

大孔吸附树脂纯化蜘蛛香总黄酮的工艺研究

郜红利¹, 谭玉柱^{2*}

1. 湖北民族学院, 湖北 恩施 445000

2. 成都中医药大学, 四川 成都 611137

摘要: 目的 建立大孔树脂富集纯化蜘蛛香总黄酮工艺方法。方法 对 D-101、AB-8、HPD-600、D-301 4 种不同极性大孔树脂进行吸附率和解吸率筛选, 确定选择 HPD-600 树脂。考察了 HPD-600 树脂上样量、pH 值、上样体积流量、上样液浓度、洗脱液配比、酸液浓度、乙醇体积分数、洗脱剂用量对蜘蛛香总黄酮的影响, 优化大孔树脂纯化工艺参数。结果 HPD-600 树脂装柱, 上样浓度为 3.03 mg/mL, 上样容量为 24.24 mg/g, 先 0.1 mol/L HCl 的 10%乙醇溶液洗脱除杂, 直至洗液颜色不再变浅、固形物含量不再增加, 后用 0.1 mol/L HCl 的 80%乙醇溶液, 洗脱体积流量 1 mL/min, 洗脱 5 倍柱体积, 收集洗脱液减压浓缩至干得提取物。结论 HPD-600 树脂适用于蜘蛛香中总黄酮的纯化, 可使蜘蛛香总黄酮质量分数达 55.25%, 收率可达 39.01%。

关键词: 蜘蛛香; 总黄酮; 大孔吸附树脂; 纯化工艺

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2014)10-1100-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.10.006

Purification of total flavonoids from *Valeriana jatamansi* by macroporous adsorption resin

GAO Hong-li¹, TAN Yu-zhu²

1. Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To establish a method of purification process for total flavonoids from *Valeriana jatamansi*. **Methods** To select an optimum resin according to the adsorption rate and resolution rate from D-101, AB-8, HPD-600, and D-301, and study the factors such as adsorption amount, pH value, elution speed, concentration of adsorption, solution proportion, concentration of hydrochloric acid, concentration of ethanol, and amount of eluent, which could affect the adsorption and desorption behavior. **Results** The HPD 600 resin among four types of resins was found with the best separating efficiency. The best results of dynamic absorption were based on the followings: sample concentration was 3.03 mg/mL, feed rate 1 mL/min, and sample capacity 24.24 mg/g. After eluted with 0.1 mol/L HCl of 10% ethanol and 5 BV of 0.1 mol/L HCl of 80% ethanol. **Conclusion** HPD-600 resin could be used to purify the total flavonoids of *V. jatamansi*, and the yield of total flavones was 39.01% and the purity was 55.25%.

Key words: *Valeriana jatamansi* Jones; total flavone; macroporous adsorption resin; purification

蜘蛛香 *Valeriana jatamansi* Jones 系败酱科缬草属植物, 又名马蹄香、老虎七、印度缬草等, 主要分布在我国湖北恩施、贵州、湖南等西南少数民族地区^[1], 以根茎及根入药, 用于治疗脘腹胀痛、呕吐泄泻、小儿疳积、风寒湿痹等^[2]。研究表明, 蜘蛛香黄酮类化合物主要有橙皮苷、芹菜素、蒙花苷、

蒙花苷异戊酸酯以及山柰酚等^[3-4], 具有抗炎抑菌、抗肿瘤作用^[5]。现有文献研究发现蜘蛛香水提取物具有显著的镇痛作用^[6], 本课题组对于蜘蛛香总黄酮和总缬草三酯提取物进行了药理实验, 结果亦显示其黄酮提取物是其发挥镇痛作用的有效部位^[7]。因此本实验采用大孔吸附树脂对蜘蛛香中黄酮类成

收稿日期: 2014-03-25

基金项目: 湖北省自然科学基金重点项目 (2010CDA047)

作者简介: 郜红利 (1967—), 男, 副教授, 研究方向: 民族药物的开发与利用。E-mail: 349523825@qq.com

*通信作者 谭玉柱 (1985—), 男, 博士在读, 讲师, 研究方向: 中药有效成分及质量标准研究。Tel: (028) 61800033 E-mail: 365762996@qq.com

分进行富集,为镇痛有效部位筛选提供参考,对于进一步开发利用蜘蛛香镇痛活性成分提供基础。

1 仪器与试药

KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),UV1100 紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司),UPT—I—10T 型优谱 UPT 系列超纯水器(成都超纯科技有限公司),BS124S 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司),R—201 旋转蒸发仪、恒温水浴锅 W201B(上海申胜生物技术有限公司),SHB—III 循环水式多用真空泵(郑州长城科技工贸有限公司)。

D-101、AB-8、HPD-600、D-301 型大孔吸附树脂及 95%乙醇、浓盐酸、氢氧化钠等均购自成都亚荣生化设备有限公司。

蜘蛛香药材采自湖北恩施州利川市福宝山,经湖北民族学院中药鉴定教研室朱敏英教授鉴定为败酱科植物蜘蛛香 *Valeriana jatamansi* Jones 的干燥根茎和根。橙皮苷(质量分数>98%,批号 110721-200512)由中国食品药品检定研究院提供。

2 方法与结果

2.1 药材脱脂处理

将蜘蛛香药材粉碎并过 40~180 目筛,以 1:10 比例的石油醚回流脱脂 2 次,抽滤,洗涤,再放入 40℃ 条件下的鼓风干燥箱中干燥 1 h,备用。

2.2 蜘蛛香中总黄酮的紫外分光光度法测定^[2]

2.2.1 标准工作曲线的制定 称取橙皮苷对照品 5.53 mg,置 50 mL 量瓶中,甲醇溶解并加至刻度,即得 0.110 6 mg/mL 溶液。分别移取上述溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 置于 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度。以甲醇作空白,于 284 nm 波长处测定吸光度值。以吸光度值对质量浓度作图,绘制标准工作曲线,得回归方程 $Y=0.035 X-0.006$, $r=0.999 3$,线性范围 5.53~27.65 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.2 药材中总黄酮的测定 称取 10 g 已脱脂的低

温干燥后的蜘蛛香粉末,加入一定量的溶剂,密塞,摇匀,超声提取(250 W, 40 kHz),离心分离,取上清液于旋转蒸发器上浓缩至干,加 30 mL 甲醇溶解,滤去不溶物,滤液加甲醇定容至 50 mL,即得样品溶液。移取 1 mL 样品溶液,加甲醇定容至 10 mL,以甲醇作空白,于 284 nm 测定吸光度值。根据回归方程计算得蜘蛛香药材中总黄酮质量分数为 1.52%。

2.3 提取液的制备

称取蜘蛛香粉末 100 g,加入适量 60%乙醇,浸泡 6 h 后超声提取 3 次,每次 30 min,滤过,滤液减压浓缩至无醇味,3 500 r/min 离心,取上清液,即得含生药 0.1 g/mL 提取液。

2.4 大孔吸附树脂种类的筛选

准确量取预处理好的 D-101、AB-8、HPD-600、D-301 大孔吸附树脂各 20 g,装入树脂柱中,分别吸取 0.1 g/mL 蜘蛛香提取液 20 mL,通过树脂柱,进行动态吸附。4 种大孔树脂对总黄酮的动态吸附和解吸见表 1。综合考察吸附和解吸性能得出 HPD-600 大孔树脂对蜘蛛香总黄酮的吸附和解吸能力合宜,是较为合适的纯化树脂。

2.5 HPD-600 大孔树脂吸附因素的确定

2.5.1 最大上样量的考察 称取 HPD-600 干树脂 5 g,装柱,加入蜘蛛香提取液 100 mL(含总黄酮 6.06 mg/mL)进行交换吸附,调节体积流量为 1 mL/min 收集流出液,5 mL 收集 1 次,共收集 15 份,编号,制成总黄酮制备液,测定吸光度值。当流出液体积为 10~20 mL 时,总黄酮泄露曲线上升缓慢,此阶段为树脂吸附阶段。当流出液为 25 mL 时,泄露曲线变化陡峭,说明已有大量药液泄露。当流出液为 40 mL 时,树脂已达到饱和吸附,流出液中总黄酮质量浓度与之后比较没有明显变化,故选择最大上样量为 20 mL,此时药液泄露较少且树脂吸附充分,此时树脂的动态吸附容量为 24.24 mg/g。见图 1。

表 1 4 种大孔吸附树脂对总黄酮动态吸附量、解吸量和解吸率比较

Table 1 Comparison on four kinds of resins about dynamic adsorption and desorption as well as desorption rates

树脂类型	吸附量/(mg·g ⁻¹)	解吸量/(mg·g ⁻¹)	解吸率/%
D101	0.902	0.308	34.13
AB-8	0.974	0.620	63.72
HPD-600	0.697	0.686	98.39
D-301	0.722	0.657	90.97

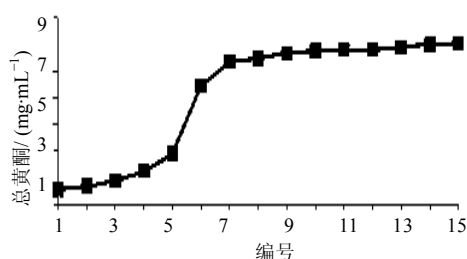


图 1 HPD-600 型大孔吸附树脂对蜘蛛香总黄酮的动态吸附曲线

Fig. 1 Dynamic adsorption curve of HPD-600 macroporous resin in total flavonoids of *V. jatamansi*

2.5.2 药液 pH 值对静态吸附的影响 称取 3 份吸干其表面水分的 HPD-600 树脂各 5 g, 置于 100 mL 三角瓶中。分别量取蜘蛛香提取液 3 份各 10 mL, 用稀盐酸和 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 5、9、7, 分别加入 3 份树脂中, 置于 20 °C 恒温水浴箱中, 间隔 30 min 振荡 1 min, 60 次/min, 2 h 后抽滤, 得滤液, 制成总黄酮制备液, 测定吸光度, 计算总黄酮的质量浓度, 得吸附量和吸附率, 见表 2。结果显示, 上样液呈中性时 HPD-600 树脂对其中黄酮类成分的静态吸附效果较好。

表 2 不同 pH 值的 HPD-600 树脂对总黄酮的静态吸附量和吸附率

Table 2 Static adsorption and adsorption rate of HPD-600 macroporous resin in total flavonoids under various pH values

pH 值	吸附量/(mg·g ⁻¹)	吸附率/%
9	7.678	63.34
7	9.980	82.34
5	6.876	56.73

2.5.3 体积流量对 HPD-600 树脂交换吸附容量的影响 称取 4 份吸干其表面水分的 HPD-600 树脂各 5 g, 分别加入 20 mL 蜘蛛香提取液, 考察体积流量 1、3、5、7 mL/min 对 HPD-600 树脂吸附蜘蛛香总黄酮的影响。分别收集流出液, 测定吸光度, 计算吸附量和吸附率。结果见表 3。结果显示, 体积流量越慢, 流出液中的总黄酮质量浓度越少, 即被 HPD-600 树脂交换吸附的总黄酮越多。

2.5.4 上样液质量浓度对 HPD-600 树脂交换吸附蜘蛛香提取液的影响 称取 5 份吸干其表面水分的 HPD-600 树脂各 10 g 湿法装柱, 将总黄酮质量浓度分别为 12.12、6.06、3.03、1.52、0.76 mg/mL 提取

表 3 不同体积流量下流出液中总黄酮

Table 3 Total flavonoids content of eluent under various velocities

体积流量/(mL·min ⁻¹)	吸附量/(mg·g ⁻¹)	吸附率/%
1	15.175	62.60
3	18.249	75.28
5	12.256	50.56
7	8.264	34.09

液各 50 mL, 分别以 1 mL/min 通过树脂柱, 室温动态吸附。检测流出液中蜘蛛香总黄酮质量浓度, 计算吸附量, 见表 4。结果显示, 在一定浓度范围内, 随着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。但由于体积流量恒定, 随总黄酮质量浓度的进一步提高, 蜘蛛香总黄酮分子在树脂内部扩散能力可能降低, 且质量浓度增加后, 与总黄酮竞争树脂吸附位点的杂质量也会增加, 因而树脂的目标吸附量反而下降, 因此选择上样液总黄酮质量浓度为 3.03 mg/mL 为宜。

表 4 不同上样液浓度对大孔树脂吸附行为影响

Table 4 Adsorption of HPD-600 macroporous resin in total flavonoids under various concentration of loading sample

上样液浓度/(mg·mL ⁻¹)	吸附量/(mg·g ⁻¹)
0.76	2.967
1.52	6.022
3.03	12.286
6.06	12.129
12.12	9.175

2.6 HPD-600 大孔树脂解吸因素的确定

2.6.1 洗脱液对比对 HPD-600 树脂解吸行为的影响 称取 3 份已吸附蜘蛛香总黄酮的 HPD-600 树脂 (取适量 HPD-600 树脂用一定量蜘蛛香提取液浸泡过夜后抽滤) 各 5 g, 分别用 80% 乙醇、0.1 mol/L NaOH 的 80% 乙醇溶液、0.1 mol/L HCl 的 80% 乙醇溶液 60 mL 洗脱, 洗脱 3 次, 每次 20 mL。加入洗脱液后各振荡 1 min, 60 次/min, 静置 30 min 后滤过, 分别合并滤液, 浓缩定容至 50 mL, 吸取 0.2 mL 定容至 10 mL, 测定吸光度, 计算洗脱液中总黄酮质量浓度, 比较洗脱率, 见表 5。结果显示

洗脱率大小为 0.1 mol/L NaOH 的 80%乙醇>0.1 mol/L HCl 的 80%乙醇>80%乙醇。选择 0.1 mol/L HCl 的 80%乙醇作为洗脱剂效果较好。

表 5 不同洗脱液对大孔树脂吸附影响
Table 5 Adsorption of HPD-600 macroporous resin in total flavonoids under various eluates

洗脱液	总黄酮/(mg·mL ⁻¹)	洗脱率/%
80%乙醇	0.042 8	78.09
0.1 mol/L NaOH 80%乙醇	0.045 2	93.86
0.1 mol/L HCl 80% 乙醇	0.058 6	92.72

2.6.2 不同酸浓度对树脂吸附影响 各取 20 g 已吸附蜘蛛香总黄酮的 HPD600 树脂 4 份，装柱，分别用 80%乙醇的 0.05、0.10、0.20、0.4 mol/L HCl 溶剂 100 mL 作为洗脱剂洗脱。分别收集洗脱液，测定洗脱液中总黄酮质量浓度，见表 6。结果显示，HCl 溶液浓度为 0.1 mol/L 时，洗脱下来的总黄酮质量浓度较高，故选择 0.10 mol/L HCl。

表 6 不同酸浓度洗脱剂洗脱下来的总黄酮含量测定结果
Table 6 Determination of total flavonoids of eluent under various acid concentration

HCl/(mol·L ⁻¹)	解吸量/(mg·g ⁻¹)	解吸率/%
0.05	0.528	58.09
0.10	0.652	71.72
0.20	0.486	53.47
0.40	0.557	61.28

2.6.3 洗脱溶媒体积分数的确定 取 20 g 已处理备用的 HPD-600 树脂装柱，精密吸取 3.03 mg/mL 蜘蛛香提取液 20 mL 湿法上样，分别用 0.1 mol/L HCl 的 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%乙醇溶液为洗脱剂，用量均为 100 mL，按 1.0 mL/min 进行洗脱。分别收集洗脱液，制成总黄酮制备液，测定其中总黄酮的质量浓度，结果见表 7。结果显示，洗脱溶媒确定为先用 0.1 mol/L HCl 的 10%乙醇溶液洗脱除杂，后用 0.1 mol/L HCl 的 80%乙醇溶液洗脱。

2.6.4 洗脱剂用量的确定 取已处理备用的 HPD-600 树脂 10 g 装柱，分别加入含蜘蛛香总黄酮质量浓度为 3.03 mg/mL 提取液 20 mL，待吸附后，用 0.1 mol/L HCl 的 10%乙醇溶液洗脱除杂，直至洗

表 7 不同体积分数洗脱剂洗脱下来的总黄酮测定结果
Table 7 Determination of total flavonoids of eluent under various alcohol concentration

0.1 mol/L HCl 的不 同体积分数乙醇	总黄酮/mg	总黄酮得率/%
10	1.209	1.99
20	2.065	3.41
30	12.980	21.42
40	25.487	42.06
50	7.102	11.72
60	4.368	7.21
70	3.981	6.57
80	1.109	1.83
90	0.092	0.15

脱液颜色变浅、固形物不再增加，再用 0.1 mol/L HCl 的 80%乙醇溶液洗脱冲洗至流出液接近无色，收集洗脱液，20 mL 作为 1 个流份，共收集 10 份。挥干，制成总黄酮溶液，测定吸光度，见图 2。结果显示，当收集到第 5 份时，洗脱液中总黄酮质量已降至 1.56 mg，故认为此洗脱溶媒系统 100 mL (5 BV) 即可将总黄酮洗脱完全。

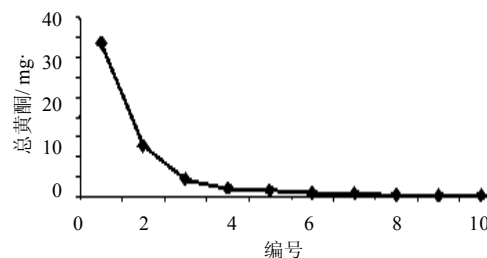


图 2 蜘蛛香总黄酮洗脱曲线
Fig. 2 Elution curve of total flavonoid from *V. jatamansi*

2.7 验证试验

称取 HPD-600 树脂 100 g 湿法装柱，分别加入总黄酮质量浓度为 3.03 mg/mL 的中性提取液 500 mL 进行动态交换吸附，至吸附均匀后，先用 0.1 mol/L HCl 的 10%乙醇溶液洗脱除杂，直至洗液颜色不再变浅、固形物不再增加，后用 0.1 mol/L HCl 的 80%乙醇溶液，以 1 mL/min 洗脱 5 倍柱体积，最后收集洗脱液，平行操作 5 份，计算收率和总黄酮质量分数，结果其平均收率为 39.01%，质量分数达到 55.25%，RSD 分别为 3.12%，2.58%。相对蜘蛛香药材中总黄酮质量分数提高近 35 倍，表明此工艺条件稳定可行。

3 讨论

本研究分别比较了橙皮苷和供试品最大吸收波长,二者相差在 3 nm 以内,因此选择 284 nm 作为测定波长;做上样体积流量考察时,随着体积流量的升高,其吸附率降低,可能是由于黄酮苷分子扩散速率较慢,体积流量升高,使大量黄酮苷来不及与 HPD-600 树脂交换吸附而发生泄漏。在静态解吸附考察时,碱性乙醇溶液的解吸附率最高,其次是酸性乙醇洗脱液,最后是乙醇液。通过颜色观察及波长扫描发现 0.1 mol/L NaOH 的 80%乙醇溶液洗脱液最大吸收波长为 207 nm,偏离目标波长 284 nm 较大,其黄酮类成分可能在碱液中已被破坏。

树脂装柱上样后,用水冲洗仅洗脱掉糖类、水溶性杂质,无法去除一些脂溶性色素,而用低体积分数乙醇冲洗可去除这类杂质,但是除杂的同时也会损失部分黄酮成分,考虑既要尽量除杂又要最大限度地富集有效成分,因此在洗脱前用 10%乙醇冲洗树脂柱至接近无色。

本实验分别比较了 4 种不同极性大孔树脂的吸附率和解吸率,最后选择 HPD-600 树脂,考察了 HPD-600 树脂上样量、pH 值、洗脱体积流量、质

量浓度、洗脱剂的种类等因素对蜘蛛香总黄酮类成分的影响,从而得到纯化工艺参数,HPD600 树脂对蜘蛛香总黄酮具有较大的吸附量,易吸附、易解吸,试验中确定的总黄酮纯化工艺可使其总黄酮质量分数达到 55.25%,这为蜘蛛香中有效部位的开发提供借鉴。

参考文献

- [1] 伍 丹. 蜘蛛香提取工艺及剂型的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2009.
- [2] 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): 149-150.
- [3] 肖 婷. 蜘蛛香总黄酮的提取纯化及抗肿瘤作用研究 [D]. 成都: 西南交通大学, 2010.
- [4] 许 婧, 刘翠周, 桂丽萍, 等. 蜘蛛香的化学成分研究 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(2): 132-134.
- [5] 龚金炎, 张 英, 吴晓琴. 黄酮类化合物抗病毒活性的研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 623-627.
- [6] 毛晓健, 李静平, 王 军. 蜘蛛香镇痛镇静作用及对胃肠运动的影响 [J]. 云南中医学院学报, 2008, 31(3): 34-37.
- [7] 郜红利, 谭玉柱. 蜘蛛香提取物的药理学研究 [J]. 华西药理学杂志, 2014, 29(2): 154-157.