

大孔树脂纯化无花果叶总黄酮

朱欣婷¹, 刘云^{2*}

(1. 遵义医学院基础医学院, 贵州 遵义 563003;
2. 遵义医学院医学与生物学研究中心, 贵州 遵义 563003)

[摘要] 目的: 研究大孔树脂纯化无花果叶总黄酮的工艺条件。方法: 采用静态吸附法对 5 种大孔树脂进行筛选, 动态吸附法优选大孔树脂纯化无花果叶总黄酮工艺。结果: 无花果叶总黄酮的纯化工艺为上样浓度 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 上样速率 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 上样体积 3 BV, 2 BV 去离子水冲洗; 4 BV 80% 乙醇以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱, 收集洗脱液; 此工艺条件下无花果叶总黄酮的转移率为 77.6%, 样品产物中总黄酮质量分数 51.3%。结论: D140 型大孔树脂对无花果叶总黄酮具有良好的富集纯化效果。

[关键词] 无花果叶; 总黄酮; 大孔树脂; D140; 纯化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0013-04

Purification of Total Flavonoids from Leaves of *Ficus carica* by Macroporous Resin

ZHU Xin-ting¹, LIU Yun^{2*}

(1. Basic Medical College, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China;
2. Medical and Biological Research Center, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

[Abstract] **Objective:** To study on purification technology conditions of total flavonoids from leaves of *Ficus carica* by macroporous resin. **Method:** Five models of macroporous resins were selected by static adsorption, purification technology of total flavonoids from leaves of *F. carica* with macroporous resin was optimized by dynamic adsorption. **Result:** Optimum purification technology was as follows: concentration of sample $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, velocity of sample $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, volume of sample 3 BV, eluted with 2 BV deionized water and abandoned eluate, then eluted with 4BV 80% ethanol at speed of $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, eluate was collected; Yield of total flavonoids was 51.3% at this technology conditions, and recovery rate of total flavonoids was 77.6%. **Conclusion:** D140 macroporous resin could purify total flavonoids from leaves of *F. carica* effectively.

[Key words] leaves of *Ficus carica*; total flavonoids; macroporous resin; D140; purification

无花果叶含香柠檬内酯、补骨脂素、维生素 C 等生物活性物质^[1-5], 另外还含有丰富的黄酮类化合物^[6]。目前对无花果叶黄酮类化合物的研究主要集中在含量测定和提取工艺方面^[6-7], 纯化工艺

的研究未见报道。近年利用大孔树脂纯化技术对藤茶总黄酮、山蜡梅叶总黄酮、千里光总黄酮进行分离纯化, 取得良好的纯化效果^[8-10]。本文以无花果叶为研究对象, 探讨大孔树脂纯化无花果叶总黄酮的方法, 为无花果叶资源的开发利用做一些前期基础工作。

1 仪器与试剂

无花果叶采自贵州遵义, 经遵义师范学院生物系何林副教授鉴定为桑科植物无花果 *Ficus carica* Linn. 的叶, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘干, 粉碎, 过 60 目筛, 备用。

芦丁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 100080-200707), D140 型大孔树脂(晨光化工研究

[收稿日期] 20111116(006)

[基金项目] 贵州省科技厅社会发展攻关项目(黔科合 SY 字 [2011]3031)

[第一作者] 朱欣婷, 讲师, 硕士, 从事生物活性成分的分离纯化方面的研究, E-mail: xintingzhu@126.com

[通讯作者] * 刘云, 从事中草药活性成分纯化和药理活性方面的研究, Tel: 15320323412, E-mail: liuyunzy@126.com

院), D101 型大孔树脂(天津大学农药厂), D4020 型大孔树脂(上海试剂一厂), AB-8, NKA-9 型大孔树脂(南开大学化工厂), 其他化学试剂均为国产分析纯。

DU800 型紫外-可见分光光度仪(美国 Beckman 公司), R-210 型旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司), AE240 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司), GZX-9140MBE 型电热恒温鼓风干燥箱(上海博达实业有限公司医疗设备厂), VLP20 型真空冷冻干燥机(美国 Thermo 公司)。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的绘制^[7] 称取芦丁对照品 5.1 mg, 30% 乙醇溶解, 定容于 25 mL 量瓶(质量浓度为 0.204 g·L⁻¹)。分别精密吸取 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL 置于 25 mL 量瓶中, 30% 乙醇补至 12 mL, 加 5% NaNO₂ 0.7 mL 摇匀, 放置 5 min; 加 10% Al(NO₃)₃ 0.7 mL; 1 mol·L⁻¹ NaOH 5 mL, 混匀; 30% 乙醇补足体积至量瓶刻度, 放置 15 min, 波长选择 510 nm, 以 30% 乙醇为空白, 测定吸光度(A), 以芦丁的质量浓度(C)为横坐标, A 为纵坐标, 作标准曲线, 得回归方程 $C = 0.02624A + 0.0029$ ($R^2 = 0.9996$), 线性范围 4.08 ~ 20.4 mg·L⁻¹。

2.2 树脂型号筛选

2.2.1 大孔树脂的预处理^[11] 95% 乙醇浸泡 24 h, 使其充分溶胀, 95% 乙醇冲洗, 至流出液加适量水无白色浑浊; 去离子水洗脱乙醇; 5% HCl 溶液浸泡 8 h, 去离子水洗至中性; 5% NaOH 溶液浸泡 8 h, 去离子水洗至中性, 浸泡于去离子水中备用。

2.2.2 提取液的制备 称取无花果叶粉 1 kg, 加 10 倍量 95% 乙醇, 冷浸提取 2 次, 每次 12 h。合并提取液抽滤 2 次, 滤液用旋转蒸发仪减压浓缩至 1/5 体积, 测得提取液的总黄酮质量浓度为 5.42 g·L⁻¹。

2.2.3 大孔树脂静态饱和和吸附量的测定 选取 D101, D4020, NKA-9, D140, AB-8 等 5 种型号大孔树脂进行试验。量取预处理溶胀后的大孔树脂 2 mL 置于 100 mL 锥形瓶中, 加入样液 20 mL, 摇床上振荡 24 h, 过滤, 测定滤液的总黄酮质量浓度。按下式计算饱和和吸附量, 结果分别为 20.5, 17.9, 27.8, 28.4, 23.8 g·L⁻¹。

$$\text{树脂静态饱和和吸附量} = \frac{(C_0 - C_t)V_y}{V_s}$$

C_0 为样液的初始质量浓度, C_t 为吸附后样液的质量浓度, V_y 为样液体积, V_s 为树脂体积。

2.2.4 大孔树脂静态解吸率的测定 将 2.2.3 中

已达饱和和吸附的各种树脂, 分别置于 100 mL 锥形瓶中, 加入 70% 乙醇 50 mL, 在摇床上振荡解吸 24 h, 过滤, 测定滤液中的总黄酮质量浓度。按下式计算树脂的静态解吸率, 结果分别为 81.3%, 73.4%, 80.9%, 90.1%, 84.9%。

$$\text{树脂静态解吸率} = \frac{C_j V_j}{Q V_s} \times 100\%$$

式中 Q 为树脂的静态饱和和吸附量, C_j 为解吸后滤液的质量浓度, V_j 为解吸后滤液体积, V_s 为树脂体积。

由以上结果可知, D140 型大孔树脂的吸附能力和解吸能力最好, 故选择 D140 型大孔树脂进行纯化试验。

2.3 D140 型大孔树脂纯化工艺研究

2.3.1 上样液浓度的考察 D140 型大孔树脂柱 5 根, 树脂床 2.2 cm × 5 cm。将 2.2.2 中的提取液配制成 1, 2, 3, 4, 5 g·L⁻¹ 的样液各 40 mL, 2 BV·h⁻¹ 流速通过 D140 型树脂柱进行动态吸附, 收集流出液; 2 BV 去离子水洗掉树脂中未被吸附的样液, 合并两部分流出液, 测定总黄酮质量浓度, 按下式计算树脂动态吸附率。

$$\text{树脂动态吸附率} = \frac{C_0 V_y - C_e V_e}{C_0 V_y} \times 100\%$$

式中 C_0 为上样质量浓度, V_y 为上样体积, C_e 为流出液质量浓度, V_e 为流出液体积。

动态吸附率分别为 92.1%, 91.8%, 86.0%, 83.8%, 75.67%。上样质量浓度在 1, 2 g·L⁻¹ 时吸附率较高, 继续加大上样, 质量浓度吸附率明显下降, 故最适上样液质量浓度为 2 g·L⁻¹。

2.3.2 上样速率的考察 取 2.3.1 项下相同规格的树脂柱 5 根, 含总黄酮 2 g·L⁻¹ 的样液 5 份, 每份 40 mL。分别以 1, 2, 3, 4, 5 BV·h⁻¹ 的流速上样, 收集流出液; 2 BV 去离子水洗掉树脂中未被吸附的样液, 合并 2 部分流出液, 测定总黄酮质量浓度, 计算吸附率。结果分别为 92.1%, 91.4%, 85.4%, 70.4%, 61.0%。

上样速率为 1, 2 BV·h⁻¹ 时, 无花果叶总黄酮的吸附率均在 90% 以上, 继续增大上样速率吸附率明显下降, 故选用 2 BV·h⁻¹ 为上样速率。

2.3.3 泄露曲线的考察 取含总黄酮 2 g·L⁻¹ 的样液若干, 以 2 BV·h⁻¹ 流速上样, 每 5 mL 为一个收集段, 检测每段流出液的总黄酮质量浓度, 并计算树脂的累计吸附量(Q_e)。见图 1。

$$\text{树脂柱的吸附量} = C_0 V_i - \sum_{i=1}^n C_i V_m$$

式中 C_0 为上样质量浓度, V_i 为上样总体积, V_m 为单个收集段的体积, C_i 为每一个收集段的质量浓度。

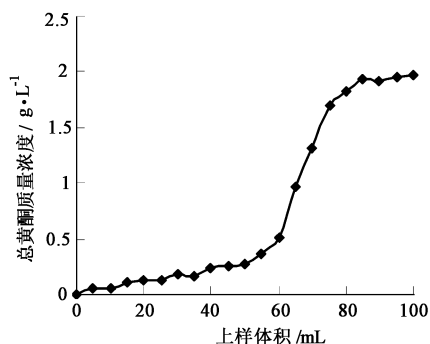


图1 无花果叶总黄酮泄漏曲线

如图1的泄漏曲线所示,上样体积在60 mL(3 BV)以内泄漏较少,当上样体积达85 mL(4.25 BV)时,泄漏液的质量浓度开始接近上样液质量浓度,此时柱子基本达到动态饱和吸附。故选择3 BV(60 mL)作为上样体积,此时树脂柱的累计吸附量为 $108 \text{ mg} \cdot \text{BV}^{-1}$ 。

2.3.4 乙醇体积分数对洗脱率的影响 准备7份 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样液60 mL, $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上样,充分吸附;2 BV去离子水冲洗;5 BV 30%乙醇,40%乙醇,50%乙醇,60%乙醇,70%乙醇,80%乙醇,90%乙醇以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱,检测洗脱液的总黄酮质量浓度,并计算洗脱率。

$$\text{洗脱率} = \frac{C_x V_x}{Q_e} \times 100\%$$

式中 Q_e 为树脂柱的吸附量, C_x 为洗脱液的质量浓度, V_x 为洗脱液的体积。

结果分别为35.1%, 38.0%, 48.7%, 62.3%, 70.8%, 85.1%, 80.4%。乙醇体积分数为30%~70%时,洗脱率较低,体积分数为80%时洗脱率达85%以上,继续提高乙醇体积分数洗脱率反而有所下降,因此确定乙醇体积分数为80%为最佳。

2.3.5 洗脱流速的考察 准备4份 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 样液60 mL, $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样,充分吸附;2 BV去离子水冲洗;5 BV 80%乙醇分别以1, 2, 3, 4 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度洗脱,检测洗脱液的总黄酮质量浓度,计算洗脱率。结果分别为88.1%, 86.5%, 80.4%, 70.4%, 以1, 2 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速洗脱时,总黄酮的洗脱率较高,3 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 时洗脱率明显下降。因此选择2 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 为乙醇的最适洗脱流速。

2.3.6 洗脱剂用量的考察 取 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样液60 mL, $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上样,充分吸附后,用2 BV去离

子水冲洗,洗脱液弃去;80%乙醇 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱,直至洗脱液无色,每20 mL(1 BV)为一个收集单位,分段收集流出液,并检测各段流出液的总黄酮质量浓度。结果总黄酮质量浓度分别为2.61%, 1.18%, 0.70%, 0.21%, 0.09%, 0.03%。乙醇用量为1 BV时,流出液的总黄酮质量浓度较高,随着洗脱剂用量的加大,流出液的总黄酮质量浓度逐渐降低,4 BV后流出液中所含的总黄酮已经很少,说明此时柱上所吸附的黄酮类物质基本上已经被洗脱下来,故洗脱剂乙醇的用量选4 BV为佳。

2.3.7 工艺验证试验 根据上述纯化试验优化后的参数进行工艺验证试验。取5份 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样液60 mL, $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上样,充分吸附后,用2 BV去离子水冲洗,洗脱液弃去;4 BV 80%乙醇以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱,收集洗脱液并检测其总黄酮质量浓度,计算总黄酮转移率分别为79.4%, 80.6%, 76.1%, 75.8%, 76.2%。将洗脱液旋转蒸发,真空冷冻干燥,计算产物中总黄酮质量分数分别为53.7%, 50.2%, 49.1%, 52.3%, 51.0%。由结果可知,此纯化工艺总黄酮得率高,重复性好。总黄酮转移率稳定在77.6%左右,产物中总黄酮的质量分数也达到了51.3%,纯化效果明显,可用于无花果叶总黄酮的纯化。

3 讨论

本试验通过对几种常用的大孔吸附树脂吸附、洗脱能力的比较,筛选出D140型大孔树脂用于无花果叶总黄酮纯化,取得了较好的效果。优选工艺条件下无花果叶总黄酮的转移率为77.6%,样品产物中总黄酮质量分数51.3%。

D140型大孔树脂是一种非极性的大孔树脂,对黄酮类物质的吸附具有良好的选择性,已成功运用于银杏黄酮的工业化生产^[12]。本试验结果进一步拓宽的D140型大孔树脂的使用范围,同时为无花果叶资源的开发利用做出了一些前期基础工作。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草. 维吾尔药卷[M]. 上海: 上海科技出版社, 2005: 89.
- [2] 孟正本, 王先, 纪江, 等. 无花果叶化学成分研究[J]. 中国药科大学学报, 1996, 27(4): 202.
- [3] 田景奎, 王爱武, 吴丽敏, 等. 无花果叶挥发油化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(6): 474.
- [4] 赵萍, 周海梅, 吴石骥. 无花果叶化学成分的研究—无花果叶挥发油的研究[J]. 中草药, 2004, 35(12): 1341.

D101 型大孔树脂纯化附子生物碱

彭拓华^{1*}, 张少俊¹, 钟世顺¹, 杨毅达², 杨彤¹

(1. 广东省生物制品与药物研究所, 广州 510440; 2. 广东药学院, 广州 510123)

[摘要] 目的:研究附子生物碱经 D101 型大孔树脂富集后化学成分的变化。方法:以附子中总生物碱、酯型生物碱、乌头碱、次乌头碱及新乌头碱的转移率为指标,采用 UV, HPLC, TLC 分别对富集前后附子提取物中的生物碱进行含量测定及其成分鉴别。结果:采用 D101 型大孔树脂富集附子生物碱,总生物碱转移率 83.70%, 纯度 67.34%; 乌头碱转移率 77.78%, 次乌头碱转移率 94.12%, 新乌头碱转移率 52.63%; TLC 比较发现显示 6 个相似的生物斑点,说明富集前后生物碱化学成分无明显差异。结论:D101 型大孔树脂能有效提高附子中总生物碱的纯度,且各生物碱转移率较高,可用于大生产推广。

[关键词] 附子; 总生物碱; 总酯型生物碱; 乌头碱; 次乌头碱; 新乌头碱

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0016-05

Enrichment and Purification of Alkaloids from *Aconitum carmichaelii* with D101 Macroporous Resin

PENG Tuo-hua^{1*}, ZHANG Shao-jun¹, ZHONG Shi-shun¹, YANG Yi-da², YANG Tong¹

(1. Guangdong Provincial Institute of Biological Products and Materia Medica, Guangzhou 510440, China;
2. Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510123, China)

[Abstract] **Objective:** To research chemical composition change after enrichment and purification of alkaloids from *Aconitum carmichaelii* with D101 macroporous resin. **Method:** Taking transfer rate of total alkaloids, diester diterpenoid alkaloids, aconitine, hypaconitine and mesaconitine as indexes, before and after purification, the content of alkaloids from extracts of *A. carmichaelii* was determined by UV and HPLC, ingredients of alkaloids differentiated by TLC. **Result:** Alkaloids from *A. carmichaelii* was enriched by D101 macroporous resin, transfer rate and purity of total alkaloids were 83.70%, 67.34%, respectively; Transfer rate of aconitine, hypaconitine and mesaconitine were 77.78%, 94.12%, 52.63%; It showed 6 similar biological

[收稿日期] 20111010(004)

[基金项目] 广州市科技攻关重点项目(2005Z2-E5071)

[通讯作者] * 彭拓华, 副主任中药师, 学士, 从事中药新药及中药作用机制研究, Tel:020-86087837, E-mail:pth_yw@126.com

- [5] 苏卫国, 董艳, 童应凯. 无花果枝、叶、果实生理活性物质的测定[J]. 天津农学院学报, 2001, 8(1): 24.
- [6] 杨润亚, 明永飞, 王慧. 无花果叶中总黄酮的提取及其抗氧化活性测定[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 78.
- [7] 彭珊珊, 肖峰. 无花果叶、番石榴叶中黄酮类化合物的提取与测定[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 300.
- [8] 易海燕, 何桂霞, 欧阳文, 等. 大孔树脂分离纯化藤茶总黄酮的研究[J]. 中草药, 2011, 42(1): 74.
- [9] 张亚梅, 张小娟, 简晖, 等. 大孔吸附树脂纯化山蜡梅叶中总黄酮的研究[J]. 中草药, 2009, 40(2): 1226.
- [10] 郁建生, 杨冰. 千里光总黄酮的分离纯化研究[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1911.
- [11] 洪雪娥, 高荫榆, 罗丽萍, 等. 大孔树脂对薯蓣黄酮吸附分离特性研究[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 423.
- [12] 何琦, 及元乔, 丁立生, 等. D140 大孔吸附树脂银杏黄酮提取纯化性能研究[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 56.

[责任编辑 全燕]