

## FL-1 多功能吸附树脂对沙棘叶总黄酮的分离纯化

欧来良<sup>1</sup>, 李家政<sup>2</sup>, 孔德欣<sup>1</sup>, 王瑞芳<sup>1</sup>, 史作清<sup>\*</sup>

(1. 南开大学 生物活性材料教育部重点实验室 分子生物学研究所, 天津 300071;

2. 天津大学 高分子材料研究所, 天津 300072)

**摘要:**目的 考察 FL-1 多功能吸附树脂对沙棘叶中总黄酮的分离纯化方法。方法 根据沙棘叶黄酮的结构特征, 考察了 FL-1 树脂的吸附性能, 并采用高效液相色谱法对沙棘叶总黄酮进行了定量分析。结果 FL-1 树脂对沙棘叶总黄酮具有较高的吸附选择性, 70% 乙醇作为脱附剂, 产品中总黄酮含量为 40.2%。结论 FL-1 树脂用于沙棘叶总黄酮的分离纯化简便有效。

**关键词:** 沙棘叶; 总黄酮; 吸附树脂 FL-1; 高效液相色谱

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2004)12-1349-03

### Separation and purification of total flavonoids from *Hippophae rhamnoides* leaves with FL-1 multifunctional resin

OU Lai-liang<sup>1</sup>, LI Jia-zheng<sup>2</sup>, KONG De-xin<sup>1</sup>, WANG Rui-fang<sup>1</sup>, SHI Zuo-qing<sup>1</sup>

(1. The Key Laboratory of Bioactive Materials, Ministry of Education, Institute of Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Institute of Polymer Materials, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract:** **Object** To study the method for separating and purifying the total flavonoids in *Hippophae rhamnoides* leaves (TFH) with multifunctional resin FL-1. **Methods** According to structural characteristic of the flavone, FL-1 resin was systematically studied for its adsorption capability. HPLC was used to measure the content of TFH. **Results** FL-1 resin can be used to produce the TFH with high quality. The purity of the TFH is 40.2% in the dried part of 70% ethanolic elution. **Conclusion** It is a simple and efficient method to separate the TFH from *H. rhamnoides* leaves with FL-1 resin.

**Key words:** *Hippophae rhamnoides* L. leaves; total flavonoids; multifunctional resin FL-1; HPLC

沙棘又名醋柳(sea buckthorn), 是我国藏医、蒙医常用药物, 具有祛痰、利肺、养胃、健脾、活血祛瘀的药理功效。现代药理研究表明, 沙棘黄酮是其发挥药效的主要活性成分, 具有调脂、降压、改善心肌缺血、抗肿瘤、抗辐射等功效。目前对沙棘研究的重点主要集中于沙棘果的开发利用, 有关沙棘叶的开发尚处于起步阶段。从沙棘叶中制备较高纯度的黄酮类化合物虽也有一定的文献报道, 但利用聚酰胺柱色谱、硅胶柱色谱、纸色谱实现的沙棘黄酮的分离, 都只局限于定性鉴别, 并未真正用于提取物的制备<sup>[1-4]</sup>。本实验通过多功能吸附树脂 FL-1 对沙棘黄酮的分离纯化, 确定了仅通过“吸附-脱附”即可得到较高纯度沙棘黄酮的生产工艺, 并采用高效液相色谱法对提取物中的总黄酮进行了定量分析。

#### 1 仪器与材料

高效液相色谱仪(Waters 公司), BSE-100 自动部分收集器, HL-2 恒流泵, BUCHER-144 型旋

转蒸发仪; 甲醇为色谱级, 其余试剂均为分析纯; 多功能吸附树脂 FL-1(自制); 槲皮素、山柰酚、异鼠李素对照品(中国药品生物制品检定所提供, 批号分别为: 0081-9914, 0081-9306, 0081-9905); 沙棘叶采摘自广西, 经国家水利部鉴定部门鉴定, 属胡颓子科沙棘属植物沙棘 *Hippophae rhamnoides* L. 的叶。

#### 2 方法与结果

2.1 树脂的预处理及再生: 取一定量的 FL-1 树脂, 装柱后用工业乙醇洗至加水不浑浊, 然后用蒸馏水洗至无醇味, 再用 3~4 倍床体积的 5% NaOH 处理, 水洗至中性, 备用。用 3~4 倍床体积 5% NaOH 即可再生。

2.2 沙棘叶上样溶液的制备: 称取沙棘叶(粉碎为直径 3 mm 左右) 100 g, 75% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 溶媒量分别为 10、6 倍。滤过后合并滤液, 减压回收乙醇, 滤去不溶物, 加水至 1 000 mL, 即得。

2.3 水解液的制备: 定量移取相当于 1.0 g 沙棘叶

\* 收稿日期: 2004-02-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29974015)

作者简介: 欧来良(1972—), 男, 博士。Tel: (022) 23500660 E-mail: ouyll001@eyou.com

的提取液于 50 mL 锥形瓶中,依次加入 30 mL 甲醇和 5 mL 25% 盐酸,于沸水浴中加热水解 1 h,冷却至室温后转入 50 mL 量瓶中,用甲醇洗涤 3 次,洗涤液转入量瓶,加甲醇至刻度。

2.4 色谱条件: 色谱柱: Kromasil C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-磷酸缓冲液(55:45:0.3); 体积流量: 0.8 mL/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 常温。

2.5 标准曲线的绘制: 精确称取槲皮素对照品 25 mg, 置 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并加至刻度。分别移取该溶液 0.2、0.5、1、2、5 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,分别进样 20 μL。结果槲皮素在 20~500 μg/mL 与峰面积线性关系良好,以峰面积对浓度作图得标准方程为:  $Y = 679.856 + 8.485544 X$ ,  $r = 0.9994$ 。

2.6 沙棘总黄酮纯度和产率的计算: 沙棘黄酮中几类苷元的分子在结构上极为相似,只是少数非强生色基团不同,而且相对分子质量也相差不多。因而它们对槲皮素的响应因子都应该接近 1,即只用槲皮素作为对照,产生的误差是可以忽略的,其转换因子可平均为 1.63。计算方程式如下:

$$\text{沙棘总黄酮纯度} = \text{槲皮素含量} \times 1.63$$

$$\text{沙棘提取物产率} = \frac{\text{沙棘提取物量}}{\text{沙棘原料投放量}} \times 100\%$$

2.7 不同洗脱溶剂对沙棘总黄酮纯度的影响: 对几种常用的溶剂吡啶、甲醇、乙醇、醋酸乙酯进行了考察,发现乙醇是一种较为理想的洗脱溶剂,结果见表 1。

表 1 不同洗脱剂对沙棘总黄酮纯度的影响

Table 1 Effect of different eluents on TFH purity

| 洗脱剂  | 纯度/% | 产率/% |
|------|------|------|
| 吡啶   | 14.2 | 5.29 |
| 甲醇   | 29.7 | 2.46 |
| 乙醇   | 30.8 | 2.20 |
| 丙酮   | 28.1 | 2.12 |
| 醋酸乙酯 | 22.0 | 1.81 |

2.8 沙棘黄酮在 FL-1 树脂上的动态吸附与洗脱: 精确量取 10 mL 上述经预处理的树脂,装入交换柱(30 cm × 1.0 cm),通入样品溶液足量,控制吸附流速为 1 BV/h,分步收集流出液,采用比色法测定流出液中总黄酮的量<sup>[5]</sup>,树脂对总黄酮的吸附量(mg/mL)按下式计算。

$$\text{吸附量} = \frac{(\text{原液质量浓度} - \text{流出液质量浓度}) \times \text{吸附体积}}{\text{树脂体积}}$$

吸附饱和后的树脂用纯水淋洗至中性,70%乙醇解吸(控制流速 1 BV/h),分步收集解吸液,依次

测定总黄酮质量浓度,分别绘制吸附曲线和解吸曲线。见图 1、2。可以看出,吸附或洗脱流速为 1 BV/h 时,10 mL FL-1 树脂可以处理 50 mL 的上柱液,即相当于 5 g 沙棘叶而不致泄露。70% 乙醇为洗脱剂时,4 BV 即可完全洗脱。

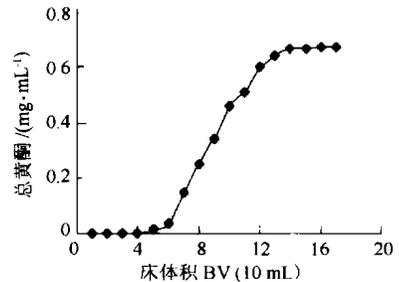


图 1 沙棘总黄酮在 FL-1 树脂上的动态吸附曲线

Fig. 1 Dynamic adsorption curve of TFH on FL-1 resin

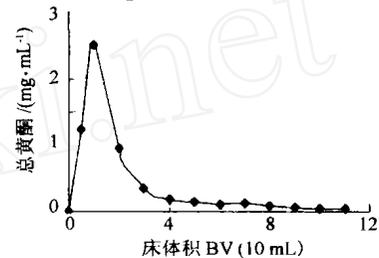


图 2 70% 乙醇洗脱 FL-1 树脂上沙棘总黄酮的动态洗脱曲线

Fig. 2 Dynamic desorption curve of TFH eluted by 70% ethanol on FL-1 resin

2.9 洗脱剂浓度的选择: 取上述经预处理的树脂各 20 mL 分别装入 3 支交换柱,分别取样品溶液各 100 mL 通入,控制流速 1 BV/h,吸附完毕后,用蒸馏水洗至中性,然后分别用 90%、70%、50% 乙醇洗脱,得洗脱液,浓缩、真空干燥、粉碎得浅黄色粉末。结果见表 2、图 3。结果显示,随着乙醇体积分数的提高,纯度相应降低,50% 乙醇作为洗脱剂虽然得到了较高纯度的产品,但却大大牺牲了产率。综合看出 70% 乙醇是较为理想的洗脱剂。

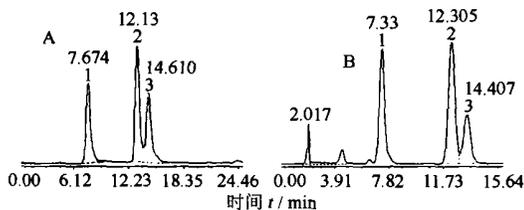
表 2 洗脱剂不同体积分数对纯度和产率的影响

Table 2 Effect of eluent concentration on purity and yield of TFH

| 洗脱剂    | 纯度/% | 产率/% |
|--------|------|------|
| 50% 乙醇 | 41.5 | 1.02 |
| 70% 乙醇 | 37.1 | 1.68 |
| 90% 乙醇 | 30.7 | 2.06 |

### 3 讨论

研究结果表明,FL-1 树脂对沙棘叶中黄酮类化合物具有良好的分离纯化效果,原因主要有以下几点: 第一,从黄酮类的结构来看,它具有极性的糖基



1-槲皮素 2-山柰酚 3-异鼠李素  
1-quercetin 2-kaempferol 3-isorhamnetin

图 3 混合对照品(A)和沙棘叶提取物水解液(B)的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and TFH hydrolysate (B)

和非极性的黄酮母核,使其总体显示弱极性,但其又具有酚羟基结构,可以作为一个良好的氢键供体。而 FL-1 树脂是具有一定胺基和羰基含量的中极性高比表面积吸附树脂,酚羟基与羰基之间、与胺基均可以形成专一性较高的氢键作用,表面吸附的存在更加强了这种作用,正是由于这种多点协同吸附作用导致了所得沙棘叶总黄酮的纯度大大提高。第二,合适洗脱剂的选择是其中另一个重要的原因,树脂对不同的物质的吸附作用力大小不同,通过洗脱剂的筛选将能够使吸附力不同的物质分开,就 FL-1 树脂对沙棘叶总黄酮的吸附而言,具有弱碱性的吡啶所得产物纯度最低,产率最高,说明吡啶对黄酮和杂

质均具有较高的洗脱率,洗脱选择性较差;醋酸乙酯极性较小,对黄酮和杂质成分的洗脱效果均较差;甲醇、乙醇和丙酮的极性较大,在有效破坏氢键的同时,也能有效破坏黄酮苷元与树脂之间的物理吸附力,而对非极性的杂质洗脱效果较差,从而起到选择性洗脱的效果。考虑到经济和安全,选择乙醇作为洗脱剂最为理想。

从 FL-1 树脂对沙棘黄酮的吸附性能研究可以看出,每次处理沙棘叶质量与树脂的体积比为 1:2 较为理想,70% 乙醇作为洗脱剂,4 倍床体积则可以基本完全洗脱。这也说明 FL-1 树脂对沙棘黄酮具有良好的吸附洗脱性能。

References:

- [1] Zhang X, Su M Y. Advances in research of pharmacological activities of *Hippophae* [J]. *Hippophae*, 1999, 12, (3): 40-44.
- [2] Xiao Z, Peng W Z, Zhu B, et al. The inhibitory effect of total flavonoids of *Hippophae* on the activation of NF- $\kappa$ B by stretching cultured cardiac myocytes [J]. *J Sichuan Univ Med Sci* (四川大学学报·医学版), 2003, 34(2): 283-285.
- [3] Yu Y, Qu SM, He Y S. Effect of lowering blood-lipid by extract of *Hippophae rhamnoides* leaves [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(9): 824-825.
- [4] Li J S, Yang Y, Fu J M, et al. Research on the extraction craft of the total flavonoids of *Hippophae rhamnoides* leaves [J]. *Hippophae*, 1999, 12, (4): 34-35.
- [5] Guo Y J, Fan L, Wang X G, et al. Discussion about  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  colorimetry for determination of total flavonoids [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2002, 22(2): 97-99.

## 补肾活血煎的絮凝工艺研究

沈 霞, 张文清, 夏 玮\*  
(华东理工大学 化学系, 上海 200237)

**摘要:**目的 探讨壳聚糖絮凝法代替醇沉法用于补肾活血煎澄清工艺的可行性。方法 壳聚糖用于补肾活血煎的澄清,通过对总固形物、淫羊藿苷含量的测定,对壳聚糖的用量、药液浓缩比进行了优选,并与醇沉工艺进行了比较。结果 壳聚糖絮凝法与醇沉法同样能使药液澄清,在有效成分的保留上,前者优于后者。结论 壳聚糖絮凝法能代替醇沉法用于补肾活血煎的澄清工艺。

**关键词:** 补肾活血煎; 壳聚糖; 淫羊藿苷; 絮凝工艺

中图分类号: R 284. 2; R 286. 02

文献标识码: B

文章编号: 0253 - 2670(2004)12 - 1351 - 04

### Flocculation procedure on Bushenhuoxue Decoction

SHEN Xia, ZHANG Wen-qing, XIA Wei

(Department of Chemistry, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** **Object** To study the feasibility of flocculation procedure on Bushenhuoxue Decoction, using chitosan instead of alcohol. **Methods** Using chitosan clarifier to the flocculation procedure of Bushen-

\* 收稿日期: 2004-02-22

基金项目: 上海市教育基金会资助项目(033)

作者简介: 沈 霞(1980—),女,上海人,2002年毕业于上海中医药大学中药学专业,现就读于华东理工大学分析化学专业硕士研究生,研究方向为中药制剂、中药质量标准的研究。Tel: (021) 64253221 E-mail: joice\_sx@hotmail.com