

# 大孔吸附树脂法纯化黄芩总黄酮工艺的研究

王春民,刘刚,费艳,赵卉,杨冬丽,王睿

(承德颈复康药业集团有限公司,河北承德 067000)

**摘要:**目的 考察 8 种大孔吸附树脂对黄芩总黄酮的分离纯化的影响,优选出纯化黄芩总黄酮的大孔吸附树脂,并确定纯化黄芩总黄酮的工艺参数。方法 以黄芩总黄酮为考察指标,采用静态和动态吸附两种方法,优选出对黄芩总黄酮吸附性能最佳的大孔吸附树脂,并对其工艺进行筛选,确定了纯化黄芩总黄酮的最佳工艺参数。结果 AB-8 型大孔吸附树脂对黄芩总黄酮有最佳的吸附分离性能,其纯化黄芩总黄酮的工艺条件为:黄芩提取液直接上样,最大上样体积为 3 BV,洗脱剂为 70%乙醇,洗脱剂用量为 7 BV。结论 AB-8 型大孔吸附树脂在所确定的工艺条件下,纯化黄芩总黄酮效果良好。

**关键词:**黄芩;总黄酮;大孔吸附树脂;纯化

**中图分类号:**R284.2;R286.02

**文献标识码:**A

**文章编号:**0253-2670(2010)01-0058-03

黄芩是唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,性寒味苦,具有清热燥湿、泻火解毒的功效,其有效成分黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素等黄酮类化合物具有抗氧化、抗炎、抗变态、抗菌、抗病毒及抗肿瘤等广泛药理作用。以往只是对黄芩中的黄芩苷进行提取,黄芩中的其他黄酮类成分没有被充分利用,因此研究纯化黄芩总黄酮的生产工艺显得尤为重要。目前大孔吸附树脂分离纯化技术在中草药有效成分的提取分离中得到了日益广泛的应用,其优点在于吸附容量大、再生简单、效果可靠,尤其适合分离纯化苷类、黄酮类、皂苷类等成分<sup>[1-3]</sup>。由于大孔吸附树脂品种多,在结构、极性、孔径等性能指标上均有不同,因此寻找具有良好选择性、吸附容量大、易解吸的树脂,对于充分利用黄芩资源,改善中药制剂质量具有积极意义。本实验对 8 种型号大孔树脂进行了比较,采用静态吸附和动态吸附方法优选出纯化黄芩中总黄酮的最佳的树脂,之后对此大孔吸附树脂富集纯化黄芩总黄酮的工艺条件进行研究,探讨其工艺流程,以其为开发黄芩总黄酮为主要成分的中药新药提供物质基础。

## 1 仪器与材料

UC-2401PC 紫外分光光度计(日本岛津),Mettler A104 分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司),CX520 型超声波清洗机(北京医疗设备二厂)。

黄芩药材为市售,经承德颈复康药业集团有限公司张雪荣高级工程师鉴定为唇形科植物黄芩 *S. baicalensis* Georgi 的干燥根。黄芩苷对照品(中国

药品生物制品检定所,批号 110715-200514);无水乙醇(分析纯),高纯水。D4020(批号 060405)、NKA-II(批号 060113)、D3520(批号 061018)、D4006(批号 060102)、NKA-9(批号 060110)、X-5(批号 060821)、D-101(批号 070305)、AB-8(批号 060905)大孔树脂均购自天津市海光化工有限公司。

## 2 方法与结果

2.1 上柱液的制备:称取黄芩药材粗粉(粉碎粒度为 10 目),加 8 倍量水,煎煮 1.5 h,煎煮 3 次,合并煎煮液,备用。

### 2.2 黄芩总黄酮的测定<sup>[4]</sup>

2.2.1 标准曲线的制备:精密称取在 60℃减压干燥 4 h 的黄芩苷对照品 2.38 mg,用 70%乙醇超声至完全溶解,定容至 10 mL,摇匀,作为对照品溶液。精密吸取对照品溶液 0.1、0.14、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 于 10 mL 量瓶中,再用 70%乙醇定容至刻度,以 70%乙醇为空白,于 278 nm 处测定吸光度(A)。以质量浓度(C)为横坐标,吸光度为纵坐标,得回归曲线方程  $A = 0.06 C + 0.0256 (r = 0.9995)$ 。

2.2.2 样品溶液的测定:取样品液稀释到一定质量浓度,于 278 nm 处测定吸光度值,按回归曲线方程计算样品液中总黄酮的质量浓度。

2.3 上柱液中总黄酮的测定:煎煮液适当稀释,在 278 nm 处测定吸光度,代入回归曲线方程,计算得总黄酮的质量浓度为 13.8 mg/mL,折算含生药量为 62.2 mg/mL。

### 2.4 大孔树脂型号的筛选

收稿日期:2009-03-07

基金项目:河北道地中药材产业体系建设示范研究项目(072764442)

作者简介:王春民(1968—),男,河北承德人,硕士,高级工程师,长期从事新药研发工作,发表论文 10 余篇。

Tel: (0314) 2292453 E-mail: cdtcmwchm@yahoo.com

2.4.1 静态吸附行为的考察:取已处理好的 8 种大孔树脂各 1 g(湿质量),置 100 mL 具塞锥形瓶中,分别精密加入上样液 15 mL,时时振摇 24 h,滤过,滤液适当稀释后测定吸光度,计算静态吸附量和吸附率。加 95%乙醇 40 mL 于锥形瓶中,时时振摇 24 h,滤过,同法测定吸光度,计算滤液中总黄酮的质量浓度,并得到解吸量和解吸率,结果见表 1。可以看出,AB-8 和 D-101 两种树脂的静态吸附结果明显好于其他 6 种树脂,其静态吸附黄芩总黄酮量高达 130.43 mg/g(湿质量)树脂和 134 mg/g(湿质量)树脂。

吸附量 = (上样液中总黄酮的质量浓度 × 样液的体积 - 水洗液中总黄酮的质量浓度 × 水洗液的体积) / 树脂的质量

吸附率 = (上样液中总黄酮的质量浓度 × 样液的体积 - 水洗液中总黄酮的质量浓度 × 水洗液的体积) / 上样液中总黄酮的质量浓度 × 样液的体积 × 100%

解吸量 = 醇洗液中总黄酮的质量浓度 × 醇洗液的体积 / 树脂的质量 × 100%

解吸率 = 醇洗液中总黄酮的质量浓度 × 醇洗液的体积 / (上样液中总黄酮的质量浓度 × 样液的体积 - 水洗液中总黄酮的质量浓度 × 水洗液的体积) × 100%

表 1 8 种型号树脂对黄芩总黄酮的静态吸附行为

Table 1 Static adsorption of total flavonoids in *S. baicalensis* by eight types of macroreticular resins

树脂类型	吸附量/ (mg · g <sup>-1</sup> )	吸附率/ %	解吸量/ (mg · g <sup>-1</sup> )	解吸率/ %
NKA-II	20.29	10.13	11.24	55.39
D3520	61.96	30.88	44.96	72.56
NKA-9	46.87	23.41	33.93	72.40
X-5	124.22	62.08	70.88	57.06
D4020	101.97	50.80	65.40	64.14
D4006	103.13	51.63	63.32	61.39
AB-8	130.43	65.07	76.33	58.52
D-101	134.75	67.40	85.10	63.15

2.4.2 动态吸附行为的考察:分别称取 8 种大孔吸附树脂,每种 10 g(湿质量),分别湿法装柱。将已知浓度的上样液分别通过这 8 种大孔树脂柱,进行动态吸附,上样完成后用蒸馏水洗涤树脂柱至水洗液呈无色,水洗液与流出液合并,体积 V<sub>1</sub>,紫外分光光度法测定总黄酮的浓度 C<sub>1</sub>。再各用 95%的乙醇以相同的体积流量进行洗脱,收集洗脱液,测定洗脱液的体积 V<sub>2</sub>,依法测定洗脱液中总黄酮的浓度 C<sub>2</sub>,根据回归曲线方程计算,评价吸附和解吸附效果。测定结果见表 2。结果表明,动态吸附的考察结果和静态吸附的考察结果基本一致,综合考虑选择 AB-8 型大孔吸附树脂作为纯化黄芩总黄酮的最佳大孔吸附树脂。

表 2 8 种型号树脂对黄芩总黄酮的动态吸附行为

Table 2 Dynamic adsorption of total flavonoids in *S. baicalensis* by eight types of macroreticular resin

树脂类型	吸附量/ (mg · g <sup>-1</sup> )	吸附率/ %	解吸量/ (mg · g <sup>-1</sup> )	解吸率/ %
NKA-II	9.10	9.28	4.14	45.46
D3520	24.60	25.10	23.53	95.66
NKA-9	16.90	17.28	11.36	67.06
X-5	63.30	64.59	40.90	64.61
D4020	51.30	52.34	41.78	81.45
D4006	46.88	47.84	34.28	73.12
AB-8	55.13	56.26	46.57	84.46
D-101	62.97	64.25	47.23	75.01

2.5 工艺研究

2.5.1 上样质量浓度的考察:将黄芩煎煮液适当稀释,分别通过 AB-8 型大孔吸附树脂,保持上样量和体积流量相同,考察不同的上样质量浓度对大孔吸附树脂吸附效果的影响,结果见表 3。结果表明不同上样质量浓度对 AB-8 型大孔吸附树脂的吸附行为影响不大,因此选择黄芩煎煮液直接上样,有利于操作。

表 3 不同上样质量浓度对吸附效果的影响

Table 3 Effect of different concentration on adsorption

上样质量浓度/(mg · mL <sup>-1</sup> )	吸附量/(mg · g <sup>-1</sup> )	吸附率/ %
3.4	61.00	66.95
6.9	57.88	68.10
13.8	59.70	67.15

2.5.2 泄漏曲线的绘制:按上述所确定的吸附条件,进行动态吸附,分段收集流出液。每份 10 mL,收集 25 份。以测定黄芩总黄酮质量浓度为考察指标,绘制泄漏曲线,结果见图 1。可以看出,当上样大约 40~50 mL(3~4 BV)时,黄芩总黄酮就已经明显泄漏了,因此确定最大上样量为 3 BV 的样品液。

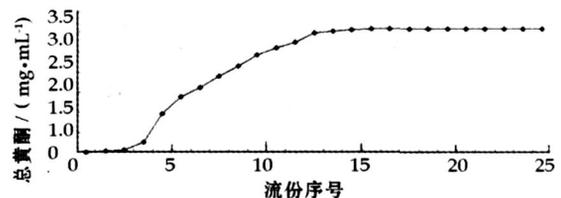


图 1 泄漏曲线

Fig 1 Leakage curve

2.5.3 洗脱剂的选择:按所确定的吸附条件饱和 AB-8 型大孔吸附树脂,先用 100 mL 水进行洗脱,再依次用 10%、30%、50%、70%、95%乙醇各 100 mL 洗脱,体积流量为 1 mL/min,收集洗脱液,以黄芩总黄酮质量为考察指标,绘制梯度洗脱曲线,结果见图 2。可以看出,95%乙醇洗脱液中已经几乎没有黄芩总黄酮了,选择太低体积分数的乙醇洗脱液

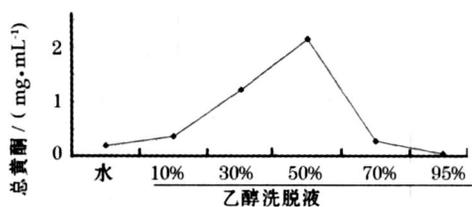


图 2 洗脱剂体积分数的选择曲线

Fig 2 Curve of different concentration of eluting agent

需要较大用量才能将吸附的黄芩总黄酮洗脱出来,因此选择 70%乙醇作为洗脱剂。

2.5.4 洗脱剂用量的选择:按所确定的吸附条件饱和 AB-8 型大孔吸附树脂,用蒸馏水洗至无色,然后用 70%乙醇洗脱,体积流量为 1 mL/min,每份收集 15 mL (1 个柱体积),共收集 10 份,以总黄酮质量浓度为考察指标,绘制曲线,结果见图 3。结果表明,7 BV 的 70%乙醇能将 98%以上树脂所吸附的黄芩总黄酮类成分洗脱下来,因此确定洗脱黄芩总黄酮的洗脱剂的用量为 7 BV。

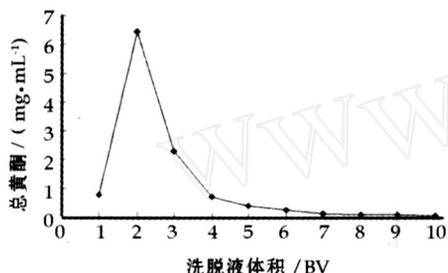


图 3 洗脱剂用量的选择曲线

Fig 3 Curve of volume of eluting agent

2.5.5 树脂重复使用次数的考察:按照上述所确定的吸附和洗脱条件,取样品液进行上柱、吸附、洗脱,在同一根树脂柱上重复操作 4 次,分别计算 4 次总

黄酮吸附量,结果第 4 次使用时黄芩总黄酮吸附量已明显下降,说明 AB-8 型大孔吸附树脂重复使用 3 次后,需要再生才可继续使用。

2.5.6 验证试验:按照上述所确定的纯化黄芩总黄酮吸附和洗脱条件,取样品液进行上柱、吸附、洗脱,黄芩总黄酮的得率为 18.69%,总黄酮的质量分数 93.89%,回收率为 81.11%。可以看出,经 AB-8 型大孔吸附树脂纯化后,黄芩总黄酮的出膏率明显减低,除杂效果好,质量分数达到 90%以上。

### 3 讨论

AB-8 型大孔吸附树脂对黄芩总黄酮有较大的静态吸附量,其静态吸附黄芩总黄酮量高达 130.43 mg/g (湿质量)树脂,也较容易解吸附(解吸率 58.52%),表现出良好的分离纯化能力;同时其动态吸附-洗脱性能也比较稳定,即动态吸附黄芩总黄酮量高达 55.13 mg/g (湿质量)树脂,解吸率 84.46%。AB-8 型大孔吸附树脂对黄芩总黄酮有很好的吸附和解吸作用。

用 70%乙醇洗脱后,能将 98%以上树脂所吸附的黄芩总黄酮类成分洗脱下来;且黄芩总黄酮的质量分数较高,达 90%以上,因此,此工艺可用于生产黄芩总黄酮,而且树脂可以再生,成本较低,无污染,生产周期短,适合大规模生产。

### 参考文献:

- [1] 李伯庭. 大孔吸附树脂在天然产物分离中的应用[J]. 中草药, 1990, 21(8): 42-44.
- [2] 邹节明, 陆浩, 何斌, 等. 苦玄参、黄芩与黄柏的大孔树脂提取研究[J]. 中草药, 2003, 34(3): 222-226.
- [3] 马振山. 大孔吸附树脂在药学领域中的应用[J]. 中成药, 1997, 19(12): 40.
- [4] 刘颖, 魏元锋, 蒋伟, 等. 大孔树脂对黄芩黄酮吸附的初步研究[J]. 湖北中医学院学报, 2005, 7(2): 28-29.

## 加纳籽中 5-羟基色氨酸的树脂纯化研究

刘岱琳<sup>1,2</sup>, 董晋泉<sup>1</sup>, 孙华庚<sup>1</sup>, 刘丹<sup>1</sup>, 於洪建<sup>1</sup>

(1. 天津尖峰天然产物研究开发有限公司, 天津 300457; 2. 中国人民武装警察部队医学院 生药教研室, 天津 300162)

**摘要:**目的 研究不同树脂对加纳籽中 5-羟基色氨酸的吸附性能, 筛选出对 5-羟基色氨酸具有较高选择性的树脂。方法 考察了 6 种树脂对 5-羟基色氨酸的静态吸附性能, 选出最优吸附树脂 G6104, 考察温度、不同 pH 值对 G6104 的吸附性能的影响以及 G6104 对 5-羟基色氨酸静态和动态的吸附性能, 并采用 HPLC 法分析 5-羟基色氨酸。结果 G6104 型树脂对 5-羟基色氨酸的吸附能力最强, 树脂的处理量为 0.9 g/g, 其在 30℃, pH 2~3 时对 5-羟基色氨酸吸附效果较好; 动态洗脱时, 氨水的浓度对洗脱影响很大, 30%氨水为最佳洗脱液。结论 G6104 型树脂对 5-羟基色氨酸具有较强的吸附选择性, 是一种较为理想的 5-羟基色氨酸分离纯化的介质, 有望利用其进行高

收稿日期: 2009-04-06

作者简介: 刘岱琳(1973—), 女, 博士, 主要从事天然产物活性成分的分离及其产业化工艺研究。

Tel: (022) 66237090-8026 E-mail: dailinch@163.com