

大孔树脂分离纯化楮叶总黄酮的工艺优选

潘晓微^{1,2}, 黄一平^{2*}

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210028;
2. 江苏省中医药研究院国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 南京 210028)

[摘要] 目的: 优选楮叶总黄酮的大孔树脂纯化工艺。方法: 以楮叶总黄酮为指标, 通过大孔树脂静态吸附和动态吸附试验筛选树脂型号, 通过单因素试验考察上样液质量浓度、洗脱剂用量、洗脱流速等因素对纯化工艺的影响。结果: HPD450 型大孔树脂分离效果最好, 其最佳工艺参数为上样液质量浓度 $4.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 径高比 1:8, 上样量 6 BV, 吸附速度 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 加 5 BV 水洗除杂, 用 50% 乙醇 8 BV 以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度洗脱。总黄酮纯度由精制前的 30.65% 提高至 75.75%, 总黄酮保留率达 79.89%, 除杂率达 64.88%。结论: HPD450 型大孔树脂纯化楮叶总黄酮的效果良好, 且工艺合理稳定, 可推广于工业生产中应用。

[关键词] 大孔树脂; 楮叶; 总黄酮; 吸附; 分离纯化工艺; 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)23-0039-04

[doi] 10.11653/syfy2013230039

Optimization of Separation and Purification Technology for Total Flavonoids from Leaves of *Broussonetia Papyrifera* by Macroporous Resin

PAN Xiao-wei^{1,2}, HUANG Yi-ping^{2*}

[收稿日期] 20130603(008)

[基金项目] 康缘中医药科技创新基金项目(HZ1015KY)

[第一作者] 潘晓微, 在读硕士, 从事中药质量标准与制剂工艺研究, Tel:025-85637809, E-mail:panxiaowei.1990@163.com

[通讯作者] * 黄一平, 研究员, 硕士生导师, 从事中药质量标准与制剂工艺研究, Tel:025-85637809, E-mail:yiping@163.com

性, 又能保留有效成分, 缩短生产周期, 避免了传统乙醇沉淀法成本高、流程长等弊端, 且已有学者证明了壳聚糖絮凝沉降法对药液中高分子物质、多糖及可溶性固形物的保留效果优于乙醇沉淀法^[5]。试验中仅选取处方中芍药苷和苦杏仁苷为考察指标, 未对其他成分如牡丹皮中丹皮酚、枳实中辛弗林等进行研究, 主要原因是经过减压浓缩后丹皮酚和辛弗林损失率较高^[6]。

不同药材及其处方需进行针对性研究。由表 4 可知, 90% 乙醇虽可使水浸出物收率降至 17.65% (表 4), 但苦杏仁苷和芍药苷保留率降低太多; 离心法虽可使 2 种有效成分保留率较高, 但水浸出物收率未受较大影响; 采用壳聚糖絮凝剂吸附澄清技术可使水浸出物收率降至 19.03%, 又可使苦杏仁苷和芍药苷具备较高保留率, 且该方法稳定性、重复性较好, 且操作简单、成本较低, 综合考虑, 可将壳聚糖絮凝剂澄清技术作为丹桃颗粒的澄清工艺。

[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: 附录 62, 96.
- [2] 陶菊春, 吴建民. 综合加权评分法的综合权重确定新探[J]. 系统工程理论与实践, 2001, 8(8): 43.
- [3] 魏效玲, 赵立新, 任建华. 多指标试验设计综合加权评分值的确定[J]. 河北建筑科技学院学报, 2003, 20(4): 68.
- [4] 祝连彩, 王伯初. 壳聚糖在中药药液澄清中的应用[J]. 重庆大学学报, 2003, 26(12): 55.
- [5] 陈以新, 盛华刚, 林桂涛, 等. 壳聚糖絮凝沉降法与乙醇沉淀法对二冬汤精制的对比研究[J]. 中成药, 2011, 33(4): 612.
- [6] 孙运从, 林桂涛, 盛华刚, 等. 壳聚糖絮凝沉降法与乙醇沉淀法对炙甘草汤的纯化效果的比较[J]. 中成药, 2011, 33(1): 173.

[责任编辑 仝燕]

(1. College of Pharmaceutical Science, Nanjing University
of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 2. Key Laboratory of New Drug Delivery System of
Chinese Meteria Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology conditions of total flavonoids from leaves of *Broussonetia papyrifera* by macroporous adsorption resin. **Method:** With total flavonoids from leaves of *B. papyrifera* as index, type of macroporous resin was screened by static adsorption-desorption and dynamic adsorption-desorption tests, effects of eluent consumption, elution flow rate, the concentration of sample solution and other factors on purification technology were investigated by single factor tests. **Result:** HPD450 was selected for its excellent adsorption and desorption properties, optimum process was as following: the concentration of sampling solution $4.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, sampling velocity $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, sample liquid volume 6 BV, eluted by 5 BV deionized water and 8 BV 50% ethanol at speed of $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, diameter to height ratio of resin 1:8, collected eluate. Under these conditions, purity of total flavonoids was up to 75.75% from 30.65%, retention rate of total flavonoids reached 79.89%, impurity removal rate reached 64.88%. **Conclusion:** HPD450 macroporous resin was suitable for separation and purification of total flavonoids from leaves of *b. papyrifera*, optimized purification technology was stable and feasible, it could be extended for industrial production applications.

[Key words] macroporous resin; leaves of *Broussonetia papyrifera*; total flavonoids; adsorption; separation and purification technology; single factor test

楮叶,又名构叶、榖树叶、酱黄叶、谷树叶,味甘,性良,无毒,始载于《名医别录》^[1],具有凉血、利水的功效,适用于治疗吐血、衄血、血崩、外伤出血、水肿等症^[2]。现代药理研究表明,楮叶具有抗炎、抗真菌、抗氧化、利尿、降压等作用^[3-7],其主要成分包括黄酮类化合物、香豆素、生物碱、蛋白质、挥发油等。

大孔树脂是一种不溶于酸、碱及各种有机溶剂的有机高分子聚合物,具有吸附容量大、吸附速度快、解吸条件温和、易于再生等优点。黄酮类化合物具有多酚结构,依靠其与大孔吸附树脂之间的范德华力进行吸附,可取得良好分离纯化效果,近年来已被广泛用于黄酮类化合物等植物活性成分的提取和分离,尤其适于工业化生产^[8]。本实验以楮叶总黄酮为研究对象,利用大孔树脂纯化技术对楮叶总黄酮进行纯化,为下一步的剂型研究奠定基础。

1 材料

UV-2802 型紫外分光光度计(上海维诚仪器有限公司生产),MS 半微量型 1/10 万电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),Milli-Q 型纯水器(美国 Millipore 公司),AL204 型 1/万电子分析天平(梅特勒-托利多公司),SHZ-82 型气水浴恒温振荡器(常州丹瑞实验设备有限公司生产),DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

D101 型大孔树脂(上海摩速科学仪器有限公司),AB-8,HPD400,HPD450,HPD500,HPD600 型大孔树脂(河北沧州宝恩吸附材料科技有限公司),聚酰胺(中国医药集团上海化学试剂公司),木犀草素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111520-200504),楮叶于 2011 年 9 月采自江苏省南京市,由江苏省中医药研究院黄一平研究员鉴定为落叶乔木桑科植物构树 *Broussonetia papyrifera* L. Vent. 的叶,所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮的含量测定

2.1.1 标准曲线的绘制^[9] 精密称取木犀草素对照品 3.88 mg,置于 10 mL 量瓶中,加 95% 乙醇适量使溶解并稀释至刻度,摇匀,得对照品储备液。精密吸取储备液 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6 mL,分别置 10 mL 量瓶中,各加入 5% AlCl_3 溶液 1 mL,用 95% 乙醇定容至刻度,摇匀,放置 30 min,以相应试剂为空白,于 278 nm 处测定吸光度(A),以 A 为横坐标,对照品质量浓度为纵坐标,得回归方程 $Y = 28.57X - 1.031$ ($r = 0.9995$),线性范围 $3.88 \sim 23.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.2 供试品溶液的制备 在前期研究基础上,取楮叶样品粗粉 500 g,加 75% 乙醇浸泡 6 h,以 $4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的速度渗漉,收集 7 倍量渗漉液,减压回收乙醇成相对密度 1.05(60 °C)的浸膏,加水冷藏,

过滤除去油脂等杂质,取上样液,即得,冷藏备用。

2.1.3 样品测定 取待测液 1 mL,置 25 mL 量瓶中,加 95% 乙醇至刻度,摇匀,精密吸取 1 mL,置 10 mL 量瓶中,按 2.1.1 项下方法自“各加入 5% AlCl₃ 溶液 1 mL”至“于 278 nm 处测定 A”操作,计算总黄酮含量。

2.1.4 精密密度试验 取 11.64 mg·L⁻¹ 木犀草素对照品溶液 6 份,按 2.1.3 项下方法测定,结果 A 的 RSD 0.99%;取供试品溶液适量,按 2.1.3 项下方法重复测定 6 次,结果 A 的 RSD 1.03%,表明仪器精密密度良好。

2.1.5 重复性试验 取同批号楮叶药材,按 2.1.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.1.3 项下方法测定,结果 A 的 RSD 1.63%,表明该方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品溶液适量,分别于制备后 0,2,4,6,8,10,12 h 后按 2.1.3 项下方法测定,结果 A 的 RSD 1.37%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.7 加样回收率试验 精密量取已知含量的楮叶样品溶液 1 mL,共 6 份,分别加入 11.64 mg·L⁻¹ 木犀草素对照品溶液 1 mL,按 2.1.3 项下方法测定 A,计算平均回收率 98.77%,RSD 1.78%。

2.2 大孔树脂纯化工艺考察

2.2.1 大孔树脂的预处理 取适量大孔树脂,加 95% 乙醇浸泡 24 h 以上,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。

2.2.2 大孔树脂型号筛选 采用静态吸附法,将 7 种处理好的树脂抽滤至不滴水为准,精密称取各树脂 5 g,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加入样品液 50 mL (总黄酮质量浓度 5.5 g·L⁻¹) 后于震荡器上,频率 120 次/min,间隔 1 min 振荡 1 次,共 2 h,静置 20 h,使其达到饱和吸附,吸取上层液测定总黄酮含量,计算树脂饱和吸附量。将经静态饱和吸附总黄酮后的树脂滤出,吸干表面水分,精密加入 60% 乙醇 50 mL 同法振荡 2 h 后滤出,测定洗脱液总黄酮含量,计算洗脱率^[10],见表 1。结果表明中等极性和极性的大孔树脂对楮叶总黄酮的静态饱和吸附量较弱极性、非极性和氢键型树脂高,其中 HPD450 型树脂静态吸附量最大;在静态洗脱中 HPD450,HPD500,HPD600 型树脂洗脱率均 > 85%;综合考虑,选取

HPD-450 型树脂。

饱和吸附量 = (总黄酮初始质量浓度 - 吸附后总黄酮质量浓度) × 吸附液体积 / 树脂量;

洗脱率 = 洗脱液总黄酮质量浓度 × 吸附液体积 / 饱和吸附量 × 100%

表 1 楮叶总黄酮的大孔树脂静态吸附考察 (n = 3)

树脂型号	树脂吸附类型	饱和吸附量/mg·g ⁻¹	洗脱率/%
聚酰胺	氢键	30.03	77.07
D101	非极性	30.50	81.18
AB-8	弱极性	32.27	73.04
HPD400	中等极性	40.87	78.86
HPD450	中等极性	43.93	88.25
HPD500	极性	38.27	88.00
HPD600	极性	36.72	89.17

2.2.3 洗脱剂浓度考察 精密称取已处理好的 HPD-450 型树脂 5 g,共 7 份,分别置于 100 mL 具塞锥形瓶中,各精密加入 2.1.2 项下供试品溶液 50 mL,按 2.2.2 项下方法震荡,使其达到饱和吸附,分离树脂,吸干表面水分。对应加入体积分数为 30%,40%,50%,60%,70%,80%,90% 的乙醇溶液各 50 mL,同法震荡洗脱 2 h 后过滤,测定洗脱液中总黄酮质量浓度,计算洗脱率分别为 64.37%,73.61%,92.23%,89.90%,80.08%,83.05%,71.18%,故选择 50% 乙醇为洗脱剂。

2.2.4 上样液质量浓度考察 将不同质量浓度的样品溶液(5.5,4.4,3.3,2.2,1.1 g·L⁻¹) 分别通过湿体积 20 mL 的 HPD450 型树脂柱,以 1 BV·h⁻¹ 的流速进行动态吸附,分别上样 40 mL,收集流出液,加去离子水 2 BV 洗脱,合并两部分流出液,测定总黄酮质量浓度,计算动态吸附率(P)分别为 78.2%,86.12%,87.34%,89.49%,90.87%,综合考虑,故选择上样液质量浓度 4.4 g·L⁻¹。

$$P = (C_0 V_y - C_e V_e) / C_0 V_y \times 100\%$$

式中 C₀ 为上样液质量浓度, V_y 为上样体积, C_e 为流出液中总黄酮质量浓度, V_e 为流出液体积。

2.2.5 径高比考察 选择径高比分别为 1:10,1:8,1:6,1:4 的树脂柱 4 根,湿法装入 HPD450 型树脂 20 mL,各加入 4.4 g·L⁻¹ 样品溶液 40 mL 以 1 BV·h⁻¹ 的速度过柱,用去离子水 2 BV 洗脱,合并两部分流出液,测定总黄酮质量浓度,计算总黄酮 P 分别为 90.01%,89.58%,82.37%,75.93%,故选择径高比 1:8。

2.2.6 吸附流速考察 取 4.4 g·L⁻¹ 样品溶液

40 mL 通过 HPD450 型大孔树脂柱(树脂体积 20 mL, 径高比 1:8), 分别以 1, 2, 3 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速进行动态吸附, 用去离子水 2 BV 洗脱, 合并两部分流出液, 测定总黄酮质量浓度, 计算总黄酮 P 分别为 89.77%, 76.24%, 62.79%, 故选择吸附流速 1 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

2.2.7 上样量考察 取 4.4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 样品溶液 200 mL 以 1 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度通过 HPD450 型大孔树脂柱(树脂体积 20 mL, 径高比 1:8), 收集流出液, 每 1 BV 收集 1 份, 共收集 10 份, 测定流出液中总黄酮含量, 绘制泄漏曲线, 结果见图 1, 表明上样体积在 120 mL (6 BV) 内泄露较少, 即上样总黄酮质量达 528 mg 时, 累积吸附量达 505.10 mg 时出现明显泄露。

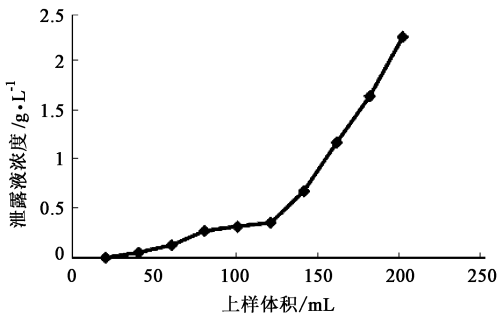


图 1 楮叶总黄酮的 HPD450 型大孔树脂泄漏曲线

2.2.8 水洗用量考察 量取 HPD450 型大孔树脂 20 mL 湿法装柱, 精密量取楮叶样品溶液 120 mL 按优选的工艺上样、过柱, 吸附完全后加水 10 BV 洗脱杂质, 以 1 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速进行动态吸附, 收集洗脱液, 每 1 BV 为 1 份, 测定每份洗脱液中总黄酮质量浓度分别为 0.284, 0.367, 0.681, 0.923, 0 ~ 0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明水洗用量为 5 BV 时, 树脂表面的总黄酮溶液及多糖已基本除尽, 故确定水洗用量 5 BV。

2.2.9 洗脱流速考察 取 4.4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的总黄酮样品溶液 120 mL, 以 1 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上样, 充分吸附, 加去离子水 5 BV 冲洗, 用 50% 乙醇 10 BV 分别以 1, 2, 3, 4 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 速度洗脱, 收集洗脱液, 测定总黄酮质量浓度, 计算洗脱率分别为 92.11%, 83.47%, 72.34%, 66.73%, 故采用 1 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速洗脱。

2.2.10 洗脱剂体积的考察 将 4.4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品溶液 120 mL 通过 HPD450 型大孔树脂柱(树脂体积 20 mL, 径高比 1:8), 以 1 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速进行动态吸附, 用去离子水 5 BV 洗脱除杂后, 用 50% 乙醇 10 BV 以 1 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速洗脱, 每 1 BV 为 1 份收集洗脱液, 共收集 10 份, 测定每份洗脱液中总黄酮含量, 绘制洗脱曲线, 结果见图 2, 表明当用 50% 乙醇 160 mL 洗脱时, 总黄酮已经基本被洗脱完全, 故确

定 50% 乙醇的洗脱体积 8 BV。

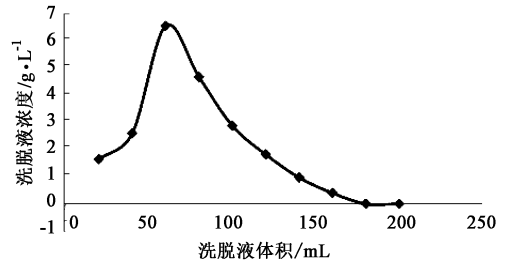


图 2 楮叶总黄酮的 HPD450 型大孔树脂洗脱曲线

2.3 验证试验 取 4.4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的上样液 3 份, 每份 120 mL (6 BV), 按优选的纯化工艺进行 3 次验证试验, 结果总黄酮纯度由精制前的 30.65% 提高至 75.75%, 总黄酮保留率达 79.89%, 除杂率达 64.88%, 说明优选的工艺稳定可行。

3 讨论

在前期对楮叶质量标准的研究中, 由于木犀草素含量较高, 故选择木犀草素为指标成分, 以反映楮叶总黄酮的含量。试验研究表明采用中等极性的大孔树脂对楮叶总黄酮的富集效果优于极性、弱极性、非极性、氢键吸附型树脂, 其中 HPD450 型树脂的纯化效果最好, 经验证试验表明优选的纯化工艺稳定可行, 该工艺具有操作简单、重复性好等优点, 具有较好的推广应用前景。

[参考文献]

- [1] 梁·陶弘景. 名医别录[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986:414.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977:2288.
- [3] 陈随清, 黄显章, 崔瑛, 等. 构树叶对大鼠前列腺炎症模型的影响[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(3/4): 110.
- [4] 黄一平, 卞美广, 朱黎明. 楮叶体外抗真菌作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(1): 49.
- [5] 贾东辉, 杨雪莹. 构树叶中黄酮成分分析和抗氧化活性的测定[J]. 职业与健康, 2006, 22(17): 1352.
- [6] 吴世成, 杨家林, 万进军. 构树叶利尿活性研究[J]. 医学信息, 2010(9): 2307.
- [7] 刘培庆, 曲钧庆. 构叶的降压作用及其机制初步分析[J]. 泰山医学院学报, 1992, 13(1): 58.
- [8] 于智峰, 王敏. 大孔吸附树脂在黄酮类化合物分离中的应用[J]. 中药材, 2006, 29(12): 1380.
- [9] 周晓霞. 杭白菊中总黄酮的浸提工艺优化及浸提动力学研究[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(12): 2645.
- [10] 郁建生, 郁建平. 大孔吸附树脂分离纯化野菊花总黄酮[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(20): 2123.

[责任编辑 全燕]