

# 甘草总黄酮的大孔吸附树脂纯化工艺优选

吕子明<sup>1,2</sup>, 陈凯<sup>3</sup>, 于向红<sup>2</sup>, 刘晓燕<sup>2</sup>, 梁俊清<sup>2</sup>, 屠鹏飞<sup>1\*</sup>

(1. 北京大学药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191;

2. 北京以岭药业有限公司, 北京 100027; 3. 北京华众思康医药技术有限公司, 北京 102209)

**[摘要]** 目的: 优选大孔吸附树脂分离、纯化甘草总黄酮的工艺条件。方法: 以总黄酮吸附量和解吸率为考察指标, 对 12 种不同类型树脂进行筛选, 在此基础上对其纯化工艺条件进行优选。结果: AB-8 型大孔吸附树脂对甘草总黄酮的纯化效果最好, 其最佳工艺条件为上样液质量浓度为  $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 每 mL 树脂最大上样量为 2 mL, 吸附流速  $0.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ , 上样液 pH 6, 6 BV 水以流速  $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  洗脱除杂, 4 BV 70% 乙醇以  $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  流速洗脱。该优选条件下, 洗脱物中甘草总黄酮纯度为 38%。结论: 该优选工艺合理、可行, 适合工业生产。

**[关键词]** 甘草; 总黄酮; 甘草苷; 大孔吸附树脂; 纯化

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0024-04

## Optimization of Purification Process for Total Flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* by Macroporous Adsorption Resin

LV Zi-ming<sup>1,2</sup>, CHEN Kai<sup>3</sup>, YU Xiang-hong<sup>2</sup>, LIU Xiao-yan<sup>2</sup>, LIANG Jun-qing<sup>2</sup>, TU Peng-fei<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmacy, Peking University, Beijing

100191, China; 2. Beijing Yiling Pharmaceutical Co. Ltd, Beijing 100027, China;

3 Beijing Huazhong Sikang Pharmaceutical Technology Co. Ltd, Beijing 102209, China)

**[收稿日期]** 20120106(012)

**[基金项目]** 国家科技重大专项课题(2011ZX09401-020)

**[第一作者]** 吕子明, 工程师, 博士, 从事天然药物、中药及合成药物化学研究, Tel: 010-59705134, E-mail: aabben@163.com

**[通讯作者]** \* 屠鹏飞, 教授, 博士, 从事天然药物化学成分及其活性研究, Tel: 010-82802750, E-mail: pengfeitu@bjmu.edu.cn

### [参考文献]

- [1] 江苏植物研究所. 江苏植物志: 下册 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1982: 8881.
- [2] 袁昌齐, 冯熙, 王鸣, 等. 欧美植物药简况及研究和开发对策. 药用植物研究与中药现代化 [M]. 南京: 东南大学出版社, 2004: 101.
- [3] 胡喜兰, 王国卫, 高英. 牛蒡根中活性成分的研究 [J]. 食品科学, 2007(28): 111.
- [4] 李玉洁, 刘树民, 李淑莲, 等. 牛蒡根抗衰老的实验研究 [J]. 食品科学, 2004, 15(9): 545.
- [5] 徐秀泉, 于荣敏, 刘柯, 等. 响应面法优化茅苍术多糖的提取工艺 [J]. 安徽农业科学, 2011, 30(20): 12082.
- [6] 魏学军, 林先燕, 冯光维, 等. 响应面法优化一贯煎中多糖的提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17

(5): 22.

- [7] 余微, 查文良, 梁惠敏, 等. 大蒜多糖组分 A 总多糖含量的分光光度法的测定 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 563.
- [8] 张伟杰, 王鹏, 林茜, 等. 三种多糖的提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 19.
- [9] 刘万仓, 孙磊, 乔善义, 等. 不同产地枸杞药材中多糖的含量测定 [J]. 国际医药科学杂志, 2011, 38(30): 229.
- [10] 李金花, 黄锁义, 农石生. 八角茎多糖的提取及含量测定 [J]. 食品科技, 2011, 36(8): 176.
- [11] BOX G E P, Hunter W G. Statistics for experiments: An introduction to design, data analysis, and model building [M]. New York: Wiley, 1990: 250.

[责任编辑 仝燕]

[ **Abstract** ] **Objective:** To optimize separation and purification technology of total flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* by macroporous adsorption resin. **Method:** Twelve different types of resin were selected with the amount of absorption and desorption ratio of total flavonoids as indexes, based on this, separation and purification technology of total flavonoids were optimized. **Result:** Purification effect of AB-8 type macroporous was the best, its optimum technology conditions were: the concentration of sample solution  $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , maximum sample quantity 2 mL to 1 mL resin, velocity of absorption  $0.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ , pH of sample solution 6, 6 BV water to remove impurities at  $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ , eluted by 4 BV 70% ethanol at flow rate of  $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ . Under this optimized process, purity of total alkaloids in elution was 38%. **Conclusion:** This optimized process was rational, feasible and suitable for industrial production.

[ **Key words** ] *Glycyrrhiza uralensis*; total flavonoids; liquiritin; macroporous adsorption resin; purification

甘草是常用中药材,具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药的功能<sup>[1]</sup>。在药品、保健品、化妆品和食品等行业中应用广泛。其中甘草总黄酮具有抗氧化、抗肿瘤、抗 HIV、保肝作用、抗溃疡、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制等药理作用<sup>[2-3]</sup>。本试验旨在优选分离纯化甘草总黄酮的最佳大孔树脂型号,并对其工艺条件及参数进行研究。

## 1 材料

UV-2100 型紫外-可见分光光度计(日本岛津),甘草(购于河北省安国以岭饮片有限公司,经河北以岭药业有限公司田清存高级工程师鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch 的干燥根及根茎),甘草苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111610-200604),NKA-9,NKA-2 型大孔吸附树脂(天津波鸿树脂科技有限公司),HPD500,HPD600,HPD300,D101,D301,AB-8 型大孔树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司),XDA-8,ZG300B,S-8,X-5 型大孔树脂(三星树脂科技有限责任公司),其他试剂均为分析纯,水为纯化水。

## 2 方法与结果

**2.1 上柱药液的制备**<sup>[3]</sup> 取适量甘草饮片,加 15 倍量 90% 乙醇提取 2 次,每次 0.5 h,合并提取液,减压回收乙醇至无醇味,加适量纯化水,即得甘草样品液。

**2.2 甘草总黄酮含量测定** 采用紫外分光光度法进行测定<sup>[4]</sup>。

**2.3 大孔吸附树脂的预处理** 分别取各种树脂适量,加 95% 乙醇浸泡 24 h,湿法装柱,用 5 BV 95% 乙醇动态洗脱,水洗至无醇味,依次用 5% 盐酸和 5% 氢氧化钠处理(分别浸泡 6 h,水洗至中性),用 95% 乙醇动态洗脱至流出液加水不变混浊为止。

**2.4 大孔吸附树脂的筛选** 试验选取 12 种型号大孔树脂对甘草总黄酮静态吸附率和解吸率进行考

察,按下式计算树脂的吸附量和解吸率。

$$\text{树脂吸附量} = (\text{上样液中总黄酮的质量} - \text{残留液中总黄酮的质量}) / \text{树脂体积}$$

$$\text{树脂解吸量} = \text{乙醇洗液中总黄酮的质量} / \text{树脂体积}$$

$$\text{树脂的解吸率} = \text{树脂解吸量} / \text{树脂吸附量} \times 100\%$$

**2.4.1 静态吸附考察** 取预处理好的树脂各 10 mL,置 50 mL 量瓶中,分别加入质量浓度为  $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的药液 10 mL,摇匀,放置 24 h,中间不断振摇,用 95% 乙醇 5 BV 洗脱,测定溶液中总黄酮含量,同时测定原液中总黄酮含量,计算解吸率。结果见表 1。

表 1 12 种大孔树脂对甘草总黄酮静态吸附考察

树脂类型	吸附量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	解吸量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	解吸率/%
NKA-9	5.02	4.02	80
X-5	15.89	11.12	70
HPD500	15.31	14.09	92
XAD-8	16.31	14.68	90
HPD600	10.20	9.28	91
AB-8	16.34	16.01	98
HPD300	15.20	14.44	95
ZG300B	15.99	14.39	90
D101	16.20	15.88	98
S-8	10.21	8.88	87
D301	9.87	8.19	83
NKA-2	2.10	1.60	76

由结果可知,AB-8,D101,ZG300B,HPD300,HPD500,XAD-8,X-5 型大孔树脂吸附效果均较好。但 XAD-8 型树脂为进口树脂,价格昂贵,且使用效果不是最好,故在做动态吸附考察时,未再考虑。

**2.4.2 动态吸附考察** 取 20 mL 不同型号已处理好的树脂分别装柱,测定体积,将一定质量浓度样品溶液通过树脂柱,以  $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  的流速进行动态吸

附,流出液每 10 mL 接受 1 份,每份均量取适量用盐酸-镁粉反应检识黄酮,并辅以 TLC 检测甘草苷,待盐酸-镁粉反应呈阳性时开始进行 TLC 检测,当检测有甘草苷泄漏时,停止上样,记录上样量。用 4 BV 水洗,收集水洗液定容于 1 000 mL 量瓶中,供含量测定用,用 80% 乙醇洗脱,洗至洗液近无色,收集洗脱液于 1 000 mL 量瓶中,定容,供含量测定用。结果见表 2。

表 2 6 种大孔树脂对甘草总黄酮动态吸附考察

树脂类型	吸附量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	解吸量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	解吸率/%
AB-8	18.00	17.64	98
D101	17.92	17.56	98
ZG300B	18.01	16.57	92
HPD300	17.89	16.10	90
HPD500	17.20	16.34	95
X-5	18.20	16.56	91

由结果可知,与其他型号树脂相比,AB-8 型树脂效果较好,且价格便宜,故选择 AB-8 型树脂。

## 2.5 纯化工艺优选

**2.5.1 上样浓度考察** 将生药质量浓度分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的上样溶液通过 AB-8 树脂柱(树脂体积 40 mL, 径高比 1:7), 以 0.5  $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$  的流速进行动态吸附, 按 2.4.2 项下“用盐酸-镁粉反应……记录上样量”操作进行试验。结果上样体积分别为 135, 75, 40, 30 mL, 每 mL 树脂对应生药量分别为 0.338, 0.375, 0.300, 0.300 g。故选取上样液生药质量浓度以 0.2  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  为佳。

**2.5.2 径高比考察** 选择直径相同的树脂柱 4 根, 湿法装入 AB-8 树脂, 使树脂径高比分别达到 1:4, 1:7, 1:10, 取生药质量浓度为 0.2  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的样品溶液过柱, 进行动态吸附, 流速 0.5  $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ , 按 2.4.2 项下“用盐酸-镁粉反应……记录上样量”操作进行试验。结果每 mL 树脂对上样体积分别为 1.5, 1.7, 1.6 mL。说明 3 个径高比无明显差别。

**2.5.3 吸附流速考察** 取生药质量浓度为 0.2  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的上样液过柱(树脂体积 40 mL, 径高比 1:7), 分别以 0.5, 1, 2  $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$  的流速进行动态吸附。按 2.4.2 项下“用盐酸-镁粉反应……记录上样量”方法操作。结果上样体积分别为 80, 60, 30 mL。故确定吸附流速为 0.5  $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

**2.5.4 上样 pH 考察** 取生药质量浓度为 0.2  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的上样液 4 份, 每份 80 mL, 分别调 pH 5, 6, 7, 8。试验发现 pH 5 时有大量沉淀产生, 过滤, 取续滤

液。分别以 0.5  $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$  的流速过柱(树脂体积 40 mL, 径高比 1:7)。按 2.4.2 项下“用盐酸-镁粉反应……记录上样量”方法操作。用 6 BV 水洗除杂, 用 70% 乙醇洗脱至盐酸-镁粉反应呈阴性, 流速均为 1  $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ , 收集洗脱液于 1 000 mL 量瓶中, 定容, 供含量测定用。结果上样体积分别为 65, 70, 70, 70 mL, 上样液中总黄酮质量分别为 0.364 8, 0.561 1, 0.567 7, 0.611 5 g, 洗脱液中总黄酮质量分别为 0.355 0, 0.550 7, 0.548 8, 0.501 2 g。由以上结果可知, pH 6 效果较好。

**2.5.5 泄露曲线考察** 取 AB-8 型树脂 40 mL, 湿法装住, 径高比 1:7, 取生药质量浓度为 0.2  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的上样液适量, 以 0.5  $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$  流速上样, 收集流出液, 每 15 mL 为 1 份, 测定各流出液中总黄酮的质量依次为 0, 8.83, 8.96, 10.80, 11.73, 26.04, 44.35, 59.32, 98.51, 124.47, 130.41, 133.01 mg。由结果可知, 上样 80 mL 时泄露开始加剧, 180 mL 时几乎达到完全泄露, 故确定最大上样量为 75 ~ 80 mL。

**2.5.6 水洗体积考察** 取生药质量浓度为 0.2  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的上样液 4 份, 每份 80 mL, 分别以 0.5  $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$  的流速过柱(40 mL), 待吸附完全后, 分别用 4, 6, 8, 10 BV 水洗除杂, 用 70% 乙醇洗脱, 洗脱至盐酸-镁粉反应呈阴性, 测定洗脱液中总黄酮的质量分别为 0.72, 0.70, 0.69, 0.65 mg; 出膏质量分别为 2.00, 1.80, 1.67, 1.48 mg。即 6 BV 水洗体积较合适。

**2.5.7 水洗流速考察** 取生药质量浓度为 0.2  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的上样溶液 3 份, 每份 80 mL, 分别以 0.5  $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$  的流速过柱(40 mL), 待吸附完全后, 用 6 BV 纯净水分别以 1, 2, 3  $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$  的流速进行水洗除杂, 用 70% 乙醇洗脱, 洗脱至盐酸-镁粉反应呈阴性, 测定洗脱液中总黄酮的含量以及出膏量。结果洗脱液中总黄酮的分别为 0.72, 0.70, 0.69 g; 出膏量分别为 2.00, 1.80, 1.67 g。由结果可知, 除杂流速为 1  $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$  时, 杂质洗脱较多, 有效成分损失较少。

**2.5.8 洗脱溶剂浓度考察** 取生药质量浓度为 0.2  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的上样溶液 6 份, 每份 80 mL, 分别以 0.5  $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$  的流速过柱(40 mL), 待吸附完全后, 分别用 6 BV 纯净水以 1  $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$  的流速进行水洗除杂, 分别用体积分数为 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 95% 的乙醇溶液以 1  $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$  的流速洗脱至盐酸-镁粉反应呈阴性, 收集洗脱液于 1 000 mL 量瓶中, 定容, 供含量测定用。结果洗脱液用量分别为 330, 275, 200, 200, 220, 260 mL; 总黄酮洗脱量分别为

0.54,0.64,0.67,0.72,0.67,0.65 g;浸膏量分别为1.25,1.71,1.78,1.80,1.67,1.58 g。综合考虑,选择70%乙醇。

**2.5.9 洗脱流速考察** 取生药质量浓度为 $0.2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的上样溶液3份,每份80 mL,分别以 $0.5\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速过柱(40 mL),待吸附完全后,分别用6 BV 纯净水以 $1\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速进行水洗除杂,用70%乙醇分别以 $1,2,3\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速洗脱至盐酸-镁粉反应呈阴性,收集洗脱液于1000 mL量瓶中,定容,供含量测定用。洗脱液用量分别为200,245,300 mL;总黄酮洗脱量分别为0.54,0.54,0.51 g;浸膏量分别为1.47,1.46,1.45 g。故选择洗脱流速为 $1\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

**2.5.10 洗脱体积考察** 取生药质量浓度为 $0.2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的上样液80 mL,以 $0.5\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 过柱(树脂体积40 mL,径高比1:7),待吸附完全后,用6 BV 水以 $1\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速洗脱除杂,用70%乙醇以 $1\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速洗脱,每15 mL洗脱液搜集1份,共收集洗脱液12份(4.5 BV)检测每份洗脱液中总黄酮的量分别为0.25,0.46,0.59,0.31,0.17,0.13,0.04,0.02,0.02,0.01,0.009,0.001 g;总黄酮累积洗脱率分别为12.33%,35.30%,64.80%,80.16%,88.43%,94.81%,96.85%,98.08%,98.88%,99.49%,99.93%,100.00%。结合生产实际,为使之洗脱完全,故洗脱体积暂定为4 BV。

**2.6 树脂使用次数考察** 每次的纯化洗脱过程按优选的纯化工艺方法进行。树脂使用1次后,用95%乙醇处理,重复使用第2次,第3次等,共使用11次,测定每次总黄酮的吸附量,当总黄酮吸附量降低到最大吸附量70%时,停止使用。结果表明第10次总黄酮的吸附量为最大吸附量的61%,第9次总黄酮的吸附量为最大吸附量的75%,即树脂最多使用次数为9次,耐用性比较好。推测如果接着用酸碱处理,可能还可重复使用多次,具体情况有待于进一步研究验证。

**2.7 纯化工艺验证试验** 按照甘草总黄酮的纯化工艺平行制备3批样品,依照上法测定各成分的含量。结果出膏率分别为13%,12%,12%;总黄酮含量分别为39%,37%,38%。说明该工艺比较稳定,重复性比较好。

### 3 讨论

采用芦丁作为对照品测定甘草总黄酮含量不够准确,所用洗脱剂为乙酸乙酯,实际生产中不够经济,且对环境和人体有污染<sup>[5]</sup>。采用 $\text{AlCl}_3$ 显色法,

柚皮苷作对照品测量甘草总黄酮,含量测定不够准确<sup>[6-9]</sup>。本课题组在研究的基础上<sup>[4,13]</sup>,确定采用甘草苷作为对照品,氢氧化钾显色法测定甘草总黄酮,并建立含量测定方法。确定大孔吸附树脂纯化甘草总黄酮的工艺为选择AB-8型大孔吸附树脂,上样液生药质量浓度为 $0.2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,每mL树脂的最大上样量为2 mL,吸附流速 $0.5\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ ,上样液pH 6;除杂溶剂为6 BV 水,除杂流速为 $1\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ ,洗脱溶剂为4 BV 70%乙醇,洗脱流速为 $1\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。该工艺合理、可行,适合工业生产。

### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010:80.
- [2] 季宇彬,姜薇,范玉玲.甘草黄酮的研究进展[J].中草药,2004,35(9):附5.
- [3] 吕子明,于向红,梁俊清,等.正交试验优选甘草黄酮和皂苷的提取工艺[J].中国保健营养,2012,23(1):1.
- [4] 马子娇,许颖,刘佳,等.甘草废渣中甘草黄酮提取工艺研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(15):15.
- [5] 张志东,楚敏,宋素琴,等.SP825大孔树脂静态吸附甘草总黄酮的研究[J].农产品加工,2007,108(8):15.
- [6] 傅博强,刘劫,王小如,等.XDA-1大孔树脂对甘草酸及甘草总黄酮的吸附分离[J].现代中药研究与实践,2004,18(增):45.
- [7] 李红,李炳奇,刘红,等.XDA-1型树脂对甘草黄酮吸附-解吸效果的研究[J].中成药,2007,29(6):830.
- [8] 李红,李炳奇,刘红,等.几种大孔树脂对甘草黄酮吸附及解吸性能的研究[J].现代食品科技,2006,23(1):11.
- [9] 张睿,林强.利用HP-20大孔树脂提取分离甘草黄酮的研究[J].北京联合大学学报:自然科学版,2006,20(2):20.
- [10] 应雪,陈文,江发寿,等.大孔吸附树脂分离纯化甘草总黄酮工艺研究[J].中国药房,2006,17(17):1355.
- [11] 韩博,陈文,景文娟,等.AB-8大孔吸附树脂对甘草总黄酮的吸附[J].南方医科大学学报,2007,27(3):265.
- [12] 梁旭霞,刘莉,张文新,等.甘草黄酮- $\beta$ -CD包合物的制备及增溶作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(7):1.
- [13] 吕子明,于向红,刘丹,等.不同产地栽培甘草含量测定研究[J].中国保健营养,2011,20(12):60.

[责任编辑 仝燕]