

泥胡菜总黄酮大孔树脂纯化工艺优化

林珊¹, 刘仁根², 曾建伟¹, 邹秀红³, 吴锦忠^{1,2*}

(1. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福州 350122;

2. 福建中医药大学药学院, 福州 350122; 3. 福建省永春县林业局, 福建永春 362600)

[摘要] 目的: 优选大孔树脂纯化泥胡菜总黄酮的工艺条件。方法: 采用静态吸附-洗脱试验筛选大孔树脂型号, 动态吸附法优化大孔树脂纯化泥胡菜总黄酮工艺参数。结果: 优选的纯化工艺为选用 D101 型树脂, 上样液质量浓度 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 上样速率 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 上样体积 4 BV, 上样液 pH 5, 加 50% 乙醇 5 BV 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱, 泥胡菜总黄酮纯度达 47.8%。结论: D101 型大孔树脂对泥胡菜总黄酮具有良好的纯化效果。

[关键词] 泥胡菜; 总黄酮; 大孔树脂; 纯化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0034-03

[doi] 10.11653/syfy2013120034

Optimization of Purification Technology of Total Flavonoids from *Hemisteptia lyrata* by Macroporous Resin

LIN Shan¹, LIU Ren-gen², ZENG Jian-wei¹, ZOU Xiu-hong³, WU Jin-zhong^{1,2*}

(1. Fujian Academy of Intergrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Fuzhou 350122, China; 2. College of Pharmacy, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China; 3. Forestry Bureau of Yongchun County, Yongchun 362600, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology conditions of total flavonoids from *Hemisteptia lyrata* by macroporous resin. **Method:** Two models of macroporous resins were selected by static adsorption-elution test, purification technology of total flavonoids from *H. lyrata* with macroporous resin was optimized by dynamic adsorption method. **Result:** D101 resin was adopted, optimized purification technology was as following: the concentration of sample solution $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ with pH 5, adsorption velocity $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, sample volume 4 BV, then eluted with 5 BV 50% ethanol at the speed of $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, collected eluate. Under these conditions, yield of total flavonoids was 47.8%. **Conclusion:** D101 macroporous resin could purify total flavonoids from *H. lyrata* effectively.

[Key words] *Hemisteptia lyrata*; total flavonoids; macroporous resin; purification

泥胡菜广泛分布于我国各地,具有清热解毒、消

肿祛瘀的作用,临床用于治疗痔漏、痈肿、疔疮、外伤出血和骨折等症^[1]。其主要化学成分为黄酮、甾醇和木脂素等化合物^[2-7]。目前对泥胡菜黄酮类化合物的研究主要为成分分离和含量测定方面,有关其纯化工艺的研究尚未见报道。近年利用大孔树脂技术对总黄酮进行纯化取得了良好效果^[8-10]。在前期研究已优化了泥胡菜总黄酮提取工艺的基础上,本实验选用大孔树脂对泥胡菜总黄酮进行纯化,并优选其工艺条件,为泥胡菜总黄酮的进一步研究提供参考。

[收稿日期] 20130207(001)

[基金项目] 福建省自然科学基金课题(2010J01198);福建省重点高校服务海西项目(No. 5)

[第一作者] 林珊,硕士,实验师,从事中药化学成分提取分离及活性筛选研究, Tel: 0591-22861168, E-mail: lisa3350@163.com

[通讯作者] * 吴锦忠,博士,教授,从事复方中药天然药物物质基础研究, Tel: 0591-22861161, E-mail: jinzhongf@126.com

1 材料

UV-1800 型紫外分光光度计(日本岛津公司),SFG-02B 型电热恒温鼓风干燥箱(黄石市恒丰医疗器械有限公司),AR2130 型电子天平(奥豪斯仪器有限公司),ELIX5 型纯水制备系统(厦门精艺兴业科技有限公司),QYC-200 型震荡仪(上海福玛实验设备有限公司)。

泥胡菜采自福建省永春县,经福建中医药大学中药鉴定教研室杨成梓副教授鉴定为菊科泥胡菜属泥胡菜 *Hemisteptia lyrata* Bunge 的干燥全草。芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号 200707),D101 和 AB-8 型大孔吸附树脂(安徽三星树脂科技有限公司),试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的绘制^[11-12] 称取芦丁对照品 10.0 mg,用 60% 乙醇溶解并定容于 50 mL 量瓶中,得对照品贮备液。分别吸取该贮备液 1,2,4,6,8 mL 置于 25 mL 量瓶中,用 60% 乙醇溶液补至 12.5 mL,加 5% 亚硝酸钠试液 0.75 mL 摇匀,放置 5 min,加 10% 硝酸铝试液 0.75 mL,摇匀,放置 5 min,加 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠试液 10 mL,用 60% 乙醇定容至刻度,摇匀,放置 10 min。以 60% 乙醇溶液为参比,于 510 nm 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 $Y = 11.880X - 0.027$ ($r = 0.9998$),线性范围 0.008 ~ 0.064 g·L⁻¹。

2.2 树脂预处理 取大孔树脂适量加 95% 乙醇浸泡 24 h,用 95% 乙醇冲洗至流出液加水无白色浑浊,水洗至无醇味;加 4% HCl 溶液浸泡 4 h,水洗至中性;加 4% NaOH 溶液浸泡 4 h,水洗至中性,备用。

2.3 泥胡菜总黄酮提取液的制备 称取泥胡菜药材 200 g,加 10 倍量 50% 乙醇回流提取 2 次,每次 1.5 h,过滤,合并提取液,减压浓缩至 100 mL,测得总黄酮质量浓度 2.0 g·L⁻¹。

2.4 大孔树脂型号筛选

2.4.1 静态吸附率的测定 选取 D101 和 AB-8 型预处理的大孔吸附树脂各 1 g,分别置于 100 mL 锥形瓶中,加入上述提取液 50 mL,在摇床上振荡吸附 24 h,过滤,测定滤液中总黄酮质量浓度,计算吸附率分别为 83.3%,56.6%。

$$\text{吸附率} = (C_0V_0 - C_1V_1) / C_0V_0 \times 100\%$$

式中 C_0 为上样液质量浓度, C_1 为吸附后剩余溶液的质量浓度, V_0 为上样体积, V_1 为吸附后剩余溶液体积。

2.4.2 静态洗脱率的测定 将 2.4.1 项下已达饱

和吸附的树脂过滤,分别置于 100 mL 锥形瓶中,加 70% 乙醇 50 mL,在摇床上振荡洗脱 24 h,过滤,测定滤液中总黄酮质量浓度,计算洗脱率分别为 94.9%,89.2%。

$$\text{洗脱率} = C_2V_2 / (C_0V_0 - C_1V_1) \times 100\%$$

式中 C_0 为上样液质量浓度, C_1 为吸附后剩余溶液的质量浓度, C_2 为洗脱液质量浓度, V_0 为上样体积, V_1 为吸附后剩余溶液体积, V_2 为洗脱液体积。

由以上结果可知,D101 型大孔树脂对泥胡菜总黄酮的吸附率和洗脱率均高于 AB-8 型大孔树脂,故选择 D101 型大孔树脂进行纯化试验。

2.5 纯化工艺优选

2.5.1 上样液质量浓度考察 称取 D101 型大孔树脂 5 份,每份 2 g,湿法装柱(2.2 cm × 5 cm,1 BV = 20 mL),分别加总黄酮质量浓度为 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 g·L⁻¹ 的上样液各 60 mL,以 3 BV·h⁻¹ 的流速过柱进行动态吸附,收集流出液,用 3 BV 去离子水洗脱,合并两部分流出液,测定总黄酮质量浓度,计算吸附率分别 73.3%,78.0%,85.1%,64.6%,53.9%,故选用上样液质量浓度 1.5 g·L⁻¹。

2.5.2 上样流速考察 量取总黄酮质量浓度 1.5 g·L⁻¹ 的试液 60 mL,分别以 1,2,3,4,5 BV·h⁻¹ 的流速上样,收集流出液,用 3 BV 去离子水洗脱,合并两部分流出液,测定总黄酮质量浓度,计算吸附率分别为 89.8%,90.1%,88.7%,64.4%,47.5%。综合时耗和吸附率考虑,选择上样流速 3 BV·h⁻¹。

2.5.3 上样量考察 量取总黄酮质量浓度 1.5 g·L⁻¹ 的试液,以 3 BV·h⁻¹ 流速上样,每 10 mL 收集 1 份,测定每份流出液中总黄酮质量浓度,见图 1。结果发现上样体积在 80 mL 内泄漏较少,而 > 80 mL 出现明显泄漏,当上样体积达 170 mL 时,几乎达到完全泄漏,故选上样体积 80 mL,即 8 BV。

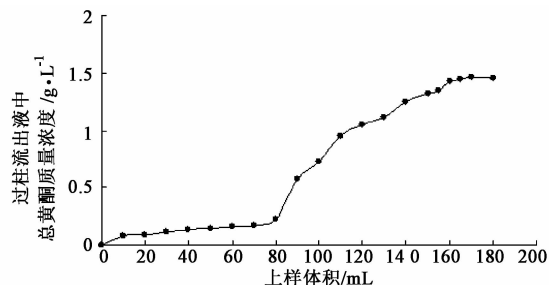


图 1 泥胡菜总黄酮泄漏曲线

2.5.4 上样液 pH 考察 量取总黄酮质量浓度 1.5 g·L⁻¹ 试液 80 mL,调 pH 分别为 4,5,6,7,8,以 3 BV·h⁻¹ 流速上样,收集流出液,用 3 BV 去离子水洗脱,

合并两部分流出液,测定总黄酮质量浓度,计算吸附率分别为 86.7%,89.8%,79.1%,64.4%,47.5%,故选取上样液 pH 5。

2.5.5 乙醇体积分数考察 量取总黄酮质量浓度 $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的试液 80 mL,以 $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速上样,用 3 BV 去离子水冲洗,收集两部分流出液,测定总黄酮质量浓度。分别用 5 BV 体积分数为 30%,40%,50%,60%,70%,80%,90% 的乙醇溶液以 $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速洗脱,收集洗脱液,测定总黄酮质量浓度,计算洗脱率分别为 58.4%,72.9%,92.8%,77.2%,72.1%,67.3%,62.0%,故选用 50% 乙醇。

2.5.6 洗脱流速的考察 量取总黄酮质量浓度 $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的试液 80 mL,以 $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速上样,用 3 BV 去离子水冲洗,加 50% 乙醇 5 BV 分别以 1,2,3,4 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的速度洗脱,收集洗脱液,测定总黄酮质量浓度,计算洗脱率分别为 86.5%,92.8%,89.1%,70.7%,故选择洗脱流速 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

2.5.7 洗脱剂用量的考察 量取总黄酮质量浓度 $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的试液 80 mL,以 $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速上样,用 3 BV 去离子水冲洗,加 50% 乙醇以 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的速度洗脱,直至洗脱液无色,收集流出液,每 20 mL 为 1 份。结果洗脱液体积为 1,2,3,4,5 BV 时,测得流出液中总黄酮质量浓度分别为 1.31,1.04,0.67,0.33,0.09 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,故选乙醇 5 BV。

2.6 验证试验 按优选的纯化工艺平行制备 3 批样品,依 2.1 项下方法测定总黄酮含量,计算总黄酮平均质量分数 47.8% ($n=3$,RSD 1.15%),说明该工艺稳定可靠。

3 讨论

样品液 pH 对化合物的吸附、分离效果的影响较大。根据化合物结构的特点调整原液 pH,可达到较好的吸附效果。一般情况下酸性物质易在酸性溶液中被吸附,碱性物质易在碱性溶液中被吸附^[13]。在酸性条件下对泥胡菜总黄酮的吸附性能较好,这

可能与提取物呈弱酸性有关。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海:上海人民出版社,1985:3038.
- [2] 董政起,李琳琳,徐珍,等. 泥胡菜属植物化学成分与药理作用研究[J]. 长春中医药大学学报,2012,28(2):353.
- [3] 黄本东,张清华. 泥胡菜挥发油化学成份的分析[J]. 华西药学杂志,1992,7(1):23.
- [4] 邹忠杰,杨峻山,鞠建华. 泥胡菜化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(10):812.
- [5] 邹忠杰,杨峻山,鞠建华. 泥胡菜化学成分研究[J]. 中草药,2006,37(9):1303.
- [6] 邹忠杰,杨峻山. 泥胡菜化学成分研究[J]. 广东药学院学报,2007,23(5):492.
- [7] 王艳梅,王继龙,张秋,等. 长白山区野生泥胡菜中总黄酮及微量元素的分析研究[J]. 北方园艺,2009(11):219.
- [8] 易海燕,何桂霞,欧阳文,等. 大孔吸附树脂分离纯化藤茶总黄酮的研究[J]. 中草药,2011,42(1):74.
- [9] 曾永长,梁少瑜,邢学峰,等. 白花蛇舌草总黄酮的大孔树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(18):26.
- [10] 朱欣婷,刘云. 大孔树脂纯化无花果叶总黄酮[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):13.
- [11] 钟明媚,陈飞虎,袁丽萍,等. 大孔树脂对鬼针草总黄酮的吸附分离特性研究[J]. 中药材,2007,30(3):338.
- [12] 葛淑兰,田景振. 大孔吸附树脂对淫羊藿总黄酮的分离纯化工艺研究[J]. 中国药学杂志,2005,40(5):365.
- [13] 韩丽,谢秀琼,周淑芳,等. 实用中药制剂新技术[M]. 北京:化学工业出版社,2002:184.

[责任编辑 仝燕]