

大孔吸附树脂纯化山蜡梅叶中总黄酮的研究

张亚梅¹, 张小娟¹, 简 晖^{1,2*}, 冯育林^{1,2*}, 王跃生^{1,2}, 杨世林^{1,2}

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006; 2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 研究大孔树脂纯化山蜡梅叶中总黄酮的工艺条件及参数。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; 又以总黄酮质量浓度为指标, 考察了最佳树脂纯化山蜡梅叶中总黄酮的工艺参数。结果 8 种树脂中, HPD400 树脂对山蜡梅叶中总黄酮纯化效果较好, 其总黄酮的静态吸附量达到 17.77 mg/g 树脂, 解吸率为 92.24%; 动态吸附量为 1.68 g/g 树脂, 用 4 倍柱体积蒸馏水、4 倍柱体积 30% 乙醇洗脱除去杂质后, 换用 70% 乙醇 6 倍柱体积洗脱, 总黄酮质量分数为 31.4%, 总黄酮转移率为 88.4%。结论 HPD400 型大孔树脂在所确定的工艺条件下, 可较好地纯化山蜡梅叶总黄酮。

关键词: 山蜡梅叶; 总黄酮; 大孔吸附树脂

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)08-1226-04

Purification of total flavones from leaves of *Chimonanthus nitens* by macroporous adsorption resins

ZHANG Ya-mei¹, ZHANG Xiao-juan¹, JIAN Hui^{1,2}, FENG Yu-lin^{1,2},
WANG Yue-sheng^{1,2}, YANG Shi-lin^{1,2}

(1. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Materia Medica, Nanchang 330006, China;

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

Abstract : Objective To investigate the technological parameters of the purification process of total flavones from the leaves of *Chimonanthus nitens* with macroporous adsorption resins. **Methods** Taking the static elution ratio and static absorption ratio as indexes, the static adsorption-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. **Results** The HPD400 macroporous resin among eight types of resins was found with the best separating efficiency, by which the dynamic absorption capacity could reach 1.68 g (crude drug)/g. Static absorption capacity and desorption ratio were 17.77 mg/g and 92.24%, respectively. After eluted with 4 BV of distilled water and 4 BV of 30% ethanol, eluant was changed with 6 BV of 70% ethanol, the yield of total flavones was 31.4% and product purity was 88.4%. **Conclusion** With definite technical process, the HPD400 macroporous adsorption resin could be used to purify the extract in the leaves of *C. nitens*.

Key words : the leaves of *Chimonanthus nitens* Oliv.; total flavones; macroporous adsorption resin

山蜡梅 *Chimonanthus nitens* Oliv. 又名亮叶蜡梅、野蜡梅, 为我国特有的蜡梅科蜡梅属植物, 药用部位为其干燥叶, 主要分布于江苏、安徽、浙江、江西等地, 生于山地树林下或路旁、溪边, 全年均可采, 以夏、秋季采收为佳^[1]。山蜡梅性温、味辛, 具有祛风解表、清热解毒之功效, 主治流感、中暑、慢性支气管炎、湿困胸闷、蚊虫叮咬。山蜡梅叶制剂主要是颗粒

剂, 临床上用于治疗风热感冒、发热、恶寒、咽痛等症, 质量标准鉴别为总黄酮、生物碱的显色反应和总黄酮的测定^[2]。山蜡梅中总黄酮主要是槲皮素和山柰酚及其与葡萄糖、鼠李糖形成的苷^[3]。本课题组前期药理研究证明山蜡梅总黄酮为山蜡梅叶治疗感冒的主要活性部位之一, 故本实验以山蜡梅叶中总黄酮为评价指标, 对 8 种不同类型的大孔吸附树脂

* 收稿日期: 2008-10-27

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划课题(2006BAI06A18-09, 2006BAI06A01-01); 江西省卫生厅中医药科研计划课题(2008A060)

作者简介: 张亚梅(1982—), 女, 陕西彬县人, 助理研究员, 硕士, 从事新药的研究与开发。Tel: (0791)7119631 E-mail: zym@zjt.com

* 通讯作者 简 晖 Tel: (0791)7119659 E-mail: jianhui126@126.com

冯育林 Tel: (0791)7119632 E-mail: fengyulin2003@hotmail.com

进行了筛选,并着重考察了大孔吸附树脂分离纯化山蜡梅叶总黄酮的工艺条件与参数,旨在寻找选择性强、吸附容量大且易于解吸的树脂,为新药开发中大规模提取分离山蜡梅叶总黄酮提供技术支持。

1 仪器与材料

UV2550 型紫外-可见分光光度计, A UW220D 十万分之一分析天平, KQ—250 型超声波清洗器, 101—3—BS—型电热恒温鼓风干燥箱。

HPD100、HPD400、NKA-9、HPD700 型大孔吸附树脂由河北沧州宝恩化工有限责任公司提供, D-101、AB-8 型大孔吸附树脂由天津南开大学化工厂提供, HP-20 型大孔吸附树脂由日本三菱化成株式会社提供, NKA-9 型大孔吸附树脂由天津市海光化工有限公司提供。芦丁对照品(批号 10080-200306)由中国药品生物制品检定所提供。所用试剂均为分析纯。

山蜡梅叶购于江西婺源,经江西中医学院龚千峰教授鉴定为蜡梅科植物山蜡梅 *C. nitens* Oliv. 的叶。

2 方法与结果

2.1 上样液制备:称取含总黄酮质量分数为 1.15% 的山蜡梅药材粗粉 200 g,加 10 倍量 30% 乙醇回流提取两次,每次 1.5 h,滤过,合并滤液,减压浓缩至无醇味,加水定容至含生药 0.4 g/mL,储存备用。

2.2 山蜡梅总黄酮的测定

2.2.1 标准曲线的绘制^[4]:精密称取于 120℃ 干燥至恒重的芦丁对照品 20 mg,用无水甲醇定容至 100 mL 量瓶中,精密吸取该液 0、0.2、0.5、1.0、1.5、2.5、3 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇至 5 mL 后,分别加 5% NaNO₂ 0.3 mL,摇匀、静置 6 min;加 10% Al(NO₃)₃ 0.3 mL,摇匀、静置 6 min;加 4% NaOH 4 mL,加水稀释至刻度,摇匀、静置 15 min。去除芦丁,照上述方法加试剂得空白对照品,在 500 nm 波长处测吸光度(A)值。以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程 $A = 0.9513 C - 0.0016$, $r = 0.999$,线性范围为 4~60 μg/mL。

2.2.2 测定方法:取一定量山蜡梅上样液浓缩至干后,用无水甲醇溶解并定容至 25 mL,取 1 mL 上述溶液于 10 mL 量瓶中,按 2.2.1 项所述操作测定 A 值,计算其总黄酮质量浓度为 4.48 mg/mL。

2.3 树脂型号的筛选研究

2.3.1 大孔树脂预处理及含水量的测定:选择 HPD100、HPD400、HPD 700、HPD 450、AB-8、D-

101、NKA-9 树脂为研究对象。分别用 95% 乙醇在室温下密封浸泡 24 h,使其充分溶胀后,湿法装柱(40 cm × 1.7 cm),继续用 95% 乙醇冲洗树脂柱,直至流出的乙醇冲洗液与蒸馏水等量混合无浑浊,即以大量的蒸馏水洗至无乙醇味,密封、备用。取少量树脂,用干燥法测定含水量。

2.3.2 静态吸附曲线的绘制:精密称取上述 8 种大孔树脂,每份相当于相应的干树脂 2.00 g,分装入 150 mL 具塞锥形瓶中,精密加入上柱液 10 mL(相当于 0.4 g 生药/mL),避光密封,每 30 min 振摇 1 次,持续 2 h,并与 0、2、4、6、8、12、24 h 吸取上清液 1 mL 按 2.2.2 项下操作测定 A 值,计算不同时间各树脂对山蜡梅总黄酮的吸附量,并绘制等温吸附曲线,结果见图 1。可见,在 6 h 时, NKA-9 树脂和 HPD400 树脂已基本达到吸附平衡,且吸附量较其他树脂大。

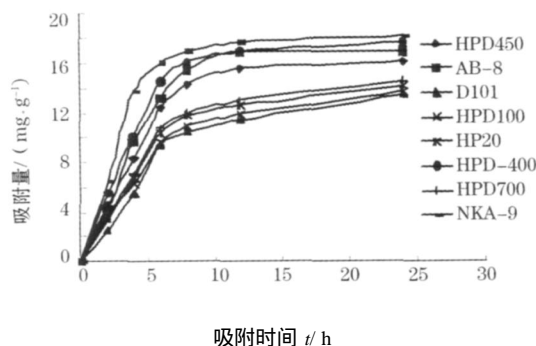


图 1 8 种树脂对山蜡梅叶中总黄酮的静态吸附曲线
Fig. 1 Static absorption curves of total flavones in leaves of *C. nitens* with eight types of resins

2.3.3 静态吸附-解吸试验^[4]:分别精密量取上样液 10 mL(上样总黄酮量 44.8 mg),加到预处理好的各型号大孔树脂中,静态吸附 24 h,上样液滤过,吸取上层液适量,按 2.2.2 项下操作测定 A 值,计算总黄酮的质量浓度。滤出的各树脂另置于 150 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 100 mL,每隔 30 min 振摇 1 min,8 h 后滤过,滤液浓缩至干,用甲醇溶解并定容至 100 mL,精密量取各滤液 2 mL,按 2.2.2 项下操作测定 A 值,计算解吸率,剩余样液减压蒸干,得固体样品,称定质量,计算总黄酮的质量分数。按下式计算静态饱和吸附量、洗脱量、静态解吸率及总黄酮质量分数。结果见表 1。可见, NKA-9 和 HPD400 型大孔树脂对山蜡梅总黄酮的吸附性能最好;但从洗脱率和总黄酮质量分数考察却显示为中等极性树脂 HPD-400 效果较 NKA-9 和其他类型树脂均较好。综合分析,HPD400 树脂为山蜡梅总黄酮分离纯化的最佳树脂。

饱和吸附量 = (上样液中总黄酮的质量浓度 × 体积 - 吸附后溶液中总黄酮的质量浓度 × 体积) / 干树脂质量

洗脱量 = 洗脱液中总黄酮的质量 / 干树脂质量

解吸率 = (洗脱液质量浓度 × 体积) / 饱和吸附量 × 100 %

总黄酮质量分数 = 洗脱液中总黄酮的质量 / 洗脱液的浸膏量 × 100 %

表 1 8 种树脂对山蜡梅总黄酮的静态吸附和解吸性能

Table 1 Absorption-desorption capacity of total flavone in leaves of *C. nitens* with eight types of resins

树脂类型	饱和吸附量/ (mg · g ⁻¹ 干树脂)	洗脱量/ (mg · g ⁻¹ 干树脂)	解吸率 / %	总黄酮质量分数 / %
AB-8	17.01	15.28	89.85	27.52
HPD400	17.77	16.39	92.24	31.34
HPD700	14.53	11.13	76.58	10.69
HPD450	16.14	14.19	87.91	26.04
D101	13.51	10.71	79.29	19.81
HPD100	13.69	10.52	76.84	18.11
NKA-9	18.24	11.82	64.80	11.27
HP20	14.14	11.32	80.06	19.57

2.4 HPD400 树脂分离纯化山蜡梅总黄酮的工艺

2.4.1 上样液质量浓度及洗脱流速的确定:称取处理好的 HPD400 型树脂 6 份(均相当于干树脂 4 g),湿法装柱。取山蜡梅上样液(总黄酮质量浓度为 4.48 mg/mL)10 mL,分别加水稀释 0、1、3 倍,每个质量浓度上柱液均平行 2 份上树脂柱,以 2 mL/min 的流速吸附完全后,上柱液质量浓度相同的树脂按两种流速(2、4 mL/min)洗脱,先以 4 倍柱体积水冲洗,再换用 4 倍柱体积 70%乙醇洗脱,收集洗脱液,得液体样品。按 2.2.2 项下操作测定 A 值后,计算总黄酮质量浓度及样品中总黄酮的质量分数,结果见表 2。可见,在上柱液中总黄酮质量固定的情况下,改变上柱液质量浓度对总黄酮收率无明显影响,但考虑到上样量为 0.4 mg/mL 时,上样液中有少量沉淀会影响树脂的吸附,故将药液稀释 1 倍,即当质量浓度相当于原生药 0.2 g/mL 上柱即可;洗脱液流速在 2 mL/min 时较 4 mL/min 的总黄酮转移率(总黄酮转移率 = 洗脱液中总黄酮质量 / 上样液中总黄酮质量 × 100%)和质量分数均较高,因此,确定上样量质量浓度为 0.2 g 生药/mL,洗脱流速确定在 2 mL/min。

2.4.2 上样量的确定:准确称取处理好的 HPD400 树脂装柱(相当于干树脂 5 g),精密吸取相当于 10 g 生药材的山蜡梅上样液 25 mL,稀释至 50 mL,以流速为 2 mL/min 通过树脂柱,每 3 mL 接收一次流出液,并测定每份流出液中的总黄酮质量浓度,以柱体积与流出液中总黄酮质量浓度做图,见图 2。结果显示,在上样液的质量浓度为 0.2 g 生药/mL 时,

表 2 上样液质量浓度及洗脱流速的影响

Table 2 Effect of feed concentration and eluting speed on total flavone in leaves of *C. nitens*

样液浓度/ (g · mL ⁻¹)	洗脱液流速/ (mL · min ⁻¹)	上柱总黄酮量/mg	醇洗脱总黄酮量/mg	总黄酮转移率 / %	总黄酮质量分数 / %
0.1	2	44.8	29.71	88.42	31.33
	4	44.8	29.66	88.27	31.22
0.2	2	44.8	29.72	88.44	31.34
	4	44.8	29.65	88.24	31.19
0.4	2	44.8	29.69	88.36	31.32
	4	44.8	29.68	88.33	31.31

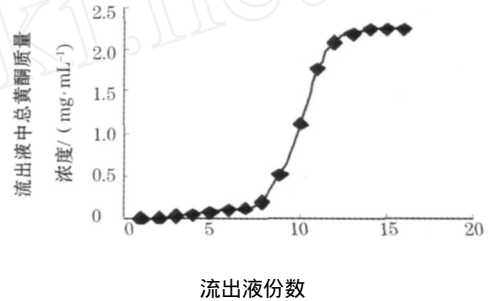


图 2 HPD400 树脂吸附总黄酮的动态吸附曲线

Fig 2 Dynamic adsorption curve of total flavone with HPD400 resin

总黄酮的泄漏点是每克树脂吸附生药量为 0.72 g,饱和点是每克树脂吸附生药量为 1.68 g。

2.4.3 洗脱溶媒的确定:精密吸取山蜡梅上柱液 20 mL,以 2 mL/min 的流速连续通过 HPD400 树脂柱,依次用水,30%、50%、70%、90%乙醇洗脱(洗脱剂用量均为 4 BV),分段收集洗脱液,测定各段中的总黄酮的质量浓度,结果见表 3。可见山蜡梅总黄酮主要集中在 50%~70%乙醇洗脱部分。

表 3 洗脱溶剂的极性对总黄酮的影响

Table 3 Effect of eluent polarity on total flavones

洗脱剂	总黄酮/ (mg · g ⁻¹)	总黄酮质量分数 / %	总黄酮转移率 / %
水	0	0	0
30%乙醇	0.248	1.08	2.21
50%乙醇	5.639	17.62	50.34
70%乙醇	4.470	41.04	39.94
95%乙醇	0.318	4.07	2.83

2.4.4 洗脱剂用量的考察:按上述确定的洗脱溶媒条件,取山蜡梅上柱液 10 mL 进行上柱,依次用水、30%乙醇分别洗脱 4 BV 后,换用 70%乙醇洗脱,控制流速 2 mL/min,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质量浓度,计算总黄酮回收率,以解吸液质量浓度和洗脱液收集份数绘制解吸曲线,见图 3。合并 70%乙醇洗脱部分各流份,减压蒸干后称定质量,计算总黄酮质量分数。结果在第 6 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,且总黄酮

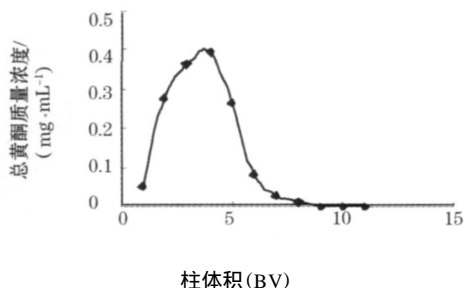


图3 HPD400树脂的动态解吸曲线

Fig 3 Dynamic desorption curve of HPD400 resin

回收率为88.4%,质量分数为31.4%,故确定洗脱剂用量为6倍量树脂柱体积。

2.4.5 树脂使用次数的考察:按照优选出来的最佳工艺,准确称取相当于50g干树脂的已处理HPD400树脂,湿法装柱,上样量为饱和点的80%,质量浓度为0.2g生药材/mL,待吸附完全,依次用水,30%乙醇水溶液4倍柱体积洗脱后,换用6倍柱体积70%乙醇溶液以0.2mL/min的流速洗脱,收集洗脱液,为1个周期,重复试验。将各次收集的洗脱液按2.2.2项操作测定总黄酮质量浓度后减压浓缩,干燥得固体样品,称定质量,计算每个周期总黄酮回收率。结果重复使用至第5周期时,由于山蜡梅提取物中含有大量叶绿素,树脂颜色变绿,残留在树脂上的杂质较多,使吸附能力减弱,总黄酮收率降到了39.8%,已不符合产品要求,需要进行再生处理。

2.4.6 再生试验研究:树脂柱先用95%乙醇洗脱至无色后,再用1%的氢氧化钠水溶液4倍柱体积洗脱,控制流速1mL/min,最后用大量蒸馏水洗至pH值为中性,换用1%盐酸水溶液4倍柱体积洗脱,最后用大量蒸馏水洗至pH值为中性即可。再生后,该树脂总黄酮收率仍可达到73%以上。经过2次再生后,树脂不可再用。

3 讨论

不同类型的树脂对山蜡梅总黄酮的吸附性能均为(NKA-9) > 中等极性树脂(HPD-400) > 弱极性树脂(HPD-450、AB-8) > 非极性树脂(HPD-100、HPD-700、HP-20、D101),显示极性树脂和中等极性树脂对山蜡梅总黄酮具有较好的吸附解吸性能;但解吸率和总黄酮质量分数却显示为弱极性树脂中等极性树脂(HPD-400) > 弱极性树脂(HPD-450、AB-8) > 非极性树脂(HPD-100、HPD-700、HP-20、D101) > 极性树脂(NKA-9)。

HPD400型大孔吸附树脂对山蜡梅总黄酮具有良好的吸附性能,其工艺条件为上样液质量浓度为0.2g生药材/mL,上样生药量与干树脂的质量比小于1.68:1;吸附6h后基本饱和,依次用水、30%乙醇溶液4BV洗脱后,换用6BV70%乙醇溶液洗脱,洗脱速率为2mL/min,总黄酮收率为88.4%,质量分数为31.4%;树脂经2次再生后可连续使用10个周期。

研究结果表明HPD400树脂具有较大的吸附量,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,实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,从而为进一步开发有效部位新药提供参考。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999.
- [2] 刘耀明,冯淑香,肖柄坤. 山蜡梅颗粒的质量标准研究[J]. 中药新药与临床药理,2003,14(3):185-188.
- [3] 李少华,胡满根,江玢,等. VIS法测定山蜡梅冲剂中的总黄酮含量[J]. 江西医学院学报,1999,34(4):87-88.
- [4] 盛萍,帕丽达·阿不力孜,刘波,等. 大孔树脂吸附法富集野菊花总黄酮的工艺研究[J]. 中草药,2006,37(8):1170-1173.

罐组逆流提取荷叶生物碱的研究

黄鑫,周永传*,陈德煦

(华东理工大学中药现代化工程中心,上海 200237)

摘要:目的 采用罐组逆流提取技术提取荷叶中的荷叶生物碱并优化其工艺条件。方法 采用分光光度法测定荷叶生物碱。按 $L_{16}(4^4)$ 正交设计表设计试验,分别考察提取时间、提取温度、固液比和乙醇体积分数4个因素的影响。结果 通过极差分析得出罐组逆流提取荷叶生物碱的最佳工艺条件为:提取时间25min,提取温度80℃,固液比1:10,乙醇体积分数70%。

* 收稿日期:2008-10-14

作者简介:黄鑫(1984—),男,江苏镇江人,华东理工大学药学院硕士研究生,研究方向为中草药有效成分的提取与纯化。

Tel:015921545525 E-mail:ashura-00@hotmail.com

*通讯作者 周永传 Tel:(021)64253329 E-mail:xdeng@ecust.edu.cn