

· 工艺与制剂 ·

天山雪莲黄酮类成分大孔树脂纯化工艺优选

葛亮^{1,2,3}, 豆浩然¹, 张晋¹, 祁娟娟¹, 倪健^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102;
2. 新疆名医名方与特色方剂学重点实验室, 乌鲁木齐 830011;
3. 新疆医科大学中医学院, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的: 优选天山雪莲总黄酮的大孔树脂纯化工艺。方法: 以芦丁为指标成分, 通过静态吸附-洗脱试验筛选大孔树脂型号, 采用单因素试验考察上样量、上样流速、洗脱流速、洗脱剂用量对天山雪莲黄酮纯化工艺的影响。结果: X-5型大孔树脂纯化效果最好, 最佳纯化工艺条件为上样液质量浓度 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 上样量 6 BV, 上样流速 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 加水 3 BV 洗去水溶性杂质, 加 20% 乙醇 6 BV 除去其他杂质, 加 40% 乙醇 5 BV 洗脱, 洗脱流速 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 收集 40% 乙醇洗脱液; 树脂纯化前后提取物中芦丁质量分数由 1.07% 提高至 12.14%。结论: X-5型树脂可用于富集天山雪莲中黄酮类成分。

[关键词] 天山雪莲; 黄酮类成分; 大孔树脂; 芦丁; 单因素试验; 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(2014)07-0001-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014070001

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000011.html>

[网络出版时间] 2014-01-21 8:51

Optimization of Purification Technology for Total Flavonoids from Saussureae Involucratae Herba by Macroporous Resin

GE Liang^{1,2,3}, DOU Hao-ran¹, ZHANG Jin¹, QI Juan-juan¹, NI Jian^{1*}

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Xinjiang Key Laboratory of Famous Prescription and Science of Formulas, Urumqi 830011, China;
3. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology of total flavonoids from Saussureae Involucratae Herba by macroporous resin. **Method:** Taking rutin as index ingredient, macroporous resin model was screened by static adsorption-elution test, single factor tests were adopted to investigate effects of sample amount, sample flow rate, elution rate and other factors on purification technology of total flavonoids from Saussureae Involucratae Herba. **Result:** X-5 macroporous resin showed the best separation efficiency by compared with other resins, its optimum purification technology were as follows: the concentration of sample solution $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, sample volume of 6 BV, adsorption rate of $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, washed impurities with 3 BV of water, removed other purities with 6 BV of 20% ethanol, eluted with 5 BV of 40% ethanol, elution velocity of $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, collected 40% ethanol eluent; After purified, the content of rutin increased from 1.07% in extract to 12.14% in ethanol eluent. **Conclusion:** X-5 macroporous resin could purify total flavonoids from Saussureae Involucratae Herba.

[收稿日期] 20130720(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173563); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09103201-026); 北京中医药大学复方中药制药创新团队基金项目(2011-CXTD-13); 新疆维吾尔自治区重点实验室科研开放课题(XJDX0910-2012-4)

[第一作者] 葛亮, 在读博士, 实验师, 从事中药制剂新技术及体内过程研究, Tel: 18699122673, E-mail: geliang917@163.com

[通讯作者] * 倪健, 博士, 博士生导师, 教授, 从事中药制剂新技术及体内过程研究, Tel: 010-84738607, E-mail: njtcm@263.net

[Key words] Saussureae Involucratae Herba; total flavonoids; macroporous resin; rutin; single factor test; purification process

天山雪莲具有散寒除湿、活血通经、抗炎镇痛、收缩子宫之功效,主治风湿性关节炎、腰膝软弱等症^[1],化学成分包括芦丁等黄酮类、紫丁香苷及绿原酸等苯丙素类、大苞雪莲碱等生物碱类、大苞雪莲内酯等内酯类、多糖类等^[2]。现代药理研究表明以芦丁为代表的黄酮类^[3]和以紫丁香苷及绿原酸为代表的苯丙素类^[4,5]成分具有明显的抗炎镇痛、抗风湿作用。大孔吸附树脂技术已被广泛应用于中药产业,具有成本较低、选择性好、吸附容量大、再生处理方便、吸附速度快等优势^[6]。本实验选择芦丁作为指标成分,采用大孔树脂纯化天山雪莲中黄酮类成分,制备纯度较高的总黄酮提取物,为天山雪莲的体内代谢研究提供实验依据。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(G1311C 型泵, G1329B 型自动进样器, G1314BVWD 型紫外检测器, Chemstation 色谱工作站, 美国 Agilent 公司), BT-125D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司), G16 型医用高速离心机(安新县白洋离心机厂)。

带阀门玻璃柱(1.5 cm × 45 cm, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司), 芦丁对照品(成都曼思特生物科技有限公司, 批号 MUST-11040302), X-5, AB-8, HPD-300, HPD-400, D101 型大孔树脂均购自河北沧州吸附材料有限公司, 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯; 天山雪莲购自新疆参茸有限公司, 由新疆医科大学附属中医医院李永和主任药师鉴定为菊科植物天山雪莲 *Saussurea involucrata* (Kar. et Kir.) Sch. Bip. 的地上部分。

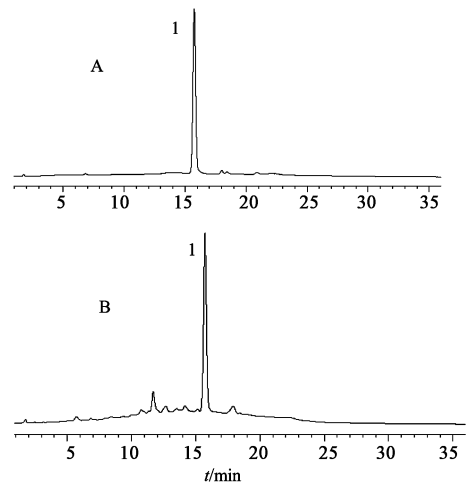
2 方法与结果

2.1 芦丁的含量测定

2.1.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 大连中汇达科学仪器有限公司), 流动相甲醇(A)-0.8% 乙酸水溶液(含 0.2% 三乙胺, B)梯度洗脱(0~20 min, 20%~60% A; 20~35 min, 60%~20% A; 35~40 min, 20% A), 检测波长 270 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 5 μL, 见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品 2.12 mg, 加甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 即得。

2.1.3 上样液的配制^[7] 称取天山雪莲粗粉



A. 对照品; B. 供试品; 1. 芦丁

图 1 天山雪莲中芦丁 HPLC

500 g, 加 8 倍量 70% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并滤液, 减压回收乙醇, 加适量水稀释至生药质量浓度 100 g·L⁻¹, 即得。

2.1.4 标准曲线的绘制 分别精密吸取对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12 μL, 按 2.1 项下色谱条件测定, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 18\ 317X + 17\ 848$ ($r = 0.999\ 7$), 线性范围 0.424~2.544 μg。

2.2 树脂的预处理 新购买的树脂使用前均用 95% 乙醇浸泡 24 h, 湿法上柱, 用适量 95% 乙醇洗至洗出液加水(1:5)无浑浊, 加水洗至无醇味, 备用。

2.3 树脂型号筛选 在具塞锥形瓶中, 分别加入预处理好的各树脂(X-5, AB-8, HPD-300, HPD-400, D-101)1 g 和上样液 20 mL, 置空气振荡器中振摇 24 h, 过滤, 滤液为平衡液; 将吸附后的大孔吸附树脂转移至具塞锥形瓶中, 加 70% 乙醇 20 mL 振荡 24 h, 过滤, 滤液加 70% 乙醇定容至 25 mL 量瓶中为解析液, 备用。按 2.1 项下方法测定芦丁含量, 计算各树脂的吸附率分别为 97.07%, 85.58%, 97.93%, 94.78%, 94.03%, 洗脱率依次为 87.73%, 90.10%, 47.83%, 89.96%, 93.54%, 故选择 X-5 型大孔树脂纯化天山雪莲黄酮类成分。

2.4 上样量考察 取上样液(100 g·L⁻¹)240 mL 以 3 BV·h⁻¹ 的流速过 X-5 型树脂柱(20 mL), 收集流出液, 每 0.5 BV 为 1 次, 按 2.1 项下方法测定流

出液中芦丁含量,结果表明流出液达6 BV时芦丁质量浓度迅速增大,开始泄漏,故最大上样量定为6 BV。

2.5 洗脱剂考察 取上样液($50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)120 mL以 $3\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速过X-5型树脂柱(20 mL),依次加水和体积分数为20%,40%,60%的乙醇溶液进行洗脱,洗脱流速 $3\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$,每1 BV收集1次并定容至25 mL量瓶中,每个梯度洗脱6 BV,按2.1项下方法测定洗脱液中芦丁含量,结果发现加水3 BV可洗去水溶性杂质至Molish反应成阴性,加20%乙醇6 BV除去其他杂质,用40%乙醇5 BV洗脱,黄酮类成分即可充分洗脱。

2.6 上样液质量浓度考察 取上样液($100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)适量,分别加水稀释成质量浓度为100,75,50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。分别精密量取各上样液75,100,150 mL以 $3\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 过X-5型树脂柱,依次加水3 BV,20%乙醇6 BV,40%乙醇5 BV洗脱,洗脱流速 $3\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$,收集40%乙醇洗脱物,按2.1项下方法测定总黄酮含量,结果上样液质量浓度为100,75,50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,芦丁质量分数分别为11.89%,12.57%,13.02%,故选择上样液质量浓度 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.7 上样流速考察 取上样液($50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)3份,每份6 BV,分别以1,2,3 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 过X-5型大孔树脂柱,依次加水3 BV,20%乙醇6 BV,40%乙醇5 BV以 $3\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速洗脱,收集40%乙醇洗脱液,结果芦丁质量分数分别为11.59%,11.92%,12.08%,故选择上样流速 $3\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

2.8 洗脱流速考察 取上样液($50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)3份,每份6 BV,以 $3\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速通过树脂柱,依次加水3 BV,20%乙醇6 BV,40%乙醇5 BV洗脱,洗脱流速分别1,2,3 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$,收集40%乙醇洗脱液,计算干浸膏中芦丁质量分数分别为10.75%,10.83%,11.32%,故选择洗脱速度 $3\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

2.9 验证试验 精密量取 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 药液6 BV按优选的纯化工艺进行3次验证试验,结果40%乙醇洗脱液干浸膏中芦丁质量分数分别为12.20%,12.15%,12.08%,表明优选的工艺稳定可行。

3 讨论

邢建国等^[8]采用HPD-400型树脂富集得到天山雪莲有效成分,收集30%乙醇与50%乙醇的混合洗脱液,芦丁质量分数约提高了5倍。而本文加乙醇溶液梯度洗脱后,提取物中芦丁的质量分数由1.07%提高至12.14%,含量约提高了12倍,为天山雪莲黄酮类成分的研究开发提供参考。

[参考文献]

- [1] 林秀云,华碧春,黄秋云.雪莲花药理研究进展[J].福建中医学院学报,2005,15(S1):53.
- [2] 李君山,蔡少青.雪莲花类药材的化学和药理研究进展[J].中国药学杂志,1998,33(8):449.
- [3] 袁晓凡,赵兵,王玉春.雪莲的研究进展[J].中草药,2004,35(12):1424.
- [4] Choi J W, Shin K M, Park H J, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of sinapyl alcohol and its glucoside syringin[J]. Planta Med,2004,70(11):1027.
- [5] Cho J Y, Nam K H, Kim A R, et al. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory effects of syringin [J]. J Pharm Pharmacol,2001,53(9):1287.
- [6] 张旭,王锦玉,仝燕,等.大孔树脂技术在中药提取纯化中的应用及展望[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(6):286.
- [7] 翟科峰,邢建国,何承辉,等.正交试验法优选天山雪莲提取工艺的研究[J].中成药,2008,30(10):1455.
- [8] 邢建国,翟科峰,何承辉,等.大孔吸附树脂纯化天山雪莲中有效成分的研究[J].中草药,2009,40(7):1062.

[责任编辑 仝燕]

欢迎投稿

欢迎订阅