

大孔吸附树脂纯化黄花草木犀的工艺研究

韩璐¹, 杨杰², 王丽莉^{3,4,5}, 周鑫堂¹, 张铁军^{3,4,5*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 沧州市中心医院, 河北 沧州 061001

3. 天津药物研究院, 天津 300193

4. 天津市中药质量控制技术工程实验室, 天津 300193

5. 中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室(天津), 天津 300193

摘要: **目的** 考察黄花草木犀中芦丁、clovin 和香豆素的最好大孔吸附树脂的纯化工艺。**方法** 通过对不同型号大孔树脂的考察优选出纯化黄花草木犀中药效成分的最好树脂类型, 并对其最大上样量、上样体积流量、洗脱溶剂体积分数和洗脱溶剂最佳用量进行优化。**结果** 经过筛选确定 HPD-300 大孔树脂为纯化黄花草木犀药效成分的最优树脂类型, 其最好纯化条件: 树脂的上样量为 2.4 g 生药/g 树脂, 上样体积流量为 2.0 BV/h, 依次用 2 BV 水洗脱和 7 BV 50%乙醇洗脱。在此条件下芦丁、clovin、香豆素质量分数提升了 7.8 倍, 平均收率为 85.38%。**结论** HPD-300 大孔树脂用于纯化黄花草木犀中芦丁、clovin、香豆素稳定性高、重复性好。

关键词: 黄花草木犀; 大孔吸附树脂; 芦丁; clovin; 香豆素; 纯化

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)07-0800-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.07.010

Purification of *Melilotus officinalis* by macroporous resins

HAN Lu¹, YANG Jie², WANG Li-li^{3,4,5}, ZHOU Xin-tang¹, ZHANG Tie-jun^{3,4,5}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061001, China

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

4. Tianjin Engineering Laboratory of Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

5. National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine (Tianjin), Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To investigate the optimum purification process of the active ingredients rutin, clovin, and coumarin in *Melilotus officinalis* by macroporous resins. **Methods** The various types of resins were selected with purification of the active ingredients rutin, clovin, and coumarin in *M. officinalis* as index. The parameters, such as sample loading maximum volume, sample loading velocity, elution solvent concentration, and elution solvent volume of optimized resin were studied. **Results** HPD-300 type macroporous resin was selected as the best type of resin for the purification of active ingredients in *M. officinalis*. The optimum purification conditions were as following: the sample loading maximum volume was 2.4 g/g macroporous resin, sample loading velocity was 2.0 BV/h, and the sample was eluted by water with 2 BV and 50% ethanol with 7 BV, respectively. Rutin, clovin and coumarin proportion promoted 7.8 times after the purification HPD-300 by macroporous resin, and the yield was 85.38%. **Conclusion** HPD-300 macroporous resin is suitable for the purification of rutin, clovin, and coumarin in *M. officinalis* with high stability and good repeatability.

Key words: *Melilotus officinalis* (L.) Pall.; macroporous resin; rutin; clovin; coumarin; purification

黄花草木犀又名辟汗草, 为豆科草木犀属植物, 现收录于《生部药品标准藏药标准》, 味苦、凉, 黄花草木犀 *Melilotus officinalis* (L.) Pall. 干燥地上部, 具有清热解毒、消炎、消肿功效, 用于治疗白喉、

收稿日期: 2015-01-02

作者简介: 韩璐 (1990—), 女, 蒙古族, 辽宁兴城人, 中药学专业硕士研究生。Tel: 18222292792 E-mail: 18222292792@163.com

*通信作者 张铁军 Tel: (022)23006848 E-mail: tiejunzh2000@yahoo.com.cn

绞肠痧、脾脏病、乳蛾等症^[1]。本课题组前期已对黄花草木犀进行了化学成分研究,结果显示草木犀中主要含有香豆素和黄酮苷类成分^[2]。香豆素类成分是黄花草木犀发挥疗效的主要药效成分,该类成分能够减轻由于各种原因造成的毛细血管壁通透性增加,阻止血清蛋白丧失,维持正常的胶体渗透压,起到抗水肿作用^[3-4];黄酮苷类成分(芦丁、clovin)同样具有较好的抗炎、镇痛和止血作用^[5-7]。目前市售的由黄酮苷类成分开发的制剂如芦丁片(止血药)、地奥司明片(痔疮、肿胀等症)在临床上用于治疗痔疮、静脉疾病等的肿胀、疼痛,疗效确切。本实验以黄花草木犀中主要药效成分香豆素和黄酮苷为指标,对黄花草木犀进行纯化工艺研究。近年来大孔树脂在天然产物的分离纯化中应用极广,是提取分离中药有效成分的一种有效方法^[8]。本实验通过优选黄花草木犀中药效成分的树脂纯化工艺技术参数,为以后大孔树脂在纯化黄花草木犀中药效活性部位的研究中提供参考。

1 仪器与材料

UV 6000LP HPLC 高效液相色谱仪(天津兰博实验室仪器设备有限公司),AB204—N 电子分析天平(Mettler Toledo),超声清洗仪(奥特宝恩斯仪器有限公司),旋转蒸发仪(无锡市星海王生化设备有限公司),玻璃色谱柱(20 cm×1.2 cm, 天大玻璃仪器厂),金怡 CHA—S 气浴恒温振荡器(江苏金坛市医疗器械厂),116 摇摆式六两装高速中药粉碎机(瑞安市永历制药机械有限公司),PTHW 型电热套(巩义市予华仪器有限责任公司)。

大孔树脂 NKA-9、AB-8、D-101(天津南开大学化工厂),HPD-300、HPD-400(沧州宝恩吸附材料科技有限公司)。黄花草木犀购自内蒙古,经天津药物研究院张铁军研究员鉴定为豆科植物黄花草木犀 *Melilotus officinalis* (L.) Pall. 的干燥地上部分,芦丁对照品(批号 100080-200707,由中国食品药品检定研究院提供,质量分数>98.0%);香豆素对照品(批号 JOT-10155,由四川省维克奇生物科技有限公司提供,质量分数>98%);clovin 对照品为自制,经色谱及光谱分析确认^[9],质量分数为 98%以上;水为纯净水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄花草木犀中成分的测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性 色谱柱 Ultimate

XB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.5%乙酸水(B),梯度洗脱,0~25 min, 10% A, 25~50 min, 14% A, 50~60 min, 12% A, 60~90 min, 10% A, 90 min 以后, 8% A;柱温 30 ℃;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 254 nm;进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别取芦丁、clovin、香豆素对照品适量,置 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,配制成含芦丁、clovin、香豆素质量浓度分别为 0.291 2、0.170 8、0.409 6 mg/mL 的混合对照品溶液,摇匀,备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取黄花草木犀药材粉末(过 40 目筛)1 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 70%甲醇 50 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷至室温,再称定质量,并用 70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取上述对照品 7.5、5.0、2.5、1.2、0.6 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,配制成不同质量浓度的混合对照品溶液。按以上色谱条件进行测定。以质量浓度为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,进行线性回归,得回归方程。芦丁: $Y=8\,489\,359.35X+37\,079.66$, $r=0.999\,9$; clovin: $Y=7\,266\,549.48X+26\,611.05$, $r=0.999\,9$; 香豆素: $Y=12\,824\,543.77X+25\,494.3$, $r=0.999\,7$ 。结果表明芦丁在 0.175 0~2.912 0 mg/mL, clovin 在 0.102 0~1.708 0 mg/mL, 香豆素在 0.246 0~4.096 0 mg/mL 均呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL,按以上色谱条件连续进样 6 次,测定各成分的峰面积,结果芦丁、clovin 和香豆素峰面积的 RSD 值分别为 1.12%、0.62%、1.31%。

2.1.6 重复性试验 取黄花草木犀药材粉末(过 40 目筛)约 1.0 g,平行称定 6 份,制备供试品溶液,进样测定色谱峰面积,计算 3 种化合物的质量分数。结果显示芦丁、clovin 和香豆素质量分数的 RSD 值分别为 2.58%、1.23%、0.62%。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取黄花草木犀药材粉末供试品溶液 10 μL,室温放置,在 0、2、4、8、12、24 h 进样分析,测定色谱峰面积,计算得芦丁、clovin、香豆素和总峰面积和的 RSD 值分别为 2.66%、3.44%、1.25%、1.80%。结果表明,供试品溶液在室温密封放置 24 h 的稳定性良好。

2.1.8 加样回收试验 称取黄花草木犀药材粉末

(过40目筛)0.25 g, 分别加入适量的混合对照品溶液, 制备供试品溶液, 按以上色谱条件测定, 计算回收率, 结果芦丁、clovin 和香豆素回收率分别为101.19%、98.13%、99.43%, RSD 值分别为1.16%、1.50%、1.62%。

2.1.9 黄花草木犀药材中指标成分的测定 称取黄花草木犀药材粉末(过40目筛)1 g, 制备供试品溶液。另取混合对照品溶液适量, 进样测定。结果显示黄花草木犀中香豆素、芦丁和 clovin 的质量分数分别为0.29%、0.23%、0.18%。色谱图见图1。

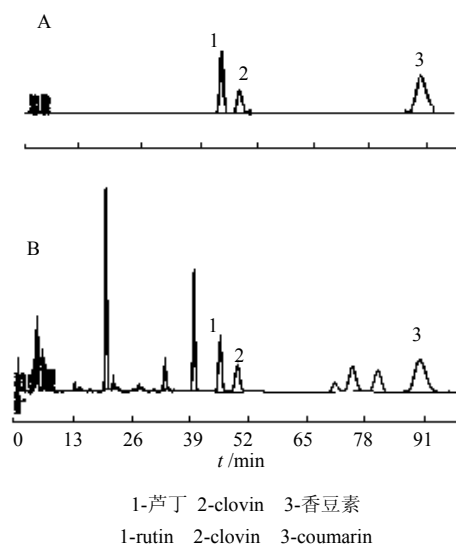


图1 对照品(A)和黄花草木犀(B)的HPLC图谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and *M. officinalis* sample (B)

2.2 上样溶液的制备

称取黄花草木犀药材20 g, 粉碎, 过10目筛, 用70%乙醇按照料液比1:15回流提取2次, 每次1 h, 滤过, 合并滤液, 浓缩至无醇味, 定容到250 mL量瓶中, 备用。

2.3 树脂类型的筛选考察

2.3.1 大孔树脂的预处理 取D101、NKA-9大孔树脂适量, 装入含有相当于树脂体积0.4~0.5倍丙酮的吸附柱中, 使其液面高于树脂层0.3 cm, 浸泡24 h。用2 BV 丙酮以2 BV/h通过树脂层, 洗至流出液加水不显白色浑浊, 同等体积流量水洗, 再将2 BV 5%盐酸溶液以4 BV/h通过树脂层, 并浸泡4 h, 同等体积流量水洗至中性, 再将2 BV 2%氢氧化钠溶液以4 BV/h通过树脂层, 并浸泡4 h, 同等体积流量水洗至中性, 备用。取HPD-300、HPD-400、AB-8大孔树脂用95%乙醇浸泡24 h, 待充分溶胀

后, 蒸馏水洗至中性, 备用。

2.3.2 静态吸附-解吸试验 精密称取预处理好的5种树脂各1 g, 滤纸吸取表面水分, 置于100 mL具塞锥形瓶中, 加入相当于4 g生药量的黄花草木犀提取液, 于气浴恒温振荡器中振摇24 h, 静置, 取上清液, 过0.45 μm微孔滤膜, 测定指标成分的质量浓度, 计算静态吸附量和吸附率。将吸附完全的大孔树脂滤过后用去离子水洗2次, 吸去树脂表面水分, 分别加入50 mL 70%乙醇, 置于气浴恒温振荡器中振摇24 h, 静置, 取上清液, 过0.45 μm微孔滤膜, 测定解吸液中指标成分的质量浓度, 计算静态解吸量和解吸率, 结果见表1。可见HPD-300大孔树脂对黄花草木犀中指标成分的吸附率和解吸率均相对较高, 因此选用HPD-300大孔树脂作为纯化黄花草木犀药效成分的最佳树脂类型。

$$\text{吸附量} = (C_0 - C_1) V_1 / W$$

$$\text{吸附率} = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100\%$$

$$\text{解吸量} = C_2 V_2 / W$$

$$\text{解吸率} = [C_2 / (C_0 - C_1)] \times 100\%$$

C_0 为原药液的指标成分的质量浓度, C_1 为静态吸附后指标成分的质量浓度, C_2 为解吸液中指标成分的质量浓度, V_1 为吸附液体积, V_2 为解吸液体积, W 为湿树脂质量

表1 5种大孔树脂静态吸附和解吸性能比较

Table 1 Adsorption-desorption capacity of five types of macroporous resins

树脂类型	化合物	吸附量/ (mg·g ⁻¹)	吸附 率/%	解吸量/ (mg·g ⁻¹)	解吸 率/%
D-101	芦丁	3.259	46.57	2.130	65.36
	clovin	1.775	31.42	1.380	77.75
	香豆素	8.065	80.41	7.230	89.65
HPD-300	芦丁	5.855	82.76	3.365	91.20
	clovin	4.345	76.90	2.380	99.66
	香豆素	9.055	90.28	8.845	97.96
HPD-400	芦丁	4.380	61.91	3.890	88.81
	clovin	2.840	50.27	2.810	99.12
	香豆素	7.805	77.82	7.790	99.87
AB-8	芦丁	4.650	65.72	3.335	71.72
	clovin	3.385	59.91	2.260	66.77
	香豆素	7.675	84.10	8.170	97.39
NKA-9	芦丁	1.345	19.01	0.505	37.54
	clovin	5.240	48.30	0.235	56.63
	香豆素	7.610	75.92	8.170	98.33

2.4 HPD-300 大孔树脂的纯化工艺考察

2.4.1 最大上样量的考察 精密称取 2 g 预处理好的 HPD-300 树脂（滤纸吸去其表面水分），湿法装柱，取黄花草木犀提取液，以 2 BV/h 上样吸附，按树脂床体积收集流出液，过 0.45 μm 微孔滤膜，测定其中 3 种化合物的质量浓度，绘制泄漏曲线，结果见图 2。可见初始阶段流出液的质量浓度很小，当上样量增加到 8 BV 时，3 种成分均开始出现泄漏，并且随着时间的增加，芦丁和 clovin 迅速泄漏，分别于 20 BV 和 24 BV 泄漏完全，这可能是由于芦丁和 clovin 均属于黄酮苷类物质，性质相似，而香豆素不同芦丁和 clovin，且在吸附的过程吸附量相对较大，故泄漏缓慢，并于 36 BV 泄漏完全。为保证药效成分损失最小，应选择树脂的上样量为 2.4 g 生药/g 树脂。

$$\text{泄露率} = (C_0 - C_3) / C_0 \times 100\%$$

C_3 为动态吸附后指标成分的质量浓度

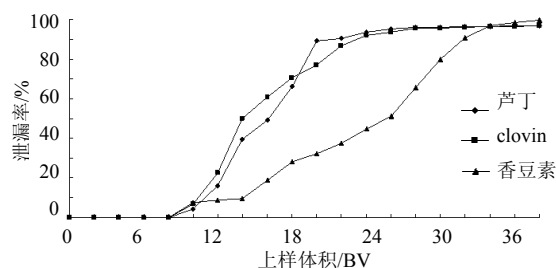


图 2 HPD-300 树脂吸附草木犀中 3 种成分的泄漏曲线
Fig. 2 Leakage curves of three components in *M. officinalis* adsorbed by HPD-300 resin

2.4.2 上样体积分量的考察 精密称取 5 份预处理好的 HPD-300 树脂（滤纸吸去其表面水分）2 g，湿法装柱，将相当于 4.8 g 生药量的草木犀提取液以 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 BV/h 不同的体积分量上样，吸附后的溶液过 0.45 μm 微孔滤膜，测定其中 3 种化合物的质量浓度，计算吸附率和平均吸附率，结果见表 2。

可见 3 种指标成分的平均吸附率分别为 80.30%、81.02%、81.59%、79.92%、76.24%。体积分量在 1~2 BV/h 时，平均吸附率缓慢上升，当体积分量在 2~2.5 BV/h 时，平均吸附率呈下降趋势，其原因可能是体积分量较大时，提取液与树脂接触的时间较短，不利于芦丁、clovin 和香豆素从液相扩散到树脂内部，使得吸附率下降。综合分析选择上样体积分量为 2 BV/h。

表 2 上样体积分量对吸附率的影响

Table 2 Effect of sample volume flow on adsorption rate

体积分量/BV	吸附率/%			平均吸附率/%
	芦丁	clovin	香豆素	
0.5	78.04	71.92	90.93	80.30
1.0	79.28	73.67	90.11	81.02
1.5	76.22	70.17	98.37	81.59
2.0	78.24	72.28	89.25	79.92
2.5	77.13	71.19	80.40	76.24

2.4.3 洗脱溶剂体积分数对吸附效果的考察 精密称取 HPD-300 大孔树脂 2 g，湿法装柱，将相当于 4.8 g 生药量的草木犀提取液以 2 BV/h 上样吸附，待吸附平衡后，先用 2 BV 去离子水洗去杂质，然后以 4 BV 的 10%、30%、50%、70%乙醇溶液以 2 BV/h 梯度洗脱，2 mL 为一个收集体积，收集洗脱液，过 0.45 μm 微孔滤膜，测定其中 3 种化合物的质量浓度，绘制每个洗脱浓度中最大解吸量的动态解吸曲线，结果见图 3。可见 3 种化合物均在 10% 乙醇时开始洗脱，芦丁和 clovin 在 30%乙醇部分洗脱完全，香豆素则主要在 50%、70%乙醇部分进行洗脱。为保证药效成分最大的洗脱量和工业化的生产成本，选择 50%乙醇洗脱溶剂最为合理。

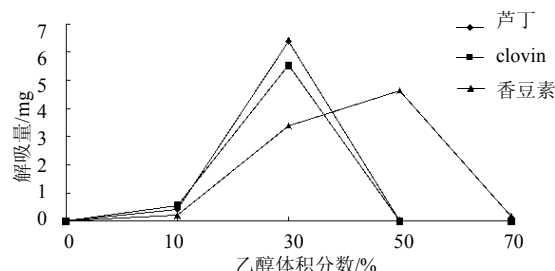


图 3 不同乙醇体积分数对解吸量的影响

Fig. 3 Effect of different ethanol concentration on desorption

2.4.4 HPD-300 树脂动态解吸试验 将上样吸附平衡的 HPD-300 树脂先以 2 BV 去离子水洗去杂质，然后用 50%乙醇溶液以 2 BV/h 进行洗脱，4 mL 为一个流分体积，收集洗脱液，洗脱液过 0.45 μm 微孔滤膜测定其中 3 种化合物的质量浓度，绘制动态解吸曲线，结果见图 4。可见 50%乙醇的洗脱曲线峰型集中，无明显拖尾现象，第 2 管时，解吸液中芦丁、clovin 和香豆素的解吸量达到最大值，第 7 管时，解吸液中的指标成分基本洗脱完全。因此，选取 7 BV（28 mL）为最佳洗脱液用量。

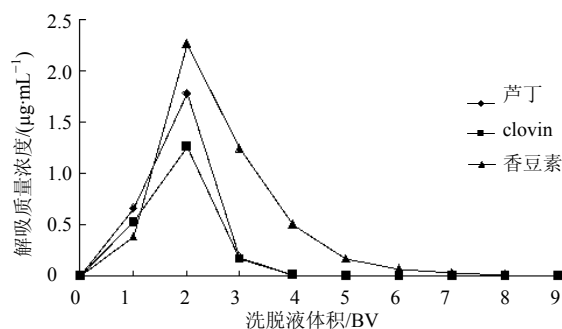


图4 HPD-300树脂的动态吸附曲线

Fig. 4 Dynamic adsorption curves on HPD-300 resin

2.5 验证试验

按已优选的最佳工艺条件：HPD-300树脂的上样量 2.4 g 生药/g 树脂，上样体积流量 2 BV/h，依次用 2 BV 水和 7 BV 50%乙醇洗脱，进行 3 次平行试验，收集洗脱液，浓缩至干，称定质量，计算 3 种化合物的质量分数和收率（收率=洗脱液中指标成分的总质量/上样液中各指标成分的总质量）。结果 3 种指标成分在提取液中的质量分数为 4.54%，经 HPD-300 大孔吸附树脂纯化后指标成分的质量分数为 35.75%；收率为 85.38%。可见采用大孔吸附树脂法分离纯化黄花草木犀中的药效成分的方法可操作行强、收率较高，可以达到较好的分离纯化效果等优点，可为纯化黄花草木犀的工业化生产提供数据参考。

3 讨论

树脂的纯净与否是实验的关键，未经过处理的树脂中存在着大量的水溶性及脂溶性杂质，这些杂质势必会影响指标成分的纯化过程。另外树脂中的气泡也会影响纯化中的柱效，故使用前需要对树脂进行酸、碱、醇和水的处理，并在处理的过程中将树脂充分溶胀，避免气泡干预^[10-12]。

树脂极性大小和空间结构是影响其吸附性能的重要因素，不同类型的大孔树脂的吸附性能不同。有机物是通过树脂的孔隙扩散到树脂内部而被吸附，因此树脂的孔隙、粒径和比表面积等均会对影响到树脂的吸附性能。HPD-300 大孔树脂为非极性物质，粒径为 0.3~1.2 mm，比表面积为 800~870 m²/g，平均孔径为 5.0~5.5 nm，洗脱性能良好^[13]。针对本研究所需要纯化的指标成分芦丁、clovin 和香豆素而言，HPD-300 树脂和香豆素属于非极性物

质，芦丁和 clovin 属于弱极性物质，且实验结果表明，HPD-300 树脂对 3 种指标成分的平均吸附率和解吸率相对较高，故确定 HPD-300 大孔树脂作为黄花草木犀中药效成分的最佳纯化树脂。

本实验通过对大孔树脂的纯化工艺考察，确定了其最佳纯化工艺：树脂上样量 2.4 g 生药/g 树脂，上样体积流量 2.0 BV/h，2 BV 水洗脱除杂后 7 BV 50%乙醇洗脱。实验中需要对黄花草木犀中两种不同类型的成分进行纯化，二者在性质方面多有差异，故需对实验结果进行综合分析评价，以确保对其药效成分进行最大程度优化。在此条件下芦丁、clovin、香豆素质量分数提升了 7.8 倍，平均收率为 85.38%。由此可以确定，采用大孔吸附树脂法分离纯化黄花草木犀中的药效成分的方法简单可行、富集效果良好。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准藏药 [S]. 1995.
- [2] 杨杰, 王丽莉, 周鑫堂, 等. 黄花草木犀化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(5): 622-625.
- [3] 孔令雷, 胡金凤, 陈乃宏. 香豆素类化合物药理和毒理作用的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(2): 165-169.
- [4] 杨杰, 王丽莉, 张铁军. 草木犀属植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(3): 443-454.
- [5] 林静. 芦丁的临床药理特点 [J]. 中国临床药理学杂志, 2009, 25(3): 256-263.
- [6] 李玉山. 芦丁的资源、药理及主要剂型研究进展 [J]. 氨基酸和生物资源, 2013, 35(3): 13-16.
- [7] 汤春妮. 黄花草木犀总黄酮的提取及鉴别 [J]. 安徽化工, 2014, 40(1): 27-28.
- [8] 石凤英, 赵军, 孙玉华. 大孔吸附树脂纯化两色金鸡菊总黄酮的工艺研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(3): 242-247.
- [9] Kicel A, Wolbiś M. Study on the phenolic constituents of the flowers and leaves of *Trifolium repens* L. [J]. Nat Prod Res, 2012, 26(21): 2050-2054.
- [10] 王国军, 唐辉, 张淑兰, 等. 大孔树脂纯化核桃隔膜总黄酮的工艺研究 [J]. 中草药, 2013, 44(19): 2688-2692.
- [11] 陶遵威, 张岩, 王文彤. 大孔吸附树脂对苦豆子多糖纯化工艺研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 515-518.
- [12] 王平, 吴金山, 郭丹, 等. 大孔树脂纯化菊米总黄酮的工艺研究 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(6): 455-459.
- [13] 丁立稳, 汤建萍, 杨书武, 等. HPD-300 大孔树脂吸附纯化荔枝核黄酮特性研究 [J]. 江西师范大学学报, 2013, 37(1): 74-78.