

AB-8 大孔吸附树脂纯化双黄连中金银花、连翘提取物工艺

李淑芳¹, 王淑美², 梁生旺², 王战红³

(1. 郑州市第三人民医院, 郑州 450000; 2. 广东药学院, 广州 510000; 3. 河南中医学院, 郑州 450000)

[摘要] 目的: 优化 AB-8 大孔吸附树脂纯化双黄连中金银花、连翘提取物的工艺。方法: 以提取物中总酚、总黄酮的含量为考察指标, 从树脂径高比、吸附浓度、吸附流速、洗脱剂浓度等方面对大孔吸附树脂纯化工艺进行优化。结果: 最佳纯化工艺为金银花、连翘提取物, 加蒸馏水稀释成 $1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (生药量), 树脂柱径高比 1:10, 最大吸附量与树脂体积比为 1:3.3, 水洗 3 倍树脂体积, 4BV 70% 乙醇洗脱。结论: AB-8 大孔吸附树脂纯化金银花、连翘提取物的最佳工艺稳定可行。

[关键词] 双黄连; 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)02-0004-04

Purification Technology of Extracts from *Lonicerae japonicae* and *Forsythiae suspensa* in Shuanghuanglian by AB-8 Macroporous Resin

LI Shu-fang¹, WANG Shu-mei², LIANG Sheng-wang², WANG Zhan-hong³

(1. Third People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000, China;

2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510000, China;

3. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology of extracts from *L. japonicae* and *F. suspensa* in Shuanghuanglian by AB-8 macroporous resin. **Method:** The content of total phenolic and total flavonoids were used as indexes. Purification technology was optimized from proportion of diameter-height, adsorption concentration, adsorption speed and eluent concentration, etc. **Result:** Optimum purification technology was as follows: extracts of *L. japonicae* and *F. suspensa* were diluted to concentration was $1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ by water, ratio of diameter-height 1:10, proportion of maximum adsorption to resin volume was 1:3.3, eluted by 3 BV of water, 4 BV 70% ethanol as the eluent. **Conclusion:** This process of purification technology was stable and feasible.

[Key words] Shuanghuanglian; macroporous resin; purification technology

双黄连由黄芩、金银花、连翘 3 味中药组成, 具有疏风解表、清热解毒之功效。适用于外感风热引起的头痛身痛, 恶寒发热, 喉痛咳嗽等诸症^[1]。方中金银花和连翘经传统的提取工艺提取, 因杂质含量高, 制剂服用量大。大孔吸附树脂是通过物理吸附从中药及其复方提取液中有选择性地吸附其中的

有效成分, 去除无效成分的一种提取纯化的新工艺, 可以达到分离、富集中药有效部位或有效成分的目的^[2]。为了充分保留双黄连中有效成分, 更好地发挥双黄连的药效, 则需对树脂纯化双黄连中金银花、连翘提取物的各项参数条件进行考察, 寻找出双黄连的最佳纯化工艺。本实验在双黄连中金银花、连翘提取工艺确定的基础上, 以总酚、总黄酮的含量为考察指标, 对双黄连中金银花、连翘提取物的纯化工艺进行了研究, 为开发更加高效精致的现代创新药物奠定基础。

1 仪器与药品

AE240 型电子分析天平 (瑞士 METTLER), UV-2201 SHIMADZU 型分光光度计 (日本岛津)。

[收稿日期] 20110821(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81073024); 广东省自然科学基金项目 (945102240); 河南省自然基金项目 (0411044800)

[第一作者] 李淑芳, 硕士, 药师, 从事中药质量分析与新药研究工作, Tel: 0371-66905392, E-mail: fangfanglishu@126.com

绿原酸对照品(批号 752-200108)、芦丁对照品(批号 080-9303)均购自中国药品生物制品检定所,金银花和连翘药材分别采自河南封丘金银花基地和河南洛阳龙峪湾,经河南中医学院生药学科陈随清教授鉴定分别为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾,木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实。AB-8 型树脂(天津南开大学化工厂),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备 金银花、连翘药材按处方比例混匀,10 倍药材量 80% 乙醇浸温 30 min,回流提取 2 次,每次 1 h。过滤,合并 2 次提取液,用旋转蒸发仪减压回收溶剂至无醇味,加蒸馏水稀释成一定质量浓度的样品溶液。

2.2 树脂的预处理^[3] AB-8 树脂用 95% 乙醇浸泡 24 h 后,湿法装柱,用 8 BV 95% 乙醇动态清洗,水洗至无醇后,依次用 3 BV 5% 盐酸(浸泡 6 h)、水洗至中性,3 BV 5% NaOH(浸泡 6 h),水洗至中性,酸、碱各重复洗 2 次,最后用 95% 乙醇动态清洗至乙醇洗脱液与水混合(1:3)不呈白色混浊溶液止,用水洗去乙醇后备用。

2.3 总酚的含量测定^[4-5]

2.3.1 标准曲线的绘制 精密吸取 $0.0806 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的绿原酸对照品溶液 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 mL 置于 25 mL 量瓶中,加入 50% 甲醇 5 mL,加 0.3% 十二烷基硫酸钠 2.0 mL, 0.6% 三氯化铁-0.9% 铁氰化钾(1:0.9)混合液 1.0 mL,混匀,在暗处放置 5 min,加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液至刻度,摇匀,在暗处放置 20 min,以显色剂为空白,分别于 715 nm 处测定吸光度,以绿原酸质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,并进行线性回归,得到回归方程 $A = 0.3409C + 0.0094$ ($r = 0.9996$),绿原酸在 $0.322 \sim 2.579 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与吸光度呈良好的线性关系。

2.3.2 供试品溶液制备 精密称取各洗脱部位的样品适量,加入 50% 甲醇溶液,定容,即得。

2.3.3 含量测定 取各供试品溶液按 2.3.1 中的显色方法进行含量测定。

2.4 总黄酮的含量测定^[6-7]

2.4.1 标准曲线的绘制 精密吸取 $0.218 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的芦丁对照品溶液 0, 1, 2, 4, 6, 8, 9 mL 置于 25 mL 量瓶中,加入 5% 亚硝酸钠溶液 1.0 mL,摇匀,放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 1.0 mL,摇匀,放置 6 min,再加入 4% 氢氧化钠 10.0 mL 溶液,用 50% 甲醇溶

液加至刻度,摇匀,放置 15 min 后,以显色剂为空白,分别于 515 nm 处测定吸光度,以芦丁的质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,并进行线性回归,得到回归方程 $A = 0.0113C + 0.0079$ ($r = 0.9994$),芦丁在 $8.72 \sim 78.48 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与吸光度呈良好的线性关系。

2.4.2 供试品溶液制备 精密称取各洗脱部位的样品适量,加入 50% 甲醇溶液,定容,即得。

2.4.3 含量测定 取各供试品溶液按 2.4.1 中的显色方法进行含量测定。

2.5 AB-8 树脂纯化双黄连工艺参数考察

2.5.1 样品溶液质量浓度的考察 取 2.1 项下的样品溶液 5 份适量,分别加蒸馏水稀释成 0.5, 1, 1.5, 2 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品,另外一份用于上大孔树脂柱前样品的留样。分别加至 30 mL AB-8 大孔吸附树脂柱,以相同流速进行动态吸附,0.5% 三氯化铁试剂反应指示吸附终点,静置 3 h,使样品溶液得以充分的吸附,先用蒸馏水洗至 Molish 反应呈阴性,再用 95% 乙醇洗脱,至 0.5% 三氯化铁反应呈阴性,减压浓缩洗脱液至干粉。以洗脱物中总酚、总黄酮的吸附量(按下式计算)及吸附-解析率为指标,优化样品溶液的上样浓度。结果见图 1。

该成分的饱和吸附量 = 上柱前样品该成分的总量 - 流出液样品该成分的总量。

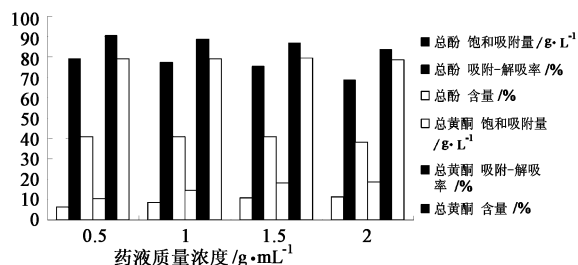


图 1 上样药液质量浓度考察

由图 1 可以看出,综合树脂的饱和吸附量、洗脱物中总酚、总黄酮的含量和吸附-解析率,1.5 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的上样药液质量浓度纯化作用较好,故选 1.5 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为样品溶液的最佳上样浓度。

2.5.2 树脂径高比的确定 取 1.5 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 原药材的样品液(3 份)分别加至径高比 1:5, 1:10, 1:15 AB-8 型大孔吸附树脂柱中,以相同流速进行吸附,用 0.5% 三氯化铁试剂反应指示吸附终点,静置 3 h,使样品溶液得以充分的吸附,先用蒸馏水洗至 Molish 反应呈阴性,再用 95% 的乙醇洗脱,至 0.5% 三氯化铁反应呈阴性,减压浓缩洗脱液至干粉。以洗脱物中总酚、总黄酮的吸附量及吸附-解析率为指

标,优化吸附柱径高比。结果见图 2。

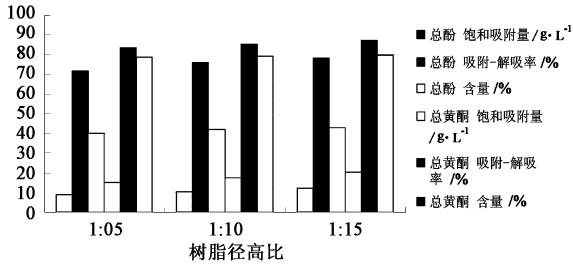


图 2 大孔树脂树脂径高比对各指标成分的吸附

综合以上总酚、总黄酮的测定结果及实际生产的可操作性,1:10 的径高比例为最佳树脂柱径高比。

2.5.3 泄漏曲线的考察 按上述所确定的吸附条件,取稀释好的样品液(1.5 g·mL⁻¹)通过 AB-8 型树脂(径高比 1:10,湿体积 90 mL),以相同流速进行动态吸附,流出液分份收集。每 2 mL 或 3 mL 收集 1 份,共收集 20 份。每份取流出液适量,按总酚、总黄酮含量测定的方法测定。以总酚和总黄酮的含量为纵坐标,累积上样体积为横坐标绘制泄漏曲线。结果见图 3。

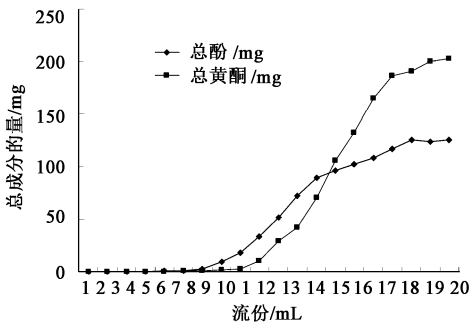


图 3 总酚、总黄酮的大孔树脂泄漏曲线

综合分析上述数据和折线图可以清楚的看到 18 mL(流份 7)时总酚开始有明显泄漏,在累积上样体积达到 40 mL(流份 18)时总酚完全泄漏,从 18 份开始总酚的泄漏含量呈持平状态,说明此时树脂柱对总酚的吸附已达到饱和,药液中的有效成分完全泄漏。总黄酮从 24 mL(流份 10)开始有明显泄漏,在累积上样体积达到 42 mL(流份 19)时总黄酮完全泄漏,从流份 19 开始总黄酮的泄漏含量呈持平状态,说明此时树脂对总黄酮的吸附已达到饱和。综上所述,树脂最大的上样量应为总酚的明显泄漏量,从而得出药物的最大上样量为 27 g。则最佳上样量与树脂体积的比例为 1:3.3。

2.5.4 水洗脱体积的确定 取 1.5 g·mL⁻¹原药材的样品液,分别通过 4 根 AB-8 树脂柱(径高比 1:

10,湿体积 30 mL),按上样量与树脂体积比 1:3.3 进行动态吸附。待吸附 3 h 后,树脂柱先分别用 1,2,3,4 倍树脂体积的蒸馏水洗脱,再用 95% 乙醇洗脱至 0.5% 三氯化铁试剂反应呈阴性。收集 95% 乙醇洗脱液,减压浓缩至干粉,称重,测定总酚的含量并计算总酚、总黄酮的吸附-解析率。见图 4。

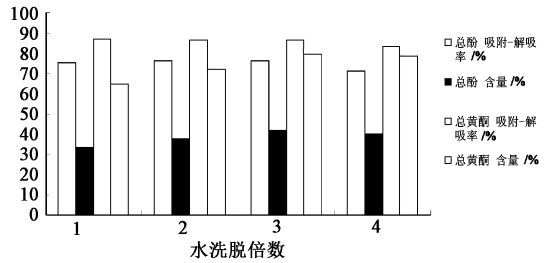


图 4 大孔树脂水洗脱体积考察

由图 4 可以看出,以 3 倍树脂体积的蒸馏水清洗树脂柱,既有利于有效的去除杂质,又能较好的保留总酚、总黄酮等有效成分。

2.5.5 洗脱剂的选择 取 1.5 g·mL⁻¹的样品液,分别通过 4 根 AB-8 树脂柱(径高比 1:10,湿体积 30 mL),按上样量与树脂体积比 1:3.3 进行动态吸附。待吸附 3 h 后,4 根树脂柱先用 3 倍树脂体积的蒸馏水洗脱,再分别用 30%,50%,70%,95% 乙醇洗脱至 0.5% 三氯化铁试剂反应呈阴性。收集乙醇洗脱液减压浓缩至干,称重,测定总酚、总黄酮的含量,并计算它们的吸附-解析率。见图 5。

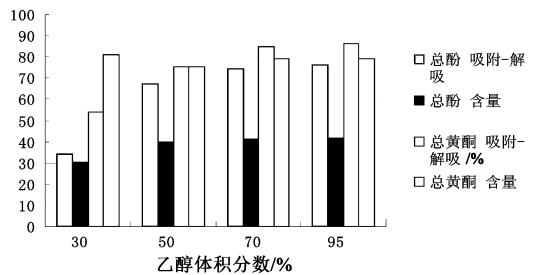


图 5 洗脱剂的选择

由图 5 可以看出,70% 和 95% 乙醇的吸附-解析率变化不大,且洗脱物中总酚、总黄酮的含量基本相似,综合分析上述因素结合生产成本考虑,选择 70% 乙醇为洗脱溶剂。

2.5.6 洗脱曲线的考察 按上述所确定的吸附条件,取质量浓度为 1.5 g·mL⁻¹的样品溶液上柱(径高比 1:10,湿体积 30 mL),按上样量与树脂体积比 1:3.3 进行动态吸附。吸附 3 h 后,3 BV 蒸馏水洗后,用 70% 乙醇洗脱,收集乙醇洗脱液,每 10 mL 收集 1 份,共收集 14 份,每份取适量测定溶液中总酚、

总黄酮的含量。以每份收集液中总酚、总黄酮的量为纵坐标,累计洗脱体积为横坐标绘制洗脱曲线。结果见图6。

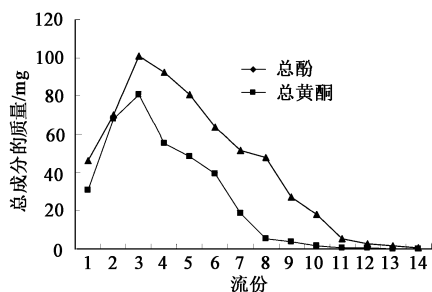


图6 大孔树脂洗脱曲线考察

由图6可以看出,当洗脱溶剂为120 mL时,可以同时总酚和总黄酮洗脱完全,即洗脱剂的用量为4倍树脂体积。

2.6 工艺验证 按照上述试验确定的条件进行验证试验,平行3份,经过AB-8大孔吸附树脂分离纯化后总酚的质量分数分别为37.94%,42.41%,38.79%,总黄酮的质量分数分别为81.75%,80.14%,77.74%,表明经大孔吸附树脂精制后有效成分得到了明显的富集。

3 讨论

文中2.1中样品溶液的制备方法来源于前期对双黄连中金银花、连翘提取工艺的研究,经水煎法正交试验与醇提法正交试验的比较得出文中的提取工艺。

随着大孔吸附树脂柱吸附-解析附次数的增加,残留在树脂上而不能被洗脱剂洗下来的杂质会增加,使大孔吸附树脂的吸附能力降低,所以,连续使用一段时间后,必须对树脂进行处理再生。

本试验总酚的含量测定的显色方法对黄酮类成分同样适用,总酚的含量测定以绿原酸为对照品,对于黄酮类成分的响应值不同,所以总酚的含量低于总黄酮的含量。

大孔吸附树脂吸附分离技术用于中草药或中药复方有效部位(群)或有效成分(群)的纯化分离,近年来得到了迅速发展,且取得显著的成果,在中药制药工业中预示着良好的发展前景。本课题组首次将该技术用于双黄连中金银花、连翘醇提物的有效部位的分离富集,取得了预期的效果,为下一步双黄连类创新药物的开发研制进行了有益的尝试和探索。

[参考文献]

- [1] 郭玉娟,刘明. 双黄连口服液不良发应临床分析[J]. 实用药物与临床,2007,10(3):177.
- [2] 吴春福. 国外复方天然药物药理研究方法思路[J]. 中药药理与临床,1995(4):39.
- [3] 陈炳华,李婷,陈婧宇,等. 大孔吸附树脂对海边月见草总黄酮的吸附及解析特性[J]. 植物资源与环境学报,2006,15(2):11.
- [4] 李文兰,范玉奇,季宇彬,等. 大孔吸附树脂对川芎中阿魏酸及总酚酸的分离纯化[J]. 中国新药杂志,2007,16(9):701.
- [5] 刘峰群,崔燕,凌海慧,等. 不同对照品对通关藤注射液总酚酸含量测定的影响[J]. 药学服务与研究,2006,6(5):383.
- [6] 游本刚,唐丽华,刘扬. 紫外分光光度法测定珍珠菜中总黄酮含量[J]. 中国野生植物资源,2007,26(1):43.
- [7] 朱笃,陈飞彪,夏剑辉,等. 金鸡菊总黄酮的提取及含量测定[J]. 食品科学,2005,26(9):314.

[责任编辑 全燕]