

# AB-8 大孔吸附树脂同时分离纯化毛冬青总黄酮、总皂苷工艺

冯素香, 苗明三\*, 苗晋鑫, 徐鹏, 邵帅, 侯朝军  
(河南中医学院, 郑州 450008)

**[摘要]** 目的: 研究大孔吸附树脂纯化毛冬青总黄酮、总皂苷的工艺条件。方法: 以总黄酮、总皂苷的吸附率和转移率为指标, 考察上样药液质量浓度、pH、树脂径高比、树脂药材比、洗脱乙醇体积分数等影响因素。结果: 毛冬青纯化工艺为上样药液质量浓度  $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 药液 pH 4.5, 药材-树脂比 1:8, 树脂径高比 1:15, 分别用 12 BV 水洗, 10 BV 30% 乙醇洗脱, 10 BV 70% 乙醇洗脱得总皂苷。结论: 采用大孔吸附树脂可较好地纯化毛冬青总黄酮与总皂苷, 纯化后毛冬青总黄酮含量、总皂苷均达 50% 以上。

**[关键词]** 大孔吸附树脂; 毛冬青; 总黄酮; 总皂苷; 纯化工艺

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0005-04

## Simultaneous Separation and Purification Technology of Total Flavonoids and Total Saponins from *Llex pubescens* by AB-8 Macroporous Resin

FENG Su-xiang, MIAO Ming-san\*, MIAO Jin-xin, XU Peng, SHAO Shuai, HOU Chao-jun  
(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To discuss purification technology conditions of total flavonoids and total saponins from *Llex pubescens* by macroporous resin. **Method:** With absorption rate and transfer rate of total flavonoids and total saponins as indexes, investigated concentration of sample liquid, pH, ratio of diameter to height of macroporous resin column, ratio of macroporous resin to crude drug, concentration of eluted ethanol and other factors. **Result:** Optimum purification conditions were as follows: concentration of sample liquid was  $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , pH of sample liquid was 4.5, ratio of crude drug to macroporous resin was 1:8, ratio of diameter to height of macroporous resin column was 1:15, total saponins were eluted by 12 BV water, 10 BV 30% ethanol and 10 BV 70% ethanol respectively. **Conclusion:** Macroporous resin could be used to purify total flavonoids and total saponins from *L. pubescens*, the content of total flavonoid and total saponins reached more than 50%.

**[Key words]** macroporous resin; *L. pubescens*; total flavonoids; total saponins; purification process

毛冬青是我国南方常用的中药材, 具有活血通脉、消肿止痛、清热解毒的功效, 在临床上广泛用于治疗冠心病、心绞痛和脉管炎等疾病<sup>[1]</sup>。目前已从

毛冬青中分离出了黄酮、皂苷、酚性成分、糖类、鞣质、氨基酸等多种化学成分<sup>[2]</sup>。大孔吸附树脂是一种广泛应用于天然产物成分提取的方法, 具有成本低、效率高、毒性低等特点, 用于黄酮类成分和皂苷类成分的富集纯化有较好的效果, 但其吸附性能及其解吸、纯化条件参数因化合物的理化性质的不同而不同<sup>[3-4]</sup>。文献报道采用大孔吸附树脂富集纯化毛冬青总皂苷的研究<sup>[5-6]</sup>, 但未见有关于毛冬青总黄酮、总皂苷同时进行分离纯化的研究。本文采用 AB-8 大孔吸附树脂方法同时纯化毛冬青总黄酮、总皂苷, 为确定毛冬青总黄酮、总皂苷的纯化工艺提供实验依据。

**[收稿日期]** 20110928(001)

**[基金项目]** “重大新药”创制科技重大专项(2009ZX09103-324)

**[第一作者]** 冯素香, 博士, 副教授, 从事中药新药及药效物质基础研究, Tel: 0371-65680562, E-mail: fengsx221@163.com

**[通讯作者]** \* 苗明三, 博士, 教授, 从事中药有效部位药效物质基础研究, Tel: 0371-65962546, E-mail: miaomingsan@163.com

## 1 材料

XS105 型分析天平(瑞士梅特勒公司),BS224S 型电子天平(北京塞多利斯仪器系统有限公司),PHS-3C 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂),UV-2450 型紫外分光光度计(岛津 Shimadzu)。

毛冬青药材购自河南省医药有限公司,经河南中医学院药学院董诚明教授鉴定为为冬青科植物毛冬青 *Llex pubescens* 的干燥根,AB-8 型大孔吸附树脂(天津市海光化工有限公司),芦丁(批号 100080-200707)、人参皂苷 Re 对照品(批号 110754-200822)均购自中国食品药品检定研究院,香草醛、高氯酸、冰醋酸、甲醇等均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 毛冬青药材的提取** 取毛冬青药材粗粉,加入 10 倍量 70% 乙醇,浸泡 0.5 h,回流提取 2 次(1.5, 1 h),合并提取液,减压回收乙醇至无醇味,得毛冬青提取液。

### 2.2 毛冬青总黄酮、总皂苷的含量测定

**2.2.1 毛冬青总黄酮含量测定方法<sup>[7]</sup>** 精密称取芦丁对照品 5.0 mg,置 50 mL 量瓶中,加 60% 甲醇 25 mL 溶解,加蒸馏水稀释至刻度,摇匀,精密量取上述对照品溶液 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加 30% 乙醇至 5 mL,精密加入 5% 亚硝酸钠 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,加 1 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液 4 mL,用 30% 乙醇稀释至刻度,摇匀,放置 15 min。以不含对照品溶液作为空白对照,采用紫外分光光度法,510 nm 处测定吸光度(A),绘制标准曲线。精密称取总黄酮 0.1 g 置 10 mL 量瓶中,加适量 40% 甲醇超声 20 min 溶解,40% 甲醇补充至刻度,摇匀,作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 0.2 mL,照标准曲线制备项下,自精密加入 5% 亚硝酸钠 0.3 mL,依法操作。以不含供试品溶液为阴性对照,依法测定 A,代入标准曲线,计算样品中总黄酮含量。

**2.2.2 总皂苷含量测定<sup>[8]</sup>** 精密称取人参皂苷 Re 对照品 2.5 mg,加甲醇使溶解并定容至 5 mL,摇匀。精密量取上述对照品溶液 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL,置 10 mL 量瓶中,挥干甲醇,加入 5% 香草醛冰乙酸溶液 0.2 mL,高氯酸 0.8 mL,混匀,置 60 °C 水浴中保温 15 min,冰水浴中 2 min,冰乙酸稀释至 10 mL,摇匀,在 600 nm 处测定 A。以对照品质量浓度(C)为横坐标,A 为纵坐标,绘制相关曲线并计算回归方程。精密称取总皂苷 0.2 g,加甲醇溶解定

容至 100 mL,摇匀,作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 0.4 mL,置于 10 mL 量瓶中,水浴挥去甲醇,照标准曲线制备项下,自精密加入新鲜配制 5% 香草醛冰乙酸溶液 0.2 mL,依法操作。以香草醛冰乙酸高氯酸为空白对照,依法测定吸收度,代入标准曲线,计算样品中总皂苷含量。

### 2.3 AB-8 树脂纯化分离工艺条件优选

**2.3.1 吸附药液质量浓度考察** 取不同质量浓度的提取药液,分别加至已处理好的 AB-8 型大孔吸附树脂柱中(100 mL 树脂,径高比 1:10),以相同流速通过树脂柱进行动态吸附,以毛冬青总黄酮、总皂苷的饱和和吸附量(上柱前成分总量 - 流出液成分总量)为指标,考察样品液的上样质量浓度。结果表明,当样品溶液质量浓度为 0.4 g·mL<sup>-1</sup> 时的饱和和吸附量较高,故选上样液质量浓度为 0.4 g·mL<sup>-1</sup> 上柱(图 1)。

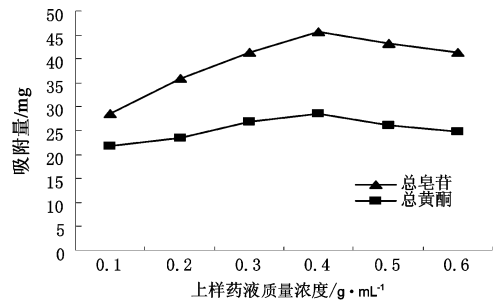


图 1 AB-8 树脂分离纯化毛冬青提取液质量浓度考察

**2.3.2 树脂径高比考察** 取 0.4 g·mL<sup>-1</sup> 毛冬青提取液,分别通过已处理好的不同径高比(1:5, 1:10, 1:15, 1:20)树脂柱中,以相同流速进行吸附,以毛冬青总黄酮、总皂苷的饱和和吸附量为指标,结果见图 2。

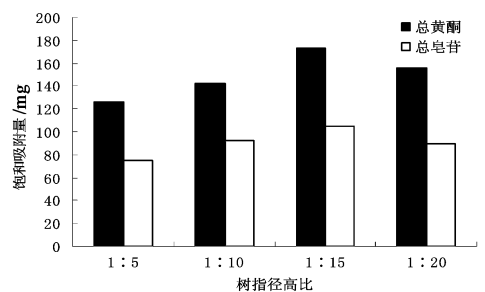


图 2 AB-8 树脂分离纯化毛冬青提取液树脂径高比考察

结果可知树脂柱径高比 1:10 和 1:15 对毛冬青总皂苷的饱和和吸附量没有明显的变化,但径高比为 1:15 时对总黄酮的饱和和吸附量高于其他径高比的饱和和吸附量,故选 1:15 的径高比。

**2.3.3 泄漏曲线考察** 按上述确定的吸附条件,

将  $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  毛冬青提取液通过 AB-8 大孔吸附树脂的吸附柱 (300 mL) 进行动态吸附,分段收集流出液。每 15 mL 收集 1 份,每份流出液蒸干,按毛冬青总黄酮含量测定的方法测定 A。以 A 为纵坐标,累计上样体积为横坐标绘制泄露曲线。结果表明,上样 110 mL 后毛冬青总黄酮开始明显泄露,至上样 120 mL,树脂达吸附饱和而完全泄露。说明药物的最大上样量为 40 g,最佳上样量与树脂体积的比例为 1:8 (图 3)。

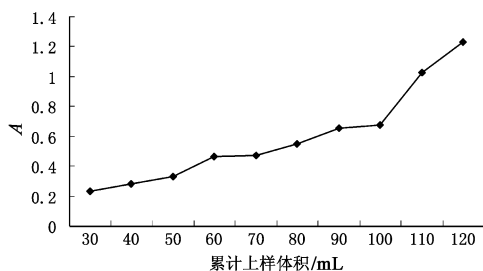


图 3 毛冬青提取液总黄酮泄露曲线

**2.3.4 洗脱乙醇体积分数的确定** 取  $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  毛冬青提取液,加至径高比 1:15 的树脂柱中,用水洗至流出液 Molish 反应阴性(用量约为 12 BV),然后分别用 10% 乙醇,20% 乙醇,30% 乙醇,40% 乙醇,50% 乙醇,60% 乙醇,70% 乙醇,80% 乙醇,95% 乙醇洗脱,洗脱液分别蒸干,称重,测定毛冬青总黄酮、总皂苷含量,计算毛冬青总黄酮、总皂苷的转移率,结果见图 4。

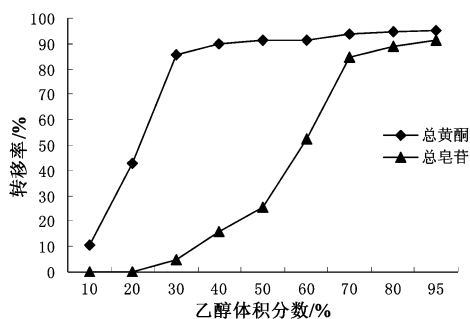


图 4 洗脱乙醇体积分数考察

从测定结果可知 30% 乙醇洗脱毛冬青总黄酮,70% 乙醇洗脱总皂苷为最优乙醇体积分数。

**2.3.5 药液 pH 考察** 取  $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  毛冬青提取液,调节 pH 分别为 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 通过 AB-8 型树脂,先用 12 BV 水洗脱,继用 30% 乙醇、70% 乙醇洗脱,洗脱液分别蒸干,称重,分别测定毛冬青总黄酮、总皂苷的含量,结果见图 5。

从测定结果可知,在 pH 4.5 左右处毛冬青总黄酮、总皂苷的质量分数最高。

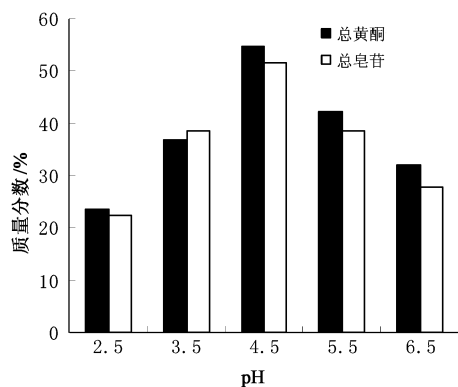


图 5 pH 对毛冬青总黄酮、总皂苷纯化效果的影响

**2.3.6 乙醇洗脱用量考察** 取  $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  毛冬青提取液,调节 pH 4.5,过树脂柱,先用 12 BV 水洗,再用不同体积的 30% 乙醇、70% 乙醇洗脱,分别收集洗脱液,将乙醇洗脱液分别蒸干,称重,测定毛冬青总黄酮、总皂苷含量,计算毛冬青总黄酮、总皂苷的转移率,结果见图 6。

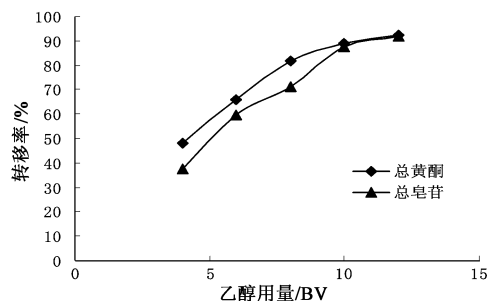


图 6 AB-8 树脂分离纯化毛冬青提取液乙醇洗脱用量考察

当乙醇用量为 10 BV 时,总黄酮、总皂苷转移率均为 90% 以上,从成本和时间上考虑,解析洗脱溶剂用量均为 10 BV。

### 3 讨论

本文通过对 AB-8 型树脂纯化分离工艺条件考察,得出 AB-8 型大孔树脂分离纯化毛冬青总黄酮、总皂苷的最佳条件为上样药液的质量浓度为  $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,药液 pH 4.5,药材-树脂 1:8,树脂径高比 1:15,分别用 12 BV 水洗,10 BV 30% 乙醇洗脱总黄酮,10 BV 70% 乙醇洗脱总皂苷。

本实验通过调节提取液的 pH,实现了毛冬青总黄酮、总皂苷的同步分离,且毛冬青总黄酮、总皂苷的得率较高,质量稳定可靠,工艺科学合理,简便易行,为同类研究提供研究思路。

### [参考文献]

- [1] 卢元媛,张玉虎,黄建昌,等. HPLC-ELSD 法测定艾可清胶囊中毛冬青皂苷甲的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):62.

# 离子交换树脂对钩藤总生物碱的纯化工艺

窦月<sup>1</sup>, 周洪雷<sup>1\*</sup>, 齐冬梅<sup>1</sup>, 李运伦<sup>2</sup>, 陈凯<sup>1</sup>

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

**[摘要]** 目的: 建立阳离子交换树脂纯化钩藤总生物碱的工艺。方法: 以钩藤总生物碱为研究指标, 考察离子交换树脂分离钩藤总生物碱的工艺条件。结果: 选择732型阳离子交换树脂, 以1 mL·min<sup>-1</sup>的流速上样, 分别用10 BV水, 6 BV 80%乙醇洗脱除杂, 最后选用1%氨性80%乙醇洗脱得到钩藤总生物碱, 含量达到50%。结论: 该方法工艺较简单, 总碱含量较高, 适合工业化生产。

**[关键词]** 离子交换树脂; 钩藤; 总生物碱; 纯化

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0008-03

## Purification Technology of Total Alkaloids from *Uncaria rhynchophylla* by Ion-Exchange Resin

DOU Yue<sup>1</sup>, ZHOU Hong-lei<sup>1\*</sup>, QI Dong-mei<sup>1</sup>, LI Yun-lun<sup>2</sup>, CHEN Kai<sup>1</sup>

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish purification technology of total alkaloids from *Uncaria rhynchophylla* with cation-exchange resin. **Method:** Total alkaloids from *U. rhynchophylla* was selected as indicator, and investigated separation technology conditions of total alkaloids from *U. rhynchophylla* by ion-exchange resin. **Result:** Seven hundred and thirty-two cation-exchange resin was chosen, flow rate of sample was 1 mL·min<sup>-1</sup> of flow rate, then eluted with 10 BV water and 6 BV 80% ethanol, finally eluted with 1% aqueous ammonia 80% ethanol, the content of total alkaloids from *U. rhynchophylla* was up to 50%. **Conclusion:** This technology was simply, the content of total alkali was high, suitable for industrial production.

**[收稿日期]** 20110514(007)

**[基金项目]** 山东省科技发展计划项目(2008GG2NS02011); 国家科技重大专项(2009ZX09301-013); 山东省自然科学基金项目(ZR2010HM017); 山东省教育厅科技计划项目(J105LL05)

**[第一作者]** 窦月, 硕士生, 从事中药化学成分及质量控制研究, Tel: 13276416287, E-mail: liaochengdy@163.com

**[通讯作者]** \*周洪雷, 教授, 博士生导师, 从事中药及天然药物有效成分及质量控制研究, Tel: 13964017341, E-mail: hongleizhou@yahoo.com.cn

[2] 姜一平, 冯锋, 谢宁, 等. 毛冬青的化学成分[J]. 药学与临床研究, 2008, 6(3): 163.

[3] 侯世祥, 田恒康. 大孔吸附树脂在中药复方分离纯化工艺中的应用[J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(3): 131.

[4] 曾永长, 梁少瑜, 邢学峰, 等. 白花蛇舌草总黄酮的大孔树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 26.

[5] 刘中秋, 蔡雄, 赖小平, 等. 大孔吸附树脂富集纯化毛冬青总皂苷工艺研究[J]. 中药新药与临床药理,

2001, 12(1): 51.

[6] 李鹏, 张宇燕, 李金辉, 等. 补阳还五汤方中红花黄芪配伍总黄酮的制备工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 10.

[7] 徐艳华, 苗明三, 徐鹏, 等. 毛冬青有效部位中总黄酮含量测定[J]. 中医学报, 2011, 26(7): 826.

[8] 徐艳华, 苗明三, 高聪聪, 等. 毛冬青有效部位中总皂苷的含量测定[J]. 中国中医药现代远程教育杂志, 2011, 9(6): 144.

[责任编辑 仝燕]