

蜘蛛香总黄酮大孔树脂纯化工艺

肖婷, 闫智勇*, 左长英, 潘玲珍, 张占平
(西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031)

[摘要] 目的: 研究蜘蛛香总黄酮的大孔树脂纯化工艺条件。方法: 采用静态吸附-解吸方法, 以吸附量和解吸率为指标, 筛选最佳树脂; 以总黄酮收率为指标, 考察最佳树脂纯化蜘蛛香总黄酮的工艺参数。结果: 5 种树脂中, HPD600 大孔树脂对蜘蛛香总黄酮纯化效果较好, 其总黄酮的静态饱和吸附容量为 $131.11 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 干树脂, 解吸率为 91.69%; 最佳动态吸附、洗脱条件为蜘蛛香总黄酮提取液质量浓度 $3.42 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 吸附流速 $2.4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 上样量 $25.64 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 干树脂; 吸附后的树脂柱先以 3 BV 水洗脱, 再用 4 BV 80% 乙醇以 $2.4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱, 总黄酮质量分数为 41.20%, 收率为 80.36%。结论: HPD600 大孔树脂在所确定的工艺条件下, 可较好的分离纯化蜘蛛香总黄酮。

[关键词] 蜘蛛香; 总黄酮; 大孔树脂; 纯化

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0036-04

Purification of Total Flavones from *Valeriana jatamansi* by Macroporous Resins

XIAO Ting, YAN Zhi-yong*, ZUO Chang-ying, PAN Ling-zhen, ZHANG Zhan-ping
(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

[Abstract] Objective: To study the optimal technologies for the purification of total flavones from *Valeriana jatamansi* with macroporous resin. **Method:** Taking the static elution ratio and absorption ratio as indexes, the static absorption-desorption was used and compared in order to find the optimum macroporous resin. The technical process for purification of total flavones with the optimum macroporous resin was screened by yield of total flavones as index. **Result:** The HPD600 macroporous resin among five types of resins was found with the best separating efficiency, by which static absorption capacity and desorption ratio could reach $131.11 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ and 91.69%, respectively. The best result of dynamic absorption was based on the followings: sample concentration $3.42 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, feed rate $2.4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, sample capacity $25.64 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, elution flow rate $2.4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$. After eluted with 3BV of distilled water and 4 BV of 80% ethanol, the yield of total flavones was 80.36% and the purity was 41.20%. **Conclusion:** With definite technical process, the HPD600 macroporous resin could be used to purify the total flavonoids of *V. jatamansi*.

[Key words] *Valeriana jatamansi*; total flavonoids; macroporous resins; purification

蜘蛛香系败酱科 (Valerianaceae) 缬草属 *Valeriana* Linn. 植物蜘蛛香 *V. jatamansi* Jones 的根

[收稿日期] 20100711(001)

[基金项目] “重大新药创制”国家科技重大专项“十一五”计划(2009ZX09103-370); 中央高校基本科研业务费专项资金(WJTU09CX063, SWJTU09ZT29); 成都市“十一五”重大科技专项(09GGZD060SF-012); 四川省中医药管理局科研课题(200674)

[第一作者] 肖婷, 硕士, 研究方向: 中药药理学, Tel: 15828205195, E-mail: xttiffany@163.com

[通讯作者] * 闫智勇, 博士, 副教授, 研究方向: 中药药理学, Tel: 028-66367214, E-mail: yzhiy@swjtu.cn

茎,始载于《本草纲目》,现代发现其有镇静催眠、抗焦虑、抗肿瘤等药理作用^[1-3]。研究表明,蜘蛛香含有环烯醚萜、挥发油、生物碱和黄酮等类成分,其中橙皮苷、蒙花苷、6-甲基芹菜素^[4-6]等黄酮类化合物为其主要有效成分之一,目前国内尚未见应用大孔树脂纯化蜘蛛香总黄酮的文献报道,本文拟对蜘蛛香总黄酮大孔树脂纯化方法进行初步研究,以期为其开发利用提供参考。

1 仪器与试药

TU-1901 可见-紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);BS 224S 精密电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);橙皮苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110721-200613);D-101, AB-8, HPD600, HPD450, HPD500 大孔树脂(河北沧州宝恩化工有限责任公司);蜘蛛香(购于成都市药材市场);水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定 参考李蓉等^[7]的研究,以橙皮苷为对照品测定蜘蛛香总黄酮含量,于 284 nm 处测吸光度(A),回归方程为 $A = 38.2C + 0.0018$ ($r = 0.9999$),线性范围 $0.005 \sim 0.025 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。经方法学考察,稳定性、精密度、重复性等均符合规定,平均加样回收率为 104.23% ($n=6$),RSD 1.36%。

2.2 样品制备 将蜘蛛香药材粉碎,石油醚(60~90)回流脱脂后,再用料液比为 1:20 的 65% 乙醇,浸泡 12 h,超声提取 3 次,每次 20 min,抽滤,合并滤液,减压回收乙醇至无醇味,再加适量水稀释,抽滤,滤液定容至 1 000 mL 即得样品液,测得总黄酮质量浓度为 $17.09 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (C_0)。

2.3 树脂筛选

2.3.1 树脂预处理及含水量测定 用 95% 乙醇浸泡并充分溶胀树脂,然后将树脂置于玻璃色谱柱(40 mm × 500 mm)中用无水乙醇淋洗,检测流出液,直至淋洗后流出液与水混合(1:5)后不再出现白色混浊,用大量水洗去乙醇至无醇味,然后分别用体积分数为 5% 的 HCl 溶液、2% 的 NaOH 溶液淋洗树脂,再用水洗至中性,抽滤,密封存放,待用。取少量经过预处理的树脂于 100 干燥至恒重,计算出每克处理后的树脂相当于干树脂的质量。

2.3.2 大孔树脂静态筛选 准确称取经预处理的树脂适量(折算为 $M \text{ g}$ 干树脂),置于 100 mL 三角瓶中,加入上述制备液 10 mL (V_0),室温下每 10 min 振

摇 10 次,持续 1 h,避光密封,静置 24 h,滤过,定容到一定体积 (V_1),测定滤液中的总黄酮浓度 (C_1)。将滤出的树脂另置于 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 100 mL 65% 乙醇,每隔 10 min 振摇 10 下,持续 1 h,遮光密封,静置 24 h,滤过,定容到一定体积 (V_2),测定解吸液中的总黄酮浓度 (C_2)。按下式分别计算静态吸附量和解吸率:

$$\text{静态吸附量} = (C_0 V_0 - C_1 V_1) / M$$

$$\text{解吸率} = C_2 V_2 / (C_0 V_0 - C_1 V_1) \times 100\%$$

结果见表 1。在相同条件下,HPD600 大孔树脂对蜘蛛香总黄酮有着较高的吸附量和解吸率,故选择 HPD600 大孔树脂做后续试验。

表 1 大孔树脂筛选结果

树脂类型	静态饱和吸附量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 干树脂	静态解吸率 / %
AB-8	61.57	74.7
HPD500	101.66	76.5
HPD600	131.11	91.7
HPD450	36.70	97.4
D101	93.97	49.9

2.4 蜘蛛香总黄酮纯化工序研究 对筛选出的 HPD600 树脂,考察上样液的流速、浓度以及洗脱剂的流速、浓度对树脂吸附和解吸性能的影响,进行动态吸附与解吸试验。

2.4.1 上样液浓度的考察 称取处理好的 HPD600 树脂 4 份(均相当于干树脂 2.0 g)湿法装柱,将 $1.71, 2.56, 3.42, 4.27 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蜘蛛香总黄酮提取物各 100 mL 分别以 $2.4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速通过树脂柱,室温进行动态吸附,检测流出液中蜘蛛香总黄酮浓度,计算树脂的吸附容量,分别为 67.94, 87.20, 107.33, 98.83 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结果表明,在一定浓度范围内,随上样液质量浓度增加,树脂对蜘蛛香总黄酮的吸附容量先增加后减少。在总黄酮低浓度区间,随着上样液质量浓度的提高,单位量树脂可吸附的总黄酮量增加,因而树脂吸附容量提高。但是,由于流速恒定,随总黄酮浓度的进一步提高,蜘蛛香总黄酮分子在树脂内部扩散能力可能降低,且浓度增加后,与总黄酮竞争树脂吸附位点的杂质也会增加,因而树脂的目标吸附量反而会下降。故选择上样液质量浓度在 $3.42 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右为宜。

2.4.2 上样液流速的考察 称取处理好的 HPD600 树脂 5 份(均相当于干树脂 2.0 g)湿法装柱,将 $3.42 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蜘蛛香总黄酮提取物各 50 mL 分别以

1.2, 2.4, 3.6, 4.8, 6.0 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速通过树脂柱, 室温下进行动态吸附, 检测流出液中蜘蛛香总黄酮浓度, 计算树脂的吸附容量, 分别为 71.44, 69.70, 62.20, 60.63, 56.77 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结果表明, 树脂的吸附容量随流速的增大而下降。在相同条件下, 上样流速慢有利于蜘蛛香总黄酮的吸附, 即当吸附流速为 1.2 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 时吸附效果最好。考虑到吸附流速为 2.4 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 时相差不大, 故选择 2.4 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速进行上柱。

2.4.3 上样量考察 称取处理好的 HPD600 型树脂 1 份(相当于干树脂 2.0 g) 湿法装柱, 取 3.42 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蜘蛛香总黄酮提取液, 室温下以 2.4 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 加在树脂柱上, 每 10 mL 收集一管流出液, 检测流出液中蜘蛛香总黄酮浓度, 计算树脂的吸附容量, 绘制动态吸附透过曲线, 结果见图 1。可见流出液中蜘蛛香总黄酮的含量随上样量增加而增加。上样量在 10 ~20 mL 吸附透过曲线上升缓慢, 此阶段为吸附过程; 上样量超过 20 mL 后, 吸附透过曲线陡然上升, 饱和点为 60 mL, 此时树脂柱完全吸附饱和。因此, 为了减少泄露, 在提高蜘蛛香总黄酮的收率的同时增大上样量, 合适的上样量选择在 15 mL 左右(此时动态吸附容量约为 25.64 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。总黄酮收率 = 过柱后总黄酮量/过柱前总黄酮量 $\times 100\%$ 。

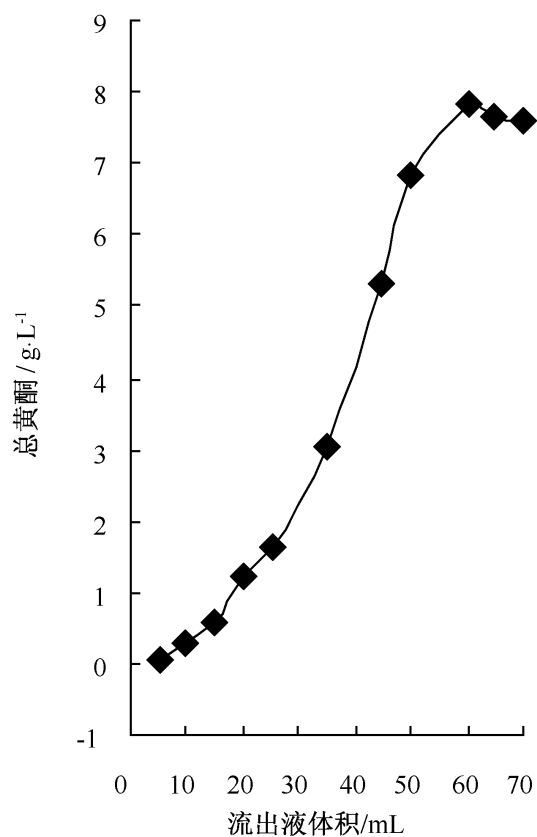


图 1 蜘蛛香总黄酮的树脂动态吸附透过曲线

2.4.4 水洗量的考察 称取处理好的 HPD600 型树脂 1 份(相当于干树脂 2.0 g) 湿法装柱, 精密吸取 3.42 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蜘蛛香总黄酮提取液 15 mL, 室温下以 2.4 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 加在树脂柱上。用足量水洗脱, 每个树

脂床体积收集 1 份, 测定每份洗脱液中固形物含量, 分别为 272.5, 263.0, 1.5, 1.3, 0.9 mg, 可见水洗脱 3 BV 时, 基本已除去水溶性杂质, 洗脱性中固形物含量已很低, 且洗脱液颜色明显变淡, 继续洗脱对试验结果影响不大, 因此洗脱用水量确定为 3 BV。

2.4.5 洗脱溶媒的确定 称取处理好的 HPD600 型树脂 1 份(相当于干树脂 2.0 g) 湿法装柱, 精密吸取 3.42 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蜘蛛香总黄酮提取液 15 mL, 室温下以 2.4 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 加在树脂柱上。依次用水, 15%, 30%, 45%, 65%, 80%, 95% 乙醇洗脱(用量均为 3 BV)。分段收集洗脱液, 测定各段中的总黄酮量, 结果见表 2。可见 65% 乙醇不能完全洗脱总黄酮, 80% 乙醇洗脱部位仍含有黄酮。因此本选择 80% 乙醇作为洗脱剂。

表 2 洗脱溶媒的确定

乙醇体积分数 / %	总黄酮量 / mg	总黄酮收率 / %
15	6.52	12.72
30	12.93	25.22
45	15.69	30.59
65	6.56	12.80
80	1.63	3.18
95	0.37	0.71

2.4.6 洗脱流速对解吸的影响 称取处理好的 HPD600 型树脂 5 份(相当于干树脂 2.0 g) 湿法装柱, 分别精密吸取 3.42 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蜘蛛香总黄酮提取液 15 mL, 室温下以 2.4 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 加在树脂柱上。3 BV 水洗脱后, 分别以 1.2, 2.4, 3.6, 4.8, 6.0 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 用 3 BV 80% 乙醇洗脱, 收集乙醇洗脱部分, 检测总黄酮含量, 计算收率, 分别为 77.66%, 80.21%, 79.19%, 78.53%, 77.47%。可见流速 2.4 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 时, 收率最大, 故选择 2.4 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 为洗脱流速。

2.4.7 洗脱剂用量的考察 按上述确定的洗脱溶媒条件, 取蜘蛛香上柱液 15 mL 上柱, 用水洗脱 3 BV 后, 换用 80% 乙醇洗脱, 控制流速 2.4 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 直至流出液无色, 每个树脂床体积收集 1 份, 分别测定各流份的总黄酮量, 计算总黄酮收率, 以收率和洗脱液收集份数绘制解吸曲线, 见图 2。结果在第 4 份洗脱液中总黄酮已经很少, 可认为树脂柱上吸附的总黄酮已经洗脱完全, 故确定洗脱剂用量为 4 倍量树脂柱体积。

2.4.8 树脂重复使用次数考察 按上述确定的吸附洗脱条件, 取蜘蛛香提取液过柱, 分别用 3 BV 水

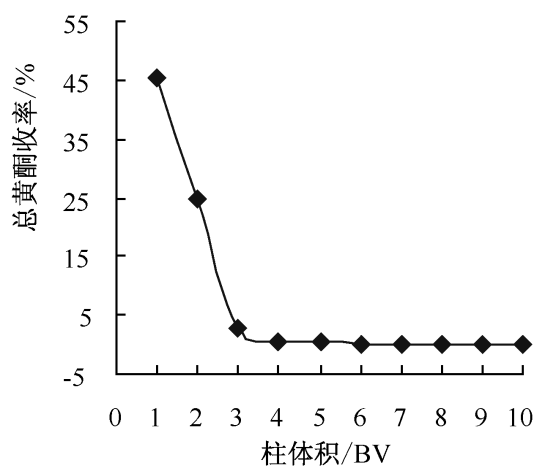


图 2 蜘蛛香总黄酮的树脂动态解吸曲线

和 4 BV 80% 乙醇洗脱完毕后, 用 95% 乙醇冲洗并用水冲至无醇味, 再进行第 2 次上样与解吸, 反复进行 8 次, 分别计算 8 次的总黄酮吸附量, 绘制树脂使用次数与树脂吸附量关系图, 见图 3。由此可见树脂在不用酸碱活化情况下反复使用 8 次, 其吸附量变化不明显。

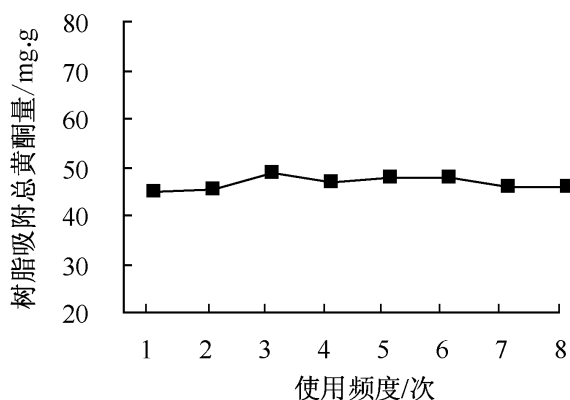


图 3 树脂反复使用次数与吸附总黄酮量关系

2.5 HPD600 树脂对蜘蛛香总黄酮的纯化效果 称取适量蜘蛛香粗提物, 按上述确定的吸附洗脱条件配置上柱液上柱, 树脂柱分别用 3 BV 水洗脱, 再用 4 BV 80% 乙醇以 $2.4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度洗脱, 收集乙醇洗脱部分, 检测总黄酮含量, 称定浸膏质量, 计算收率和黄酮质量分数。粗提物中总黄酮为 13.74%, 经过 HPD600 树脂纯化, 精制品中总黄酮为 41.20%, 富集倍数达 3.00, 且收率达 80.36%。

3 讨论

药材因产地、气候、采收季节等原因会造成成分的含量差异, 故试验中考察上样量时不以生药量计算, 而直接以总黄酮量计算, 这样可消除药材含量的客观差异对试验结果的影响。

在本试验的洗脱溶媒考察时, 曾尝试用 HPLC 对各洗脱部分进行跟踪分析, 发现水洗脱部分基本都是杂质, 15% 乙醇洗脱部分杂质多, 但含部分橙皮苷; 30% ~65% 乙醇洗脱部分含大量黄酮类如橙皮苷、蒙花苷、芹菜素、槲皮素等; 80% 洗脱部分杂质峰少, 且含部分芹菜素和槲皮素; 95% 部分含极少量芹菜素。因此, 在选择洗脱溶媒时, 结合总黄酮的收率, 确定以 80% 乙醇作为洗脱溶媒。

HPD600 树脂对蜘蛛香总黄酮具有较大的吸附量, 易吸附、易解吸, 其重复使用次数等性能与其他树脂相比也具有明显优势, 试验中确定的总黄酮纯化工艺可为进一步纯化总黄酮(使质量分数达到 50% 以上) 提供借鉴, 从而为进一步开发蜘蛛香黄酮有效部位提供参考。

[参考文献]

- [1] 陈磊, 康鲁平, 秦路平, 等. 总缬草素的质量标准和镇静催眠活性研究[J]. 中成药, 2003, 25(8): 663.
- [2] Bounthanh C, Bergmann C, Beck G P, et al. Valepotriates, a new class of cytotoxic and antitumor agents[J]. Planta Med, 1981, 41(1): 21.
- [3] 闫智勇, 张天娥, 彭佳, 等. 蜘蛛香对焦虑模型大鼠行为学及脑组织神经递质含量的影响[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(3): 67.
- [4] 陈磊, 郑清明, 郑汉臣, 等. 蜘蛛香的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(1): 8.
- [5] Mardern, Violah, Wasowski C, et al. 6-Methylapigeninandhesperidin: Newvaleriana flavonoids with activity on the CNS[J]. Pharm Bio Behav, 2003, 75(3): 537.
- [6] Sebastian Fernandez, Cristina Wasowski, Alejandro C Paladini, et al. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*[J]. Pharm Bio Behav, 2004, 77: 399.
- [7] 李蓉, 李小平, 吴莹. 紫外分光光度法测定蜘蛛香中总黄酮的含量[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(12): 149.

[责任编辑 邹晓翠]