

# 火绒草中总黄酮的纯化工艺优选

曹跃<sup>1</sup>, 王丽<sup>1</sup>, 周翎<sup>2</sup>, 谢雪<sup>1</sup>, 许枬<sup>1\*</sup>

(1. 辽宁中医药大学药学院, 大连 116600; 2. 大连海港医院, 大连 116101)

**[摘要]** **目的:** 优选火绒草中总黄酮的大孔吸附树脂富集纯化工艺。**方法:** 采用静态吸附/解吸与动态吸附/解吸相结合的方法, 用紫外-可见分光光度法测定火绒草中总黄酮含量, 筛选最佳大孔吸附树脂, 并对其纯化工艺进行优选。**结果:** 确定采用HPD100型大孔吸附树脂对火绒草中总黄酮进行富集纯化, 其最佳工艺条件为以2 BV火绒草供试品溶液(生药质量浓度 $0.1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )为最大上样量, 吸附速率为 $1 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ , 吸附2 h, 洗脱流速 $4 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ , 5 BV水洗脱, 4 BV 30%乙醇洗脱, 3 BV 50%乙醇洗脱, 收集洗脱液, 减压浓缩, 即得。按上述最佳纯化工艺总黄酮洗脱率 $>90\%$ 。**结论:** 该优选工艺稳定可行, 适合工业化生产。

**[关键词]** 大孔吸附树脂; 火绒草; 水溶性黄酮; 纯化工艺

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0038-03

## Optimization of Purification Technology for Total Flavonoids from *Leontopodium leontopodioid*

CAO Yue<sup>1</sup>, WANG Li<sup>1</sup>, ZHOU Ling<sup>2</sup>, XIE Xue<sup>1</sup>, XU Nan<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;  
2. Dalian Harbour Hospital, Dalian 116101, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize enrichment and purification technology of total flavonoids from *Leontopodium leontopodioid* by macroporous resin. **Method:** Optimum macroporous resin and its purification technology was optimized by static adsorption/desorption and dynamic adsorption/desorption. The content of total flavonoids was determined by ultraviolet and visible spectrophotometry method. **Result:** HPD100 macroporous resin showed good concentration and purification capabilities to total flavonoids from *L. leontopodioid*. Optimum technology conditions were as follows: 2 BV sample liquid (the concentration of raw drug was  $0.1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) of *L. leontopodioid* was passed through HPD-100 resin in 2 h with adsorption rate of  $1 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ , eluted by 5 BV water, 4 BV 30% ethanol, 3 BV 50% ethanol, respectively, elution flow rate was  $4 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ . Eluate was collected to concentrating under vacuum. Under this optimized technology, the elution rate of total flavonoids was more than 90%. **Conclusion:** This optimized technology was stable, feasible, it was suitable for industrial production.

**[Key words]** macroporous resin; *Leontopodium leontopodioid*; water-soluble flavonoids; purification technology

火绒草为菊科火绒草属植物火绒草的干燥全草, 在我国东北和青藏高原等地产量丰富。以往主要作为民间用药, 近年来由于其在治疗小儿急慢性

肾炎、急性肾炎、小儿复发性肾病综合症、糖尿病等症中取得很好的疗效, 受到很多学者的关注, 临床用量逐年提高<sup>[1-5]</sup>。

**[收稿日期]** 20120112(001)

**[基金项目]** 十一五“重大新药创制”科技重大专项项目(2009ZX09103-394)

**[第一作者]** 曹跃, 硕士, 从事中药有效成分提取分离研究, Tel: 15998452608, E-mail: caoyue0412@126.com

**[通讯作者]** \* 许枬, 博士, 副教授, 从事中药有效成分及活性研究, Tel: 0411-87586014, E-mail: xudanbs@163.com

火绒草水提取物对四氧嘧啶引起的糖尿病有明显的防治作用,能明显对抗肾上腺素和外源葡萄糖引起的小鼠血糖升高<sup>[6]</sup>。采用酸碱水半仿生提取工艺获得的火绒草水溶性提取物也有很好的抗糖尿病作用<sup>[7]</sup>。火绒草水提取物还有抗炎和抑制肝细胞损伤等活性<sup>[8]</sup>。化学研究显示,火绒草中富含黄酮,包括槲皮素、芹菜素、山奈酚、芦丁、芹菜素-7-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖苷<sup>[9]</sup>、金圣草素-4'-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷<sup>[10]</sup>、大波斯菊苷<sup>[5]</sup>等。本试验考察6种不同型号大孔吸附树脂对火绒草中水溶性黄酮类化合物进行富集纯化,并对其纯化工艺进行优选。

## 1 材料

FA1004B型1/万分析天平(上海精密科学仪器有限公司),U3010型紫外分光光度计(日本日立公司),AB-8型树脂(安徽三星树脂科技有限公司),D101型树脂(天津欧瑞生物科技有限公司),HPD100,HPD700,HPD450,DM130型树脂均由河北沧州宝恩化工有限公司提供。芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号100080-200707),火绒草采集于辽宁新民县,经辽宁中医药大学王冰教授鉴定为火绒草 *Leontopodium leontopodioid* (Wild) Beauv.,所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

## 2 方法与结果

**2.1 供试品溶液的制备** 取火绒草50 g,加10倍量75%乙醇回流提取1 h,提取液浓缩至干膏,加水溶解并定容至500 mL量瓶中,滤过,取续滤液,即得(生药含量为0.1 g·mL<sup>-1</sup>)。

**2.2 对照品溶液的制备** 取干燥至恒重的芦丁对照品适量,精密称定,制成0.2 g·L<sup>-1</sup>的芦丁甲醇溶液,即得。

**2.3 紫外吸收光谱的测定** 精密吸取对照品溶液5 mL,供试品溶液1 mL,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇至6 mL,加5% NaNO<sub>2</sub>溶液0.3 mL,摇匀,静置6 min,加10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>溶液0.3 mL,摇匀,静置6 min,加4% NaOH溶液3 mL,加甲醇至刻度,摇匀,静置15 min,以相应试剂为空白,照紫外-可见分光光度法(2010年版《中国药典》一部附录VA),在400~800 nm进行扫描,供试品和对照品吸收谱图相近,且均在520 nm处有最大吸收,故选定520 nm为测定波长。

**2.4 标准曲线的绘制** 精密吸取芦丁对照品溶液0.25,0.5,1,2,4 mL,分别置于10 mL量瓶中,按2.3项下方法,自“加甲醇至6 mL”起依法测定吸光度,测定波长为520 nm。以吸光度(*Y*)为纵坐标,芦

丁质量浓度(*X*)为横坐标,绘制标准曲线。得回归方程  $Y = 8.4395X + 0.0324$  ( $r = 0.9992$ ),线性范围3.15~79.34 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.5 树脂型号筛选** 量取已处理好的6种大孔吸附树脂各4 mL,分别置50 mL具塞烧瓶中,精密加入供试品溶液2.5 mL,充分振摇后,室温下静置12 h,滤过,取续滤液2 mL,置10 mL量瓶中,按标准曲线制备项下的方法,自“加甲醇至6 mL”起依法测定溶液中的总黄酮含量。取上述吸附饱和后的树脂,分别精密加入95%乙醇25 mL解吸,充分振摇后,室温下静置12 h,滤过,取续滤液1 mL,置10 mL量瓶中,按标准曲线制备项下方法,自“加甲醇至6 mL”起依法测定解吸液中总黄酮含量。计算各型号树脂的吸附率、吸附量、解析率、解吸量及回收率,结果见表1。

吸附率 = (上样总黄酮 - 未吸附黄酮) / 上样总黄酮;  
吸附量 = 上样总黄酮 - 未吸附黄酮;  
解吸率 = 解吸液中黄酮 / 上样总黄酮;  
解吸量 = 解吸液中黄酮;  
转移率 = 实际测得黄酮 / 理论上样黄酮。

表1 不同型号树脂的考察指标

树脂型号	吸附率	吸附量	解吸率	解吸量	转移率
	/%	/mg	/%	/mg	/%
AB-8	92.4	19.47	80.4	15.7	68.2
HPD100	93.5	19.96	96.7	19.3	84.1
D101	91.7	19.15	91.9	17.6	76.7
HPD700	90.5	18.61	81.7	15.2	66.2
HPD450	89.0	17.44	86.9	15.2	66.0
DM130	91.8	19.19	85.5	16.4	71.5

由表1可见,HPD100对供试品溶液具有易吸附,易解吸的特点,故选用HPD100大孔吸附树脂富集纯化火绒草中总黄酮成分。

## 2.6 富集纯化工艺

**2.6.1 泄露曲线的绘制** 量取10 mL已处理好的HPD100大孔树脂,湿法装柱,供试品溶液上样,流出速度1 BV·h<sup>-1</sup>,收集流出液,每5 mL收集1流份,共收集16份,分别取0.2 mL至10 mL量瓶中,按标准曲线制备项下方法测定吸光度,计算黄酮含量,绘制泄露曲线(图1)。

由图1可知,上样量30 mL时,泄漏率达12.2%;上样量20 mL时,泄漏率仅为2.6%,故确定每mL树脂最大上样量为2 mL供试品溶液。

**2.6.2 洗脱溶媒及其用量的确定** 取10 mL已处理好的HPD100大孔树脂,湿法装柱,以流速1 BV·h<sup>-1</sup>上样20 mL,吸附2 h,5 BV水洗至molish反应阴性,依次用30%乙醇,50%乙醇,70%乙醇,90%乙

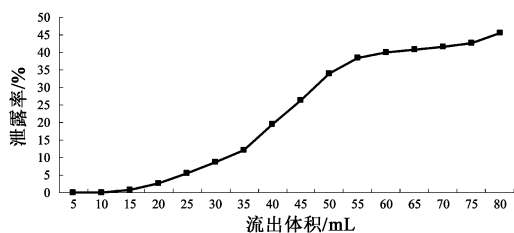


图 1 火绒草中总黄酮 HPD100 大孔树脂泄露曲线

醇各 4 BV 以  $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  流速洗脱, 每 1 BV 收集 1 流份, 减压浓缩, 加甲醇定容至 10 mL。分别取 0.5 mL 至 10 mL 量瓶中, 按照标准曲线制备项下方法, 测定总黄酮含量, 分别计算洗脱率, 结果见表 2。

洗脱率 = 洗脱液中黄酮含量 / 树脂吸附黄酮量  $\times 100\%$

表 2 火绒草中总黄酮 HPD100 大孔树脂洗脱溶媒及其用量考察

乙醇体积 分数/%	总黄酮洗脱率/%			
	1 BV	2 BV	3 BV	4 BV
30	5.75	28.85	21.72	9.79
50	4.41	6.83	4.10	0.68
70	0.26	0.41	0.56	0.51
90	0.47	0.44	0.49	0.51

由表 2 结果可知, 4 BV 30% 乙醇和 3 BV 50% 乙醇可将约 81.4% 的总黄酮洗脱下来, 故确定洗脱溶媒及其用量为 4 BV 30% 乙醇和 3 BV 50% 乙醇。

综合上述试验结果可知, HPD100 大孔吸附树脂富集火绒草中总黄酮成分的最佳工艺为以流速  $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  将 2 BV 样品溶液上样, 吸附 2 h, 5 BV 水洗, 4 BV 30% 乙醇及 3 BV 50% 乙醇以  $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  的流速洗脱, 合并洗脱液, 即得火绒草中总黄酮成分。

**2.7 验证试验** 取 50 mL 已处理好的 HPD100 大孔树脂, 湿法装柱, 按优选的最佳工艺进行纯化, 洗脱液浓缩, 测定总黄酮含量。结果火绒草中总黄酮成分洗脱率为 94.2%。试验表明工艺经放大 5 倍后, 结果与实验室小试结果重复性良好 ( $\text{RSD} < 3\%$ ), 证明该优化工艺条件稳定可行。

### 3 讨论

本实验显示 HPD100 型大孔吸附树脂对火绒草中水溶性黄酮类成分有较好的富集纯化能力, 预试验结果表明, 吸附时间和样品质量浓度是影响大孔吸附树脂富集纯化火绒草中总黄酮的主要因素, 经反复试验最终确定最佳吸附时间为 2 h, 最佳样品质量浓度为生药含量  $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

本文采用的总黄酮含量测定方法为  $\text{NaNO}_2$ - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - $\text{NaOH}$  法<sup>[11-12]</sup>, 加入显色剂时, 应充分摇匀, 且放置一定时间, 以确保显色反应完全。每次量瓶中残留  $\text{NaOH}$  必须在实验结束后清洗干净, 以免影响下一次测定结果。正常显色反应后, 溶液呈粉红色; 在有  $\text{NaOH}$  残留的量瓶中进行显色, 溶液则呈橙红色。为避免因残留  $\text{NaOH}$  造成误差, 清洗量瓶时应用 10% 醋酸浸泡 2 h, 再用蒸馏水冲洗干净。由于火绒草中总黄酮主要为黄酮和黄酮醇类化合物, 芦丁为其主要成分之一。故本文采用芦丁作为对照品, 测定火绒草中总黄酮的含量。

### [参考文献]

- [1] 赵全成, 周丹, 李春生, 等. 老头草化学成分的研究[J]. 中药通报, 1988, 13(2): 34.
- [2] 何凤先. 火绒草为主治疗急性肾炎一百例[J]. 浙江中医杂志, 1994, 29(6): 280.
- [3] 张君, 刘天吉, 李杰, 等. 肾复康加环磷酰胺冲击治疗小儿复发性肾病[J]. 辽宁中医杂志, 1997, (7): 27.
- [4] 尹秀玲, 王金霞, 龙茹. 火绒草治疗糖尿病的研究与开发[J]. 生物学杂志, 2000, 17(2): 25.
- [5] 武彦文, 高文远, 苏艳芳, 等. 火绒草属植物的化学成分和药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(4): 245.
- [6] 焦淑萍, 姜虹, 任庆林, 等. 火绒草对四氧嘧啶糖尿病小鼠高血糖的降低作用[J]. 吉林医学院学报, 1997, 17(2): 10.
- [7] 方玉春, 辛现良, 朱伟明, 等. 老头草半仿生提取物的降血糖作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2007(19): 508.
- [8] 宋雪英, 伍义行, 胡少青, 等. 火绒草水溶性提取物对 D-半乳糖胺致肝细胞损伤的抑制作用[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(29): 3072.
- [9] 潘春媛, 张国刚, 米文珍, 等. 火绒草中的黄酮苷类成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(11): 886.
- [10] 潘春媛, 尤海丹, 贺杰, 等. 火绒草正丁醇层化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(6): 436.
- [11] 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(3): 39.
- [12] 谢雪, 张宏达, 陈昱竹, 等. 大孔吸附树脂纯化愈肾颗粒中总黄酮工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 8.

[责任编辑 全燕]