

贯叶连翘总黄酮的纯化工工艺研究

王刚^{*}, 马忠仙, 谭莉莉

(遵义医学院 药物化学教研室, 贵州 遵义 563003)

[摘要] 目的: 研究大孔吸附树脂富集贯叶连翘总黄酮的工艺条件及参数。方法: 以静态饱和吸附量、静态解吸率为考察指标, 比较了 6 种大孔树脂纯化贯叶连翘总黄酮的工艺。又以总黄酮含量为指标, 对最佳树脂吸附工艺条件进行了筛选。结果: HPD-600 树脂吸附和解吸效果最佳, 上样液的质量浓度 $3.81 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 吸附流速 $1 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 洗脱剂 70% 乙醇, 洗脱流速 $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 洗脱剂用量 3 BV。

[关键词] 贯叶连翘; 总黄酮; 大孔吸附树脂

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0011-04

Study on Purification Process of Total Flavonoids from *Hypericum Perforatum*

WANG Gang^{*}, MANG Zhong-xian, TAN Li-li

(Department of Medicinal Chemistry, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

[Abstract] To investigate the technological parameters of the enrichment process of total flavones from *Hypericum perforatum* with macroreticular resins. The static capacity absorption and the static rate of desorption of six types macroreticular resins were studied and compared respectively in order to find the optimum macroreticular resin. The technical process for purification of total flavones with the optimum macroreticular resin was screened by total flavones product. The results indicated that the absorption capacity and elution ratio of HPD-600 type of macroporous resin were the best in these types of macroporous resin. The optimum extraction condition was the concentration and the flow velocity of the original solution were $3.81 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $1 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$. The eluant was 70% ethanol and the eluting velocity was $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, The consumption of eluant was 3 BV.

[Key words] *Hypericum perforatum*, total flavones; macroreticular resin

贯叶连翘在我国民间已有 2 000 多年的药用历史^[1], 现代药理研究表明其具有抗抑郁、抗病毒、抗肿瘤、抗脑缺血等作用^[2]。贯叶连翘含有多种具有生物活性的化学成分, 主要含有苯并二萜酮类化合物、间苯三酚类化合物和黄酮类化合物^[3]。其中黄酮类化合物是其主要有效成分之一, 对心肌缺血和脑缺血具明显的预防和治疗作用^[4]。本研究应用大孔树脂分离纯化贯叶连翘总黄酮, 得到的优化工艺简单可行。

1 仪器与试药

TU-1901 型双波长紫外-可见分光光度计(北京普析仪器有限公司)。

贯叶连翘药材(于 2008 年 7 月采购自贵州安顺地区, 并经本校药学系杨建文教授鉴定为藤黄科金丝桃属多年生草本植物贯叶连翘); HPD-100, HDP-450、HDP-600 型大孔吸附树脂(沧州宝恩化工有限公司), NKA-9, AB-8, D-101 型大孔吸附树脂(南开大学化工厂); 芦丁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 100081-200306, 纯度 > 98%); 化学试剂均为分析纯, 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取在 120 干

[收稿日期] 2009-12-21

[通讯作者] * 王刚, Tel: 0852-8609461, E-mail: w98855350@163.com

燥至恒重的芦丁对照品 12.37 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加 30% 乙醇适量, 超声处理使其溶解, 放冷、加 30% 乙醇定容, 摇匀, 即得(每 1 mL 中含无水芦丁 0.247 mg)。

2.1.2 标准曲线制备 精密量取对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 各加 30% 乙醇至 6 mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL, 摇匀放置 6 min, 加 10% 硝酸铝溶液 1 mL, 摇匀、放置 6 min, 加氢氧化钠试液 10 mL, 加 30% 乙醇定容摇匀、放置 15 min, 以相应试剂为空白, 进行全波长扫描。结果表明, 芦丁对照品的最大吸收波长为 531 nm, 故选此波长为检测波长。以对照品溶液浓度 (C) 与吸光度 (A) 进行线性回归, 得到回归方程 $A_{531} = 11.206 C + 1.867 \times 10^{-3}$ ($r = 0.99912$), 对照品芦丁的浓度在 $9.88 \sim 59.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好^[5]。

2.1.3 样品液总黄酮含量测定 精密量取上柱液 0.1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 30% 乙醇定容, 摇匀, 自 2.1 项下“加水至 6 mL”起依法操作, 测定其在 531 nm 处 A , 由回归方程可计算出总黄酮含量。

2.2 大孔树脂的筛选

2.2.1 树脂的预处理 大孔树脂用 95% 乙醇浸泡 24 h 充分溶胀后, 湿法装柱, 用 95% 乙醇洗至流出液与水混合(1:5) 不呈白色浑浊为止, 然后以大量去离子水洗尽乙醇, 用水浸泡备用。

2.2.2 上柱液的制备 称取贯叶连翘药材粗粉 2 kg, 用 10 倍量 90% 乙醇, 提取 2 次, 每次 1 h, 合并提取液, 减压浓缩至原药材浓度为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 高速离心 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min, 取上清液备用, 测得总黄酮质量浓度为 $7.76 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.3 大孔吸附树脂静态吸附和解吸试验考察

静态吸附: 分别精密称取不同型号的树脂 1 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入上柱液 10 mL, 将各锥形瓶置旋转摇床上振荡 24 h(吸附后溶液中总黄酮质量浓度不再减少), 转速为 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 充分吸附后抽滤, 测定滤液中总黄酮浓度, 计算各种树脂的吸附容量 (Q)。 $Q = (C_0 - C_r) \times V / W$, 其中: Q 为吸附量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), C_0 为吸附前总黄酮浓度 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), C_r 为吸附后总黄酮浓度 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), V 为上柱液体积 (mL), W 为树脂质量 (g)。
静态解吸: 将上述静态吸附后的树脂抽滤, 于锥形瓶中加 70% 乙醇 20 mL, 将锥形瓶置于旋转摇床上振荡 24 h, 转速为 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 充分解吸后滤过, 测定滤液中总黄酮浓度, 计

算各种树脂的解吸率, 结果见表 1。

解吸率 = (解吸液浓度 \times 解吸液体积) / 吸附量 \times 100%。

表 1 不同型号树脂对贯叶连翘总黄酮的静态吸附量和解吸率(20 , $n=3$)

树脂型号	极性	总黄酮吸附容量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	解吸率/%
NKA-9	极性	61.09	81.66
HPD-600	极性	70.56	88.19
AB-8	弱极性	58.43	78.40
HPD-450	弱极性	65.06	69.99
D-101	非极性	61.13	66.86
HPD-100	非极性	65.82	82.65

从表 1 可以看出, 6 种大孔吸附树脂中 HPD-600 在静态吸附解吸试验中具有较好的吸附能力和解吸能力, 所以选择 HPD-600 型大孔树脂对贯叶连翘总黄酮进行纯化。

2.3 HPD-600 大孔树脂纯化工艺研究

2.3.1 上样吸附参数的选择 泄漏曲线的考察: 取处理好的 HPD-600 型树脂 5 g(干重), 湿法装入 $1.5 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$ 的色谱柱中, 不断加入上柱液(总黄酮质量浓度 $7.76 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 以 $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速进行动态吸附, 收集流出液, 每 5 mL 为 1 份, 于 531 nm 处测吸光度, 计算总黄酮含量, 绘制泄漏曲线, 结果见图 1。

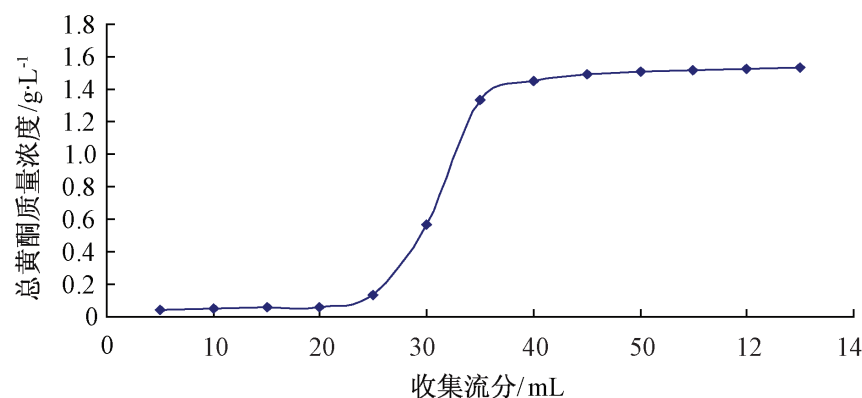


图 1 总黄酮 HPD-600 树脂泄漏曲线 ($n=3$)

可见, 从第 5 流分开始, 泄露液总黄酮量出现少量泄漏, 随着流分数的增加至第 8 流分时, 总黄酮含量明显增多, 说明 HPD-600 树脂对总黄酮的吸附量达到饱和。考虑到生产工艺中要避免造成总黄酮的泄漏, 拟定上样量为 1.08 (大孔树脂/生药, $\text{g} \cdot \text{g}$)。

最佳上样浓度: 取上柱液(总黄酮浓度 $7.76 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 10 mL, 共 5 份, 其中 4 份分别稀释至 $0.28, 0.69, 1.44, 3.81 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速通过 HPD-600 树脂柱进行动态吸附, 树脂床体积约为 20 mL。然后用等量去离子水清洗树脂中未被吸附的成分,

一并收集流出液。测定并计算流出液的浓度, 计算总黄酮吸附率 (A)。 $A = (C_0 - C_r) / C_0 \times 100\%$, 结果见表 2。

表 2 上样浓度对黄酮吸附率的影响 ($n=3$)

样品质量浓度 / $g \cdot L^{-1}$	流出液质量浓度 / $g \cdot L^{-1}$	吸附率 / %
7.76	7.09	91.46
3.81	3.53	92.82
1.44	1.29	90.23
0.69	0.60	87.37
0.28	0.24	86.49

由表 2 可以看出, 样液浓度为 $3.81 g \cdot L^{-1}$ 时吸附率较高, 可达到 92.82%, 黄酮液浓度过大或过小都影响吸附效果, 所以样液浓度以 $3.81 g \cdot L^{-1}$ 上柱为好。最佳吸附流速: 取处理好的 HPD-600 型树脂 8 g (干重), 湿法装入 $1.5 cm \times 50 cm$ 的色谱柱中, 树脂床体积约为 20 mL, 再取上柱药液 (总黄酮浓度 $3.81 g \cdot L^{-1}$) 6 mL 上树脂柱, 分别以 1, 2, 3, 4, 5 $BV \cdot h^{-1}$ 的流速进行吸附后, 以 5 BV 水洗脱至无色, 再用 70% 乙醇以 2 $BV \cdot h^{-1}$ 的速度洗脱, 收集洗脱液至 250 mL, 于 531 nm 处测定吸光度, 测定总黄酮含量, 计算转移率, 转移率 = 解吸率 \times 吸附率 \times 100%, 结果见表 3。

表 3 吸附流速考察 ($n=3$)

吸附速率 / $BV \cdot h^{-1}$	总黄酮 / mg	转移率 / %
1	19.48	81.57
2	16.71	68.47
3	15.87	62.72
4	18.56	69.38
5	17.96	62.31

从表 3 可知, 吸附流速越慢, 贯叶连翘溶液中黄酮越能和树脂充分接触, 从而能更好地吸附在树脂上, 因此选择吸附率为 1 $BV \cdot h^{-1}$ 较适当。

2.3.2 树脂解吸参数的考察 洗脱液乙醇浓度: 取 HPD-600 大孔树脂 8 g (干重), 经处理后, 湿法装柱 ($1.5 cm \times 50 cm$) 树脂床体积约为 20 mL。再取上柱药液 (总黄酮浓度 $3.81 g \cdot L^{-1}$) 6 mL 上树脂柱, 以 1 $BV \cdot h^{-1}$ 的流速进行吸附, 再以 5BV 水洗脱后, 分别用 30%, 50%, 70%, 95% 乙醇洗脱, 收集不同浓度乙醇洗脱液, 定容至 250 mL, 于 531 nm 处测定吸光度, 测定总黄酮含量, 计算转移率。结果见表 4。

表 4 乙醇浓度考察 ($n=3$)

洗脱剂 / %	总黄酮 / mg	转移率 / %
30	7.47	32.68
50	15.88	69.49
70	18.63	81.48
95	19.75	86.42

由结果可知, 用 70%, 95% 的乙醇洗脱, 转移率较高, 从成本上考虑, 选 70% 乙醇作为洗脱剂。最佳洗脱流速: 取处理好的 HPD-600 型树脂 8g (干重), 湿法装入 $1.5 cm \times 50 cm$ 的色谱柱中, 树脂床体积约为 20 mL, 再取上柱药液 (总黄酮浓度 $3.81 g \cdot L^{-1}$) 6 mL 上树脂柱, 以 1 $BV \cdot h^{-1}$ 的流速进行吸附后, 以 5 BV 水洗脱至无色, 用 70% 乙醇洗脱, 流速分别为 1, 2, 3, 4, 5 $BV \cdot h^{-1}$, 收集洗脱液至 250 mL, 于 531 nm 处测定吸光度, 计算总黄酮含量。结果见表 5。

表 5 洗脱速率考察 ($n=3$)

流速 / $BV \cdot h^{-1}$	总黄酮 / mg	转移率 / %
1	16.77	73.36
2	17.79	77.83
3	19.31	84.46
4	18.43	80.63
5	17.93	78.42

由表 5 可以看出, 在 1 ~3 $BV \cdot h^{-1}$, 洗脱率随洗脱速率的增加逐渐增大, 当洗脱速率继续增加时, 洗脱率开始降低, 这可能是由于在洗脱体积一定的情况下, 如果速率太大, 洗脱剂还没有来得及和黄酮充分接触就已经通过了树脂柱。因此选择洗脱速率 3 $BV \cdot h^{-1}$ 为宜。洗脱剂用量: 取处理好的 HPD-600 型树脂 8 g (干重), 湿法装入 $1.5 cm \times 50 cm$ 的色谱柱中 (1 BV 约 20 mL), 缓慢加入上柱溶液 6 mL (总黄酮浓度 $3.81 g \cdot L^{-1}$), 以 1 $BV \cdot h^{-1}$ 的流速进行吸附后, 用 5 BV 蒸馏水洗脱至无色, 再用 70% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 每 10 mL 为 1 份, 共收集 10 份, 于 531 nm 处测定吸光度。计算总黄酮的含量。见图 2。

从图 2 可以看出, 当洗脱剂用量达到 70 mL (3.5 BV 左右) 时, 洗脱液中黄酮含量已经接近零, 可认为树脂上的黄酮已基本洗脱完全, 可以停止洗脱。

2.4 验证实验 按上述实验得出的优选纯化工工艺条件进行 3 次验证实验, 结果重复性较好, 方法简

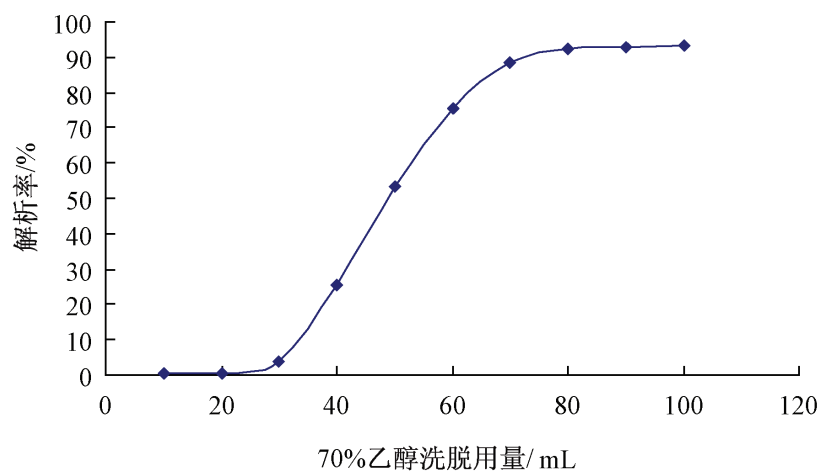


图 2 总黄酮洗脱曲线 (n=3)

便可行,可以用于贯叶连翘总黄酮的纯化。结果见表 6。

表 6 纯化工艺验证试验结果

No	投料量 /g	总黄酮量 /mg	提取物中总黄酮质量分数 /%	总黄酮转移率 /%
1	10	837.33	69.03	83.21
2	10	841.29	70.54	84.33
3	10	865.68	68.86	83.95

3 讨论

通过测定分析 6 种大孔树脂对贯叶连翘总黄酮的吸附特性,确定 HPD-600 树脂为最佳吸附剂。优化 HPD-600 树脂分离贯叶连翘总黄酮的最佳工艺

为:贯叶连翘黄酮上样液的质量浓度为 $3.81 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,吸附流速为 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,洗脱剂为 70%乙醇,洗脱流速为 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,洗脱剂用量为 3 BV。

大孔吸附树脂具有机械强度高、选择性好、吸附量高、解析容易、耐污染强等特点。本实验证明大孔吸附树脂纯化贯叶连翘总黄酮的方法是可行的,为贯叶连翘总黄酮在医药及食品方面的进一步提供帮助。

[参考文献]

- [1] 吴立宏,胡海燕,黄世亮,等.连翘与贯叶连翘的本草考证[J].中国中药杂志,2002,27(8):612.
- [2] 吴敏,王霞,许平.贯叶连翘的研究进展[J].中成药,2004,26(9):760.
- [3] 吴晶晶,何宇新,李玲,等.贯叶连翘的研究进展[J].时珍国医国药,2009,20(2):404.
- [4] 李艳,曹学丽,付鹏,等.贯叶连翘的化学成分及其提取方法研究进展[J].北京工商大学学报,2007,25(6):6.
- [5] 花蕾,张文清,夏玮.桑叶总黄酮的大孔树脂纯化工艺[J].中成药,2007,29(12):1759.

[责任编辑 仝燕]

(上接第 10 页)

表 6 优化工艺验证试验结果

No.	色度	水分 /%	柚皮苷含量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	橙皮苷含量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	新橙皮苷含量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
1	8.815	6.308	46.36	2.918	34.35
2	10.66	5.988	43.39	2.539	30.77
3	9.901	6.133	46.28	2.668	33.19
4	11.98	6.494	44.07	2.381	31.32
5	10.66	5.988	43.95	2.540	31.57
6	9.901	6.143	44.69	2.621	32.11
7	11.98	6.494	44.53	2.639	31.35
8	8.815	6.308	43.99	2.840	32.78
9	10.66	5.988	45.17	2.680	32.08
10	9.901	6.143	43.98	2.567	31.41
平均	10.33	6.199	44.64	2.639	32.09
RSD/%	10.66	3.14	2.26	5.82	3.35

相关分析可以看出,色度差与柚皮苷含量和新橙皮苷含量之间存在显著的负相关,饮片色度差越小,即饮片色泽越接近标准饮片的色泽,柚皮苷和新橙皮苷的含量就越高,由此可以说明传统樟帮炮制工艺中以枳壳的色泽来控制饮片的质量具有一定的科学性,本实验结果为进一步探讨枳壳蜜麸制后的炮制作用,制定蜜麸炒樟帮枳壳饮片质量标准提供了一定的参考依据。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部.北京:化学工业出版社,2010:171.
- [2] 龚千锋.中药炮制学[M].北京:中国中医药出版社,2003:135.
- [3] 王发英,徐欢,杨武亮,等.枳壳质量标准研究[J].中成药,2009,31(12):1897.

[责任编辑 仝燕]