

# 大孔吸附树脂分离纯化葛根总黄酮和葛根素的工艺优选

朱梦良, 招丽君, 梁新丽, 赵国巍, 廖正根\*, 明良山, 王洁  
(江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 优选大孔吸附树脂分离、纯化葛根总黄酮和葛根素的工艺。方法: 考察 AB-8, D-101, HPD-100, S-8 4 种不同极性吸附树脂对葛根中总黄酮和葛根素的静态吸附及解吸性能, 筛选树脂型号; 以葛根素、总黄酮转移率和纯度为指标, 通过单因素试验考察其吸附和洗脱条件。结果: 选用 AB-8 型大孔吸附树脂, 优选的工艺条件为上样液质量浓度  $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 葛根与大孔树脂质量比 1:2, 径高比 1:6, 用 2 BV 水洗除杂, 加 2 BV 80% 乙醇以  $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  洗脱。转移率均  $>92\%$ , 所得葛根总黄酮纯度达 80%, 葛根素质量分数 25%。结论: AB-8 型大孔树脂用于富集葛根总黄酮和葛根素效果最佳, 是一种理想的分离纯化介质, 且优选的工艺操作简单、方法可靠。

[关键词] 大孔吸附树脂; 葛根总黄酮; 葛根素; 分离纯化

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)04-0023-04

## Optimization of Separation and Purification Technology for Total Flavonoids and Puerarin from *Pueraria lobata* by Macroporous Adsorption Resin

ZHU Meng-liang, ZHAO Li-jun, LIANG Xin-li, ZHAO Guo-wei,  
LIAO Zheng-gen\*, MING Liang-shan, WANG Jie

(Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM),  
Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize separation and purification technology of total flavonoids and puerarin from *Pueraria lobata* by macroporous adsorption resin. **Method:** Static adsorption and desorption performance of four kinds of different polar macroporous adsorption resins (S-8, AB-8, D-101, HPD-100) for total flavonoids and puerarin from *P. lobata* were investigated, in order to select optimal resin; With yield and purity of total flavonoids and puerarin as indexes, single factor test was used to investigate adsorption and elution conditions. **Result:** AB-8 macroporous resin was chosen, its optimized technology conditions were as followings: the concentration of sample solution  $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , mass ratio of raw material-resin 1: 2, diameter-height ratio of column 1: 6, washed by 2 BV water, eluted with 2 BV 80% ethanol, elution flow rate  $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Elution rate of total flavonoids and puerarin were more than 92%, purity of total flavonoids and puerarin could reach 80% and 25%, respectively. **Conclusion:** AB-8 macroporous adsorption resin was suitable for enrichment total flavonoids and puerarin from *P. lobata*, it was a kind of ideal separation and purification medium, optimized technology was simple and reliable.

[Key words] macroporous adsorption resin; total flavonoids from *Pueraria lobata*; puerarin; separation and purification

葛根始载于《神农本草经》, 具清热解毒、解痉 镇痛、升阳解肌等功效, 主要有效成分有异黄酮类、

[收稿日期] 20120912(011)

[基金项目] 国家自然科学基金(30960516); 江西省自然科学基金(20114BAB215040)

[第一作者] 朱梦良, 硕士, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel: 15979151520, E-mail: zhu mLsc@163.com

[通讯作者] \* 廖正根, 博士, 教授, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel: 0791-87119190, E-mail: lyzlyg@163.com

葛根苷类、三萜皂苷类等。随着现代研究的深入,葛根在心血管系统方面的作用日益受到关注,临床主要用于抗高血压、抗心律失常、扩张冠状血管等<sup>[1-2]</sup>。

树脂吸附技术是利用有机高聚物吸附剂吸附溶液中有效成分的方法,在中草药有效成分的提取分离及成分测定方面已显示出其独特的作用。近年来,大孔树脂逐渐被应用于中草药化学成分的分离纯化和中药新药的开发研制。本实验旨在通过筛选分离、纯化葛根中总黄酮和葛根素的大孔树脂,优化吸附、洗脱工艺,确定分离、纯化葛根总黄酮和葛根素成分的工艺路线。

### 1 材料

Agilent 1260 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 科技有限公司),UV2100PC 型紫外-可见分光光度仪(优尼科上海仪器有限责任公司),QYC-200 型恒温摇床(上海福玛实验设备有限公司),DZTW 型调温电热套(北京市永光明医疗仪器厂),BS-124S 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司),TG-328A 型 1/10 万电子天平(德国 Sartorius)。

葛根素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 101765),AB-8, D-101, HPD-100, S-8 型大孔树脂(河北沧州宝恩化工有限公司),甲醇为色谱纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯,葛根于 2012 年购自精华制药亳州康普有限公司,经江西中医学院药学院曹岚教授鉴定为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi 的干燥根。

### 2 方法与结果

**2.1 葛根提取工艺** 参考 2010 年版《中国药典》愈风宁心片中葛根提取工艺<sup>[3]</sup>,称取葛根 200 g,加 10 倍量 85% 乙醇加热回流提取 3 次,提取时间分别为 4, 3, 3 h, 滤过,合并滤液,浓缩至 1.0 g·mL<sup>-1</sup>,备用。

#### 2.2 含量测定

**2.2.1 葛根素对照品溶液的制备** 精密称取葛根素对照品 2.30 mg,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得 92 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.2.2 葛根素测定的色谱条件** Phenomenex-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.60 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸(11:89),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 250 nm,柱温 35 ℃。

**2.2.3 葛根素标准曲线的制备** 取葛根素对照品贮备溶液,加 30% 乙醇分别稀释成质量浓度为 46, 23, 11.5, 9.2, 4.6, 2.3, 1.15 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液,

按 2.2.2 项下色谱条件,分别进样 20 μL,测定峰面积。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 92.058X + 17.094$  ( $r = 0.9998$ ),线性范围 1.15 ~ 46.0 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.2.4 葛根总黄酮标准曲线的制备** 精密量取葛根素对照品贮备液 1.0, 2.5, 4.0, 5.5, 7.0, 8.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加 30% 乙醇定容至刻度线,摇匀,紫外分光光度仪于 250 nm 测定吸光度(A),以质量浓度为横坐标,为 A 纵坐标,得线性回归方程  $Y = 0.0726X + 0.0165$  ( $r = 1$ ),线性范围 2.412 ~ 20.502 mg·L<sup>-1</sup>。

### 2.3 不同型号大孔树脂的筛选<sup>[4-7]</sup>

**2.3.1 树脂的选择** 选择 AB-8 等 4 种不同大孔树脂用于试验,各树脂性质参数见表 1。

表 1 不同型号大孔树脂性质参数

树脂类型	极性	粒径 /mm	表面面积 /m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup>	平均孔径 /Å <sup>0</sup>
AB-8	弱极性	0.35 ~ 1.25	450 ~ 500	85 ~ 90
D-101	非极性	0.35 ~ 1.25	500 ~ 550	90 ~ 100
HPD-100	非极性	0.35 ~ 1.25	650 ~ 700	85 ~ 90
S-8	中等极性	0.35 ~ 1.25	100 ~ 120	26 ~ 30

**2.3.2 静态饱和和吸附量考察** 精密称取已处理好的 4 种大孔树脂各 5.0 g,分别置于 50 mL 锥形瓶中,精密加入葛根提取液 10 mL,放入恒温摇床振荡 24 h,待充分吸附后滤过,测定滤液中剩余葛根总黄酮的质量浓度。计算树脂饱和和吸附量。

饱和和吸附量 = (初始质量浓度 - 吸附后质量浓度) × 吸附液体积 / 树脂量。

**2.3.3 洗脱率考察** 将静态饱和和吸附后滤出的树脂,用双蒸水清洗后,吸干表面的水分,分别置于 50 mL 锥形瓶中,加 95% 乙醇 30 mL 洗脱,放入恒温摇床里振荡 13 h,过滤,测定洗脱液中葛根总黄酮和葛根素的质量浓度,计算洗脱率,结果见表 2。

洗脱率 = (洗脱液质量浓度 × 洗脱液体积) / 饱和和吸附量 × 100%

表 2 4 种大孔树脂对葛根总黄酮和葛根素的静态饱和和吸附量和静态洗脱率测定 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

树脂型号	葛根素		葛根总黄酮	
	饱和和吸附量 /mg·g <sup>-1</sup>	洗脱率 /%	饱和和吸附量 /mg·g <sup>-1</sup>	洗脱率 /%
AB-8	43.45 ± 0.14 <sup>1)</sup>	62.14 ± 8.12	117.67 ± 0.19	69.8 ± 8.67
D-101	43.55 ± 1.36 <sup>1)</sup>	51.90 ± 7.68	118.76 ± 2.40	61.7 ± 6.08
HPD-100	43.10 ± 1.41 <sup>1)</sup>	55.64 ± 2.31	121.08 ± 3.87	63.3 ± 2.13
S-8	40.02 ± 0.55	66.36 ± 0.31	112.04 ± 1.51	62.6 ± 0.89

注: S-8 与 D-101, HPD-100, AB-8 型大孔树脂比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

运用 SPSS 11.5 统计软件进行处理,发现 AB-8, D-101, HPD-100 型大孔树脂对葛根素、葛根总黄酮的静态饱和和吸附量均无显著差异。S-8 较其他 3 种树脂对葛根素、葛根总黄酮的静态饱和和吸附量相对较小。D-101, HPD-100 型大孔树脂对葛根素的洗脱率相对较低, AB-8, S-8 型树脂较高,且二者比较无差异;4 种树脂对葛根总黄酮的洗脱率无显著差异,直观分析, AB-8 型树脂对葛根总黄酮的洗脱率最高。因此,综合分析本试验采用 AB-8 型大孔树脂。

## 2.4 AB-8 型大孔树脂分离纯化葛根总黄酮的工艺优化

### 2.4.1 吸附条件的考察

**2.4.1.1 上样液质量浓度考察<sup>[8]</sup>** 分别称取处理好的 AB-8 型树脂 10 g, 湿法装柱, 分别加入 0.25 g·mL<sup>-1</sup> 药液 20 mL, 0.5 g·mL<sup>-1</sup> 药液 10 mL, 1.0 g·mL<sup>-1</sup> 药液 5 mL 上柱, 每份药液含葛根总黄酮均为 548.90 mg, 完全吸附后, 用水冲洗至无色, 用 95% 乙醇 100 mL 以 1 mL·min<sup>-1</sup> 进行洗脱, 收集洗脱液, 分别测定洗脱液中葛根素和总黄酮的含量, 计算转移率和纯度。洗脱液葛根素(总黄酮)转移率 = 洗脱液中葛根素(总黄酮)质量浓度 × 洗脱液体积 / 上样液葛根素(总黄酮)质量浓度 × 上样液体积 × 100%; 洗脱液葛根素(总黄酮)纯度 = 洗脱液中葛根素(总黄酮)质量浓度 × 洗脱液体积 / 洗脱液干膏质量 × 100%, 结果见表 3。

表 3 AB-8 型大孔树脂吸附条件上样液质量浓度的考察 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

上样液质量浓度 / g·mL <sup>-1</sup>	葛根素转移率 / %	葛根素纯度 / %	总黄酮转移率 / %	总黄酮纯度 / %
0.25	22.58 ± 0.15	5.26 ± 0.52	58.80 ± 7.72	68.15 ± 8.22
0.5	23.17 ± 0.82	5.61 ± 0.61	62.53 ± 5.38	75.31 ± 7.33
1.0	33.19 ± 1.33	6.53 ± 0.52	80.43 ± 7.79	76.91 ± 6.45

由表 3 可知, 3 个水平总体均数的差别具有统计学意义。确定上样液质量浓度 1.0 g·mL<sup>-1</sup>。

**2.4.1.2 泄漏曲线绘制<sup>[9-10]</sup>** 称取 AB-8 型树脂约 10 g, 湿法装柱, 将 0.25 g·mL<sup>-1</sup> 葛根样品液 100 mL 上柱, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 分段收集流出液, 每 10 mL 一份, 测定每份中葛根总黄酮的质量浓度, 绘制泄漏曲线, 见图 1。

由图 1 可知, 第 4 份流出液时开始大量泄漏, 同时第 1 份基本是树脂间水分, 扣去树脂间水分 10 mL, 确定上样量 ≤ 0.5 g·g<sup>-1</sup>。

### 2.4.2 洗脱条件的考察

**2.4.2.1 除杂用水量的考察<sup>[11]</sup>** 称取经处理后的

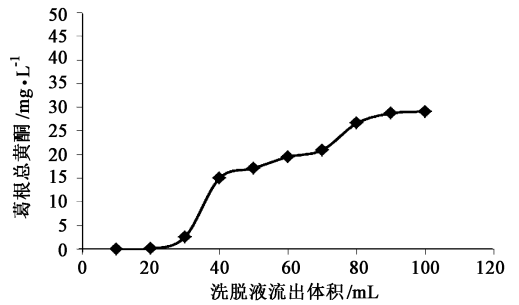


图 1 AB-8 型大孔树脂上样吸附泄漏曲线的考察

AB-8 型树脂 30 g, 用 1.0 g·mL<sup>-1</sup> 葛根液 10 mL 上柱, 分别用 2, 4, 6 BV 水洗除杂, 用 70% 乙醇 4 BV 洗脱, 收集洗脱液, 分别测定洗脱液中葛根素转移率分别为 (93.55 ± 11.23)%, (94.70 ± 7.89)%, (94.62 ± 8.62)% ; 葛根总黄酮转移率分别为 (105.59 ± 6.32)%, (103.95 ± 7.24)%, (90.70 ± 10.12)% ; 葛根素纯度分别为 (24.60 ± 2.13)%, (25.37 ± 2.35)%, (27.60 ± 2.78)% ; 葛根总黄酮纯度依次为 (77.78 ± 7.53)%, (77.19 ± 6.13)%, (78.84 ± 8.76)% ; 说明 3 种除杂用水量对洗脱液中总黄酮和葛根素的纯度影响不大, 且 6 BV 水洗除杂时总黄酮转移率低, 耗时长, 综合考虑选择 2 BV 水洗。

**2.4.2.2 乙醇体积分数考察<sup>[12-13]</sup>** 称取 AB-8 型大孔树脂 10 g, 用 1.0 g·mL<sup>-1</sup> 葛根液 5 mL 上柱, 吸附完全后用 2 BV 水洗除杂, 分别用体积分数为 30%, 60%, 70%, 80%, 90% 的乙醇溶液各 50 mL 洗脱, 收集洗脱液, 分别测定各流出液中葛根素和总黄酮的质量浓度, 计算其转移率和纯度, 结果见表 4。

表 4 AB-8 型大孔树脂洗脱条件乙醇体积分数的考察 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

乙醇体积分数 / %	葛根素转移率 / %	葛根素纯度 / %	总黄酮转移率 / %	总黄酮纯度 / %
30	35.72 ± 3.78	21.81 ± 2.09	35.26 ± 3.76	56.92 ± 4.84
60	38.08 ± 2.90	22.03 ± 2.10	40.85 ± 4.04	62.48 ± 3.19
70	50.37 ± 4.51	22.68 ± 3.08	55.72 ± 5.78	66.34 ± 6.95
80	53.30 ± 5.66	22.95 ± 2.14	60.81 ± 4.37	69.24 ± 7.38
90	47.44 ± 4.37	22.93 ± 1.79	51.90 ± 6.03	66.33 ± 8.31

由表 4 可知, 洗脱剂乙醇体积分数为 80% 时, 洗脱液中葛根素、总黄酮转移率和纯度均较高, 故选择 80% 乙醇洗脱。

**2.4.2.3 洗脱流速的考察<sup>[14]</sup>** 称取处理好的 AB-8 型树脂 30 g, 湿法装柱, 用 1.0 g·mL<sup>-1</sup> 葛根液 10 mL 上柱, 吸附完全后用 2BV 水洗脱, 再用 4 BV 80% 乙醇洗脱, 洗脱流速分别为 1, 2, 3 mL·min<sup>-1</sup>, 收集洗脱液, 分别测定洗脱液中葛根素转移率分别

为  $(42.77 \pm 4.13)\%$ ,  $(42.80 \pm 5.14)\%$ ,  $(40.33 \pm 4.01)\%$ ; 葛根总黄酮转移率分别为  $(96.51 \pm 8.82)\%$ ,  $(96.74 \pm 7.83)\%$ ,  $(91.44 \pm 7.57)\%$ ; 葛根素纯度分别为  $(12.95 \pm 1.21)\%$ ,  $(12.97 \pm 0.79)\%$ ,  $(12.43 \pm 1.09)\%$ ; 葛根总黄酮纯度依次为  $(77.27 \pm 9.59)\%$ ,  $(77.48 \pm 8.87)\%$ ,  $(74.49 \pm 6.98)\%$ ; 故确定流速为  $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

**2.4.2.4 洗脱用乙醇量的考察**<sup>[15]</sup> 称取处理好的 AB-8 型树脂 30 g, 湿法装柱, 量取  $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  葛根样品液 10 mL 上柱, 用 2 BV 水除杂, 加 80% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 每 BV 为 1 份, 测定各洗脱液中葛根素和葛根总黄酮的含量, 计算其累积转移率, 绘制洗脱曲线, 见图 2。

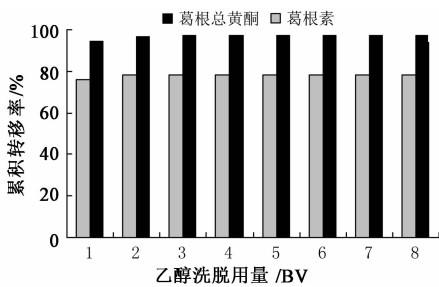


图 2 AB-8 型大孔树脂乙醇洗脱用量考察

由图 2 可知, 2 BV 乙醇已洗脱了绝大部分的葛根总黄酮和葛根素, 增加乙醇用量对葛根总黄酮和葛根素的转移率无影响, 因此选择 2 BV 80% 乙醇洗脱。

**2.4.3 验证试验** 称取已处理好的 AB-8 型树脂 30 g, 湿法装柱, 取  $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  葛根样品液 10 mL 上柱, 用 2 BV 水洗除杂, 加 2 BV 80% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 测定洗脱液中葛根总黄酮转移率分别为 92.92%, 93.23%, 103.68%; 葛根素转移率分别为 100.23%, 94.61%, 97.63%; 同时取 10 mL 洗脱液于  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  浓缩干燥至恒重, 计算葛根素纯度分别为 24.60%, 24.82%, 26.55%; 葛根总黄酮纯度分别为 83.59%, 79.35%, 78.75%; 说明优选的工艺稳定可行。

### 3 讨论

葛根中主要成分为黄酮类成分, 这些成分的极性存在一定差异, 但大多极性较小, 因此择极性较小的树脂进行该类成分的分离纯化。本实验主要选择中等极性至非极性的树脂, 中等极性、弱极性、非极性树脂也存在孔径等性质参数的区别, 研究表明, 中等极性的大孔树脂静态饱和和吸附量较弱极性、非极性树脂低, 弱极性与非极性树脂对葛根中有效组分的静态饱和和吸附量、解吸率均无差异, 但直观分析弱极性树脂优于非极性树脂。

本试验选择 AB-8 型树脂, 以葛根总黄酮和葛根素的转移率和纯度为指标, 系统性地考察上样液治疗浓度、除杂用水量、乙醇体积分数、洗脱流速、乙醇用量等影响树脂分离纯化效果的因素。运用该工艺得葛根素和总黄酮的纯度分别为  $(25.32 \pm 1.07)\%$ ,  $(80.56 \pm 2.64)\%$ 。该工艺可靠、稳定、安全且可获得纯度较高的葛根总黄酮和葛根素, 有效部位损失少。

### [参考文献]

- [1] 郑炜, 史道华. 葛根素心血管作用机制的研究进展[J]. 中国药师, 2008, 11(2): 171.
- [2] 李明臣, 李贵海. 中药葛根地上部分的研究进展[J]. 中国药房, 2005, 16(15): 1197.
- [3] 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: 1188.
- [4] 陈最鹏, 刘志辉, 钱芳. AB-8 大孔吸附树脂纯化葛根总黄酮[J]. 医药导报, 2008, 27(5): 585.
- [5] 祝婧云. 白芷对配伍“对药”有效成分肠道转运的影响及机理研究[D]. 南昌: 江西中医学院, 2011.
- [6] 周媛, 程凡, 罗少华. 大孔树脂对葛根总黄酮的吸附及分离纯化研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(12): 3008.
- [7] 夏林波, 李博, 邓仕任, 等. 大孔吸附树脂分离纯化芫花黄酮苷元工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 13.
- [8] LIU Huo-an, WANG Bo-chu, DAI Chuan-yun, et al. Optimization of preparative separation and purification of total flavonoids from Radix Puerariae by macroporous resin method [J]. J Chin Pharm Sci, 2006, 15(2): 121.
- [9] 杨荣平, 王宾豪, 方艾权, 等. 大孔树脂分离葛根总黄酮工艺优化[J]. 中成药, 2004, 26(10): 784.
- [10] 冯素香, 苗明三, 苗晋鑫, 等. 大孔吸附树脂同时分离纯化毛冬青总黄酮总皂苷工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 5.
- [11] 向大雄, 李焕德, 朱叶超, 等. 大孔吸附树脂分离纯化葛根总黄酮的研究[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(1): 35.
- [12] 何宇新, 于杰, 李玲, 等. 大孔树脂分离纯化葛根总黄酮工艺研究[J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 28(6): 957.
- [13] 刘佳, 季芳, 孙陶利, 等. 甘草黄酮分离纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 49.
- [14] 李旭洲, 韩立炜, 张岩峰, 等. 葛根中葛根黄酮的水提取及大孔树脂的纯化工艺研究[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(9): 626.
- [15] 董金香, 孙旭, 邱野, 等. 大孔树脂纯化葛根总黄酮工艺研究[J]. 吉林中医药, 2011, 31(9): 909.

[责任编辑 全燕]