

# 大孔树脂纯化黄蜀葵花总黄酮的工艺优选

张华潭<sup>1</sup>, 郑文丽<sup>1</sup>, 魏艳婷<sup>1</sup>, 张静宜<sup>1</sup>, 李春花<sup>2\*</sup>

(1. 河北医科大学, 石家庄 050017; 2. 河北中医学院, 石家庄 050200)

**[摘要]** 目的: 优选黄蜀葵花总黄酮的大孔树脂纯化工艺, 为黄蜀葵花制剂的工业化生产提供参考。方法: 利用静态吸附-洗脱试验筛选纯化黄蜀葵花总黄酮的大孔树脂型号。采用UV测定总黄酮含量, 检测波长510 nm; 在单因素试验基础上, 以总黄酮质量及纯度的综合评分为指标, 采用正交试验考察乙醇体积分数、上样液质量浓度及pH对纯化工艺的影响。结果: AB-8型大孔树脂对黄蜀葵花总黄酮的吸附与洗脱性能较好。最优纯化条件为树脂柱径高比1:6, 上样液质量浓度0.2 g·mL<sup>-1</sup>, pH 5.0, 最佳上样量3 BV, 乙醇体积分数75%, 洗脱液用量6 BV; 总黄酮质量417.5 mg, 纯度58.04%。结论: AB-8型大孔树脂可有效富集、纯化黄蜀葵花总黄酮, 优选的纯化工艺稳定可行。

**[关键词]** 黄蜀葵花; 总黄酮; 大孔树脂; 纯化工艺

**[中图分类号]** R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0028-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015010028

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141113.1457.007.html>

**[网络出版时间]** 2014-11-13 14:57

## Optimization of Purification Process of Total Flavonoids from *Abelmoschi Corolla* by Macroporous Resin

ZHANG Hua-tan<sup>1</sup>, ZHENG Wen-li<sup>1</sup>, WEI Yan-ting<sup>1</sup>, ZHANG Jing-yi<sup>1</sup>, LI Chun-hua<sup>2\*</sup> (1. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize purification process of total flavonoids from *Abelmoschi Corolla* with macroporous resin. **Method:** Five kinds of resins for purification of total flavonoids from *Abelmoschi Corolla* were compared by static adsorption and elution test. UV was employed to determine the content of total flavonoids with detection wavelength at 510 nm; based on single factor tests, taking composite score of quality and purity of total flavonoids as index, orthogonal design were used to optimize purification process conditions with ethanol concentration, concentration and pH of sample solution as factors. **Result:** AB-8 macroporous resin was selected, optimum technological conditions were as follows: ratio of diameter-height 1:6, sample solution concentration of 0.2 g·mL<sup>-1</sup>, pH 5.0, volume of sample solution 3 BV, with 6 BV of 75% ethanol as eluant; quality and purity of total flavonoids were 417.5 mg and 58.04%. **Conclusion:** Total flavonoids from *Abelmoschi Corolla* can be effectively purified and separated by AB-8 macroporous resin.

**[Key words]** *Abelmoschi Corolla*; total flavonoids; macroporous resin; purification process

黄蜀葵花含有丰富的黄酮类化合物,其中以金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素-3'-葡萄糖苷及芦丁等含量较高,可用于治疗缺血性心脏病和缺血性脑血管病。黄蜀葵花总黄酮对急性心肌缺血、缺氧损伤具有保护作用,且对不完全缺血性脑损伤有一定保护作用<sup>[1-4]</sup>。目前对黄蜀葵花总黄酮的纯化工艺研究较少<sup>[5]</sup>,且常采用单因素试验优选纯化工艺。本实

验通过静态吸附-洗脱试验筛选纯化黄蜀葵花总黄酮的大孔树脂型号,结合单因素试验及正交试验优选纯化工艺参数,为黄蜀葵花制剂的工业化生产提供参考。

### 1 材料

SP-756P型紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司),TD200型电子天平(天津天平仪器有限公司)

**[收稿日期]** 20140506(003)

**[基金项目]** 河北省中医药管理局课题(2012075)

**[第一作者]** 张华潭,在读硕士,从事中药制剂的新技术及新方法研究, Tel:13363803695, E-mail: huatanmo@163.com

**[通讯作者]** \*李春花, 硕士, 教授, 从事中药制剂的新技术及新方法研究, Tel:13803369966, E-mail: hbykdxlc@163.com

司),TG328B型分析天平(上海精科仪器厂)。黄蜀葵花购于安国药材市场,经河北中医学院侯芳洁讲师鉴定为 *Abelmoschus manihot* 的干燥花冠,符合2010年版《中国药典》一部相关项下规定。D101, AB-8型大孔树脂(天津市光复精细化工研究所); NKA9, FL1型大孔树脂(天津欧瑞生物科技有限公司); HPD-300型大孔树脂(河北沧州宝恩化工有限公司),芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号100080-200707),试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 黄蜀葵花总黄酮的含量测定<sup>[5-6]</sup>

**2.1.1 上样液的制备** 在前期研究基础上,取干燥后黄蜀葵花药材200 g,加12倍量85%乙醇回流提取2次,每次2.5 h,合并滤液,回收乙醇至无醇味,加水稀释成含0.2 g·mL<sup>-1</sup>药液,离心(5 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min),双层滤纸过滤,备用(总黄酮5.46 g·L<sup>-1</sup>)。

**2.1.2 标准曲线的建立** 精密称取经五氧化二磷干燥至恒重的芦丁对照品2 mg,加85%乙醇配成85.2 mg·L<sup>-1</sup>对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 mL置于10 mL量瓶中,加入5% NaNO<sub>2</sub>溶液0.5 mL,摇匀,放置6 min;加入10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>溶液0.5 mL,摇匀,放置6 min;加入4% NaOH溶液5 mL,加85%乙醇稀释至刻度,放置15 min,以85%乙醇同法操作制备空白溶液,按比色法于510 nm处测定吸光度(A),以A对质量浓度(C)进行线性回归,得回归方程  $A = 28.203C + 0.0063$  ( $r = 0.9993$ ),表明芦丁在4.26 ~ 25.56 mg·L<sup>-1</sup>呈良好线性关系。

### 2.2 树脂的筛选<sup>[7-8]</sup>

**2.2.1 静态吸附性能比较** 根据黄蜀葵花总黄酮的理化性质和树脂吸附性能,选择AB-8, D101, HPD-300, NKA9, FL1型大孔树脂进行静态吸附试验。取5种预处理好的树脂各2 mL,分别置于50 mL具塞磨口锥形瓶中,各加入上样液10 mL,于室温下搅拌放置8 h至吸附平衡,过滤,按2.1项下方法测定滤液中总黄酮含量,计算吸附率分别为89.54%, 83.36%, 79.92%, 82.71%, 50.74%。

**2.2.2 静态洗脱性能比较** 将2.2.1项下已吸附黄蜀葵花总黄酮的树脂过滤抽干,分别置于50 mL具塞磨口锥形瓶中,加入70%乙醇30 mL,于室温下搅拌洗脱8 h,过滤,按2.1项下方法测定洗脱液中总黄酮含量,计算洗脱率分别为85.39%, 82.15%, 84.12%, 73.58%, 86.53%。综合吸附率与洗脱率考虑,确定AB-8型大孔树脂纯化黄蜀葵花总黄酮。

### 2.3 单因素试验考察

**2.3.1 上样液质量浓度** 取上样液4份,每份20 mL,分别加水制成0.25, 0.2, 0.15, 0.1 g·mL<sup>-1</sup>,以1 BV·h<sup>-1</sup>的流速通过AB-8型大孔树脂柱<sup>[7]</sup>,用水洗至无盐酸镁粉反应,收集过柱液与水洗液,同置100 mL量瓶内,定容。按2.1项下方法测定总黄酮含量,计算总黄酮吸附率分别为88.5%, 89.7%, 87.5%, 87.1%,故确定上样液质量浓度0.2 g·mL<sup>-1</sup>。

**2.3.2 乙醇体积分数** 取上样液4份,每份20 mL,以1 BV·h<sup>-1</sup>的流速进行动态吸附,水洗至无盐酸镁粉反应,加水定容至100 mL量瓶中,分别用70%, 75%, 80%, 85%的乙醇溶液洗脱,均洗至无色且无盐酸镁粉反应,收集洗脱液置250 mL量瓶中,加水定容。按2.1项下方法测定总黄酮含量,计算洗脱率分别为81.6%, 84.2%, 82.1%, 82.0%,故选用75%乙醇。

**2.3.3 洗脱液用量** 取上样液20 mL以1 BV·h<sup>-1</sup>的流速进行动态吸附,水洗至无盐酸镁粉反应,用75%乙醇洗脱,按每份50 mL分段收集洗脱液,共6份,分别加水定容至100 mL量瓶中,按2.1项下方法测定,结果洗脱液中总黄酮质量分别为22.2, 25.1, 20.9, 8.8, 2.6, 1.1 mg,故确定洗脱液体积6 BV(1 BV = 50 mL)。

**2.3.4 上样液pH** 取上样液4份,每份20 mL,调节pH分别为3, 5, 7, 9,在相同条件下按1 BV·h<sup>-1</sup>流速进行动态吸附,用水洗至无盐酸镁粉反应,收集过柱液与水洗液,定容。按2.1项下方法测定,计算总黄酮吸附率分别为87.4%, 90.1%, 62.5%, 40.1%,说明上样液pH 5时树脂对总黄酮的吸附性能最好。

**2.3.5 树脂径高比** 取上样液3份,每份20 mL,调节pH 5,分别通过3根径高比1:6, 1:8, 1:10的大孔树脂柱(树脂量相等),以1 BV·h<sup>-1</sup>流速进行动态吸附,水洗至无盐酸镁粉反应,收集洗脱液,定容,按2.1项下方法测定总黄酮含量,计算吸附率分别为92.1%, 88.1%, 65.2%,确定最佳径高比1:6。

**2.3.6 泄露曲线考察** 取上样液150 mL,调节pH 5,以相同上样流速进行动态吸附,分段收集流出液,每段10 mL,共15份,浓缩至适当浓度,按2.1项下方法测定流出液中总黄酮含量,见图1。结果显示当上样液为120 mL时,总黄酮开始泄露,说明AB-8型大孔树脂对总黄酮的最大吸附量120 mL(4 BV),为保证样品能被充分吸附,确定最佳上样量3 BV。

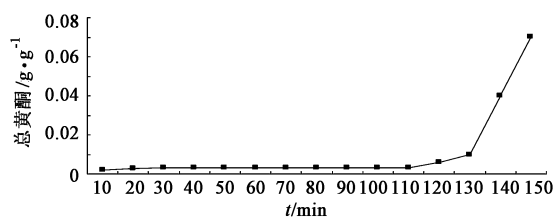


图 1 黄蜀葵花总黄酮在 AB-8 型大孔树脂的泄露曲线  
Fig. 1 Leak curve of AB-8 macroporous resin for total flavonoids from *Abelmoschi Corolla*

表 1 黄蜀葵花总黄酮的 AB-8 型大孔树脂纯化工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of purification process for total flavonoids from *Abelmoschi Corolla* by AB-8 macroporous resin

No.	A 上样液质量浓度 /g · mL <sup>-1</sup>	B 上样液 pH	C 乙醇体积 分数/%	D(空白)	总黄酮		综合评分
					质量/mg	纯度/%	
1	0.1	6	75	1	259.8	31.22	58.27
2	0.1	5	60	2	305.1	37.75	69.38
3	0.1	4	90	3	201.0	24.42	45.32
4	0.05	6	60	3	217.9	27.27	49.82
5	0.05	5	90	1	327.2	41.12	74.96
6	0.05	4	75	2	245.0	28.03	53.74
7	0.2	6	90	2	309.5	42.57	74.08
8	0.2	5	75	3	415.5	57.78	100.00
9	0.2	4	60	1	304.5	44.98	75.57

注:综合评分 = (样品总黄酮质量/总黄酮质量最大值) × 50 + (总黄酮纯度/总黄酮纯度最大值) × 50。

表 2 综合评分方差分析

Table 2 Variance analysis of composite score

方差来源	SS	MS	F	P
A	1 218.71	609.35	33.69	<0.05
B	975.66	487.83	26.97	<0.05
C	67.73	33.87	1.87	>0.05
D(误差)	36.17	18.09	1.00	

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19$ 。

醇体积分数 75%。综合单因素试验与正交试验结果,确定 AB-8 型大孔树脂纯化黄蜀葵花总黄酮的最佳工艺为径高比 1:6,上样液质量浓度 0.2 g · mL<sup>-1</sup>, pH 5,最佳上样量 3 BV,流速 1 BV · h<sup>-1</sup>,加 75% 乙醇 6 BV 洗脱。

2.5 验证试验 取黄蜀葵花总黄酮上样液 90 mL,共 3 份,按优选的工艺条件进行纯化,收集洗脱液,计算总黄酮质量为 417.2,415.5,419.9 mg,纯度分别为 58.36%,58.03%,57.72%,说明黄蜀葵花总黄酮经 AB-8 型大孔树脂纯化后,总黄酮纯度接近

2.4 正交试验<sup>[9-10]</sup> 在预试验基础上,选择乙醇体积分数、上样液质量浓度及 pH 为考察因素,每个因素设计 3 个水平,取上样液 90 mL,共 9 份,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表安排试验,以总黄酮质量和纯度的综合评分为指标,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

由直观分析可知,各因素对纯化效果的影响顺序为 A > B > C。方差分别表明因素 A, B 具有显著性影响,因素 C 则影响不显著,选择最佳纯化工艺为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>,即上样液质量浓度 0.2 g · mL<sup>-1</sup>, pH 5,乙

60%,较纯化前提高了 >10 倍,且重复性较好。

### 3 讨论

洗脱液的种类和浓度对纯化效果产生较大影响,优良的洗脱液有利于大孔树脂的循环使用和保护。洗脱液对黄酮类成分的亲和力应大于树脂对黄酮类成分的亲和作用,故应选用极性且沸点低的有机溶剂。洗脱液的水溶性应较大,以便洗脱后残留洗脱液易被水带出,防止残存洗脱液造成提前泄露。综上所述,甲醇、乙醇和丙酮等均符合要求,可作为纯化总黄酮的洗脱剂,考虑到甲醇和丙酮具有一定毒性,乙醇是医药工业中常用溶剂,故本文选择乙醇作为洗脱剂。

在上样液浓度考察过程中发现,样品液浓度越高,洗脱过程中流速变缓和柱床堵塞的情况越严重,可能是提取液浓度高时浓缩造成了水分挥发较多,杂质越容易析出,故在上样液浓缩后,采用适当离心、过滤,结果流速变缓、柱床堵塞情况明显改善。采用大孔树脂纯化黄蜀葵花总黄酮是富集与除杂的过程,仅采用总黄酮含量或纯度均不能全面反映真实纯化效果,故本文确定正交试验指标时采用两者

加权之和作为评价指标,以更全面反映纯化效果。

[参考文献]

[1] 李春梅,安雅婷,王涛,等. 中药黄蜀葵花化学成分  
的分离与鉴定(Ⅲ)[J]. 沈阳药科大学学报,2011,28  
(7):520-525.

[2] 范丽,郭岩,陈志武,等. 黄蜀葵花总黄酮预处理对家  
兔心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国药理学通  
报,2006,22(1):106-109.

[3] 李庆林,王成永,彭代银,等. 黄蜀葵花总黄酮对心肌  
缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. 中国实验方剂  
学杂志,2006,12(2):39-42.

[4] 刘爽,江蔚新,吴斌. 黄蜀葵花化学成分及药理活性  
研究进展[J]. 中国现代中药,2010,12(8):5-9.

[5] 袁慧,周亚球,光琴. 黄蜀葵花总黄酮的大孔树脂纯

化工艺[J]. 安徽医药,2009,13(2):136.

[6] 周正华,杜安全,王先荣. 黄蜀葵花中总黄酮含量测  
定方法的比较研究[J]. 中药材,2006,29(11):  
1192-1194.

[7] 黄志宏,蒋东旭,赖小平. 大孔吸附树脂法富集纯化  
荆芥穗总黄酮的工艺研究[J]. 中药材,2010,33(9):  
1476-1480.

[8] 黄松,赵薇,陶艳,等. 甜茶总黄酮大孔树脂精制工  
艺研究[J]. 中成药,2010,32(8):1338-1342.

[9] 周欣,范国荣. 短瓣金莲花总黄酮大孔树脂纯化工  
艺研究[J]. 中药材,2009,32(9):1450-1454.

[10] 林珊,刘仁根,曾建伟,等. 泥胡菜总黄酮大孔树脂纯  
化工艺优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19  
(12):34-36.

[责任编辑 刘德文]

---

## 欢迎订阅 2015 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国中文核心期刊”、“中国科技论文统计源期刊(2013年扩刊版)”、“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊、美国《化学文摘》统计源期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创建于1995年10月,主要设置栏目:学术专论、综述、工艺与制剂、化学与分析、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘等。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16开本,242页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价35元,全年840元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655,欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街16号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfjx\_2010@188.com,网址:www.syfjxzz.com。