

大孔树脂吸附纯化维药天山堇菜总黄酮

贺锐锐¹, 詹雪艳², 谭鹏², 林宏英², 陈鑫³, 赵保胜^{2*}

(1. 北京大学第一医院临床药理所, 北京 100191; 2. 北京中医药大学, 北京 100029;
3. 北京大学医学部分析教研室, 北京 100191)

[摘要] 目的: 研究大孔树脂吸附纯化天山堇菜总黄酮的条件及参数, 为黄酮类化合物的富集提供参考。方法: 比较了3种大孔树脂对天山堇菜总黄酮的吸附性能; 以天山堇菜总黄酮的得率和纯度为考察指标, 对大孔树脂吸附纯化天山堇菜总黄酮的工艺进行筛选。结果: AB-8大孔树脂对天山堇菜总黄酮的吸附性能最好, 达48.0 mg·g⁻¹湿树脂, AB-8大孔树脂对天山堇菜总黄酮最佳洗脱浓度为35%乙醇, 洗脱液为4 BV。天山堇菜总黄酮的得率达2.08%, 纯度达71.1%。结论: 大孔树脂富集黄酮类化合物工艺简便, 树脂再生容易, 可用于工业化生产。

[关键词] 天山堇菜; 黄酮化合物; 大孔树脂; 纯化; 维吾尔药

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)19-0093-03

[doi] 10.11653/syjf2013190093

Purification of Flavonoids from *Viola tianshanica* by Macroporous Resin

HE Rui-rui¹, ZHAN Xue-yan², TAN Peng², LIN Hong-ying², CHEN Xin³, ZHAO Bao-sheng^{2*}

(1. Institute of Clinical Pharmacology, Peking University, Beijing 100191, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the condition and parameters of adsorption and purification of total flavones contained in *Viola tianshanica* by macroporous resin so as to provide methods for the enrichment of flavonoids. **Method:** The adsorption properties of 3 kinds of macroporous resins for total flavonoids of *V. tianshanica* were compared; the yield and purity of total flavonoids from *V. tianshanica* were considered as standards, the purification process of total flavonoids in *V. tianshanica* by macroporous resin was selected. **Result:** It was found that the adsorption properties of AB-8 macroporous resins for total flavonoids of *V. tianshanica* were the best, up to 48 mg·g⁻¹ wet resin, the best conditions to elute the total flavonoids adsorbed by AB-8 macroporous resin was 35% ethanol, resin vs. crude drug was 2.5:1, ratio of diameter to height was 1:8. Using this process, the yield of the total flavones of *V. tianshanica* was up to 2.08%, the purity was 71.1%. **Conclusion:** This process is simple and practicable, it can be used to purify the total flavones contained in *V. tianshanica*.

[Key words] *Viola tianshanica*; flavonoids; macroporous resin; purification; Uighur medicine

[收稿日期] 20130416(013)

[基金项目] 中药复方药物动力学研究团队项目(2011-CXTD-12)

[第一作者] 贺锐锐, 研究实习员, Tel: 010-82802542, E-mail: yanheruirui@sina.com

[通讯作者] * 赵保胜, 博士, 副研究员, 从事中药药效与物质基础研究, Tel: 010-64286291, E-mail: zhaobs1973@163.com

天山堇菜 *Viola tianshanica* Maxim 为堇菜科堇菜属植物, 以全草入药^[1-2], 主要用于各种发热、受寒、感冒、胸膜炎、肺炎、咽炎、疔疮肿痈。天山堇菜经预试验检出含有挥发油、黄酮类、生物碱、氨基酸、黏液质皂苷、鞣质等物质^[3-7]。黄酮类有效成分对治疗冠心病、老年痴呆、脑血栓和消除自由基、抑菌、抗癌等方面有显著效果, 无副作用, 可以开发出多种

药品和保健食品。大孔树脂吸附分离技术应用广泛^[8-10],在医药上具有吸附、富集、分离、纯化不同母核结构药物的功能,可用于单一或复方中药的分离与纯化^[11-12]。故本课题尝试采用大孔树脂的方法富集天山堇菜中黄酮类成分,为天山堇菜的开发提供参考。

1 材料

SpectramaxM2 型分光光度计 (Molecular Devices), AY 型电子天平 (日本岛津), RE-52 型旋转蒸发仪 (上海医械专机厂), SHZ-III 型循环水真空泵 (上海锦华层析设备厂), 101A-1 型干燥箱 (上海实验仪器总厂), DR-HW-2 恒温水浴锅 (北京市医疗设备总厂)。

天山堇菜由本实验室采集, 芦丁对照品 (批号 F990707), D4020, AB8, S-8 大孔树脂 (南开大学化工厂)。

2 方法与结果

2.1 天山堇菜中总黄酮的含量测定

2.1.1 标准曲线的确定 精密称取芦丁对照品 25 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加 80% 乙醇溶解, 定容, 精密吸取 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分置于 10 mL 量瓶中, 加 5% 亚硝酸钠 0.3 mL, 放置 6 min, 再加 10% 硝酸铝 0.3 mL, 放置 6 min, 加 4% 氢氧化钠 4 mL, 加水至刻度, 摇匀, 进行全波长扫描, 在 510 nm 均有最大吸收。以 510 nm 处测得的吸光度 (A) 对质量浓度 (C) 回归, 得回归方程 $A = 10.86C - 0.0012$ ($r = 0.998$), 在 $10 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 质量浓度与吸光度有良好的线性关系。

2.1.2 天山堇菜样品液制备及其总黄酮含量测定

将天山堇菜粉碎, 过 20 目筛, 用 6 倍药材体积石油醚 (60 ~ 90 °C) 回流去脂 2 次, 每次 4 h, 再用 6 倍药材体积 70% 乙醇回流提取 4 次, 每次 2 h, 温度 80 °C, 抽滤, 合并滤液, 减压回收乙醇适量, 水浴蒸发成膏状, 再加适量热水溶解, 抽滤, 即得样品液。

2.2 大孔吸附树脂的预处理 大孔吸附树脂的预处理及装柱 在提取器中加 95% 乙醇加热回流洗脱树脂, 至洗脱液蒸干后无残留物。洗净的树脂挥去溶剂后保存备用。以乙醇湿法装柱, 用乙醇洗脱, 不时检测流出的乙醇, 直流出的乙醇液用水稀释不混浊为止 (取 1 mL 乙醇加 5 mL 水), 用纯化水洗至无醇味^[8], 备用。

2.3 工艺条件及参数的优化

2.3.1 不同大孔树脂对天山堇菜总黄酮的吸附性能比较 分别称取各预处理好的湿树脂 15.0 g, 乙

醇湿法装柱 (直径 1.5 cm × 20 cm)。吸取天山堇菜样品液 20 mL ($1.0 \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$) 上柱, 预吸附 8 h, 过柱流出液重吸附 1 次, 收集 20 mL 1 份, 流速 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 平行 3 份。按 2.1.2 测定样品液和过柱液总黄酮浓度, 计算不同树脂的吸附容量, 结果见表 1。通过表 1 结果可知, 在 3 种树脂中 AB-8 型大孔树脂对天山堇菜总黄酮的吸附性能最好, 每克湿树脂可吸附 48.00 mg。

$$\text{吸附容量} = (\text{上柱液浓度} - \text{过柱液浓度}) / \text{树脂质量} \times \text{溶液体积}$$

表 1 不同大孔树脂对天山堇黄酮吸附性能的影响

树脂名称	湿树脂/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
D4020	40.25
AB-8	48.00
S-8	43.17

2.3.2 乙醇体积分数考察 取 AB-8 20 g (干重), 经处理后, 湿法装柱 (2 cm × 20 cm), 树脂床体积约为 15 mL。再取天山堇水溶液 (总黄酮 $24.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 5 mL 上树脂柱, 以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速进行吸附, 再以 5 BV 的水洗脱后, 分别用 10%, 30%, 50%, 75%, 90% 乙醇洗脱, 各收集 4 倍猪蹄积洗脱液, 于 500 nm 处测定 A, 计算总黄酮含量, 结果见表 2。从表 2 可以看出, 最佳洗脱的乙醇体积分数为 35%。

表 2 天山堇菜总黄酮的测定

体积分数	10%	35%	50%	65%	80%
含量	1.5%	78.3%	18%	6%	0

2.3.3 洗脱曲线的绘制 将吸附饱和的树脂用 35% 乙醇, 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度洗脱, 按树脂床体积收集洗脱液, 于 500 nm 处测定 A, 计算含量, 天山堇菜总黄酮的解吸附曲线见图 1。

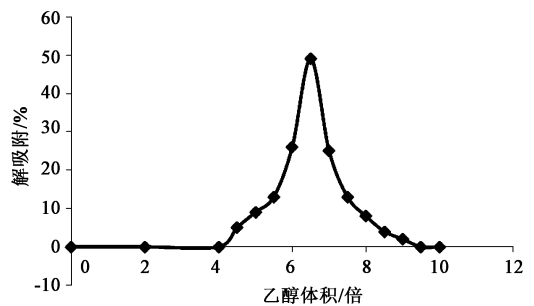


图 1 天山堇黄酮解吸附曲线

实验过程中, 35% 解吸液中天山堇含量最高, 表现出最大的富集纯化效果, 故解吸天山堇菜黄酮的

最适乙醇体积分数为 35%,绘制上述解吸附曲线,可以看出 AB-8 型大孔吸附树脂吸附黄酮类的泄露点和饱和点分别为 4.0 倍上样液体积、6.5 倍上样液体积。

2.3.4 分离的天山堇菜总黄酮纯度考查 取 20 g AB-8(干重),经处理后,湿法装柱(2 cm × 20 cm),树脂床体积约为 15 mL。再取天山堇菜水溶液(总黄酮 185.75 g·L⁻¹)5 mL 上树脂柱,收集洗脱液,定容至 100 mL,测定总黄酮的含量,取 50 mL,水浴蒸干,于 105 ℃ 干燥 3 h,测定干膏收率,计算总黄酮的纯度,结果见表 3。

表 3 天山堇菜总黄酮的测定

试验次数	总浸膏量/g	总黄酮/%
1	2.5	71.3
2	2.5	71.9
3	2.5	70.2

从表 3 可以看出,经 AB-8 大孔树脂处理后的总黄酮可达 70% 以上,且具有良好的重复性。

3 讨论

天山堇菜在维药中应用广泛,但由于其特殊的地理位置,对它的研究较少,尤其是其总黄酮的含量不高、富集、分离、纯化存在一定的困难。根据本文研究获得的参数利用 AB-8 大孔树脂吸附,提取分离天山堇菜总黄酮的得率为 2.08%,纯度为 71.11%,表明大孔树脂吸附纯化法用于天山堇菜总黄酮提取分离,具有吸附快、解吸率高、吸附容量大、洗脱率高、树脂再生简便等特点,而且产品的得率和纯度稳定。

传统药材的提取方法,如水提和醇提等方法,得到的提取物杂质与大孔树脂富集法相比偏高,如经大孔树脂吸附技术处理后得到的精制物可使药效成分高度富集,提取得率仅为原生药的 2% ~ 5%,而一般水煮法为 20%,醇沉法为 10% ~ 15%。大孔树脂能缩短生产周期,免去了静置沉淀浓缩等耗时和

耗电等工序,属于节省能源的提取方法。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准. 维吾尔药分册[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社, 2010:8.
- [2] 刘勇民. 维吾尔药志. 上册[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社, 1993:35.
- [3] 吴建芳, 薛梅, 李炳奇, 等. 天山堇菜总黄酮的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2010, 35(10):214.
- [4] 盛萍, 堵年生, 古丽, 等. HPLC 法测定维吾尔药天山堇菜中七叶内酯的含量[J]. 新疆医科大学学报, 2005, 26(6):586.
- [5] 田树革, 丁剑冰, 周晓英. 维药天山堇菜中化学成分分析及抑菌实验研究[J]. 中国民族医药杂志, 2000, 6(3):36.
- [6] 于健东, 戴忠, 林瑞超. 天山堇菜化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22):2916.
- [7] 项斌, 杜国华, 王煦辰, 等. 快速分离与鉴定天山堇菜中的天然环肽[J]. 药学学报, 2010, 45(11):1402.
- [8] 曹群华, 瞿伟菁, 李家贵, 等. 大孔树脂吸附纯化沙棘籽渣总黄酮的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(3):225.
- [9] Toki K, Saito N, Irie Y, et al. 7-O-Methylated anthocyanidin glycosides from *Catharanthus roseus*[J]. Phytochemistry, 2008, 69(5):1215.
- [10] Kong J M, Chia L S, Goh N K, et al. Analysis and biological activities of anthocyanins [J]. Phytochemistry, 2003, 64:923.
- [11] 刘通讯, 金宁, 孙寒潮. 山楂原花青素的提取纯化工艺及其组分鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(12):142.
- [12] 陈阳, 王军华, 滕利荣, 等. 大孔树脂法纯化红花芸豆色素及初步鉴定[J]. 农业工程学报, 2007, 23(6):237.

[责任编辑 邹晓翠]