

大孔树脂分离纯化酸枣仁总黄酮的工艺优选

王勇*, 李洪福, 魏娜, 李永辉

- (1. 海南医学院药学院, 海口 571199;
2. 海南省热带药用植物研究开发重点实验室, 海口 571199;
3. 海口市黎族医药重点实验室, 海口 571199)

[摘要] 目的: 优选大孔树脂分离纯化酸枣仁醇提取物中总黄酮的工艺。方法: 通过静态和动态吸附-洗脱试验比较 6 种不同型号大孔树脂对酸枣仁总黄酮的吸附和解吸性能, 筛选最佳大孔树脂型号; 以总黄酮质量浓度为指标, 采用单因素试验考察药液质量浓度、吸附速率、上样体积、洗脱剂浓度、洗脱速率等因素对纯化工艺的影响。结果: 大孔树脂分离纯化酸枣仁总黄酮的最佳工艺条件为选择 SP-207 型大孔树脂, 上样液质量浓度 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 吸附速率 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 上样量 5 BV, 加 70% 乙醇 4.5 BV 以 $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速率洗脱; 酸枣仁总黄酮纯度达 65.47%。结论: 该优选工艺稳定可行, 适用于酸枣仁总黄酮的分离纯化。

[关键词] 酸枣仁; 总黄酮; 大孔吸附树脂; 分离纯化工艺; 静态吸附-洗脱试验; 动态吸附-洗脱试验; 单因素试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0004-04

[doi] 10.11653/syjf2013230004

Optimization of Separation and Purification Technology for Total Flavonoids from *Ziziphi Spinosae Semen* by Macroporous Adsorption Resin

WANG Yong*, LI Hong-fu, WEI Na, LI Yong-hui

- (1. School of Pharmaceutical Sciences, Hainan Medical University, Haikou 571199, China; 2. Hainan Provincial Key Laboratory of Research and Development on Tropical Medicinal Herbs, Haikou 571199, China;
3. Haikou Municipal Key Laboratory of Li Nationality Medicine, Haikou 571199, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize separation and purification technology of total flavonoids from ethanol extract of *Ziziphi Spinosae Semen* (ZSS) by macroporous adsorption resin. **Method:** Adsorption and desorption properties of six different types of macroporous resins for total flavonoids from ZSS were compared by static and dynamic adsorption and desorption tests to select optimum type of macroporous resin; With the content of total flavonoids as index, single factor tests were adopted to investigate adsorption and elution conditions of macroporous resin, such as the concentration of sample diluted, adsorption rate, eluent concentration and so on. **Result:** SP-207 macroporous resin was adopted, optimum separation and purification conditions for total flavonoids from ZSS were as follows: the concentration of sample solution $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, adsorption rate $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, sample volume 5 BV, eluted by 4.5 BV of 70% ethanol at a flow rate of $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$; The content of total flavonoids from extract of ZSS was 65.47%. **Conclusion:** This optimized process was stable, feasible and suitable for separation and purification of total flavonoids from ZSS.

[Key words] *Ziziphi Spinosae Semen*; total flavonoids; macroporous adsorption resin; separation and purification technology; static adsorption and desorption test; dynamic adsorption and desorption test; single factor test

[收稿日期] 20130515(014)

[基金项目] “十一五”国家科技支撑计划(2007BAI27B05); 海南省自然科学基金项目(813192)

[通讯作者] *王勇, 硕士, 实验师/助理研究员, 从事南药与黎药提取工艺与质量标准研究, Tel: 0898-31350773, E-mail: wangyong1982_2004@aliyun.com

酸枣仁具有补肝、宁心、敛汗和生津之功效,常用于治疗虚烦不眠、惊悸多梦、体虚多汗、津伤口渴^[1],主要成分包括三萜皂苷、黄酮、生物碱、脂肪酸等,其中酸枣仁皂苷 A、总黄酮、生物碱及不饱和脂肪酸等与镇静催眠作用密切相关^[2]。大孔吸附树脂为新型高分子材料,具有良好的吸附性能,是纯化中药有效成分的一种有效方法^[3-5]。目前,已有利用大孔树脂分离纯化酸枣仁中三萜总皂苷、醇提取物、黄酮类组分的报道^[6-11]。本实验通过静态、动态吸附-洗脱试验筛选酸枣仁总黄酮的适宜大孔吸附树脂,并通过单因素试验考察上样量、乙醇体积分数等因素对纯化工艺的影响,为分离制备酸枣仁其他活性成分提供技术依据,同时也为酸枣仁保健产品的研发提供参考。

1 材料

UV-1600 型紫外-可见分光光度计(北京瑞利电分析仪器公司),H-16 型离心机(北京安必升科技发展有限公司)。SP-207,SP-825 型大孔吸附树脂(日本三菱化学公司),D-101,DA-201 净品型大孔吸附树脂(天津市海吾化工有限公司),FL-1,FL-2 型大孔吸附树脂(天津欧瑞生物科技有限公司),斯皮诺素对照品(纯度 98.5%,上海同田生物公司,批号 09051321),酸枣仁[于 2009 年 7 月购于河北省内丘县酸枣仁军景加工厂,经海南医学院药学院中药鉴定学教研室曾念开副教授鉴定为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子],水为蒸馏水,乙醇为药用级,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 酸枣仁总黄酮的含量测定 精密称取经减压干燥至恒重的斯皮诺素对照品 1.34 mg,置于 10 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 0.134 g·L⁻¹的对照品储备液。分别精密吸取该储备液 0.25,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 mL 于 10 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,于 335 nm^[1,12]处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y=0.0365X$ ($r=0.9996$),线性范围 3.35 ~ 33.5 mg·L⁻¹。

2.2 上样液的制备 取酸枣仁药材粗粉 1 kg,加 8 倍量 70% 乙醇加热回流提取 3 次,每次 2 h,过滤,合并滤液,回收乙醇浓缩至 2 L(生药质量浓度 0.5 g·mL⁻¹),离心 15 min (16 000 r·min⁻¹),取上清液备用,测得总黄酮质量浓度 1.487 g·L⁻¹。

2.3 大孔树脂的预处理 取 6 种大孔树脂适量,加

乙醇适量浸泡过夜,分别用乙醇连续洗涤数次至洗脱液加适量水无白色浑浊,加水洗至无醇味即可。

2.4 大孔树脂型号的选择

2.4.1 静态吸附试验 取 6 种大孔树脂(FL-1,FL-2,D-101,DA-201,SP-207,SP-825)各 2.0 g(干重),分别加入酸枣仁水溶液 20 mL,每 5 min 振摇 1 次,振摇 2 h,静置过夜。分别取各树脂吸附后的溶液 1.0 mL,取上清液于 335 nm 处测定 A,计算各种树脂对酸枣仁总黄酮的吸附率分别为 92.47%,59.31%,94.42%,89.37%,96.84%,96.57%。

$$\text{吸附率} = (\text{原液总黄酮质量} - \text{吸附后总黄酮质量}) / \text{原液总黄酮质量} \times 100\%$$

2.4.2 静态洗脱试验 将静态吸附的树脂滤过抽干,加入 70% 乙醇 30 mL 洗脱,每 5 min 振摇 1 次,振摇 2 h,静置过夜。分别取各洗脱液 1.0 mL,取上清液于 335 nm 处测定 A,计算各种树脂对酸枣仁总黄酮的洗脱率分别为 70.34%,56.62%,58.84%,98.18%,89.17%,88.63%。综合考虑,选择 SP-207,SP-825 型大孔树脂进一步考察。

2.4.3 动态吸附试验 取 SP-207,SP-825 型干树脂各 5.0 g,装于 20 mm × 300 mm 树脂柱内,加上样液于柱顶,以 2 mL·min⁻¹ 的流速进行动态吸附,收集流出液,每 10 mL 收集 1 次,分别于 335 nm 处测定 A,计算总黄酮质量浓度,绘制 2 种树脂的动态吸附泄露曲线,见图 1,表明 SP-207 与 SP-825 型树脂达吸附饱和时,吸附的酸枣仁总黄酮质量后者较大。

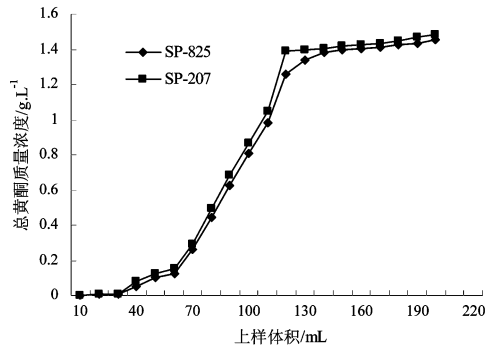


图 1 不同型号大孔树脂对酸枣仁总黄酮的动态吸附泄露曲线

2.4.4 动态洗脱试验 取处理好的 SP-207,SP-825 型树脂各 20 g,装于 20 mm × 300 mm 柱内,将上样液 180 mL 加于柱顶(树脂吸附饱和),以 2 mL·min⁻¹ 的流速进行动态吸附,加 5 BV 水以 2 BV·h⁻¹ 的流速洗脱,用 70% 乙醇以 2 BV·h⁻¹ 的流速洗脱,收集流出液,每 10 mL 收集 1 次,分别于 335 nm 处测定 A,以洗脱液体积为横坐标,总黄酮质量浓度为纵坐标,绘制 2 种树脂的动态洗脱曲线,见图 2,表

明 SP-207 型树脂的解吸效果较 SP-825 型树脂好。综合考虑,确定选用 SP-207 型大孔树脂分离纯化酸枣仁总黄酮。

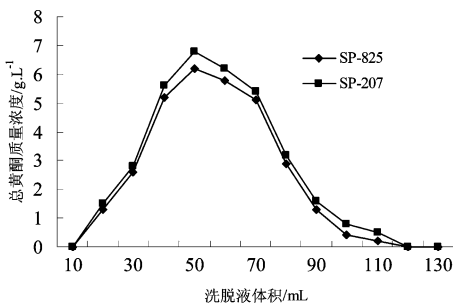


图 2 不同型号大孔树脂对酸枣仁总黄酮的动态洗脱曲线

2.5 上样液质量浓度考察 取处理好的 SP-207 型树脂 4 份,每份 10 g (干重),湿法装柱(20 mm × 300 mm),取上样液 5 mL,分别加水稀释 0, 2, 5, 10 倍后上树脂柱,以 2 BV · h⁻¹ 的流速进行吸附,加 5 BV 水洗脱,用 70% 乙醇洗脱,收集洗脱液至 50 mL,于 335 nm 处测定 A,计算酸枣仁总黄酮洗脱率分别为 71.86%, 73.76%, 74.97%, 76.03%, 表明当药液浓度稀释 10 倍时,洗脱率最高,但与药液不稀释时差别不大,故上样液不必稀释,即上样液生药质量浓度 0.5 g · mL⁻¹。

2.6 吸附速率考察 取处理好的 SP-207 型树脂 4 份,每份 10 g (干重),湿法装柱(20 mm × 300 mm),取上样液 5 mL 上柱,分别以 1, 2, 3, 4 BV · h⁻¹ 的流速吸附,加水 5 BV 洗脱,用 70% 乙醇以 2 BV · h⁻¹ 的速度洗脱,收集洗脱液至 50 mL,于 335 nm 处测定 A,计算总黄酮洗脱率分别为 87.45%, 70.34%, 69.54%, 77.05%, 表明当吸附速率为 1 BV · h⁻¹ 时,吸附效果最好。

2.7 上样量考察 取处理好的 SP-207 型树脂 10 g (干重),湿法装柱(20 mm × 300 mm),取酸枣仁水溶液 5 mL 上树脂柱,以 1 BV · h⁻¹ 的流速进行吸附,按树脂床体积数收集流出液,于 335 nm 处测定 A,计算总黄酮质量浓度,结果发现当上样量为 3 BV 时开始泄漏,5 BV 时达吸附饱和。

2.8 乙醇体积分数考察 取处理好的 SP-207 型树脂 4 份,每份 10 g (干重),湿法装柱(20 mm × 300 mm),取酸枣仁水溶液 5 mL 上柱,以 1 BV · h⁻¹ 的流速进行吸附,加水 5 BV 洗脱后,分别用体积分数为 30%, 50%, 70%, 90% 的乙醇洗脱,收集洗脱液至 50 mL,于 335 nm 处测定 A,计算总黄酮洗脱率分别为 45.86%, 65.75%, 73.98%, 75.72%, 表明当乙

醇体积分数为 90% 时,洗脱效果最好,但与用 70% 的乙醇洗脱,解吸率相差不大,且乙醇体积分数高易挥发,从经济、节约成本方面考虑,采用 70% 乙醇洗脱。

2.9 洗脱速率考察 取处理好的 SP-207 型树脂 4 份,每份 10 g (干重),湿法装柱(20 mm × 300 mm),取酸枣仁水溶液 5 mL 上样,以 1 BV · h⁻¹ 的流速进行吸附,加水 5 BV 洗脱后,用 70% 乙醇洗脱,洗脱流速分别为 1, 2, 3, 4 BV · h⁻¹,收集洗脱液至 50 mL,于 335 nm 处测定 A,计算总黄酮洗脱率分别为 73.62%, 72.63%, 81.25%, 85.48%, 故选择洗脱速率 4 BV · h⁻¹。

2.10 洗脱终点的确定 将吸附饱和的树脂用 70% 乙醇以 4 BV · h⁻¹ 的速度洗脱,按树脂床体积收集洗脱液,于 335 nm 处测定 A,计算总黄酮质量浓度,显示当洗脱液用量为 4.5 BV 时,基本将总黄酮洗净。

2.11 酸枣仁总黄酮纯度考察 取处理好的 SP-207 型树脂 3 份,每份 10 g (干重),湿法装柱(20 mm × 300 mm),取酸枣仁水溶液 5 mL 上树脂柱,收集洗脱液,定容至 100 mL,测定总黄酮的浓度,取 40 mL,水浴蒸干,于 105 °C 干燥 3 h,取干膏适量,计算总黄酮纯度,结果 3 次试验中酸枣仁总黄酮纯度分别为 63.75%, 65.98%, 66.67%, 表明经 SP-207 型大孔树脂处理后,总黄酮纯度大大提高,且具有良好的重复性。

3 讨论

影响大孔树脂分离纯化的因素除了本实验考察的因素外,还有树脂柱径高比、上样液 pH、药材量与树脂用量等因素。一般径高比越大,越有利于分离,但在实际工业生产中常选用短粗柱进行分离纯化,试验中通过考察上样条件和洗脱条件时固定树脂柱径高比约 1:7。酸枣仁中化学成分较为复杂,通过溶液 pH 调节,酸碱成分易析出沉淀,使溶液浑浊,有效成分不易被吸附、易堵塞树脂柱,影响洗脱流速,故未对上样溶液 pH 进行考察。

[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: 343.
[2] 李秋玲, 王二丽, 郭素华. 中药酸枣仁镇静催眠化学成分及药理作用[J]. 天津药学, 2010, 22(5): 59.
[3] 柯小温, 陈磊, 宋洪涛, 等. 大孔树脂与 ZTC 联用纯化白子草总黄酮的研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(9): 1219.

香蜂花中迷迭香酸的提取工艺优选

张峻颖¹, 付璞², 朱孝云³, 吴春勇^{4*}

(1. 中国药科大学中药制剂教研室, 南京 211198; 2. 青岛市市立医院药学部, 山东 青岛 266000;
3. 上海医药工业研究院, 上海 200040; 4. 中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009)

[摘要] 目的: 优选香蜂花中迷迭香酸的提取工艺。方法: 以迷迭香酸含量为指标, 通过单因素试验考察提取溶剂、提取方式、提取时间及溶剂用量对工艺的影响, 采用正交试验考察提取次数、提取时间和加醇量对迷迭香酸含量的影响, 优选香蜂花的提取工艺。采用 HPLC 测定迷迭香酸含量, 色谱条件为 Hanbon Megres C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲酸-乙腈-水 (0.5:20:80, A) 与甲酸-甲醇-乙腈 (0.5:40:60, B) 梯度洗脱 (0~25 min, 0%~45% B; 25~30 min, 45%~100% B), 检测波长 330 nm, 进样量 20 μL。结果: 最佳提取工艺为加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h; 迷迭香酸平均提取量达 25.27 mg·g⁻¹。结论: 优选的工艺稳定可行, 为香蜂花的资源开发提供参考。

[关键词] 香蜂花; 迷迭香酸; 提取工艺; 单因素试验; 正交试验; 高效液相色谱

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0007-04

[doi] 10.11653/syfy2013230007

Optimization of Extraction Technology for Rosmarinic Acid in *Melissa officinalis* L.

ZHANG Jun-ying¹, FU Ying², ZHU Xiao-yun³, WU Chun-yong^{4*}

(1. Department of Pharmacellitics of Traditional Chinese Medicines,
China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China;

2. Department of Pharmacy, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266000, China;

3. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China;

[收稿日期] 20130729(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81102819); 江苏省自然科学基金项目 (BK2012358); 中央高校基本科研业务费专项基金 (JKQ2011023)

[第一作者] 张峻颖, 博士, 讲师, 从事中药新剂型及质量分析研究, Tel:025-86185252, E-mail:ivy366300@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 吴春勇, 博士, 副教授, 从事药物分析研究, Tel:025-83271269, E-mail:analysis99@126.com

- [4] 程文明, 张明, 李俊, 等. 大孔树脂纯化野菊花总黄酮的工艺研究[J]. 中成药, 2011, 33(9):1508.
- [5] 孟兆青, 丁岗, 柳子介, 等. 异长春花苷内酰胺大孔树脂纯化研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(8):1007.
- [6] 丁轲, 崔莹, 陆晶晶, 等. SP700 大孔树脂纯化酸枣仁中三萜总皂苷的研究[J]. 离子交换与吸附, 2011, 27(1):33.
- [7] 王锋, 刘雪松, 陈勇, 等. 酸枣仁皂苷大孔树脂纯化工艺及 HPLC-ELSD 测定方法研究[J]. 中药材, 2010, 33(8):1343.
- [8] 杨军宣, 吴天骄, 尹蓉莉, 等. 正交设计法优选酸枣仁皂苷的大孔吸附树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12):63.
- [9] 李果, 王静, 李祖伦. 大孔树脂纯化酸枣仁皂苷工艺研究[J]. 中国药房, 2006, 17(15):1191.
- [10] 崔瑛, 刘菊, 张卫娜. 大孔树脂纯化酸枣仁醇提取物工艺研究[J]. 中成药, 2009, 31(7):1035.
- [11] 丁轲, 谷禹, 陆晶晶, 等. 酸枣仁黄酮组分提取纯化工艺的研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(4):62.
- [12] 王勇, 魏娜, 朱智云. 酸枣仁药材总黄酮提取工艺研究[J]. 海南医学院学报, 2011, 17(7):882.

[责任编辑 仝燕]