

神香草总黄酮的大孔树脂纯化工艺优选

阿依先木·他西¹, 艾尼娃尔·艾克木², 于洋¹, 麦合苏木·艾克木^{1*}, 阿不都热依木·玉苏甫^{1*}

(1. 新疆医科大学 维吾尔医学院, 乌鲁木齐 830011;

2. 新疆医科大学 药学院, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的:** 优选神香草总黄酮的大孔树脂纯化工艺。**方法:** 以总黄酮吸附率和洗脱率为指标, 通过静态吸附-洗脱试验比较 11 种大孔树脂对神香草总黄酮的吸附和洗脱性能, 筛选最佳大孔树脂型号。采用单因素试验考察上样液质量浓度、上样流速、树脂径高比、洗脱剂浓度及用量、洗脱流速等因素对大孔树脂纯化工艺的影响。**结果:** 选用 AB-8 型大孔树脂, 其最佳纯化工艺参数为上样液质量浓度 $2.56 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 上样流速 $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 树脂径高比 1:5, 加水 5 BV 以流速 $5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 除杂, 洗脱液弃去, 加 70% 乙醇 9 BV 以流速 $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱, 收集洗脱液。神香草总黄酮纯度达 65.6%。**结论:** 采用 AB-8 型大孔树脂纯化神香草总黄酮的工艺稳定可行, 为该药用部位的开发提供参考。

[关键词] 神香草; 总黄酮; 大孔吸附树脂; 芦丁

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0027-04

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.2015130027

Optimization of Purification Technology of Total Flavonoids from *Hyssopus officinalis* TAX Ayxam¹, EKIM Aniwar², YU Yang¹, EKIM Mahsum^{1*}, YUSUP Abdiryim^{1*} (1. Institute of Traditional Uighur Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Institute of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology of total flavonoids from *Hyssopus officinalis* by macroporous resin. **Method:** Adsorption and desorption capacity of total flavonoids was taken as index, 11 different types of macroporous resins were screened, static adsorption-elution test were carried out. Single factor test was used to investigate purification technology of total flavonoids from *H. officinalis*. **Result:** AB-8 macroporous resin was the most suitable one for purification of total flavonoids in *H. officinalis*. Optimum purification parameters were as followings: the sample concentration of $2.56 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, sample flow rate of $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, diameter-high ratio of resin bed 1:5, washed impurity with 5 BV of water, elution flow rate of $5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ and discarded eluent, eluted with 9 BV of 70% ethanol at $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$. Purity of total flavonoids reached 65.6%. **Conclusion:** This purification technology is stable, feasible and suitable for purification of total flavonoids from *H. officinalis*.

[Key words] *Hyssopus officinalis*; total flavonoids; macroporous resins; rutin

神香草是维吾尔族医学常用药材, 以全草入药, 药性为二级干热, 具有生干生热、温肺平喘、祛寒止咳、燥湿祛痰、发汗解毒、消炎退肿的功效, 在维族医学用于治疗哮喘、肺炎、气管炎、咳嗽、感冒发烧和风湿等^[1-2]。《中华本草》维吾尔药卷记载: 药用全草, 全株主要含黄酮类、生物碱类、挥发油等化学成

分^[3]。其中黄酮类化合物具有广泛的药理活性及营养保健作用。研究总黄酮的纯化工艺对提高神香草的生物利用率具有实际意义。大孔吸附树脂具有良好的吸附性能, 在分离、纯化中草药活性成分方面具有极大的优越性^[4-5]。树脂本身的性质不同程度地影响着分离纯化效果^[6]。在前期已对神香草总

[收稿日期] 20150226(009)

[基金项目] 新疆少数民族科技人才特殊培养计划科研项目(201323122)

[第一作者] 阿依先木·他西, 硕士, 助教, 从事维吾尔医药作用机制研究, Tel:13899848106, E-mail:39974410@qq.com

[通讯作者] * 麦合苏木·艾克木, 硕士, 副教授, 从事维吾尔医药作用机制研究及新药开发, E-mail:mahsum008@126.com;

* 阿不都热依木·玉苏甫, 博士, 教授, 从事维吾尔医药作用机制研究及新药开发, E-mail:ayusup@126.com

黄酮提取工艺进行研究的基础上。本实验以神香草总黄酮为指标,通过单因素试验优选其大孔树脂纯化工艺,为该药用部位的开发利用提供参考。

1 材料

UV-2550型紫外-可见分光光度计(日本岛津), BL1500型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。神香草全草由新疆维吾尔自治区维吾尔医院药房提供,经该医院制剂中心质检部伊力哈木·买买提副主任药师鉴定为唇形科植物欧神香草 *Hyssopus officinalis* 的干燥地上部分。D-101, AB-8, DM-130, X-5型大孔树脂(南开大学化工厂), FL-3型大孔树脂(天津欧瑞生物科技有限公司), DM-B1, HP-20, ADS-17, HPD-600, ADS-7, 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100080-201409,纯度 $\geq 98\%$),水为蒸馏水,试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮的含量测定 精密称取芦丁对照品10.0 mg于100 mL量瓶中,加60%乙醇定容,摇匀,得 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照品溶液。分别精密吸取芦丁对照品溶液0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,分别置于10 mL量瓶中,均加水至5.0 mL,各加入5%亚硝酸钠溶液0.3 mL,放置6 min;加入10%硝酸铝溶液0.3 mL,放置6 min;加4%氢氧化钠溶液4 mL,摇匀,加水定容,摇匀,放置15 min,在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 $Y = 13.837C + 0.0052 (R^2 = 0.9991)$ 。

2.2 上样液制备^[7] 取干燥的神香草全草500 g,粉碎过20目筛,加12倍量70%乙醇回流提取3次,每次1.0 h,过滤,滤液减压浓缩至无醇味,真空冷冻干燥,得神香草总黄酮粗品。取粗品加水稀释成溶液,离心($10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 3 min),取上清液,备用,测得总黄酮质量浓度 $2.56\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 大孔树脂预处理 取适量大孔树脂,加95%乙醇浸泡 $>24\text{ h}$,充分溶胀后湿法装柱,用95%乙醇洗脱至流出液加水混合(体积比1:2)不产生白色浑浊为止,加水洗至无醇味,用5%氢氧化钠溶液5 BV洗脱,加水洗至中性,用5%盐酸5 BV洗脱,水洗至中性,备用。

2.4 大孔树脂型号筛选 取11种处理好的大孔树脂(D-101, AB-8, DM-130, DM-B1, FL-3, X-5, HP-20, ADS-17, HPD-600, ADS-7, HPD-300)各2 g(干重),分别置于250 mL具塞瓶中,各加入上样液40 mL,在恒温震荡箱中于 $25\text{ }^\circ\text{C}$, $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 震荡4 h,取各

树脂吸附后的溶液1.0 mL,计算各大孔树脂对神香草总黄酮的吸附率分别为39.3%, 65.2%, 34.8%, 15.3%, 16.2%, 41.1%, 23.3%, 35.8%, 49.2%, 44.4%, 55.1%。取上述静态吸附的树脂过滤抽干,各加入70%乙醇40 mL洗脱,在恒温震荡箱中于 $25\text{ }^\circ\text{C}$, $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振摇4 h,分别取各树脂的洗脱液1.0 mL,计算洗脱率分别为31.9%, 59.2%, 22.3%, 17.1%, 21.9%, 20.8%, 14.3%, 31.7%, 35.6%, 32.9%, 30.1%。结果表明11种树脂均对神香草总黄酮有一定吸附能力,其中DM-B1, FL-3型大孔树脂的洗脱率大于吸附率,原因可能是其吸附能力较弱,部分上样液附着于树脂表面,70%乙醇将其溶解(前期提取工艺筛选发现70%乙醇为最佳提取溶剂),使其洗脱率大于吸附率。而X-5, HPD-300型大孔树脂洗脱率远小于吸附率的原因是树脂对成分的死吸附较严重。综合考虑,选用AB-8型大孔吸附树脂。

2.5 吸附条件优化

2.5.1 上样液质量浓度考察 取6份处理好的AB-8型大孔树脂2 g(干重)置于树脂柱(25 mm \times 200 mm,下同)中,编号1~6。量取6份 $7.68\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 上样液,每份30 mL,分别稀释至60, 90, 120, 150, 180 mL,分别过柱,控制上样流速 $2\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 通过树脂柱,测定流出液中总黄酮含量,计算总黄酮吸附率分别为38.06%, 38.86%, 68.11%, 52.69%, 44.91%, 41.59%,故选择质量浓度为 $2.56\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的上样液比较适宜。

2.5.2 树脂床径高比考察 取5份处理好的AB-8型大孔树脂置于不同树脂柱中,树脂床径高比分别为1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6,分别量取5份 $2.56\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 上样液过柱,每份50 mL,控制流速 $2\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$,测定流出液总黄酮含量,计算总黄酮吸附率分别为52.11%, 57.20%, 65.32%, 75.71%, 63.60%,故选择树脂床径高比1:5。

2.5.3 上样流速考察 称取5份处理好的AB-8型大孔树脂置于树脂柱中,径高比1:5,干树脂质量9.6 g,量取 $2.56\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 上样液50 mL,控制上样流速分别为2, 3, 4, 5, 6 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$,计算总黄酮吸附率分别为66.34%, 73.31%, 78.88%, 75.83%, 74.78%,故上样流速应控制在 $4\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

2.5.4 上样量考察 取AB-8型大孔树脂湿法装柱,按优选的上样条件吸附,流出液每1 BV收集1份,共收集14份,以流出液体积为横坐标,总黄酮质量浓度为纵坐标,绘制梯度洗脱曲线,见图1。结果

表明流出液中总黄酮含量随上样体积的增加而提高。当上样体积从 1 BV 增至 7 BV 时,流出液中总黄酮含量的增加较平稳;而上样体积达 8 BV 时,流出液中总黄酮质量浓度达 $1.132 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,从 9 BV 开始总黄酮质量浓度加速升高,即上样液中总黄酮开始泄露,故选择上样量 9 BV。

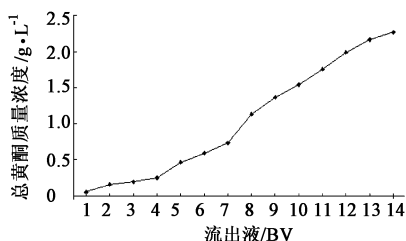


图 1 AB-8 型大孔树脂对神香草总黄酮的动态吸附曲线
Fig. 1 Dynamic adsorption curve of AB-8 macroporous resin for total flavonoids of *Hyssopus officinalis*

2.6 洗脱条件优化

2.6.1 洗脱剂浓度考察 取 AB-8 型大孔树脂湿法装柱,取 $2.56 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 上样液 50 mL 过柱,按优选的条件吸附,依次用水和体积分数为 30%, 50%, 70% 的乙醇溶液各 5 BV 洗脱,流出液每 1 BV 收集为 1 份,共收集 20 份流出液,以洗脱液体积为横坐标,总黄酮质量浓度为纵坐标,绘制梯度洗脱曲线,见图 2。结果表明用水洗脱时,洗脱液中总黄酮质量浓度较平稳。开始加 30% 乙醇洗脱时,洗脱液中总黄酮质量浓度趋于加速增加,故选择加水 5 BV 洗脱杂志。当用 50% 乙醇 5 BV 洗脱完时,总黄酮质量浓度达 $0.566 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,而用 70% 乙醇洗脱完时,总黄酮质量浓度仅 $0.093 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,故选择 70% 乙醇。

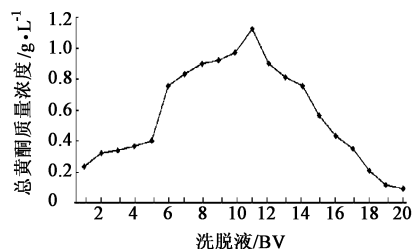


图 2 AB-8 型大孔树脂对神香草总黄酮的洗脱曲线
Fig. 2 Elution curve of AB-8 macroporous resin for total flavonoids of *Hyssopus officinalis*

2.6.2 洗脱流速考察 称取 4 份处理好的 AB-8 型大孔树脂湿法装柱,量取 $2.56 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 上样液 50 mL,按优选的条件进行吸附,加水 5 BV 以流速 $5 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 洗脱,加 70% 乙醇 5 BV 洗脱,洗脱流速分别为 1, 2, 3, 4 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$,收集流出液,计算总黄酮洗脱率分

别为 69.5%, 73.31%, 81.4%, 84.3%, 故选择洗脱流速 $4 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

2.6.3 洗脱剂用量考察 取 AB-8 型大孔树脂湿法装柱,取 $2.56 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 上样液 50 mL 过柱,待吸附完全后加水 5 BV 冲洗(流速 $5 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$),弃去洗脱液;加 70% 乙醇洗脱,调节流速 $4 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$,收集洗脱液,每 1 BV 收集为 1 份,共收集 10 份,以洗脱液体积为横坐标,总黄酮质量浓度为纵坐标,绘制洗脱曲线,见图 3。结果显示当洗脱液体积从 1 BV 增至 3 BV 时,流出液中总黄酮质量浓度逐渐增加;自洗脱液体积从 4 BV 开始,洗脱液中总黄酮质量浓度开始下降,用 70% 乙醇洗脱至 9 BV 时,洗脱液仅有少量总黄酮 ($0.72 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),并且洗脱能力变弱,故选择洗脱剂用量 9 BV 为佳。

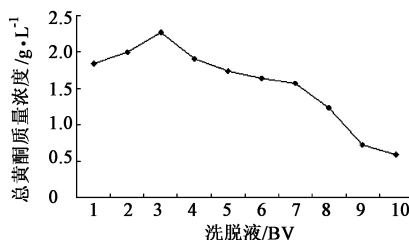


图 3 洗脱剂用量对 AB-8 型大孔树脂吸附神香草总黄酮的影响
Fig. 3 Effect of the amount of eluent on adsorption of AB-8 macroporous resin for total flavonoids of *Hyssopus officinalis*

3 讨论

神香草是治疗哮喘、支气管炎等疾病的良药,是新疆特有药材之一,近年在新疆维吾尔自治区人工种植神香草获得成功,为其开发和利用提供了充足的物质资源。课题组前期对神香草抗哮喘作用及其机制进行了系列研究,在神香草总黄酮的提取工艺研究中 TLC 鉴别试验显示神香草可能含有芦丁,并发现神香草含提取液和芦丁对照品溶液均在 510 nm 处有最大吸收波长,故选择芦丁为对照品。采用紫外-可见分光光度法测定神香草总黄酮提取液和乙酸乙酯部位中总黄酮质量分数分别为 5.8% 和 46.5%。通过对不同提取物的抗炎、止咳、祛痰及平喘作用考察发现,乙酸乙酯部位作用更显著。通过溶剂分配法使神香草总黄酮纯度 $> 50\%$,药效试验发现其具有显著的抗炎、止咳、祛痰及平喘作用,同时其能抑制炎症细胞、改善肺组织炎症反应^[9]。但因溶剂分配法富集神香草总黄酮中需用乙酸乙酯、正丁醇等有机溶剂,且工艺繁琐、纯化效率低,无法应用于工业化生产。在前期已确定神香草总黄酮提取工艺的基础上,本文采用大孔树脂法对其进行纯化,纯化后总黄酮质量分数达 65.6%,符合中药 5

类新药研发的要求。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准. 维吾尔药分册[S]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社, 1999:78.

[2] 《中国医学百科全书》编委会. 中国医学百科全书. 维吾尔医学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2005:229.

[3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 维吾尔药卷[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2005:257.

[4] 潘晓微,黄一平. 大孔树脂分离纯化楮叶总黄酮的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(23): 39-42.

[5] 傅华强,邹建国,刘飞,等. 大孔树脂分离纯化枳壳中总黄酮的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013,

19(4):14-17.

[6] Gökmen V, Serpen A. Equilibrium and kinetic studies on the adsorption of dark colored compounds from apple juice using adsorbent resin[J]. J Food Eng, 2002, 53(3):221-227.

[7] 努尔江·肉孜,麦合苏木·艾克木,阿不都热依木·玉苏甫. 正交试验法优选维药神香草总黄酮的提取工艺研究[J]. 新疆医科大学学报, 2012, 35(5): 584-587.

[8] 麦合苏木·艾克木,努尔江·肉孜,阿不都热依木·玉苏甫. 维药神香草乙酸乙酯部位对大鼠实验性哮喘炎症反应的影响[J]. 科技导报, 2011, 29(30):52-56.

[9] 麦合苏木·艾克木,努尔江·肉孜,阿不都热依木·玉苏甫. 维药神香草总黄酮对卵清白蛋白致大鼠维药神香草总黄酮对卵清白蛋白致大鼠哮喘模型气道炎症的影响哮喘模型气道炎症的影响[J]. 科技导报, 2013, 31(36):52-56.

[责任编辑 刘德文]

《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)

经过中国科学院“中国科学引文数据库(Chinese Science Citation Database,简称 CSCD)”定量遴选、专家定性评估,《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)。

2015—2016 年度 CSCD 收录来源期刊 1200 种,其中中国出版的英文期刊 194 种,中文期刊 1006 种。CSCD 来源期刊分为核心库和扩展库两部分,其中核心库 872 种(以备注栏中 C 为标记);扩展库 328 种(以备注栏中 E 为标记)。

CSCD 具有建库历史最为悠久、专业性强、数据准确规范、检索方式多样、完整、方便等特点,自提供使用以来,深受用户好评,被誉为“中国的 SCI”。CSCD 是我国第一个引文数据库,曾获中国科学院科技进步二等奖。该数据库已在我国科研院所、高等学校的课题查新、基金资助、项目评估、成果申报、人才选拔以及文献计量与评价研究等多方面作为权威文献检索工具获得广泛应用。