM-130 resin could effectively enrich total flavonoids from Gossampini Flos, optimum purification process was as following: the concentration of sample solution $4.89 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH of 4.0, flow rate for sampling of $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, removed impurities by 5 BV of water and then eluted total flavonoids with 3 BV of 50% ethanol at flow rate of $2.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$; purity of total flavonoids increased from 13.33% in sample solution to 77.68% in eluant. **Conclusion:** DM-130 resin could be used for purification and enrichment of total flavonoids from Gossampini Flos, which had high industrial production value with characteristics of easy operation, low cost and highlight purification effect.

[Key words] Gossampini Flos; total flavonoids; DM-130 macroporous resin; enrichment and purification; static adsorption-elution

木棉花别名斑枝花、琼枝、攀枝花,味甘、淡,性凉,归大肠经,功能清热凉血、利湿解毒,临床用于治疗泄泻、痢疾、疮毒、咳血、痔疮出血等症^[1]。作为广州的市花,民间常用木棉花煮糖水以祛湿气,故可尝试将其开发成袋泡茶等现代剂型。其富含黄酮类成分^[2-3],具有抗炎、抗肿瘤、保肝等作用^[4-7]。本实验拟采用大孔树脂富集纯化木棉花总黄酮,通过单因素试验优选工艺参数,为该药味的现代开发提供参考。

1 材料

Genesys TM2 型紫外-可见分光光度计(Spectronic 公司),TM-B 型电子天平(余姚市纪铭称重校验设备有限公司),LIBROR AEG-220 型分析天平(日本岛津公司),HY-4 型调速多用振荡器(江苏金坛市宏华仪器厂),XMTD-8222 型烘箱(精宏设备有限公司)。木棉花药材购自广州采芝林药业有限公司,经广州中医药大学中药分析教研室王术玲副教授鉴定为木棉科植物木棉 *Bombax malabaricum* (DC.) Merr. 的干燥花;DA-201,DM-01,DM-130,AB-8,D-101 型大孔吸附树脂(沧州宝恩吸附材料有限公司),芦丁对照品(批号 100080-200707,中国食品药品检定研究院),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品

适量,加 50% 乙醇溶解并配成 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液,即得。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密吸取对照品溶液 0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇至 5 mL,加入 5% NaNO_2 溶液 0.3 mL,摇匀,静置 6 min,加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.3 mL,摇匀,静置 6 min,加入 4% NaOH 溶液 4 mL,用 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,静置 15 min,于 510 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $A = 0.0135C + 0.0078$ ($r = 0.999$),线性范围 $5.00 \sim 50.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.3 供试品溶液的制备及测定 取木棉花药材粉末适量,加适量 70% 乙醇超声提取 2 次,每次 40 min,过滤,水浴蒸干,加水溶解,离心($3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min),取上清液稀释至适宜浓度,备用。按 2.1.2 项下方法显色,于 510 nm 处测定 A,计算总黄酮含量。

2.2 树脂的筛选 精密称取各型号树脂约 1.0 g (干质量),分别置于 25 mL 量瓶中,加供试品溶液(总黄酮 $1.70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)稀释至刻度,置恒温摇床中振荡 24 h,测定溶液中总黄酮含量,计算树脂吸附率;取上述 5 种吸附后的树脂,依次加水和 50% 乙醇稀释至刻度,置振荡 24 h,测定洗脱液中总黄酮含量,计算洗脱率,结果见表 1,故选择 DM-130 型大孔吸附树脂。

表1 5种型号大孔吸附树脂对木棉花总黄酮静态吸附率和洗脱率的影响 %

型号	吸附率	水洗脱率	50%乙醇洗脱率
AB-8	75.61	11.40	59.57
DA-201	71.15	9.17	42.46
DM-130	78.29	8.87	58.09
D-101	77.12	9.18	52.18
DM-301	72.63	11.11	50.01

2.3 吸附性能考察

2.3.1 样品液 pH 调节 木棉花样品溶液(总黄酮 $2.42 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) pH 分别为 3, 3.5, 4(原液), 4.5, 5, 依次定容至装有 DM-130 型大孔树脂的 25 mL 量瓶中, 恒温摇床中振摇 24 h, 计算静态吸附率, 结果表明随 pH 增大, 大孔树脂对总黄酮的吸附率逐渐增大, 于 pH 4 时吸附率达最高值, 之后随 pH 的增大, 吸附率降低, 故选择样品溶液 pH 4。

2.3.2 吸附时间 精密称取 DM-130 型大孔吸附树脂适量, 置 25 mL 量瓶中, 加木棉花样品溶液(总黄酮 $2.42 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 稀释至刻度, 置于恒温摇床中振摇, 分别于 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 h 取样, 计算树脂对总黄酮的吸附率, 结果表明吸附 8 h 后树脂对总黄酮吸附率基本不再变化, 即 DM-130 型树脂对总黄酮的吸附速率较慢, 静置 > 8 h 才能达到吸附平衡。

2.3.3 上样液质量浓度 精密称取 DM-130 型大孔吸附树脂适量, 置于 25 mL 量瓶中, 分别加入总黄酮质量浓度约 $1.47, 2.41, 3.54, 4.89, 5.71, 6.34 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的供试液, 振摇 24 h, 计算静态吸附率, 结果表明随上样液中总黄酮质量浓度的增加, 树脂吸附率缓慢下降, 至 $4.89 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 后, 吸附率下降幅度增大, 故选择 $4.89 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 上样液。

2.3.4 吸附流速 将等量的供试液(总黄酮 $4.89 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别以 $1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速通过 DM-130 型树脂柱, 结果发现低流速对总黄酮吸附量的影响较小, 当流速 $> 3.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 后, 随流速的增加, 总黄酮吸附量逐渐下降, 故选择吸附流速 $3.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

2.3.5 泄露曲线绘制 将供试液加至装有 DM-130 型树脂的色谱柱中, 控制流速 $3.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 进行动态吸附, 分段收集流出液, 每 1 BV 为 1 份, 测定流出液中总黄酮质量浓度, 当树脂达吸附饱和时, 停止上样, 记录上样量, 以流出液中总黄酮质量浓度对上样体积作图, 泄露曲线见图 1。结果显示开始时总黄酮吸附效果较好, 之后随上样量的增加, 吸附率缓慢

下降, 当处理 7 BV 后, 流出液中总黄酮质量浓度达泄露点(10%), 表明 DM-130 型大孔树脂对总黄酮的吸附量达平衡。

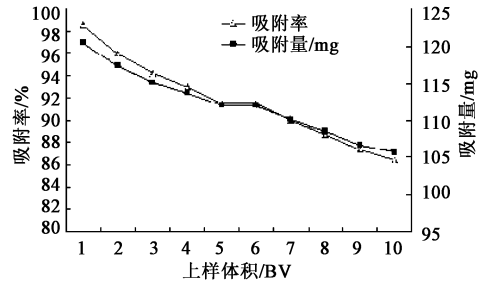


图1 DM-130型大孔树脂对木棉花总黄酮的泄露曲线

2.4 洗脱特性考察

2.4.1 洗脱溶剂 向充分吸附总黄酮的 DM-130 型大孔树脂中分别加入 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 的乙醇溶液定容至 25 mL 量瓶中, 置于恒温摇床中振摇 24 h, 测定洗脱液中总黄酮含量, 计算洗脱率, 结果显示 50% 乙醇对总黄酮的洗脱率较高。

2.4.2 水洗用量^[8] 加足量水洗脱已达到吸附平衡的 DM-130 型大孔树脂柱, 分段收集洗脱液, 每 1 BV 为 1 份, 测定洗脱液中总黄酮和总固形物含量, 绘制洗脱曲线, 见图 2。结果发现加水量 $\geq 5 \text{ BV}$ 时已基本除去水溶性杂质, 由于洗脱过程一直伴随总黄酮类成分的泄露, 为减免总黄酮的损失, 确定水洗用量 5 BV。

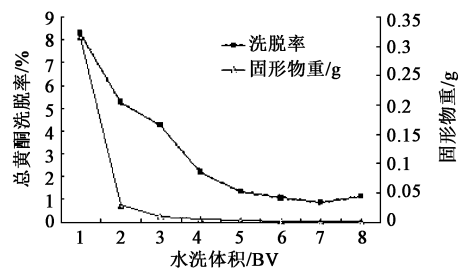


图2 加水量对木棉花总黄酮洗脱液中固形物和总黄酮含量的影响

2.4.3 洗脱曲线绘制 取已达吸附平衡并用 5 BV 水洗脱后的 DM-130 型大孔树脂柱, 加 50% 乙醇以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱, 分段收集洗脱液, 每 1 BV 为 1 份, 测定洗脱液中总黄酮质量浓度, 结果表明 50% 乙醇用量 $\geq 3 \text{ BV}$ 可将木棉花总黄酮基本洗脱完全。

2.4.4 上样量、洗脱流速和洗脱剂用量^[8] 在单因素试验基础上, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验考察洗脱剂用量、洗脱流速及上样量对木棉花总黄酮纯化工艺的影响, 以洗脱液中总黄酮洗脱率和纯度的综合评分为评价指标, 综合评分 = 总黄酮洗脱率 $\times 0.5$ + 总黄酮纯度 $\times 0.5$, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 2 木棉花总黄酮纯化工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 洗脱流速 /BV·h ⁻¹	B 上样量 /BV	C 洗脱剂用量 /BV	D(空白)	总黄酮		综合评分
					解吸率/%	纯度/%	
1	2	6	2	1	88.90	81.70	85.30
2	2	7	3	2	95.58	79.78	87.68
3	2	8	4	3	92.40	76.80	84.60
4	3	6	3	3	89.21	69.65	79.43
5	3	7	4	1	88.64	71.40	80.02
6	3	8	2	2	84.10	73.15	78.62
7	4	6	4	2	86.18	68.54	77.36
8	4	7	2	3	86.40	72.56	79.48
9	4	8	3	1	83.23	70.14	76.69
K ₁	85.860	80.697	81.133	80.670			
K ₂	79.357	82.393	81.267	81.220			
K ₃	77.843	79.970	80.660	81.170			
R	8.017	2.423	0.607	0.550			

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	108.850	2	196.126	<0.01
B	9.279	2	16.719	>0.05
C	0.610	2	1.099	>0.05
D(误差)	0.555	2	1.000	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0, F_{0.01}(2,2) = 99.0$ 。

由直观分析可知,各因素对纯化工艺的影响顺序为 $A > B > C$ 。方差分析表明 A 因素对纯化工艺的影响具有极显著性差异,其他因素则无显著性影响,确定最佳纯化工艺为 $A_1B_2C_2$,即上样量 7 BV,洗脱流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,50% 乙醇用量 3 BV。取 3 根 DM-130 型树脂柱,按优选的纯化工艺进行 3 次验证试验,收集洗脱液,计算总黄酮洗脱率 91.17%,纯度 77.68%,说明优选的工艺稳定可行。

3 讨论

据文献报道,除芦丁外,木棉花主要还含有槲皮素、异牡荆黄素、bombalin、amurenlactone、异槲皮苷、芹菜素-7-O-新橙皮糖苷、烟花苷、槲皮素-3-O-木糖苷、(R)-3-ethyl-pentyl-β-rutinoside 等黄酮类成分^[2],其中除异牡荆黄素和异槲皮苷外大部分黄酮苷元与芦丁苷元结构较为相似,故总黄酮的含量测定选择芦丁为指标成分。

静态吸附试验过程中发现宜选择量瓶震荡,不宜用锥形瓶,因为量瓶震荡时大孔树脂碰撞不会太激烈,可较好地模拟树脂在柱子中状态,而选用锥形瓶较容易将树脂震碎,导致试验结果出现较大偏差。

黄酮类成分为多羟基化合物,具有一定酸性,pH 考察时不宜将 pH 调得过高,以免形成离子型物质,破坏黄酮类成分结构,改变溶解性、极性等性质。泄露曲线的考察应选择泄漏点为指标,即流出液质量浓度为上样液质量浓度的 10%,既可减少上样液的流失,又可缩短试验时间。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:59.
- [2] 吴鹏,王国才,吴霞,等. 木棉花的化学成分研究[A]. 中国化学会第 9 届全国天然有机化学学术会议论文集[C]. 北京:中国知网,2012:122.
- [3] 刘晓辉,杨明,宋东光,等. 红木棉树叶主要物质含量探测与分析[J]. 北方园艺,2013(4):68.
- [4] 伍小燕,唐爱存,卢秋玉. 木棉花总黄酮对小鼠免疫性肝损伤的影响[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(15):1175.
- [5] 许建华,黄自强,李常春,等. 木棉花乙醇提取物的抗炎作用[J]. 福建医学院学报,1993,27(2):110.
- [6] 许建华,李常春,黄自强. 木棉花乙醇提取物的抗肿瘤活性[J]. 中国肿瘤临床,1995,22(增刊):108.
- [7] 齐一萍,郭舜民. 木棉的化学成分与药理作用研究[J]. 福建医药杂志,2002,24(3):119.
- [8] 张蕾,韩坚,冯志强,等. 大孔吸附树脂富集纯化广金钱草总黄酮的工艺研究[J]. 中草药,2011,42(12):2442.

[责任编辑 刘德文]