

HP-20 型大孔树脂富集纯化南山茶花总黄酮的工艺优选

尚志春, 宋明明, 史丽颖*, 于大永, 唐玲, 王永奇
(大连大学药物研究所, 辽宁 大连 116622)

[摘要] 目的: 优选 HP-20 型大孔树脂富集纯化南山茶花总黄酮的工艺参数。方法: 以总黄酮含量和洗脱率为指标, 采用单因素试验考察 HP-20 型大孔吸附树脂的静态饱和吸附量、动态饱和吸附量、乙醇体积分数、乙醇用量等工艺参数。结果: HP-20 型大孔树脂对南山茶花总黄酮的静态饱和吸附量 $50.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。最佳纯化工艺为上样液体积 9 BV, 分别用 3 BV 去离子水及 15% 乙醇洗除杂质, 35% 乙醇 10.5 BV 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱。总黄酮纯度达 54.24%, 总黄酮洗脱率 29.83%。结论: HP-20 型大孔吸附树脂对南山茶花总黄酮具有良好的纯化效果, 优选的工艺合理、稳定可行。

[关键词] 南山茶花; HP-20 型大孔吸附树脂; 总黄酮; 工艺条件

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0011-03

[doi] 10.11653/zgsyfyjzz2013070011

Optimization of Enrichment and Purification Technology for Total Flavonoids from Flowers of *Camellia semiserrata* by HP-20 Macroporous Resin

SHANG Zhi-chun, SONG Ming-ming, SHI Li-ying*, YU Da-yong, TANG Ling, WANG Yong-qi
(Institute of Materia Medica, Dalian University, Dalian 116622, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology parameters of total flavonoids from flowers of *Camellia semiserrata* with HP-20 macroporous resin. **Method:** With elution ratio and purity of total flavonoids as indexes, technology parameters of HP-20 macroporous resin were investigated by single factor test, including static saturated adsorption amount, dynamic saturated adsorption amount, the concentration and amount of alcohol, et al. **Result:** Static saturated adsorption amount was 50.5 mg per gram resin. Optimum purification technology was as following: the volume of sample liquid 9 BV, washed impurity with 3 BV of deionized water and 3 BV of 15% ethanol, eluted with 10.5 BV of 35% ethanol at flow rate of $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$. Under these process conditions, purity of total flavonoids was up to 54.24%, elution rate of total flavonoids was 29.83%. **Conclusion:** HP-20 macroporous resin had good purification effects on total flavonoids from flowers of *C. semiserrata*, this optimized purification process was reasonable, stable and feasible.

[Key words] flowers of *Camellia semiserrata*; HP-20 macroporous resin; total flavonoids; technology conditions

南山茶分布于广西的东南部至广东西南部,海拔 250 ~ 500 m 山地,资源丰富,具有抗癌、抗骨质疏松

松、抗 HIV 病毒^[1]等作用。本课题组前期已经对南山茶种子、叶、果皮的化学成分^[2-4]进行了研究,发现其富含的黄酮类成分具有较高的抗骨质疏松的活性^[5]。南山茶花是南山茶的重要药用部位,且总黄酮含量较高^[6]。本实验采用 HP-20 型大孔吸附树脂对富集纯化南山茶花中总黄酮,并通过单因素试验优选工艺条件,为南山茶资源的开发利用做一些前期的基础工作。

[收稿日期] 20121024(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30772714)

[第一作者] 尚志春,在读硕士,从事天然活性物质的研究, E-mail: shang8102016@163.com

[通讯作者] * 史丽颖,博士,副教授,从事天然活性物质研究, E-mail: shiliying99074@163.com

1 材料

Unico7200 型可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司), Laborata4000 型旋转蒸发器(德国 Heidolph 公司), BP210S 型 1/10 万电子天平(德国 Sartorius 公司)。南山茶花采集于广西平南县六陈镇, 经中科院昆明植物所裴盛基教授鉴定为山茶科植物南山茶 *Camellia semiserrata* Chi. 的花; 芦丁对照品(东京化成工业株式会社, 纯度 98%), HP-20 型大孔吸附树脂(日本三菱化学公司), 水为蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的绘制^[6] 精密称取烘至恒重的黄酮对照品 10 mg, 用甲醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中, 精密吸取该溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL, 分别置于具塞试管中, 加甲醇至 4.0 mL, 再加入 5% NaNO₂ 溶液 0.3 mL, 摇匀, 室温放置 6 min, 加 10% AlCl₃ 溶液 0.3 mL, 摇匀, 室温放置 10 min, 于 400 nm 处测定吸光度(A)。以 A 为纵坐标, 总黄酮质量浓度为横坐标, 得回归方程 $A = 21.044C - 0.0474$ ($r = 0.9994$), 表明总黄酮质量浓度在 0.002 ~ 0.0346 g·L⁻¹ 与 A 呈良好线性关系。

2.2 HP-20 型大孔吸附树脂的预处理^[7-8] 取一定量 HP-20 型大孔吸附树脂, 用 95% 乙醇浸泡 24 h, 湿法装柱, 先用 95% 乙醇冲洗, 至流出液加适量水无白色混浊出现, 改用去离子水冲洗至无醇味, 若需要可再用 5% HCl 浸泡 8 h, 用去离子水洗至中性, 加 5% NaOH 浸泡 8 h, 去离子水洗至中性, 浸泡于去离子水中备用。

2.3 总黄酮提取浸膏的制备 将南山花粉碎置 500 mL 圆底烧瓶中, 加 20 倍量 85% 乙醇于 95 °C 回流提取 2 次, 每次 3 h, 合并浸提液, 减压浓缩成膏状, 于 60 °C 烘至恒重, 作为供试品浸膏待用。

2.4 静态饱和吸附量的确定 称取供试品浸膏 1.21 g, 用水溶解并定容至 100 mL, 制成总黄酮质量浓度 1.86 g·L⁻¹ 的溶液。称取 HP-20 型大孔吸附树脂 3.00 g, 置于 250 mL 锥形瓶中, 加入上述溶液 100 mL。室温振荡 24 h, 静置, 吸附完全后, 取样测定残余溶液中总黄酮含量。计算平衡吸附量^[9]。结果静态饱和吸附量 50.5 mg·g⁻¹。

$$Q = (C_0 - C)V/G$$

式中 C_0 和 C 分别为初始和平衡时溶液中总黄酮质量浓度, V 为供试品溶液体积, G 为树脂质量。

2.5 动态饱和吸附量的确定 取 HP-20 型大孔吸附树脂 20.00 g, 湿法装柱(径高比 1:10), 取供试品

浸膏 67.11 mg, 用水溶解并定容至 200 mL 量瓶中, 制成总黄酮质量浓度 0.051 g·L⁻¹ 的溶液。以 2 BV·h⁻¹ 连续通过树脂柱, 收集流出液, 测定流出液中总黄酮质量浓度。结果上样量分别为 30, 60, 90, 120, 150, 180 mL 时, 流出液中总黄酮质量浓度分别为 0.0047, 0.017, 0.027, 0.034, 0.038, 0.053 g·L⁻¹。说明当上样量为 180 mL(9 BV) 时, HP-20 型大孔吸附树脂已达饱和^[10]。

2.6 乙醇体积分数考察 取 HP-20 型大孔吸附树脂 20.00 g, 湿法装柱, 称取 2.3 项下干燥至恒重的浸膏 1.28 g, 用适量水溶解后上柱, 依次加水及体积分数 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 80% 的乙醇溶液以 2 BV·h⁻¹ 梯度洗脱, 分别洗至无色, 收集各部分洗脱液, 减压浓缩成膏状, 60 °C 真空干燥至恒重, 测定总黄酮质量分数分别为 9.44%, 25.6%, 33.7%, 19.4%, 16.1%, 12.4%, 15.6%; 总黄酮洗脱率分别为 3.94%, 7.17%, 12.63%, 6.74%, 5.75%, 9.51%, 7.67%。说明采用 30% 乙醇洗脱时效果最好。为探求更高的总黄酮纯度和洗脱率, 考察了依次用水, 15% 乙醇、35% 乙醇以 2 BV·h⁻¹ 梯度洗脱, 结果在 35% 乙醇的洗脱液中总黄酮纯度达 54.24%, 洗脱率 29.83%。

2.7 乙醇洗脱剂用量的确定 取 HP-20 型大孔吸附树脂 20.00 g, 湿法装柱, 量取 2.5 项下溶液 180 mL 上柱, 吸附完全后。依次用去离子水 3 BV, 15% 乙醇 3 BV 及 35% 乙醇以 2 BV·h⁻¹ 流速洗脱, 直至洗脱液无色, 收集 35% 乙醇洗脱液, 每 1.5 BV 收集 1 次, 测定每次收集液中总黄酮质量浓度。结果当 35% 乙醇用量为 10.5 BV 时, 收集液中总黄酮质量浓度仅为 0.0014 g·L⁻¹, 因此 35% 乙醇用量选 10.5 BV。

2.8 工艺验证试验 取 5 份南山茶花供试品溶液 180 mL, 按优选的工艺进行洗脱, 收集 35% 乙醇洗脱液, 旋转蒸发, 干燥, 测得总黄酮纯度分别为 55.22%, 53.26%, 53.16%, 53.11%, 54.67%, 洗脱率分别为 30.28%, 30.04%, 29.35%, 29.23%, 30.15%, 说明优选的工艺重复性较好。

3 讨论

在优选乙醇体积分数时, 30% 乙醇洗脱液中总黄酮含量最高, 之后随乙醇体积分数增加, 黄酮含量逐渐下降。因此, 本实验尝试了采用水和 35% 乙醇洗脱, 测得 35% 乙醇洗脱液中总黄酮纯度达 37.4%。虽然高于 30% 乙醇洗脱液中总黄酮纯度, 但还是未使总黄酮纯度 > 50%, 因此还需继续探索。

正交试验优选罗布麻叶中总鞣质提取工艺

樊珍珍, 热娜·卡斯木*, 王晓梅, 胡君萍, 王新玲, 王小青
(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的: 优选罗布麻叶中总鞣质的提取工艺。方法: 以鞣质含量为指标, 采用单因素试验考察提取方式、提取溶剂、料液比等因素对提取工艺的影响; 以浸膏得量和总鞣质提取量为综合评价指标, 通过正交试验考察提取次数、提取时间及料液比对罗布麻叶中总鞣质提取工艺的影响, 确定最佳提取工艺。结果: 最佳提取工艺为 $A_2B_3C_3$, 即加 20 倍量甲醇回流提取 3 次, 每次 3 h。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 可作为罗布麻叶的工业化生产工艺。

[关键词] 罗布麻叶; 总鞣质; 提取工艺; 正交试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0013-04

[doi] 10.11653/zgsyxfjzxx2013070013

Optimization of Extraction Technology for Total Tannin from Leaves *Apocynum venetum* by Orthogonal Test

FAN Zhen-zhen, RENA Ka-simu*, WANG Xiao-mei, HU Jun-ping, WANG Xin-ling, WANG Xiao-qing
(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[收稿日期] 20121021(001)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区科技支疆项目(201191259); 2012 年国家科技支撑计划课题(2012BAI30B02)

[第一作者] 樊珍珍, 在读硕士, 从事新疆特色中药资源的开发与利用, Tel: 0991-4363345, E-mail: van-zone26@163.com

[通讯作者] * 热娜·卡斯木, 博士, 教授, 从事新疆特色中药资源的开发与利用, Tel: 0991-4362473, E-mail: renakasimu@vip.sina.com

用水, 15% 乙醇及 35% 乙醇梯度洗脱时, 35% 乙醇的洗脱液中总黄酮纯度达 54.24%。推测可能原因是南山茶花醇提物中水溶性及极性大的杂质较多, 降低了富集物中总黄酮的相对含量, 用 15% 乙醇可有效地将这些杂质与主要黄酮类物质分离。因此, 确定最佳纯化工艺为上样液体积 9 BV, 依次用 3 BV 去离子水, 15% 乙醇 3 BV, 35% 乙醇 10.5 BV 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速梯度洗脱, 结果 35% 乙醇洗脱液中总黄酮纯度由 37.4% 提高至 54.24%, 样品中总黄酮洗脱率也达 29.83%。

[参考文献]

[1] 王永奇, 吴小娟, 李红冰, 等. 药用山茶属植物的研究[J]. 大连大学学报, 2006, 27(4): 47.
[2] Wu X J, Tang L, Lin H J, et al. Flavonoids from seeds of *Camellia semiserrata* Chi. and their estrogenic activity[J]. Biosci Biotechnol. Biochem, 2008, 72(9): 2428.
[3] 林红景, 冯宝民, 史丽颖, 等. 南山茶叶化学成分的研究

究[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(24): 1852.
[4] 张薇薇, 于大永, 史丽颖, 等. 南山茶果皮化学成分的研究[J]. 广西植物, 2012, 32(5): 698.
[5] 唐玲, 冯宝民, 史丽颖, 等. 山茶属植物的抗骨质疏松作用[J]. 中药材, 2008, 31(10): 1540.
[6] 王宝昌, 张薇薇, 史丽颖, 等. 南山茶花化学成分的含量分析[J]. 华西药学, 2012, 27(6): 100.
[7] 黄志宏, 蒋东旭, 赖小平. 大孔吸附树脂法富集纯化荆芥穗总黄酮的工艺研究[J]. 中药材, 2010, 33(9): 1476.
[8] 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.
[9] 林红景, 吴小娟, 唐前, 等. Diaion HP-20 富集纯化南山茶种子抗原原 I 型骨质疏松有效部位的研究[J]. 中国药房, 2009, 20(3): 183.
[10] 海平, 苏雅乐其其格. 蒙药小白蒿中总黄酮的提取及其抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 59.

[责任编辑 仝燕]