

大孔吸附树脂纯化独活总黄酮的工艺优选

桑林¹, 王晓林^{2*}, 钟方丽², 张志龙², 薛健飞², 陈帅²

- (1. 长春大学特殊教育学院, 长春 130022;
2. 吉林化工学院化学与制药工程学院, 吉林 吉林 132022)

[摘要] 目的: 优选独活总黄酮的大孔吸附树脂纯化工艺。方法: 以总黄酮的吸附率和洗脱率为指标, 采用静态吸附-洗脱与动态吸附-洗脱试验优选大孔树脂型号; 通过单因素试验优选独活总黄酮的纯化工艺参数。结果: LSA-33型大孔吸附树脂纯化效果最好, 其最佳工艺为上样药液中总黄酮质量浓度 $0.1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 上柱药液 pH 2~3, 吸附速率 $4\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 用3 BV 75%乙醇洗脱, 洗脱速率 $3\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 收集洗脱液, 经大孔树脂纯化后独活干浸膏中总黄酮纯度由原来的9.87%提高至32.59%。结论: LSA-33型大孔树脂适用于独活总黄酮的初步纯化。

[关键词] 大孔树脂; 独活; 总黄酮; 纯化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0057-04

Optimization of Purification Technology for Total Flavonoids in *Angelica pubescens* by Macroporous Adsorption Resin

SANG Lin¹, WANG Xiao-lin^{2*}, ZHONG Fang-li², ZHANG Zhi-long², XUE Jian-fei², CHEN Shuai²

- (1. Special Education College of Changchun University, Changchun 130022, China;
2. School of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin 132022, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology of total flavonoids in *Angelica pubescens* by macroporous resin. **Method:** With adsorption rate and desorption rate of total flavonoids as indexes, macroporous resin models were optimized by static adsorption and desorption experiments as well as dynamic adsorption and desorption tests; Purification technology parameters of total flavonoids were optimized by single factor test. **Result:** LSA-33 macroporous resin presented the best effect of purification, optimum purification conditions were as followings: the concentration of total flavonoids from sample solution $0.1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH of sample solution 2-3, adsorption rate $4\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, eluted with 3 BV 75% ethanol, desorption rate $3\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, collected eluent, purity of total flavonoids in dry extract of *A. pubescens* was changed from 9.87% to 32.59%. **Conclusion:** LSA-33 macroporous resin was suitable for preliminary purification of total flavonoids in *A. pubescens*.

[Key words] macroporous resin; *Angelica pubescens*; total flavonoids; purification

独活药用历史悠久, 广泛记载于多部中医药著作, 现多用于慢性关节炎、坐骨神经痛等属肝肾不

足、慢性气管炎等症的治疗^[1-2], 主要成分有香豆素、挥发油、皂苷和黄酮, 还有少量甾醇、有机酸和糖类成分^[3-4], 现代药理研究表明, 独活具有镇痛及抗炎作用^[5-6]、抗氧化及延缓脑老化作用^[7]、抗血小板凝集与心血管作用^[8]、抗心律失常作用^[9]、抗肿瘤作用^[10]等。

黄酮类化合物广泛存在于自然界, 是一类重要的天然有机化合物, 其生理活性多种多样, 引起了国内外的广泛重视, 但目前关于其黄酮类化合物的纯

[收稿日期] 20120908(007)

[第一作者] 桑林, 硕士, 副教授, 从事中医推拿、针灸及天然产物的研究, E-mail: wangxiaolin69@eyou.com

[通讯作者] * 王晓林, 硕士, 副教授, 从事天然产物有效成分的提取及纯化研究, Tel: 18943241239, E-mail: wangxiaolin69@eyou.com

化研究还很少。本实验考察 6 种不同型号大孔树脂对独活总黄酮的纯化效果,确定最佳大孔树脂型号,并通过单因素试验优选其纯化工艺,为独活的进一步开发利用提供依据。

1 材料

752N 型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),W5-100SP 型恒温水浴锅(上海申生科技有限公司),CS101-AB 型电热鼓风干燥箱(中国重庆实验设备厂),JY2002 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

独活购自安徽省亳州市华申药业有限公司,经吉林化工学院药学系薛健飞博士鉴定为伞形科植物重齿毛当归 *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan 的干燥根;LSA-21,LSA-10,AB-8,LX-36,D-101,LSA-33 型大孔吸附树脂(西安蓝晓科技有限公司);芦丁(中国药品生物制品检定所,批号 100080-200707),水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量测定 精密称取 120 °C 干燥至恒重的芦丁对照品 20.0 mg,置 100 mL 量瓶中,加 60% 乙醇超声溶解并定容至刻度,制成 0.20 g·L⁻¹ 的芦丁对照品溶液^[11]。精密吸取芦丁对照品溶液 2.0,4.0,6.0,8.0,10.0,12.0 mL,分别置于 50 mL 量瓶中,加 60% 乙醇 10 mL,摇匀,加入 5% 亚硝酸钠溶液 1.0 mL,摇匀,放置 6 min,加入 10% 硝酸铝溶液 1.0 mL,摇匀,放置 6 min,加入 4% 氢氧化钠溶液 10.0 mL,并用 60% 乙醇稀释至刻度,摇匀,放置 15 min。以相应试剂为空白对照液,照紫外分光光

度法,于 510 nm 处测定吸光度(A)。以质量浓度为横坐标,A 为纵坐标^[12-13],得回归方程 $A = 12.0C - 0.00183$ ($r = 0.9999$),表明芦丁在 8.0 ~ 48.0 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系。

2.2 树脂类型的选择

2.2.1 树脂预处理 称取 LX-36,LSA-33,LSA-10,D-101,AB-8,LSA-21 型大孔吸附树脂各 50 g,加入玻璃树脂柱内,用 95% 乙醇连续洗涤数次约 2 h,直至流出液加水(1:5)不混浊为止,用水洗涤至无醇味,加 5% HCl 溶液浸泡 4 h 后以 4 ~ 6 BV·h⁻¹ 的流速洗涤 2 h,用水洗至中性,加 2% NaOH 溶液浸泡 6 h 后以 4 ~ 6 BV·h⁻¹ 洗涤 2 h,用水洗至中性,抽滤至干,置于密闭容器中,备用^[14]。

2.2.2 独活总黄酮提取液的制备 取独活粗粉适量,加 8 倍量 60% 乙醇加热回流提取 3 次,每次 1 h,过滤,合并滤液,减压浓缩至无醇味,用水定容至一定体积,摇匀,备用。

2.2.3 静态吸附及洗脱试验 取处理后的 LX-36,LSA-33,LSA-10,D-101,AB-8,LSA-21 型湿树脂各 2 g,加至 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 0.6996 g·L⁻¹ 独活总黄酮提取液 40 mL,每 10 min 振摇 1 次,约 30 s,共 2 h,静止 48 h,滤过,分别吸取各树脂吸附后药液 4.0 mL,按 2.1 项下方法于 510 nm 处测定 A,计算各树脂对独活总黄酮的吸附率。将静态吸附的树脂抽滤至干,于室温条件下加入 95% 乙醇 100 mL 洗脱,每 10 min 振摇 1 次,约 30 s,持续 2 h,静置 48 h,过滤,分别吸取各洗脱液 5.0 mL,按 2.1 项下方法于 510 nm 处测定 A,计算各树脂对独活总黄酮的洗脱率^[15-16],结果见表 1。

表 1 6 种大孔树脂对独活总黄酮的吸附率与洗脱率

树脂型号	吸附后药液中总黄酮 /g·L ⁻¹	吸附量 /mg	吸附率 /%	洗脱液中总黄酮 /g·L ⁻¹	洗脱量 /mg	洗脱率 /%
LX-36	0.225 9	18.949 4	67.71	0.101 5	10.152 5	53.58
LSA-33	0.188 4	20.449 4	73.07	0.127 4	12.735 8	62.28
LSA-10	0.322 7	15.074 4	53.87	0.074 9	7.485 8	49.66
D-101	0.281 1	16.741 1	59.82	0.091 5	9.152 5	54.67
AB-8	0.315 4	15.366 1	54.92	0.095 7	9.569 2	62.27
LSA-21	0.315 4	15.366 1	54.92	0.110 7	11.069 2	72.04

由表 1 可知,D-101,LSA-10 型大孔树脂对独活总黄酮的纯化效果相对较差,所以选择 LSA-33,AB-8,LX-36,LSA-21 型大孔树脂进行动态研究。计算公式如下^[17]:

$$\begin{aligned} \text{吸附率} &= [(C_0 \times V_0 - C_1 \times V_1) / C_0 \times V_0] \times 100\%; \\ \text{洗脱率} &= \{ (V_2 \times C_2) / [C_0 \times V_0 - C_1 \times V_1] \} \times 100\%; \\ \text{纯度} &= (m_2 / m_1) \times 100\%。 \end{aligned}$$

式中 C₀ 表示起始提取液中总黄酮质量浓度,C₁ 表示吸附 48 h 后溶液中总黄酮质量浓度,C₂ 表示洗脱液中总黄酮质量浓度,V₁ 表示提取液体积,V₂ 表示洗脱液体积,m₁ 表示洗脱液干燥后固体的称样量,m₂ 表示洗脱液中总黄酮的测定量。

2.2.4 动态吸附及洗脱试验 取处理后树脂 LSA-33,AB-8,LX-36,LSA-21 型大孔树脂各 4 g,湿法上

柱,分别加入 $0.7102 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 独活提取液 30 mL ,以 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速进行动态吸附,收集吸附后溶液,于 510 nm 处测定 A ,用 50 mL 95% 乙醇以 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速进行动态洗脱,分别收集各洗脱液,于 510 nm 处测定 A ,分别计算独活总黄酮的动态吸附率和洗脱率,结果见表 2。

表 2 4 种大孔树脂对独活总黄酮的动态吸附与洗脱率

树脂型号	C_1 / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	吸附量 / mg	C_2 / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	洗脱量 / mg	吸附率 / $\%$	洗脱率 / $\%$
LX-36	0.322 7	11.302 3	0.225 9	11.069 1	53.05	97.94
LSA-21	0.356 1	10.113 7	0.212 3	9.765 8	47.47	96.56
LSA-33	0.214 4	14.230 8	0.271 7	13.041 6	66.79	91.64
AB-8	0.370 7	9.147 0	0.213 3	10.131 8	42.93	94.57

由表 2 可知,在所考察的 4 种树脂中,洗脱率均 $>90\%$,但 LSA-33 型树脂的吸附率高出其他 3 种树脂较多,故选择 LSA-33 型树脂进行独活总黄酮的纯化工艺。

2.3 LSA-33 型大孔吸附树脂纯化工艺优选^[18]

2.3.1 独活提取液质量浓度的考察 取已处理的 LSA-33 型吸附树脂 5 份,每份 6 g ,湿法装柱,分别加入独活提取液(总黄酮质量浓度 $0.8196 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)及其稀释了 4,8,12,16 倍的独活提取液各 30 mL ,以 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速进行吸附,分别收集过柱液并记录体积,分别用 50 mL 95% 乙醇以 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速进行洗脱,分别收集洗脱液并记录体积,于 510 nm 处测定 A ,计算吸附率分别为 71.29% , 79.89% , 81.14% , 78.71% , 78.84% ;洗脱率分别为 92.84% , 82.85% , 74.06% , 76.57% , 63.89% 。说明随上样液质量浓度的降低,洗脱率逐渐下降,综合考虑选择上样液质量浓度 $0.8196 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3.2 吸附速率的考察 取已处理的 LSA-33 型吸附树脂 5 份,每份 6 g ,湿法装柱,分别加入独活提取液各 30 mL ,分别以 $1,2,3,4,5 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速进行吸附,分别收集过柱液并记录体积,用 50 mL 95% 乙醇以 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速进行洗脱,分别收集洗脱液并记录体积,于 510 nm 处测定 A ,计算吸附率分别为 83.69% , 83.11% , 81.51% , 80.52% , 80.16% ;洗脱率 91.06% , 92.17% , 91.56% , 91.23% , 90.92% 。说明吸附速率对独活总黄酮的吸附率影响较小,从节约时间的角度考察,吸附速率选择以 $4\sim 5 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 为宜,后续试验中将吸附速率固定为 $4 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

2.3.3 乙醇体积分数考察 取已处理的 LSA-33 型吸附树脂 5 份,每份 6 g ,湿法装柱,分别加独活提取

液各 30 mL ,以 $4 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速进行吸附,收集过柱液并记录体积,用体积分数分别 10% , 30% , 50% , 75% , 95% 的乙醇溶液各 50 mL ,以 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速进行洗脱,收集洗脱液并记录体积,于 510 nm 处测定 A ,结果吸附率分别为 82.15% , 82.54% , 81.72% , 83.41% , 81.71% ;洗脱率依次为 18.53% , 68.61% , 69.21% , 90.87% , 92.20% 。说明随乙醇体积分数的增大,洗脱率逐渐增大,从节约成本角度出发将洗脱液乙醇体积分数固定为 75% 。

2.3.4 洗脱速率的考察 取已处理的 LSA-33 型吸附树脂 5 份,每份 6 g ,湿法装柱,分别加入独活提取液各 30 mL ,以 $4 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速进行吸附,收集过柱液并记录体积,加 75% 乙醇 50 mL ,分别以 $1,2,3,4,5 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速进行洗脱,分别收集洗脱液并记录体积,于 510 nm 处测定 A ,结果吸附率分别为 81.82% , 82.82% , 81.70% , 82.55% , 83.47% ;洗脱率依次为 85.99% , 90.75% , 94.08% , 89.89% , 89.17% 。说明洗脱速率对树脂的洗脱率有一定影响,但并不很明显,确定最佳洗脱速率为 $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

2.3.5 洗脱曲线考察 取已处理的 LSA-33 型吸附树脂 6 g ,湿法装柱,加入独活提取液 30 mL ,以 $4 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速进行吸附,收集过柱液并记录体积,计算,结果总黄酮吸附率 82.60% ;用 75% 乙醇以 $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速进行洗脱,分段收集洗脱液,每段 0.5 BV (6 mL),测定 A ,计算洗脱液中总黄酮的质量浓度和洗脱量,见图 1。

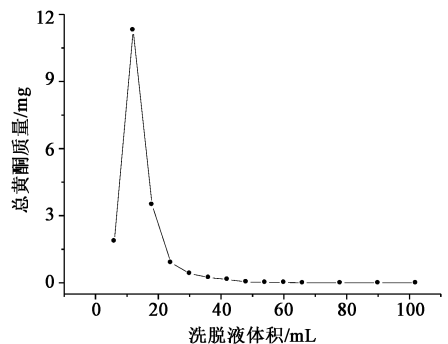


图 1 独活总黄酮洗脱终点考察

由图 1 可知,当洗脱液用量为 10 BV 时,洗脱液中已检测不出总黄酮,此时洗脱量 18.46 mg ,洗脱率 94.12% ;当洗脱液用量为 3 BV 时,总黄酮洗脱量 18.23 mg ,占总洗脱量 98.76% 。故选择 3 BV 75% 乙醇液。

2.3.6 独活提取液 pH 的考察 取已处理的 LSA-33 型大孔吸附树脂 8 份,每份 6 g ,湿法装柱,准备独活提取液 8 份,每份 30 mL ,依次调 pH 为 $1\sim 2$,

2~3, 3~4, 4~5, 5~6, 6~7, 7~8, 8~9, 以4 BV·h⁻¹流速进行吸附, 收集过柱液并记录体积。分别用36 mL 75%乙醇以3 BV·h⁻¹流速进行洗脱, 收集洗脱液, 于510 nm处测定A。结果吸附率依次为82.13%, 86.40%, 83.76%, 81.45%, 78.28%, 76.64%, 75.64%, 73.72%; 洗脱率分别为86.28%, 93.71%, 92.95%, 94.03%, 89.75%, 90.86%, 90.33%, 92.77%。故选择上柱液pH调为2~3为宜。

2.4 验证试验 取已处理的LSA-33型吸附树脂4份, 每份6 g, 湿法装柱, 准备4份独活提取液, 每份30 mL, 其中3份直接调pH至2~3, 另一份石油醚脱脂后调pH 2~3, 分别加至树脂柱, 按优选工艺进行试验, 计算总黄酮质量浓度。结果吸附率分别为85.61%, 85.93%, 86.90%, 87.65% (脱脂液); 洗脱率依次为93.52%, 93.35%, 91.68%, 92.88%。再各取上柱液、洗脱液20 mL, 倒入恒重蒸发皿中水浴蒸干, 于60℃烘箱中干燥至恒重, 计算浸膏中总黄酮含量, 结果原独活提取液中总黄酮纯度9.87%, 脱脂后提取液中总黄酮纯度35.63%, 3次验证试验中总黄酮纯度分别为31.29%, 34.01%, 32.47%。说明经LSA-33型大孔树脂纯化后, 总黄酮纯度由9.87%提高到32.59%, 如果独活提取液用石油醚脱脂后再进行大孔树脂纯化, 总黄酮纯度比未脱脂时高3.04%。

2.5 树脂重复使用试验 按优选工艺在同一根树脂柱上重复进行5次试验, 结果吸附率分别为86.75%, 87.34%, 86.94%, 86.77%, 84.82%; 洗脱率依次为93.37%, 91.32%, 92.49%, 90.88%, 86.66%; 总黄酮纯度分别为33.24%, 32.85%, 29.48%, 29.04%, 26.08%, 故将树脂重复使用数定为4次。

3 讨论

本实验初步确定LSA-33型大孔吸附树脂分离纯化独活总黄酮的效果较理想, 其纯化工艺为独活总黄酮样品液质量浓度0.1 g·mL⁻¹, 样品液pH 2~3, 吸附速率4 BV·h⁻¹, 用3 BV 75%乙醇以3 BV·h⁻¹流速进行洗脱, 洗脱率高达92.85%, 纯化后总黄酮纯度增大了3.3倍, 树脂不经处理可重复使用4次, 具有一定推广应用价值。由于独活中化学成分较复杂, 且黄酮类化合物含量较低, 故独活提取液纯化后总黄酮的含量相对较低。要获得更高纯度的独活总黄酮, 需采用相关方法对独活原药材进行处理(如使用石油醚脱脂), 再将其提取液经过LSA-33

型大孔吸附树脂进行分离纯化。

[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: 246.
- [2] 龚高柏, 吴红玲. 独活常见药对的临床应用[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(20): 2653.
- [3] 张才煜, 张本刚, 杨秀伟. 独活化学成分研究[J]. 解放军药学学报, 2007, 23(4): 241.
- [4] 丁希飞, 冯煦, 董云发, 等. 中药独活化学成分的研究[J]. 中药材, 2008, 31(4): 516.
- [5] 范莉, 李林, 何慧凤. 独活挥发油抗炎、镇痛药理作用的研究[J]. 安徽医药, 2009, 3(2): 133.
- [6] Kosuge Takuo, Yokota Masami, Sugiyama Kiyoshi, et al. Studies on bioactive substances in crude drug used for arthritic disease in traditional Chinese medicine. Isolation and identification of an anti-inflammatory and analgesic principle from the root of angelica pubescens maxim[J]. Chem Pharm Bull, 1985, 33(12): 5351.
- [7] 李海权, 李德新, 孙松辉. 衰老小鼠脑组织 mtDNA 缺失呼吸链酶复合体活性的变化以及独活作用机制的实验研究[J]. 中医学刊, 2006, 24(2): 279.
- [8] 柳江华, 徐绥绪, 姚新生. 独活的化学成分与药理研究进展[J]. 沈阳药学院学报, 1994, 11(4): 143.
- [9] 李荣芷, 孟娟知, 何云庆, 等. 中药独活抗心律失常活性成分γ-氨基丁酸的研究[J]. 北京医科大学学报, 1989, 21(5): 376.
- [10] 林黎, 钱晓萍, 刘宝瑞. 中药独活的化学成分及其抗肿瘤活性的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(2): 373.
- [11] 程丹, 郑鹏武, 周斌, 等. 肿节风总黄酮大孔吸附树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 15.
- [12] 阿布力克木·阿布力孜, 阿布力米提·阿布都卡德尔, 迪丽努尔·塔力甫. 新疆野生苍耳叶中总黄酮的超声波提取工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 131.
- [13] 赵晨晨, 承伟, 王立冬. 微波辅助提取络石藤总黄酮的工艺研究[J]. 中草药, 2012, 43(4): 718.
- [14] 白夺龙, 杨开华. 大孔吸附树脂分离纯化技术及应用[J]. 海峡药学, 2007, 19(9): 96.
- [15] 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.
- [16] 曹跃, 王丽, 周翎, 等. 火绒草中总黄酮的纯化工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 38.
- [17] 陈顺, 关延彬. 大孔树脂吸附骨碎补总黄酮特性的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(8): 750.
- [18] 张若洁, 徐永霞, 王鲁峰, 等. 大孔树脂纯化芦笋总皂苷的工艺研究[J]. 中草药, 2012, 43(6): 1097.

[责任编辑 仝燕]