

三脉紫菀总黄酮的提取纯化工艺优选

周志望¹, 黄慧莲², 邵峰², 刘荣华², 赵海平², 胡林峰², 何小汝², 任刚^{2*}

(1. 南昌大学药学院, 南昌 330006; 2. 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:** 优选三脉紫菀总黄酮的提取、纯化工艺条件。**方法:** 采用正交试验设计, 以总黄酮含量为指标, 优选三脉紫菀总黄酮的提取工艺条件; 以总黄酮静态吸附量和解吸率为考察指标筛选大孔吸附树脂型号, 并优化其纯化总黄酮的工艺条件。**结果:** 最佳提取工艺条件为乙醇体积分数 60%, 浸提温度 50 °C, 浸提 3 次, 料液比 1:10。HPD-500 型大孔吸附树脂对三脉紫菀总黄酮有较好的吸附分离性能, 以 16 mg 总黄酮/g 树脂的上柱量配制成 50 g·L⁻¹ 的上柱液, 上柱后静置 1 h, 用 4 BV 水洗除杂, 用 2 BV 70% 乙醇洗脱, 收集洗脱液。此工艺条件下, 总黄酮纯度 76.7%, 树脂富集倍数 3.83。**结论:** 该优选工艺简便、实用, 可为三脉紫菀的工业生产提供参考。

[关键词] 三脉紫菀; 总黄酮; 提取; 纯化; 工艺优化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0007-04

Optimization of Extraction and Purification Technology for Total Flavones from *Aster ageratoides*

ZHOU Zhi-wang¹, HUANG Hui-lian², SHAO Feng², LIU Rong-hua²,
ZHAO Hai-ping², HU Lin-feng², HE Xiao-ru², REN Gang^{2*}

(1. School of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang 330006, China;

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

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction and purification technology of total flavones from *Aster ageratoides*. **Method:** With the content of total flavones as index, extraction technology conditions of total flavones was optimized by orthogonal test; Type of macroporous resin was selected with static adsorption capacity and desorption rate as indexes, and to optimized purification technology of total flavones. **Result:** Optimum extraction conditions were as follows: soaking extracted 3 times with 10 times the amount of 60% ethanol at 50 °C. HPD-500 type macro porous resin showed better adsorption and desorption property, optimum purification conditions were as follows: sample solution was prepared with the concentration of 50 g·L⁻¹, subjected to HPD-500 type macroporous resin column chromatography with load ratio of 16 mg total flavones per gram of resin, standing for 1 hour, column was eluted with 4 BV water before being eluted with 2 BV 70% ethanol. Under these conditions, purity of total flavones was 76.7%, which enhanced 3.83 times. **Conclusion:** This optimized technology was convenient and practical, it could provide a reference for industrial production of *A. ageratoides*.

[Key words] *Aster ageratoides*; total flavones; extraction; purification; technology optimization

[收稿日期] 20120220(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30901855); 江西中医学院创新人才实验区招标课题(JZ0903)

[第一作者] 周志望, 博士, 讲师, 从事天然产物的提取分离、结构鉴定、合成及构效关系研究, Tel: 13657083092, E-mail: zzw_308@163.com

[通讯作者] *任刚, 博士, 副教授, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 0791-7118607, E-mail: firmblue2005@yahoo.com.cn

三脉紫菀又名三脉叶马兰,产于我国华北、东北、西北、西南等地,日本、朝鲜亦有分布^[1],具清热解毒、祛痰镇咳的功效,在江西民间是治疗哮喘病的有效单方,因此得名换肺草。其化学成分主要包括黄酮类(地上部分)和皂苷类(地下部分),此外还含有三萜^[2-3]、倍半萜^[4]、二萜^[5-8]、单萜^[9]、甾醇^[10-12]、脂肪酸^[9-11]等成分。其中黄酮类成分以黄酮、黄酮醇、二氢黄酮类为主^[13-14],是三脉紫菀祛痰镇咳作用的主要药效物质基础之一,具有较高的开发价值。本试验旨在建立三脉紫菀总黄酮的含量测定方法,同时对总黄酮的提取、纯化工艺进行优选,以期为进一步化学及药理研究奠定基础。

1 材料

UV-2550 型紫外-可见分光光度计(日本岛津),GZX9070MBE 型真空干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),BT25S 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),三脉紫菀地上部分于 2011 年 10 月采自江西省余干县山区,植物标本经本课题组刘荣华教授鉴定为 *Aster ageratoides* Turcz., 凭证标本保存于江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室标本室。芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100080-200707),HP-20 型大孔吸附树脂(日本三菱),HPD-500,HPD-600 型大孔吸附树脂(沧州宝恩化工有限公司),试验所用试剂均为市售分析纯。

2 方法和结果

2.1 含量测定^[15] 比色法是 2010 年版《中国药典》^[16]中用于测定总黄酮的方法,常用硝酸铝比色法^[17]。本试验将芦丁和三脉紫菀总黄酮供试液在 200~700 nm 进行全波长光谱扫描,二者的吸收峰峰形和最大吸收波长吻合,故采用芦丁为测试对照品^[18]。

2.1.1 对照品溶液的配制 准确称取芦丁对照品 17.3 mg 于 10 mL 量瓶中,加 70% 乙醇定容至刻度,摇匀使其充分溶解。准确移取 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4 mL 上述对照品溶液于 10 mL 量瓶中,依次加入 5% NaNO₂, 10% Al(NO₃)₃, 4% NaOH 各 0.15 mL,加 70% 乙醇定容,摇匀,超声 15 min,待测。

2.1.2 供试品溶液的显色 精确称取干浸膏 1.0 g 于 10 mL 量瓶中,加适量 70% 乙醇溶解,依次加入 5% NaNO₂ 0.15 mL, 10% Al(NO₃)₃ 0.15 mL, 4% NaOH 5.0 mL,加 70% 乙醇定容,摇匀,超声 15 min,待测。纯化工艺考察试验中所得滤液、洗脱液的供

试品溶液显色方法类此。

2.1.3 检测波长的选择 分别精确吸取对照品溶液和供试品溶液各 1 mL,依次加入 5% NaNO₂ 0.15 mL,摇匀,静置 6 min,加入 10% 硝酸铝 0.15 mL,摇匀,静置 6 min,加入 4% 氢氧化钠 5 mL,用 70% 乙醇定容至 10 mL,静置 10 min,以依次加入上述显色剂的 70% 乙醇溶液作为空白对照,于 200~700 nm 进行全波长光谱扫描,结果在 509 nm 处有最大吸收,故选择测定波长 509 nm。

2.1.4 标准曲线的绘制 **2.1.1** 项下对照品溶液用 UV-2550 紫外分光光度计于 509 nm 处测定对照品溶液吸光度(A)。以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得线性回归方程 $A = 1.2369C - 0.0275$ ($r = 0.9994$)。三脉紫菀总黄酮以芦丁计在 0.0865~0.692 g·L⁻¹ 具有良好线性关系。

2.2 提取工艺的优化 采用正交试验设计对三脉紫菀总黄酮的提取工艺进行优化和筛选,考察料液比、浸提温度、浸提次数及乙醇体积分数 4 个因素对提取工艺的影响,每个因素选择 3 个水平,因素水平见表 1。三脉紫菀地上部分常温阴干,50℃ 干燥至恒重。粉碎过 4 号筛,称取粗粉 5.0 g 于 500 mL 圆底烧瓶中,按正交表安排,加入适量相应体积分数乙醇溶液,常温下浸置 12 h,水浴回流提取 2 h,回收乙醇得提取物。按 L₉(3⁴) 正交表安排试验,以总黄酮含量为指标考察各因素对提取效果的影响,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 三脉紫菀总黄酮提取工艺优选正交试验因素水平

水平	A 料液比 /g·mL ⁻¹	B 浸提 温度/℃	C 浸提 数/次	D 乙醇体积 分数/%
1	1:6	50	1	60
2	1:8	60	2	75
3	1:10	70	3	95

由表 2,3 可见,由极差可知,影响总黄酮提取效果的因素由大到小依次为 $A > C > D > B$,以极差最小的 B 因素为误差项进行方差分析,料液比对总黄酮的含量有显著影响,浸提次数、乙醇体积分数对总黄酮含量无显著影响。最佳工艺为 A₃C₃D₁B₃。但结合实际生产,从节省能源的角度考虑,确定选择工艺条件为 A₃C₃D₁B₁,即料液比 1:10,回流提取 3 次,乙醇体积分数 60%,浸提温度 50℃。在此最佳工艺条件下,进行 3 次验证试验,结果 5.0 g 三脉紫菀地上部分提取得到的浸膏平均含量 0.48 g,总黄酮平均质量分数 20.42%。

表2 三脉紫菀总黄酮提取工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	总黄酮提取率/%
1	1	1	1	1	1.265
2	1	2	2	2	1.159
3	1	3	3	3	1.968
4	2	1	2	3	1.809
5	2	2	3	1	2.567
6	2	3	1	2	1.575
7	3	1	3	2	3.429
8	3	2	1	3	2.176
9	3	3	2	1	2.976
K_1	4.39	6.50	5.02	6.81	
K_2	5.95	5.90	5.94	6.16	
K_3	8.58	6.52	7.96	5.95	
R	1.40	0.21	0.98	0.29	

表3 总黄酮提取率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	2.99	2	1.49	22.58	<0.05
B	0.08	2	0.04	0.62	
C	1.51	2	0.76	11.44	
D(误差)	0.13	2	0.07	1.00	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

2.3 纯化工艺优化

2.3.1 上柱溶液的制备 称取 1.0 g 三脉叶紫菀地上部分提取物置于烧杯中,加 20 倍量水充分搅拌,超声处理 10 min,使其充分溶解,过滤,即得。

2.3.2 静态吸附试验 分别精密称取处理好的各类型树脂 1.5 g,置于 50 mL 锥形瓶中,每瓶加入样品溶液 25 mL,每隔 5 min 振摇 10 s,持续 2 h,静置 18 h,抽滤得滤液和饱和吸附三脉紫菀总黄酮的树脂,测定滤液中总黄酮含量。按下式计算树脂饱和吸附量。结果 HPD500,HPD600,HP20 树脂的饱和吸附量分别为 16.85,18.46,5.83 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,说明 HP-20 对三脉紫菀总黄酮的静态吸附较小,其余 2 种树脂的吸附量均 $>16.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,可用于三脉紫菀总黄酮的吸附分离工艺。

饱和吸附量 = (初始浓度 - 吸附后浓度) × 吸附液体积 / 树脂质量。

2.3.3 树脂静态解吸试验 取 2.3.2 项下已饱和吸附三脉紫菀总黄酮的树脂置于 50 mL 锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 25 mL,每隔 5 min 振摇 10 s,持续 2 h,过滤得洗脱液,测定 3 种树脂洗脱液中总黄

酮质量分别为 15.47,15.11,4.16 mg,计算洗脱率依次为 91.8%,81.85%,71.35%。结合静态吸附试验结果,确定 HPD-500 型树脂综合性能最佳。故选用 HPD-500 型树脂分离纯化三脉紫菀总黄酮。

$$\text{洗脱率} = \frac{\text{洗脱液质量浓度} \times \text{洗脱液体积}}{\text{饱和吸附量}} \times 100\%$$

2.3.4 动态吸附-解吸试验

2.3.4.1 乙醇体积分数的考察 准确称取 3 份 HPD-500 型大孔吸附树脂,每份 7 g,分别装入 2 cm × 5 cm 的玻璃柱中。将 10 mL 样品液以 2 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上柱,上样后静置 1 h,用 2 BV 水洗至流出液基本无色。分别用体积分数 60%,70%,80% 的乙醇以流速 2 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱至流出液近无色,以 FeCl_3 试液检测基本无阳性反应,说明黄酮类成分已洗脱完全。分别测定各流份中总黄酮质量分别为 13.7,17.5,17.7 mg;总黄酮纯度依次为 76.1%,79.7%,72.7%。说明 70% 乙醇洗脱液中总黄酮解吸量及纯度均较佳,故确定 70% 乙醇为洗脱液。

2.3.4.2 水洗除杂用量考察 准确称取 3 份 HPD-500 型大孔吸附树脂,每份 7 g,分别装入 2 cm × 5 cm 玻璃柱中。将 20 mL 样品液以 2 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上柱,上样后静置 1 h,分别以 2,4,6 BV 水冲洗(流速 2 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$),用 2 BV 70% 乙醇以 2 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速进行洗脱,收集洗脱液,定容,稀释,测定 A,结果总黄酮纯度分别为 75.4%,76.5%,78.2%,总黄酮收率分别为 76.1%,75.2%,75.6%。为减少用水量,缩短洗脱时间,确定用 4 BV 水洗除杂。

2.3.4.3 洗脱剂用量考察 准确称取 3 份 HPD-500 型大孔吸附树脂,每份 7 g,分别装入 2 cm × 5 cm 玻璃柱中。将 20 mL 样品液以 2 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上柱,上样后静置 1 h,分别加 2,4,6 BV 70% 乙醇洗脱,收集洗脱液,测定,结果总黄酮收率分别为 75.04%,76.1%,74.2%,考虑到洗脱剂用量过多会增加洗脱时间,延长生产周期,造成浪费,故确定加 2 BV 乙醇洗脱。

2.4 验证试验 准确称取 3 份 HPD-500 型大孔树脂 7 g,分别装入 2 cm × 7 cm 玻璃柱中,将 20 mL 样品液以 2 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上柱,按上述优选的工艺条件进行吸附、洗脱,收集乙醇洗脱液,按 2.1 项下方法测定总黄酮含量,结果总黄酮纯度分别为 78.0%,75.2%,76.8%;收率依次为 77.2%,75.4%,71.2%,说明该优选工艺稳定可行。

3 讨论

本试验采用静态吸附率和静态洗脱率对分别代

表弱极性、中等偏大极性 & 强极性的 3 种大孔吸附树脂进行筛选。结果表明,HPD-500 型大孔吸附树脂对三脉紫菀总黄酮有较大静态吸附量,同时容易解吸附,表现出较好的综合分离纯化能力。在此基础上,对利用 HPD-500 型树脂对三脉紫菀总黄酮的工艺条件进行优化,得最佳工艺参数为以 16.0 mg 总黄酮/g 干树脂的上柱量配制成 50.0 g·L⁻¹ 上柱液,上柱后静置 1 h,用 4 BV 水洗除杂,用 2 BV 70% 乙醇洗脱,收集洗脱液,其中总黄酮纯度为 76.7%,经大孔树脂纯化后总黄酮纯度从 20.4% 提高至 76.7%,纯化效果明显。

[参考文献]

[1] 郑朝宗. 浙江植物志. 第 6 卷[M]. 杭州:浙江科学技术出版社, 1993:238.

[2] Yan F L, Yao S M, Zhou Y. Two new tetracyclic triterpenoids and other constituents from *Aster ageratoides* var. *oophyllus* [J]. J Chin Chem Soci, 2007, 54(5):1321.

[3] Yan F L, Wang A X, Jia Z J. Pentacyclic triterpenoids from *Aster ageratoides* var *pilosus* [J]. Pharmazie, 2004, 59(11):882.

[4] Ahmed A A, Mahmoud A A, Hegazy M F, et al. Terpenoid constituents of *Aster subspicatus* and *A. ageratoides*[J]. Pharmazie, 2002, 57(8):567.

[5] 程东亮, 曹小平, 韦汉勋. 三褶脉紫菀中的新二萜苷 [J]. 植物学报, 1994, 36 (6):483.

[6] Cheng D L, Cao X P, Wai A X, et al. A new diterpene glycoside from *Aster ageratoides* Turcz [J]. Chin Chem Lett, 1993, 4(1):39.

[7] Cheng D L, Cao X P, Wei H X, et al. Kaurane diterpenoids from *Aster ageratoides* [J]. Phytochemistry, 1993, 33(5):1181.

[8] Guo S J, Katalinic J P, He L, et al. A new kaurane diterpene and a new echinocystic acid saponin from *Aster ageratoides*[J]. Pharmazie, 1998, 53(7):481.

[9] 闫福林, 董丽, 刘振岭, 等. 长毛三脉紫菀化学成分的研究 [J]. 新乡医学院学报, 2007, 24(6):548.

[10] 席荣英, 白素平, 孙祥德, 等. 卵叶三脉紫菀化学成分的研究 [J]. 中草药, 2003, 34(9):785.

[11] 周跃, 刘振岭, 卢光洲, 等. 卵叶三脉紫菀化学成分的研究 [J]. 新乡医学院学报, 2006, 23(2):125.

[12] 周跃, 郭兰青, 牛晓明, 等. 卵叶三脉紫菀中三萜及甾体化合物 [J]. 新乡医学院学报, 2003, 20(6):393.

[13] 刘可越, 赵昱波, 刘海军, 等. 紫菀属植物化学成分与生物活性研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(5):276.

[14] 赵海波, 杨晓燕, 侯相民, 等. 三脉紫菀化学成分的研究 [J]. 广东化工, 2011, 38(9):23.

[15] 任刚, 刘荣华, 邵峰, 等. 二色波罗蜜根皮总黄酮提取纯化工艺研究 [J]. 中药材, 2010, 33(8):1320.

[16] 中国药典. 一部[S]. 2010:30.

[17] 李进冉, 张思巨, 李琳, 等. 白土苓中大泽明素与总黄酮的含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8):68.

[18] 刘可越, 周斌, 刘海军, 等. 紫菀止咳滴丸的制备工艺及质量标准 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):19.

[责任编辑 仝燕]