

大孔吸附树脂法优选荔枝草总黄酮纯化工艺

程建明,葛婷婷,彭国平,郑云枫*
(南京中医药大学药学院,南京 210029)

[摘要] 目的:优选荔枝草总黄酮的富集纯化工艺。方法:以总黄酮吸附率、解吸率和转移率为评价指标,采用静态吸附-解吸法,筛选大孔树脂型号;以总黄酮含量为指标,确定洗脱剂浓度;以除杂率、高车前苷转移率和总黄酮转移率为指标,优选其纯化工艺。结果:D101 型树脂分离效果较好,其最佳工艺为生药量-树脂体积 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,用 7 BV 75% 乙醇溶液洗脱,洗脱流速 $6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结论:D101 树脂可有效地对荔枝草总黄酮进行富集纯化。

[关键词] 荔枝草总黄酮;大孔吸附树脂;纯化工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0063-03

Optimization of Purification Technology for Total Flavonoids from *Salvia plebeia* by Macroporous Adsorption Resin

CHENG Jian-ming, GE Ting-ting, PENG Guo-ping, ZHENG Yun-feng*
(College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize enrichment and purification technology of total flavonoids from *Salvia plebeia*. **Method:** With adsorption-desorption ratio and transfer ratio as indexes, optimum macroporous resin was selected by static adsorption-desorption ratio tests; The concentration of eluting agent was determined with the content of total flavonoids as index; Purification technology was optimized with impurity rate, transfer rate of homoplantagin and transfer rate of total flavonoids as indexes. **Result:** D101 was selected for its excellent adsorption and desorption properties, optimum process was as follows: the amount of crude drugs to D101 macroporous resin $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, eluted with 7 BV 75% ethanol, elution flow rate $6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. **Conclusion:** Total flavonoids from *S. plebeia* could be effectively purified and separated by D101 macroporous resin.

[Key words] total flavonoids from *Salvia plebeia*; macroporous resin; purification technology

荔枝草主产江苏、浙江、安徽,味苦、辛,性凉,具有清热解暑、止咳平喘、凉血、利尿等功效,主治感冒发热、咽喉肿痛、肺热咳嗽、咳血等。现代临床上常用荔枝草及其复方制剂治疗咳嗽、咽炎等病症,效果良好^[1]。全草主要含黄酮类化合物,现代药理研究表明荔枝草黄酮类化合物具有抑菌^[2]、止咳平喘^[3]、祛痰及抗组胺^[4]、抗肝损^[5]等作用。目前,国内学者对荔枝草总黄酮提取工艺研究居多,但对其

精制工艺研究较少。本文以荔枝草地上部分为原料,在静态工艺筛选的基础上,采用大孔树脂吸附分离技术,对荔枝草总黄酮的精制工艺进行动态研究,确定大孔吸附树脂精制荔枝草总黄酮的最佳工艺,为荔枝草总黄酮在工业生产中分离提纯提供试验依据。

1 材料

DW 型调温电热器(上海燃烧设备工程设备工程技术有限公司),745 型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司),1100 型高效液相色谱仪(Agilent LC 工作站,HT-230A 型柱温箱,美国 Agilent),TGL-16G 型高速离心机(上海安亭科学仪器有限公司),BP 211D 型电子天平、MP 51001 型电子天平(上海恒平科学仪器有限公司)。

[收稿日期] 20120511(009)

[第一作者] 程建明,博士,副研究员,从事中药新药研发,Tel:025-86798011,E-mail:cjm7895@163.com

[通讯作者] * 郑云枫,博士,从事中药成分分析研究,Tel:025-86798186,E-mail:zyunfeng88@yahoo.com.cn

芦丁(中国药品生物制品检定所,批号 100080200707),AB-8,HPD826,HPD100,D101 型大孔树脂(河北沧州宝恩化工有限公司),水为纯净水,其余试剂均为分析纯,荔枝草(安徽省亳州市药材总公司,批号 110310,由南京中医药大学谈献和教授鉴定为唇形科植物荔枝草 *Salvia plebeia* R. Br. 的地上部分)。

2 方法与结果^[6-8]

2.1 树脂预处理 取适量树脂,用 95% 乙醇浸泡 24 h,除去树脂碎片和杂物。湿法装柱,用 95% 乙醇洗至流出液与水不产生白色浑浊现象为止,水洗至无醇味,用 5% HCl 溶液与 2% NaOH 溶液分别浸泡树脂柱 2~4 h,水洗至中性,浸泡于蒸馏水中,备用。

2.2 上柱液的制备 荔枝草药材加 60% 乙醇回流提取 3 次,每次加醇 6 倍,每次煎煮 1 h,滤过,合并滤液,减压回收乙醇,离心得上清液。

2.3 总黄酮含量测定 准确称取芦丁 5.43 mg,70% 乙醇超声溶解,定容至 25 mL,分别精密吸取 0,0.5,1,2,3,4,5,6 mL 于 25 mL 量瓶中,分别加 70% 乙醇至 6 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,静置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,静置 6 min,加 4% 氢氧化钠溶液 10 mL,用 70% 乙醇稀释至刻度,摇匀,静置 15 min,于 510 nm 处测定吸光度(A),以不含芦丁的空白管对照调零做空白对照,用最小二乘法线性回归,得回归方程 $A = 11.884C - 0.011$ ($r = 0.9987$)。按上述方法测定待测液中的 A,由回归方程即可求得质量浓度。

2.4 高车前苷含量测定 Hedera ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),检测波长 335 nm,柱温 40 °C,流动相甲醇(A)-0.5% 冰醋酸梯度洗脱(0~15 min, 42%~50% A; 15~20 min, 50%~90% A; 20~25 min, 90% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 5 μL。按上述方法测定待测液中高车前苷峰面积,由外标一点法求得高车前苷质量浓度。

2.5 大孔树脂型号筛选

2.5.1 静态吸附性能比较 将 4 种处理好的树脂抽滤至不滴水为准,准确称取 5 g 树脂,分别量取 0.1 g·mL⁻¹ 的荔枝草黄酮料液 50 mL 置于 100 mL 具塞三角瓶中,放置 12 h,测定此时溶液中总黄酮含量,计算吸附率。

吸附率 = (吸附前药液质量浓度 - 吸附后药液质量浓度) / 吸附前药液质量浓度 × 100%。

2.5.2 静态解吸附性能比较 将 2.5.1 项下充分吸附后的树脂过滤,置于 100 mL 具塞锥形瓶中,分

别加入 70% 乙醇 50 mL,充分解吸 12 h,测定解吸液总黄酮含量,计算解吸率。结果见表 1。

解吸率 = 解吸液质量浓度 × 解吸液体积 / 吸附总量 × 100% ;

解吸液总黄酮转移率 = 吸附率 × 解吸率 × 吸附前药液中总黄酮质量 / 吸附前药液中总黄酮质量 × 100% 。

表 1 大孔吸附树脂对总黄酮的静态吸附解吸试验

树脂型号	总黄酮量/mg		吸附率 /%	解吸率 /%	转移率 /%
	吸附前	吸附后			
AB-8	209.2	68.2	67.38	84.69	57.06
HPD826	209.2	62.4	70.15	71.58	50.21
HPD100	209.2	71.4	65.84	83.95	55.27
D101	209.2	69.3	66.88	95.88	64.12

由表 1 结果可知,HPD826 型树脂吸附率最高,AB-8,D101 型树脂次之。从解吸率和总黄酮转移率角度考虑,D101 型树脂均处于较高水平。故本试验确定采用 D101 型大孔树脂。

2.6 荔枝草总黄酮纯化工工艺考察

2.6.1 乙醇体积分数考察 取 30 mL D101 型树脂,湿法装柱,加入上样液 120 mL,以 1 mL·min⁻¹ 上样,吸附完全后,加入体积分数为 65%,75%,85% 的乙醇溶液,弃去死体积 7 mL 后,洗脱液每 10 mL 收集 1 管,共收集 10 管,测定其中总黄酮含量,以管数为横坐标,每管流出液中总黄酮含量为纵坐标绘制曲线图(图 1)。

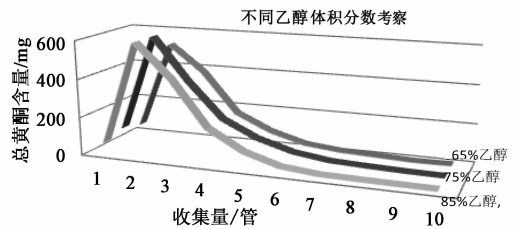


图 1 荔枝草总黄酮纯化工工艺中洗脱剂考察

由图 1 可知,75% 乙醇和 85% 乙醇能很快达到峰值,洗脱能力均比 65% 乙醇好,考虑到节约乙醇,故选择 75% 乙醇为洗脱剂。

2.6.2 正交试验设计 以生药量/树脂体积(A)、洗脱速率(B)、乙醇用量(C)为考察因素,以除杂率(IR)、总黄酮保留率(FTR)和高车前苷保留率(HTR)为考核指标,按 L₉(3⁴) 正交表进行试验。取回收乙醇后的药液,平行 9 份,进行 D101 大孔树脂纯化试验,上样流速 1 mL·min⁻¹,树脂用量 30 mL,水洗体积 2 BV,洗脱剂 75% 乙醇。收集洗脱液并定容至 60 mL,检测,试验安排及结果见表 2,方差分析

见表3。

$IR = (\text{纯化前含固量} - \text{纯化后含固量}) / \text{纯化前含固量} \times 100\%$;

$FIR = \text{纯化后总黄酮含量} / \text{纯化前总黄酮含量} \times 100\%$;

$HTR = \text{纯化后高车前苷含量} / \text{纯化前高车前苷含量} \times 100\%$ 。

表2 荔枝草总黄酮纯化工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	IR /%	FTR /%	HTR /%	综合 评分
1	0.8	2	3	1	73.83	56.37	50.12	74.36
2	0.8	4	5	2	66.18	79.74	89.01	90.21
3	0.8	6	7	3	63.72	86.11	92.66	92.22
4	1.0	2	5	3	64.58	77.01	86.27	87.57
5	1.0	4	7	1	69.77	74.46	92.20	91.26
6	1.0	6	3	2	77.27	50.25	52.86	74.91
7	1.2	2	7	2	66.72	84.55	98.87	95.17
8	1.2	4	3	3	74.73	51.41	57.90	75.48
9	1.2	6	5	1	70.40	74.86	87.72	90.38
K_1	256.80	257.11	224.75	256.01	256.80	257.11	224.75	
K_2	253.74	256.95	268.17	260.29	253.74	256.95	268.17	
K_3	261.03	257.51	278.65	255.28	261.03	257.51	278.65	
R	7.29	0.55	53.90	5.01	7.29	0.55	53.90	

注:综合评分 = $(0.4 \times \text{除杂率} / \text{最大除杂率} + 0.3 \times \text{总黄酮保留率} / \text{最大总黄酮保留率} + 0.3 \times \text{高车前苷保留率} / \text{最大高车前苷保留率}) \times 100\%$ 。

表3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	8.93	2	4.46	1.83	
B	0.05	2	0.03	0.01	
C	544.51	2	272.26	111.45	<0.01
D(误差)	4.89	2	2.44		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$, $F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

由表3可知,生药量-树脂体积和洗脱流速对结果无显著性影响,乙醇用量对试验结果有显著性影响,由直观分析表可知,D101型树脂的最佳工艺为 $A_3B_3C_3$ 。为保证环境条件,同时不影响药液的吸附,最终树脂纯化工艺定为 $A_2B_3C_3$,即生药量-树脂体积 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 7 BV 75% 乙醇洗脱,洗脱流速 $6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.7 验证试验 取 D101 大孔树脂 60 mL,加 0.8

$\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 荔枝草药液 75 mL,上样流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,加 2 BV 水洗,加 75% 乙醇 7 BV 以 $6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速冲洗,收集流出液定容至 60 mL,取样测含固量、总黄酮及高车前苷含量。除杂率分别为 65.95%, 65.28%, 67.71%;总黄酮保留率依次为 89.08%, 92.52%, 90.58%;高车前苷保留率分别为 96.95%, 97.35%, 99.49%。说明该优选工艺稳定可行。验证结果表明,样品中总黄酮纯度由精制前的 30.45% 提高至 82.65%,高车前苷则由 4.12% 提高至 11.76%。

3 讨论

预试验中对药液浓度、药液 pH 进行考察,发现上样液质量浓度 $0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,IR, FTR, HTR 均处于较高水平,故选择上样液质量浓度 $0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$;原液 pH 在 4.83 左右,经研究发现,pH 对试验结果无明显影响,因此未对 pH 进行考察。

在试验中发现,树脂吸附样品后应尽快处理,放置时间太长不利于解吸附,原因可能是某些成分与树脂形成死吸附,会降低树脂再次使用时的吸附量,导致树脂重复使用的次数降低,生产成本提高。

[参考文献]

- [1] 傅国强,王硕,王跃生.荔枝草及其混淆品的 HPLC 指纹图谱鉴定[J].江西中医学院学报,2008,20(6):72.
- [2] 裴云萍,吴正红,方芸,等.荔枝草及复方荔枝草提取液体外抑菌实验[J].江苏药学及临床研究,2001,9(3):6.
- [3] 郭仁永,李玲,郝洪.荔枝草止咳平喘作用的研究[J].国医论坛,2000,15(4):41.
- [4] 刘旭杰,李玲,郝海鸥.荔枝草的祛痰及抗组胺作用[J].第四军医大学学报,2003,24(19):1776.
- [5] 刘庆增,王金兰.近年来日本对中药药理作用研究的一些进展[J].中药药理与临床,1988,4(2):50.
- [6] 张素华,王正云.大孔树脂纯化芦笋黄酮工艺的研究[J].食品科学,2006,27(2):182.
- [7] 郑雅楠,吕吕珊,任涛.丹葛滴丸大孔树脂精制工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(22):39.
- [8] 于国峰,丁嘉信,王超,等.红花总黄酮大孔树脂纯化工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(12):39.

[责任编辑 全燕]