

枇杷叶总黄酮大孔树脂纯化工艺优化

刘云^{1*}, 朱欣婷²

(1. 遵义医学院医学与生物研究中心, 贵州 遵义 563003; 2. 遵义医学院基础医学院, 贵州 遵义 563003)

[摘要] **目的:** 优选大孔树脂吸附法富集枇杷叶总黄酮的工艺条件。**方法:** 以芦丁为对照品, 硝酸铝显色法检测枇杷叶总黄酮的含量。以静态吸附容量、静态解吸率为考察指标, 比较 6 种大孔树脂对枇杷叶总黄酮的吸附和解吸效果, 筛选最佳大孔树脂型号, 并对其吸附和解吸条件进行探讨。**结果:** HPD100 型大孔树脂最适合于枇杷叶总黄酮的纯化, 其纯化工艺为上样液质量浓度 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 上样速率 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 上样液体积 2.5 BV , 2 BV 去离子水冲洗, 5 BV 70% 乙醇以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱, 收集洗脱液。在此工艺条件下, 总黄酮得率 78.7%, 总黄酮纯度 47.3%。**结论:** HPD100 型大孔树脂对枇杷叶总黄酮具有良好的纯化效果, 优选工艺合理、稳定可行。

[关键词] 枇杷叶; 总黄酮; 大孔树脂; HPD100; 纯化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0055-03

Optimization of Purification Process for Total Flavonoids from Leaves of *Eriobotrya japonica* by Macroporous Resin

LIU Yun^{1*}, ZHU Xin-ting²

(1. Medical and Biological Research Center, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China;
2. Basic Medical College, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize enrichment technology conditions of total flavonoids from leaves of *Eriobotrya japonica* by macroporous adsorption resin. **Method:** With rutin as reference substance, the content of total flavonoids was determined by aluminium nitrate chromogenic method. With static adsorption capacity and static desorption rate as indexes, optimum type of macroporous resin was selected by comparing adsorption and desorption effect of 6 kinds macroporous resin for total flavonoids from leaves of *E. japonica*, and to investigate its adsorption and desorption conditions. **Result:** HPD 100 macroporous resin was the most suitable for purification of total flavonoids from *E. japonica*. Optimum purification conditions were: the concentration of sampling liquid of $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, sampling velocity $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, sample liquid volume 2.5 BV , eluted by 2 BV deionized water and 5 BV 70% ethanol at the speed of $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, eluate was collected. Under these process conditions, yield of total flavonoids was 78.7%, purity of total flavonoids was 47.3%. **Conclusion:** HPD 100 macroporous resin had a good purification effect of total flavonoids from leaves of *E. japonica*, optimized purification process was reasonable, stable and feasible.

[Key words] leaves from *Eriobotrya japonica*; total flavonoids; macroporous resin; HPD 100; purification

枇杷叶又名巴叶、芦桔叶, 是一种常见中药, 记载于历版《中国药典》中, 其味苦, 性微寒, 归肺、胃经, 具有清肺止咳、降逆止呕的功效^[1]。目前已从

枇杷叶中分离出三萜酸、黄酮、多酚、倍半萜及皂苷等化学成分^[2-5]。近年来在枇杷叶总黄酮的提取工艺^[6-8], 黄酮苷元的含量测定^[9-10]等方面做了大量工作, 但对其总黄酮的富集纯化方面研究较少, 这在一定程度上制约了枇杷叶总黄酮药理学活性的研究。本文利用大孔树脂纯化技术对枇杷叶总黄酮进行纯化, 以期为进一步药理学活性研究提供物质基础。

[收稿日期] 20120110(007)

[通讯作者] * 刘云, 讲师, 硕士, 从事中草药活性成分纯化和药理活性方面的研究, E-mail: liuyunzy@126.com

1 材料

R-210 型旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI),DU800 型紫外-可见分光光度仪(美国 Beckman 公司),GZX-9140MBE 型电热恒温鼓风干燥箱(上海博达实业有限公司医疗设备厂),AE240 型电子天平(瑞士梅特勒—托利多公司),VLP200 型真空冷冻干燥机(美国 thermo 公司)。

芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100080-200707),HPD100、HPD600 型大孔树脂(沧州宝恩化工有限公司),AB-8、NKA-9 型大孔树脂(南开大学化工厂),D140 型大孔树脂(晨光化工研究院),D101 型大孔树脂(天津大学农药厂),其他试剂均为国产分析纯。枇杷叶采自贵州遵义,由遵义师范学院生物系何林副教授鉴定为蔷薇科植物枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 的叶,采集后 60 °C 烘干,粉碎,过 60 目筛,备用。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的绘制^[8] 准确称取芦丁对照品 5.0 mg,95% 乙醇溶解并定容于 25 mL 量瓶(质量浓度 0.20 g·L⁻¹)中,分别吸取 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 mL 对照品溶液于 25 mL 量瓶,用 50% 乙醇溶液补至 12 mL。加入 5% NaNO₂ 0.7 mL 摇匀,放置 5 min,加 10% Al(NO₃)₃ 0.7 mL,1 mol·L⁻¹ NaOH 5 mL,混匀,用 50% 乙醇补足至刻度,放置 15 min,以 50% 乙醇溶液为参比,检测波长 510 nm,测定不同质量浓度下的吸光度值,作标准曲线,得回归方程 $Y = 35.575X - 0.0961$ ($r = 0.9993$),线性范围 4.0 ~ 20.0 mg·L⁻¹。

2.2 树脂预处理^[11] 树脂柱用 95% 乙醇浸泡 24 h,95% 乙醇冲洗至流出液加适量水无浑浊,去离子水洗至无醇味,5% HCl 浸泡 8 h,去离子水洗至中性,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 枇杷叶总黄酮提取液的制备 称取枇杷叶粉 500 g,用 10 倍量 70% 乙醇在 70 °C 温度下提取 2 次,每次 4 h,合并提取液,减压过滤 2 次,浓缩至 1/5 提取液体积,测得提取液中总黄酮质量浓度为 5.31 g·L⁻¹。

2.4 大孔树脂型号筛选 量取 HPD100,HPD600,NKA-9,AB-8,D140,D101 型大孔树脂各 5 mL 于 100 mL 锥形瓶中,加入 50 mL 上述提取液,在摇床上振荡吸附 24 h,过滤,测定滤液中总黄酮质量浓度,计算各种树脂的静态吸附容量(Q)分别为 18.4,17.9,15.7,16.8,15.8,13.7 g·L⁻¹。

$$Q = (C_0 - C_i)(V_y/V_s)$$

C_0 为吸附前总黄酮质量浓度, C_i 为吸附后总黄酮质量浓度, V_y 为样液体积, V_s 为树脂体积。

静态吸附后的各种树脂,分别置于 100 mL 锥形瓶中,加入 85% 乙醇 50 mL,在摇床上解吸 24 h,过滤,测定滤液中总黄酮质量浓度,计算树脂的静态解吸率(A)分别为 92.4%,69.6%,73.1%,83.4%,85.2%,71.4%。

$$A = C_j V_j / Q V_s \times 100\%$$

C_j 为解吸后滤液中总黄酮质量浓度, V_j 为解吸后滤液体积。

由结果可知,HPD100 型大孔树脂对枇杷叶总黄酮吸附和解吸能力最好,故选择 HPD100 大孔树脂进行纯化试验。

2.5 HPD100 大孔树脂纯化工艺研究

2.5.1 上样液质量浓度考察 量取 20 mL HPD100 大孔树脂湿法装柱(2.2 cm × 5 cm)。配制总黄酮质量浓度分别为 1,2,3,4,5 g·L⁻¹ 的上样液各 40 mL,以 2 BV·h⁻¹ 的流速过柱进行动态吸附,收集流出液,2 BV 去离子水洗脱,合并两部分流出液,测定其中总黄酮质量浓度,按下式计算 HPD100 大孔树脂的动态吸附率(P)。

$$P = (C_0 V_y - C_e V_e) / C_0 V_y \times 100\%$$

C_0 为上样液质量浓度, V_y 为上样体积, C_e 为流出液质量浓度, V_e 为流出液体积。

结果大孔树脂吸附率分别为 91.1%,91.7%,90.6%,84.7%,76.2%。故采用 3 g·L⁻¹ 为上样液质量浓度。

2.5.2 上样速率的考察 精密量取总黄酮质量浓度为 3 g·L⁻¹ 的试液 5 份,每份 40 mL。分别以 1,2,3,4,5 BV·h⁻¹ 流速上样,收集流出液,2 BV 去离子水洗脱,合并两部分流出液,测定其中总黄酮质量浓度,计算树脂的动态吸附率分别为 92.1%,91.5%,86.3%,81.1%,65.5%。故选用上样速率 2 BV·h⁻¹。

2.5.3 总黄酮泄露曲线的考察 配制总黄酮质量浓度为 3 g·L⁻¹ 试液,以 2 BV·h⁻¹ 速率上样,每 10 mL 收集 1 份,测定每份流出液中总黄酮的质量浓度。结果见图 1。

由结果可知,上样体积在 50 mL(2.5 BV)内泄漏较少,超过 50 mL 后出现明显泄漏。当上样体积达 90 mL(即 4.5 BV)时,泄漏液中总黄酮质量浓度接近上样液中质量浓度,说明树脂柱已基本达动态饱和吸附。故选择 50 mL(2.5 BV)为上样体积。

2.5.4 乙醇体积分数对洗脱率的影响 取总黄酮

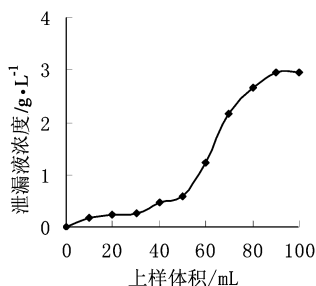


图1 枇杷叶总黄酮泄漏曲线

质量浓度为 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的试液 50 mL , 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上样, 吸附充分后, 2 BV 去离子水冲洗, 收集两部分流出液, 并测定其中总黄酮质量浓度, 计算树脂柱的总吸附量 (Q_e)。

$$Q_e = C_0 V_y - C_e V_e$$

C_0 为上样浓度, V_y 为上样体积, C_e 为流出液浓度, V_e 为流出液体积。

分别用 5 BV 体积分数 30% , 40% , 50% , 60% , 70% , 80% , 90% 的乙醇以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱, 检测洗脱液中总黄酮浓度, 计算洗脱率 (H) 分别为 40.6% , 42.2% , 50.5% , 73.4% , 89.4% , 84.5% , 81.4% 。故选用 70% 乙醇为洗脱溶剂。

$$H = C_x V_x / Q_e \times 100\%$$

Q_e 为树脂柱的总吸附量, C_x 为洗脱液的质量浓度, V_x 为洗脱液的体积。

2.5.5 洗脱流速的考察 取总黄酮质量浓度为 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的试液 50 mL , 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上样, 吸附充分, 2 BV 去离子水冲洗, 5 BV 70% 乙醇分别以 $1, 2, 3, 4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 速度洗脱, 收集洗脱液, 测定其中总黄酮质量浓度, 计算洗脱率分别为 91.1% , 88.2% , 80.9% , 76.4% 。故采用 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的洗脱流速。

2.5.6 洗脱剂用量的考察 取总黄酮质量浓度为 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的试液 50 mL , $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上样, 充分吸附, 2 BV 去离子水冲洗, 70% 乙醇以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱, 直至洗脱液无色, 以 20 mL (1 BV) 为一个收集单位, 分段收集流出液, 测定各段流出液中总黄酮质量浓度。结果洗脱液用量为 $1, 2, 3, 4, 5 \text{ BV}$ 时, 流出液中总黄酮质量浓度分别为 $2.59, 2.16, 1.25, 0.64, 0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。故选择洗脱剂乙醇的用量为 5 BV 。

2.6 工艺验证试验 取 5 份总黄酮质量浓度 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的试液 50 mL (2.5 BV), 按上述优选工艺进行 5 次验证试验, 结果产物中总黄酮质量分数分别为 $(47.3 \pm 1.3)\%$; 总黄酮得率分别为 $(78.7 \pm 1.2)\%$ 。

3 讨论

据文献报道枇杷叶中的黄酮类成分主要是芦丁^[12-13] 和黄酮苷类物质, 黄酮苷类物质经酸水解后得到的产物主要为槲皮素和山奈酚^[9-10]。槲皮素是芦丁的母核, 芦丁比槲皮素多一个二糖; 山奈酚与槲皮素在化学结构上也极为相似; 故选用芦丁作为对照品能比较准确地反映枇杷叶总黄酮的含量。

【参考文献】

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010;190.
- [2] Nunziatina De Tommasi, Francesco De Simone, Cosimo Pizza, et al. Constituents of *Eriobotrya japonica*. A study of their antiviral properties [J]. J Nat Prod, 1992, 55(8):1067.
- [3] Louati S, Simmonds S J. Flavonoids from *Eriobotrya japonica* growing in Tunisia [J]. Biochem Syst Ecol, 2003, 31(1):99.
- [4] Hideyuki I, Kobayashi E, Takamatsu Y. Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and their cytotoxicity against human oral tumore cell lines [J]. Chem Pharm Bull, 2000, 48(5):687.
- [5] Nunziatina De Tommasi, Francesco De Simone, Rita Aquino, et al. Plant metabolites, new sesquiterpene glycosides from *Eriobotrya japonica* [J]. J Nat Prod, 1990, 53(4):810.
- [6] 游见明, 兰江涛. 枇杷叶总黄酮提取工艺研究 [J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3):37.
- [7] 钱剑林. 白沙枇杷叶黄酮类物质提取工艺的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(7):252.
- [8] 董海丽, 王谦. 枇杷叶总黄酮超高压提取及抗氧化活性 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(5):489.
- [9] 韩秀奇, 曾颂, 李书渊. 不同采收季节枇杷叶中黄酮类成分的含量考察 [J]. 广东药学院学报, 2010, 26(6):576.
- [10] 罗美红, 吕寒, 李维林. 枇杷叶中总黄酮含量的高效液相色谱测定 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3):582.
- [11] 洪雪娥, 高荫榆, 罗丽萍, 等. 大孔树脂对薯蓣黄酮吸附分离特性研究 [J]. 食品科学, 2006, 27(10):423.
- [12] 陈剑, 李维林, 吴菊兰, 等. 枇杷叶的化学成分 [J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(4):67.
- [13] 吕寒, 李维林, 裴咏萍, 等. 枇杷叶中黄酮类化学成分的 HPLC-MSⁿ 分析 [J]. 现代中药研究与实践, 2009, 22(6):56.

[责任编辑 仝燕]