

薄荷总黄酮的纯化工艺优选

钟昆芮¹, 张凡¹, 姜艳艳¹, 王玉霞², 刘斌^{1*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100102; 2. 重庆医药高等专科学校, 重庆 400030)

[摘要] 目的: 优选聚酰胺纯化薄荷总黄酮的工艺条件。方法: 以总黄酮含量和吸附-洗脱率为指标, 采用单因素试验考察 5 种不同类型的纯化材料对总黄酮的吸附能力, 确定纯化材料, 并对其纯化工艺中吸附条件、除杂条件和洗脱条件进行优化。结果: 优化工艺条件为上样液质量浓度 $0.1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 上样量为生药量与聚酰胺体积比 1:6, 吸附流速 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 柱床径高比 1:9, 待吸附结束后, 用 3 BV 10% 乙醇洗脱除杂, 除杂流速 $4 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 再用 3 BV 90% 乙醇以 $8 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速洗脱, 经聚酰胺 (30~60 目) 纯化后, 薄荷总黄酮纯度可达 50%。结论: 优选的纯化工艺分离效果良好、操作简单、重复性好, 可用于分离富集薄荷总黄酮。

[关键词] 薄荷; 总黄酮; 聚酰胺; 纯化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0011-04

Optimization of Purification Technology for Total Flavonoids from *Mentha haplocalyx*

ZHONG Kun-rui¹, ZHANG Fan¹, JIANG Yan-yan¹, WANG Yu-xia², LIU Bin^{1*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 400030, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize polyamide purification technology of total flavonoids from *Mentha haplocalyx*. **Method:** With the content and transfer rate of total flavonoids as indexes, adsorption capacity of 5 different kinds of purification materials for total flavonoids was investigated by single factor test, in order to

[收稿日期] 20121018(005)

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20100013110002); 国家自然科学基金项目(81173520)

[第一作者] 钟昆芮, 在读硕士, 从事中药化学研究, E-mail: markselby1992@163.com

[通讯作者] * 刘斌, 教授, 从事中药(复方)质量控制和评价方法研究, Tel: 010-84738628, E-mail: liubinyn67@163.com

筛, 整粒需过 60 目筛。根据金莲花总黄酮提取物的物理特性, 制备过程中最好采用高速制粒机, 以保证物料能充分混合, 乙醇宜少量多次加入, 这样才会使软材不会过软或过硬, 保证颗粒的粒度。

[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: 205.
- [2] 顾桂秋, 张西果. 更昔洛韦分散片的处方工艺研究[J]. 中国现代临床医学, 2005, 4(5): 1.
- [3] 陈燕军, 张琛, 赵小妹, 等. 几种常用填充剂与崩解剂在中药分散片应用中的性能比较[J]. 中国中药杂

志, 2002, 27(8): 580.

- [4] 李绍林, 张建军. 丹参提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 46.
- [5] 李瑞明, 容颖慈, 邓桂兴. 感冒灵分散片的研制[J]. 广东药学, 2003, 13(2): 4.
- [6] 张颖娟, 郭阿霞. 复方百部颗粒组方药味配伍比例优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 40.
- [7] 杨基森. 中药制剂设计学[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 1992: 338.
- [8] 高英, 李卫民, 伍淑华, 等. 均匀设计与正交设计在金莲花提取工艺筛选研究中的比较应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(1): 1.

[责任编辑 仝燕]

determine optimum purification material, and adsorption, impurity removing and eluting conditions in purification technology were optimized. **Result:** Optimum purification conditions were as follows: The concentration of sample solution $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, diameter-height ratio of column 1:9, adsorption rate $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, proportion between the total amount of solution and resin column 1:6, 3 BV of 10% ethanol to wipe off impurity with flow rate of $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, then 3 BV of 90% ethanol to elute with $8 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$. After purified by polyamide (30-60 mesh), purity of total flavonoids was up to 50%. **Conclusion:** This optimized purification technology was simple and feasible with good reproducibility, it could be used for the separation and the enrichment of total flavonoids from *M. haplocalyx*.

[**Key words**] *Mentha haplocalyx*; total flavonoids; polyamide; purification

薄荷为传统的辛凉解表药,具有疏散风热、清利头目、疏肝行气等作用^[1-2]。其主要化学成分有挥发油、酚酸类、萜类、黄酮类等,其中黄酮类成分,如醉鱼草苷、刺槐素、椴树素、蒙花苷、香蜂草苷、香叶木素是薄荷中重要的药效成分^[3-6],具有抗氧化、清除自由基等作用^[7-8]。聚酰胺近年被广泛用于中药有效成分的分离^[9-11],具有选择性高、分离效果好、操作简便等特点。尤其适合分离纯化酚类、醌类、黄酮类化合物^[12]。本实验以薄荷总黄酮含量和吸附-洗脱率为指标,采用单因素试验优选纯化材料,并优选其纯化工艺。

1 材料

TU-1810 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用有限公司),BT 25S 型 1/10 万电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司)。

薄荷(北京同仁堂药材公司,由北京中医药大学张贵君教授鉴定为唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 干燥全草),蒙花苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111528-200606)。聚酰胺(30~60 目),D-101 型大孔吸附树脂(天津南开大学化工厂);HPD-826,HPD-400,S-8 型大孔吸附树脂(沧州宝恩化工有限公司);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄荷总黄酮含量测定

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取蒙花苷对照品适量,置 10 mL 量瓶中,加 70% 乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取薄荷黄酮部位 4 mg,置 10 mL 量瓶中,用 70% 乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 线性关系考察 精密吸取 $0.304 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蒙花苷对照品溶液 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4 mL, 分别置于加有 100 mg 镁粉的具塞刻度试管中,将试管置冷水浴中,缓慢滴加浓 HCl 3.0 mL,并不时振摇试

管,加 70% 乙醇至 7.0 mL,摇匀,置 80 °C 水浴中加热 30 min,取出,迅速冷却至室温,用 70% 乙醇补足至 7.0 mL,摇匀,于 470 nm 处测定吸光度(A),通过外标两点法计算总黄酮含量。以对照品质量浓度为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $Y = 8.2735X - 0.034$ ($r = 0.9996$),表明蒙花苷在 $0.0174 \sim 0.1042 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 A 呈良好线性关系。

2.1.4 稳定性考察 精密吸取蒙花苷对照品溶液和供试品溶液各 2.0 mL,按 2.1.3 项下方法显色后放置不同时间测定 A。结果 RSD 分别为 0.75%, 1.02%;表明蒙花苷对照品和供试品溶液在显色后 60 min 内基本稳定。

2.1.5 精密度考察 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,精密吸取 6 份,按 2.1.3 项下方法测定 A,计算 RSD 0.19%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 加样回收率试验 取已知含量的薄荷总黄酮样品(总黄酮质量分数 50.45%)6 份,每份约 2 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,各精密加入 $1.0020 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蒙花苷对照品溶液 1.0 mL,用 70% 乙醇定容。精密吸取 2.0 mL,按 2.1.3 项下方法测定 A,结果平均加样回收率 100.51%,RSD 1.16%。

2.2 纯化材料筛选

2.2.1 上样液制备 取薄荷药材,加 14 倍量 70% 乙醇提取 3 次,每次 1.5 h,合并乙醇提取液,减压回收溶剂至无乙醇味,得薄荷乙醇提取物,加水分散溶解,以薄荷药材计,上样液质量浓度 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,以 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,取上清液,即得。

2.2.2 动态吸附考察 分别取处理好的 D-101, HPD-400, HPD-826, S-8 型大孔吸附树脂及聚酰胺各 30 mL,装柱,测定死体积,上样液通过各纯化材料色谱柱,收集流出液,每 10 mL 为 1 份,用 HCl-Mg 比色法确定吸附终点,吸附达到饱和和停止上样,记录上样量。树脂柱和聚酰胺柱均用水洗脱除杂,再用 70% 乙醇洗脱至无色,收集乙醇洗脱液,回收溶剂至无乙醇味,减压干燥称重,按 2.1.3 项下方法测定乙

醇洗脱物中总黄酮的含量。计算比吸附量分别为 1.18, 1.66, 1.42, 1.89, 2.37 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 吸附-洗脱率依次为 48.78%, 53.13%, 58.75%, 48.76%, 51.83%。表明聚酰胺纯化性能优于其他纯化材料。

比吸附量 = (上样液体积 - 死体积) \times 上样液中总黄酮含量 / 纯化材料体积; 吸附-洗脱率 = 洗脱物质量 \times 洗脱物中总黄酮含量 / (上样液体积 - 死体积) \times 上样液中总黄酮含量 $\times 100\%$ 。

2.3 聚酰胺纯化工艺吸附条件优化^[3-5, 13-14]

2.3.1 离心乙醇体积分数考察 按 2.2.1 项下方法制备提取液, 回收溶剂至干, 残留物分别用水, 15% 乙醇, 30% 乙醇, 45% 乙醇稀释至药液质量浓度 0.1 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 以 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 取上清液回收溶剂至无乙醇味, 加水稀释至质量浓度 0.1 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 即为上样液。通过聚酰胺柱, 吸附结束后, 用 70% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 回收溶剂至无乙醇味, 减压干燥称定质量, 按 2.1.3 项下方法测定 70% 乙醇洗脱物中总黄酮质量分数依次为 30.16%, 31.32%, 33.40%, 30.83%; 计算吸附-洗脱率分别为 72.07%, 81.02%, 88.60%, 90.46%。故确定离心乙醇体积分数为 30%。

2.3.2 上样液质量浓度考察 根据样品的溶解性能及预试验结果, 配制质量浓度分别为 0.05, 0.1, 0.2 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的上样液。量取相同体积的上样液进行吸附, 按 2.3.1 项下方法自“用 70% 乙醇洗脱”开始, 测得总黄酮质量分数分别为 34.06%, 35.57%, 33.59%; 吸附-洗脱率依次为 89.39%, 89.34%, 79.02%。因此选择上样液质量浓度 0.1 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3.3 吸附流速考察 取上样液, 分别以 2, 4, 6 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速通过聚酰胺柱, 吸附结束后, 按 2.3.1 项下方法自“用 70% 乙醇洗脱”开始, 测得总黄酮质量分数分别为 35.86%, 33.65%, 31.84%; 吸附-洗脱率分别为 89.34%, 79.21%, 72.50%。故选择吸附流速 2 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

2.3.4 径高比考察 取上样液, 分别通过已经处理好的柱床径高比为 1:7, 1:9, 1:12 的聚酰胺柱, 吸附结束后, 按 2.3.1 项下方法自“用 70% 乙醇洗脱”开始, 测得总黄酮质量分数依次为 31.13%, 35.86%, 36.16%; 吸附-洗脱率依次为 89.48%, 89.34%, 86.58%。故最终选择柱床径高比 1:9。

2.3.5 最大上样量的考察 取上样液 30, 40, 50, 60, 70 mL, 分别通过聚酰胺柱, 吸附结束后, 用 70% 乙醇洗脱, 收集 70% 乙醇洗脱液, 回收溶剂至无乙醇味, 减压干燥称重, 按 2.3.1 项下方法自“用 70%

乙醇洗脱”开始, 测得总黄酮质量分数依次为 34.45%, 35.21%, 34.12%, 31.89%, 29.70%; 吸附-洗脱率依次为 88.95%, 87.40%, 87.94%, 84.59%, 83.12%。故确定最大上样量为 50 mL, 即上样药材量与聚酰胺体积比 1:6。

2.4 聚酰胺纯化工艺除杂条件优化

2.4.1 除杂溶剂考察 取上样液, 按确定的吸附条件进行吸附后, 分别用体积分数为 5%, 10%, 15% 的乙醇溶液各 2 BV 进行洗脱除杂, 除杂流速 4 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 按 2.3.1 项下方法自“用 70% 乙醇洗脱”开始, 测得总黄酮质量分数依次为 34.28%, 39.40%, 38.90%; 吸附-洗脱率分别为 87.20%, 86.68%, 75.93%。故确定除杂溶剂为 10% 乙醇。

2.4.2 除杂溶剂用量考察 取上样液, 按已确定的优化吸附条件进行动态吸附, 吸附结束后, 分别用 10% 乙醇除杂洗脱, 洗脱体积分别为 2, 3, 4 BV, 流速 4 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 用 2 BV 70% 乙醇洗脱, 洗脱流速 4 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 收集洗脱液, 回收溶剂至无乙醇味, 减压干燥称重, 测得总黄酮质量分数依次为 39.40%, 42.87%, 43.13%; 吸附-洗脱率分别为 86.68%, 85.14%, 80.31%。因此确定除杂溶剂用量 3 BV。

2.4.3 除杂溶剂流速考察 取上样液, 按确定的吸附条件进行动态吸附, 吸附结束后, 用 3 BV 10% 乙醇洗脱除杂, 除杂流速分别为 2, 4, 8 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 按 2.4.2 项下自“用 2 BV 70% 乙醇洗脱”开始, 测得总黄酮质量分数分别为 44.70%, 43.58%, 40.21%; 吸附-洗脱率分别为 82.47%, 85.93%, 87.44%。因此选择除杂流速 8 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

2.5 洗脱条件优化

2.5.1 洗脱溶剂考察 取上样液, 按确定的吸附、除杂条件操作, 分别用体积分数为 50%, 70%, 90% 的乙醇溶液各 2 BV 洗脱, 洗脱流速 4 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 收集乙醇洗脱液, 回收溶剂至无乙醇味, 减压干燥称重, 测得总黄酮质量分数分别为 34.62%, 43.07%, 50.21%; 吸附-洗脱率依次为 73.33%, 85.90%, 90.52%。故确定 90% 乙醇为洗脱剂。

2.5.2 洗脱流速考察 取上样液按确定的吸附、除杂条件操作, 用 2 BV 90% 乙醇洗脱, 流速分别为 2, 4, 8 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 收集乙醇洗脱液, 回收溶剂至无乙醇味, 减压干燥称重, 测得总黄酮质量分数依次为 48.53%, 50.21%, 50.50%; 吸附-洗脱率分别为 90.50%, 90.52%, 89.48%。故选择洗脱流速 8 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

2.5.3 洗脱曲线 取上样液, 按确定的吸附、除杂

条件操作,用 90% 乙醇洗脱,洗脱流速 $8 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,收集洗脱液,每 1 BV 为 1 份,共 5 份,回收溶剂至无乙醇味,减压干燥称重。计算总黄酮洗脱量,分别为 14.02,17.68,1.10,0.31,0.24 mg。说明 3 BV 90% 乙醇洗脱时,总黄酮已基本洗脱完全,确定洗脱体积为 3 BV。

2.6 工艺验证 分别取薄荷药材 50,500,1 000 g,按 2.2.1 项下方法制备上样液,依优化的分离富集工艺制备 3 批薄荷黄酮部位。结果测得总黄酮质量分数分别为 50.58%,50.92%,51.02%;吸附-洗脱率分别为 88.10%,86.24%,86.55%;总黄酮得率分别为 0.64%,0.64%,0.64%。说明优选的工艺稳定可靠,可满足工业生产基本要求。

3 讨论

在建立薄荷总黄酮含量测定方法过程中,曾采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法,结果显示薄荷黄酮部位和对照品两者显色后最大吸收波长相差较大,同时该反应在黄酮 B 环不具备 3',4'-邻位二酚羟基结构时无法显色^[15],且专属性较差^[16],因此未采用此方法进行薄荷总黄酮含量测定。 AlCl_3 比色法对薄荷总黄酮含量测定也不适用,薄荷所含主要黄酮类化合物蒙花苷、橙皮苷等经 AlCl_3 络合显色后,其最大吸收波长红移较小,无法作为薄荷总黄酮含量测定方法。经查阅文献^[17-19],最终确定采用 HCl-Mg 比色法对薄荷总黄酮进行含量测定,方法准确、可靠、稳定性好,可作为薄荷总黄酮含量测定的有效方法。

离心液乙醇体积分数和洗脱液乙醇体积分数是关键参数。在聚酰胺纯化工艺中,上样液需回收溶剂并离心去除脂溶性成分后才可通过聚酰胺,否则大量脂溶性物质上样会导致严重的柱堵塞。但薄荷黄酮部位含有低极性黄酮苷元,如香叶木素,在此操作过程中由于溶解度下降,被离心损失。选择合适的离心乙醇体积分数有利于提高黄酮部位总黄酮含量和吸附-洗脱率,达到最好的纯化效果。洗脱溶剂的乙醇体积分数是提高黄酮部位总黄酮含量的另一关键工艺参数。采用 90% 乙醇洗脱,黄酮部位中总黄酮含量最高。该工艺分离效果良好,操作简单,重复性良好,具有较好的推广应用价值和产业化前景。

[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,2010:354.

- [2] 高学敏. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社,2002:69.
- [3] 徐超. 薄荷化学成分研究[D]. 北京:北京中医药大学,2009.
- [4] 李祥,邢文峰. 薄荷的化学成分及临床应用研究进展[J]. 中南药学,2011,9(5):362.
- [5] 曾建伟,钱士辉,吴锦忠,等. 薄荷非挥发性成分研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(5):400.
- [6] 郑健,赵东升,吴斌,等. 留兰香中化学成分的分离与鉴定[J]. 中国中药杂志,2002,27(10):749.
- [7] 梁振益,吴娟. 薄荷提取物抗氧化性能的研究[J]. 中国油脂,2008,33(2):26.
- [8] 周蓉,邹怀波,池小雷. 薄荷提取物的抗氧化性研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(31):9847.
- [9] 薛扬,吴唯. 聚酰胺树脂的层析分离应用[J]. 化工新型材料,2005,33(4):50.
- [10] 吴新荣,刘志刚,颜仁梁,等. 聚酰胺颗粒分离纯化土茯苓总黄酮研究[J]. 中药材,2009,32(10):1606.
- [11] 蔡凌云,黎云祥,石凤湘,等. 白筋叶总黄酮的聚酰胺树脂纯化工艺[J]. 时珍国医国药,2011,22(4):926.
- [12] 黄先丽,王晓静. 聚酰胺在药物提取分离中的应用[J]. 齐鲁药事,2008,27(6):359.
- [13] 涂华,陈碧琼,张燕军. 天然类黄酮物质的提取工艺研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):277.
- [14] 罗朵生,朴胜华,黄利华,等. 天然类黄酮物质的提取工艺研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(17):17.
- [15] 刘利群. 有机理论与药物分析[M]. 北京:人民卫生出版社,1984:344.
- [16] 郭亚健,范莉,王晓强,等. 关于 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法测定总黄酮方法的探讨[J]. 药物分析杂志,2002,22(2):97.
- [17] 龚元,李咏梅,陈明. 基于盐酸-镁粉反应比色法的梭洞学中总黄酮含量的测定[J]. 安徽农业科学,2010,38(11):5636.
- [18] 董玉,王爱民,陈朝军,等. 文冠木中总黄酮的含量测定方法研究[J]. 内蒙古医学院学报,2008,30(5):364.
- [19] 夏林波,董倩,邓仕任,等. 中药芫花总黄酮含量测定方法研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(9):2099.

[责任编辑 全燕]