

大孔吸附树脂分离纯化藤茶总黄酮的研究

易海燕, 何桂霞*, 欧阳文, 李 斌, 刘赫男

湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

摘 要: 目的 研究不同大孔树脂对藤茶总黄酮的吸附及解吸性能, 为分离纯化藤茶总黄酮提供选择树脂的依据。方法 以藤茶总黄酮质量浓度、洗脱率及总黄酮回收率为指标, 通过考察静态和动态吸附试验, 筛选最佳大孔吸附树脂分离纯化藤茶总黄酮的工艺条件。结果 HPD-100 大孔树脂对藤茶总黄酮的静态饱和吸附容量为 314.50 mg/g 干树脂, 静态洗脱率为 97.81%; 最佳动态吸附质量浓度为 1.3~2.0 mg/mL、动态饱和吸附量为 257.6 mg/g 干树脂, 吸附速度为 1 mL/min; 树脂柱吸附 30 min 后, 先以蒸馏水洗脱至洗脱液无色, 再用 80 倍干树脂的 70%乙醇以 1 mL/min 洗脱。结论 HPD-100 大孔树脂较适合分离纯化藤茶总黄酮, 藤茶总黄酮质量分数从 69.09%提高到 83.74%, 洗脱率高达 78.20%, 总黄酮回收率达 77.23%。

关键词: 藤茶; 总黄酮; HPD-100 大孔吸附树脂; 分离; 纯化

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)01-0074-04

Separation and purification of total flavones in *Ampelopsis grossedentata* by macroporous resins

YI Hai-yan, HE Gui-xia, OUYANG Wen, LI Bin, LIU He-nan

College of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Key words: *Ampelopsis grossedentata* (Hand.-Mazz.) W. T. Wang; total flavonoids; HPD-100 macroporous resin; separation; purification

藤茶又名显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand.-Mazz.) W. T. Wang, 是葡萄科蛇葡萄属的一种野生藤本植物, 主要分布于广东、广西、湖南、湖北等省区^[1-2]。湖南江华县瑶族山乡百姓采集茎叶, 经揉制、干燥, 用于防治感冒、中暑、肠胃不适等, 相传已有数百年应用历史。该药性味甘淡, 功效清热解毒, 主治黄疸型肝炎、感冒风热、咽喉肿痛, 还具有解酒作用^[3-4]。藤茶中主要有效成分为黄酮类化合物, 并以二氢杨梅素的量为最高^[5-6]。药理实验表明, 二氢杨梅素具有明显拮抗 Na 和高 K 所致的兔胸主动脉条收缩反应及钙拮抗作用, 且毒性低, 可作为抗心律失常、心肌缺血、高血压, 护肝的新型药物^[7-9], 该药材制成的袋泡茶在临床上用于高血压及冠心病辅助治疗已取得明显效果。因此本实验采用大孔吸附树脂对藤茶总黄酮的分离纯化工艺进行了研究, 旨在为新药的研制开发中利用该技术制备藤茶总黄酮提供帮助。

1 材料与仪器

藤茶药材购于湖南岳阳药材公司, 经湖南中医

药大学中药鉴定教研室彭菲教授鉴定为葡萄科蛇葡萄属显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand.-Mazz.) W. T. Wang 的嫩茎叶; AB-8、NKA-9、HPD-100、D-101 型大孔吸附树脂 (沧州宝恩化工有限公司), 二氢杨梅素对照品 (自制, 经光谱鉴定结构, 质量分数 98%以上); 试剂均为国产分析纯。Agilent LC-1200 高效液相色谱仪; UV-160 紫外分光光度计 (北京瑞丽分析仪器有限公司); FA2104 万分之一电子天平 (上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 藤茶总黄酮的测定^[10]

2.1.1 对照品溶液的配制 精密称取真空 70 °C 干燥至恒重的二氢杨梅素对照品 6.6 mg, 乙醇溶解并定容至 25 mL, 从中吸取 0.8 mL, 定容至 10 mL, 得 21.21 ng/mL 对照品溶液, 备用。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密吸取 21.21 ng/mL 对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加入 2% $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ 甲醇溶液 0.4 mL,

收稿日期: 2010-04-12

基金项目: 湖南省教育厅科学研究资助项目 (07C498); 湖南省重点学科中药学资助项目

作者简介: 易海燕 (1986—), 女, 湖南省宁乡人, 湖南中医药大学药学院 2008 级硕士研究生。

*通讯作者 何桂霞 Tel: (0731)88458240 Fax: (0731)88458227 E-mail: heguixia65@yahoo.cn

再加 95%乙醇定容至刻度,摇匀,室温避光放置 1 h 后于 318 nm 下测定吸光度。以质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,计算得回归方程为 $Y=0.0516X-0.0003$, $r=0.9998$ 。

2.1.3 测定 供试品溶液适量,置 10 mL 量瓶中,精密吸取一定量,分别按“2.1.2”项下方法操作,测定吸光度,计算供试品溶液中总黄酮的质量浓度。

2.2 上样溶液的制备

取干燥藤茶 50 g,以 70%乙醇 300 mL 回流提取 2 次,每次 1 h。合并提取液,回收乙醇,得浸膏。取浸膏适量,加适量蒸馏水进行溶解,收集母液,作为上样液(总黄酮质量浓度为 4.026 mg/mL)。

2.3 树脂的预处理及含水量的测定

取 4 种大孔树脂适量,分别用乙醇浸泡 24 h,充分溶胀,用 95%乙醇冲洗,至洗出液按 1:5 加蒸馏水无白色浑浊现象,再用蒸馏水洗至无醇味,处理后的树脂密封保存,备用。取少量树脂,抽干

后,测定各树脂的含水量,见表 1。

表 1 大孔树脂性质和含水量

Table 1 Properties and moisture of macroporous resins

树脂类型	极性	含水量/%	孔径/nm	比表面积/ ($\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$)
D-101	非极性	63.50	10	400
HPD-100	非极性	69.00	9~10	650~700
NKA-9	极性	72.50	1.55~1.65	250~290
AB-8	弱极性	68.00	1.3~1.4	480~520

2.4 藤茶总黄酮的静态吸附性能的考察

2.4.1 树脂比吸附量的测定 精密称取上述处理好的 4 种吸附树脂(每份相当于干树脂 4 g)置 500 mL 锥形瓶中,分别加入 400 mL 上样液,室温振摇吸附,于 1、2、4、6、8、10 h 吸取上清液测定吸光度,计算在各时刻树脂对藤茶总黄酮的比吸附量,见表 2。可以看出 4 种大孔树脂静态吸附 10 h 后基本达到饱和,且 HPD-100 的比吸附量最大。

表 2 静态吸附性能

Table 2 Properties of static adsorption

树脂类型	吸附量/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)						
	0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h
AB-8	131.03	212.41	254.22	273.50	280.68	280.92	282.55
NKA-9	138.20	192.52	243.00	274.38	282.05	287.60	289.23
HPD-100	128.90	210.58	264.42	302.97	310.90	313.07	314.50
D-101	125.85	164.49	198.00	214.37	219.60	223.17	221.74

2.4.2 藤茶总黄酮的静态解吸附性能的考察 将 4 种吸附饱和的树脂滤出,水洗,滤纸吸干,每种树脂等分成 4 份,每份相当于各干树脂 1.0 g,各精密加入 30%、50%、70%、90%乙醇 40 mL,振摇 6 h,静置 24 h,收集每份乙醇洗脱液,依法测定吸光度,测定其总黄酮的量。剩余洗脱液回收乙醇,干燥,称定质量,计算浸膏中总黄酮的量。结合吸附量计算解吸率,并与原液的测定结果比较,计算总黄酮的回收率(总黄酮回收率=过柱后藤茶总黄酮质量/过柱前藤茶总黄酮质量 $\times 100\%$),结果见表 3。

可以看出 HPD-100 的吸附量、解吸率和总黄酮回收率均最高,所以 HPD-100 为最佳树脂,70%乙醇为最佳洗脱剂。

2.5 HPD-100 大孔树脂动态吸附条件的考察

2.5.1 原液质量浓度对吸附的影响 取 5 根已处理好的 HPD-100 树脂柱(相当于 1 g 干树脂,径高比为 1:22),精密量取 5 份总黄酮质量浓度为 4.026 mg/mL 的藤茶水溶液 10 mL,分别加入蒸馏水 0、5、10、15、20 mL,混匀后上柱,体积流量为 1 mL/min,分别收集过柱液,测定质量浓度,计算吸附量,结

表 3 静态解吸附性能

Table 3 Properties of static desorption

树脂类型	30%乙醇		50%乙醇		70%乙醇		90%乙醇	
	解吸率/%	总黄酮回收率/%	解吸率/%	总黄酮回收率/%	解吸率/%	总黄酮回收率/%	解吸率/%	总黄酮回收率/%
AB-8	71.18	49.96	90.60	63.58	92.91	65.21	96.56	67.76
NKA-9	60.27	43.30	91.72	65.89	96.56	69.28	97.98	70.51
HPD-100	70.08	54.74	89.38	69.82	97.81	76.41	97.22	75.94
D-101	84.34	45.91	91.4	50.37	96.17	52.97	97.84	53.89

果见表 4。结果表明,质量浓度是影响吸附纯化的重要因素,藤茶总黄酮与大孔树脂间发生了以吸附为主的作用。实验中上样液质量浓度越小,总黄酮被吸附量越大。因此选择最佳吸附质量浓度为 1.3~2.0 mg/mL。

表 4 上样液质量浓度对总黄酮的影响
Table 4 Effect of various sample concentration on total flavones

上柱液质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	吸附量/(mg·g ⁻¹)
4.026	31.2
2.684	32.8
2.013	34.2
1.610	36.3
1.342	35.8

2.5.2 吸附流量对吸附的影响 取 5 根已处理好的 HPD-100 树脂柱(相当于 1 g 干树脂,径高比为 1:22),用 25 mL 总黄酮质量浓度为 1.610 mg/mL 的藤茶水溶液上样。吸附流量分别为 1、2、3 mL/min。过柱液定容,测定吸光度,计算得树脂动态吸附量分别为 36.4、33.3、32.1 mg/g。结果表明,随着流量的增加吸附量减少,最佳流量为 1 mL/min。

2.5.3 HPD-100 大孔树脂动态吸附曲线的绘制及上样量的确定 取含总黄酮 1.610 mg/mL 的藤茶水溶液,以流量为 1 mL/min 上样于已处理好的 HPD-100 树脂柱(相当于 1 g 干树脂,径高比为 1:22)分段收集洗脱液,每个树脂体积(湿体积 16mL)收集 1 份,共收集 17 份,分别测定吸光度,计算黄酮的质量浓度,结果见图 1。可知当上样达 10 BV 时,树脂开始泻漏,上样 14 BV 时达到饱和。从而确定上样量为 257.6 mg/g 干树脂。

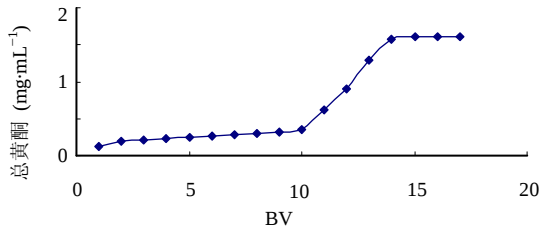


图 1 HPD-100 大孔树脂的动态吸附曲线
Fig. 1 Dynamic adsorption curve of HPD-100 macroporous resin

2.6 HPD-100 大孔树脂动态解吸附条件的考察

2.6.1 洗脱剂的考察 取 4 根达到吸附饱和的 HPD-100 树脂柱,分别用蒸馏水洗脱至洗脱液近无

色,再分别用 30%、50%、70%、90%乙醇以 1 mL/min 洗脱,以 FeCl₃ 反应为指标,洗脱至反应呈阴性。收集乙醇洗脱液,测定其总黄酮的量。剩余洗脱液回收乙醇,干燥称定质量,计算浸膏中总黄酮的质量分数,并计算总黄酮回收率,结果见表 5。结果表明,用 70%乙醇作为洗脱剂,总黄酮质量分数和总黄酮回收率均最高。

2.6.2 洗脱剂流量的考察 取 3 根达到吸附饱和的 HPD-100 树脂柱,分别用蒸馏水洗脱至洗脱液近无色,再用 70%乙醇分别以 1、2、3 mL/min 洗脱,以 FeCl₃ 反应为指标,洗脱至反应呈阴性。收集乙醇洗脱液,测定其总黄酮的量。剩余洗脱液回收乙醇,干燥称定质量,计算浸膏中总黄酮的质量分数,并计算总黄酮回收率,结果见表 6。结果表明,流量为 1 mL/min,总黄酮质量分数和总黄酮回收率均最高。

表 5 洗脱剂体积分数对总黄酮的影响
Table 5 Effect of elution concentration on total flavones

乙醇体积分数/%	乙醇用量/mL	总黄酮质量分数/%	总黄酮回收率/%
30	160	54.55	35.44
50	140	71.64	70.78
70	80	85.43	76.70
90	70	65.02	60.28

表 6 不同洗脱流量的比较
Table 6 Comparison of various current velocities

洗脱流量/(mL·min ⁻¹)	洗脱用量/mL	总黄酮质量分数/%	总黄酮回收率/%
1	80	84.21	76.6
2	160	75.32	61.0
3	160	50.26	36.2

2.6.3 最佳吸附时间的考察 精密吸取 1.610 mg/mL 藤茶溶液 160 mL(按开始泄漏时上样量确定),分别通过 4 根树脂柱(1 g 干树脂)后,分别静置 5、15、30、60 min,4 根树脂柱分别用等量蒸馏水洗脱至洗脱液无色,再用 70%乙醇洗脱,以 FeCl₃ 反应为指标,洗脱至反应呈阴性。收集乙醇洗脱液,测定其总黄酮的量。剩余洗脱液回收乙醇,干燥称定质量,计算浸膏中总黄酮的质量分数,并计算总黄酮回收率,结果见表 7。结果表明,静置 30 min 后总黄酮质量分数与其回收率均最高,时间过长或过短均偏低,这可能与时间过长解吸困难,时间过短吸附不完全有关。故确定最佳吸附时间为 30 min。

表7 不同吸附时间的比较
Table 7 Comparison of various adsorption times

吸附时间/min	总黄酮质量分数/%	总黄酮回收率/%
5	76.92	94.0
15	72.75	75.6
30	82.34	77.4
60	70.22	69.7

2.6.4 洗脱剂用量的考察 精密量取 1.610 mg/mL 藤茶溶液 160 mL (按开始泻露时上样量确定), 通过已处理好的 HPD-100 树脂柱(相当于 1 g 干树脂, 径高比为 1:22), 以 1 mL/min 过柱, 吸附 30 min 后, 先用蒸馏水洗脱至无色, 再用 70%乙醇, 以 1 mL/min 洗脱, 每 1 BV (湿体积 16 mL) 收集 1 份, 共收集 5 份, 测定其总黄酮的量。剩余洗脱液回收乙醇, 干燥, 称定质量, 计算浸膏中总黄酮的质量分数, 结果见表 8。结果表明, 第 5 份洗脱液中总黄酮的量已经很少, 可认为树脂上吸附的总黄酮已经洗脱完全, 故确定洗脱剂的用量为 80 mL, 相当于 80 mL/g 干树脂。

表8 不同流份中总黄酮的比较
Table 8 Comparison of total flavones in various flowing capacities

流份/BV	洗脱剂中总黄酮/mg	总黄酮质量分数/%
1	119.841	87.32
2	67.221	72.43
3	8.398	70.63
4	4.438	69.78
5	1.286	55.33

2.7 纯化藤茶总黄酮的验证试验

量取 1 280 mL 质量浓度为 1.610 mg/mL 藤茶溶液, 通过已处理好的 HPD-100 树脂柱 (相当于 8 g 干树脂), 以 1 mL/min 过柱, 吸附 30 min 后, 先用蒸馏水洗脱至无色, 再用 70%乙醇, 以 1 mL/min 洗脱, 洗脱剂用量为 640 mL, 收集乙醇洗脱液, 测定其总黄酮的量。剩余洗脱液回收乙醇, 干燥, 称定质量, 计算浸膏中总黄酮的质量分数, 并计算总黄酮回收率。相同条件的试验重复做 3 次, 结果见表 9。可见 HPD-100 大孔树脂纯化藤茶总黄酮后, 藤茶提取液中总黄酮的质量分数从 69.12% 提高到 83.74%, 洗脱率达到 78.20%, 回收率为 77.23%。

3 讨论

本实验证实了 HPD-100 型大孔吸附树脂纯化藤茶提取液中总黄酮不仅具有吸附快、解吸率高等

表9 HPD-100 大孔树脂纯化藤茶总黄酮试验的验证
Table 9 Verification of total flavones in *A. grossedentata* purified by HPD-100 macroporous resin

试验号	原液提取物 中总黄酮/%	纯化后总 黄酮/%	洗脱率/%	回收率/%
1	68.87	83.94	78.16	77.36
2	69.08	83.10	79.11	77.24
3	69.32	84.20	77.34	77.10
平均值	69.09±0.23	83.74±0.57	78.20±0.88	77.23±0.11

特点, 而且具有吸附容量较大、洗脱率高等优点, 具有一定的推广应用价值。

HPD-100 型树脂对藤茶总黄酮有良好的吸附性能, 纯化工艺为: 总黄酮质量浓度为 2.0~1.3 mg/mL 的藤茶水溶液以 1 mL/min 上 HPD-100 大孔吸附树脂, 吸附饱和 30 min 后用蒸馏水洗脱至溶液无色, 再用 80 倍干树脂的 70%乙醇以 1 mL/min 洗脱。收集乙醇洗脱液, 回收乙醇, 干燥, 即得大孔树脂纯化的藤茶总黄酮。在此条件下, 用 HPD-100 型树脂吸附分离总黄酮, 藤茶提取液中总黄酮的质量分数从 69.12% 提高到 83.74%, 洗脱率达到了 78.20%, 总黄酮回收率达 77.23% 以上, 工艺基本稳定可行。

参考文献

- [1] 中国高等植物研究所. 中国高等植物图鉴·补编 [M]. 第 2 册. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] 刘建新, 周天达. 藤茶的生药学研究 [J]. 中草药, 1999, 30(6): 459-463.
- [3] 全国中草药汇编编写组. 中草药汇编 [M]. 下册. 北京: 人民卫生出版社, 1997.
- [4] 刘建新. 瑶旗藤茶对兔肠平滑肌的影响和解痉实验研究 [J]. 中国民族医药杂志, 1998, 4(2): 43-44.
- [5] 张友胜, 杨伟丽, 崔春. 显齿蛇葡萄化学成分的研究 [J]. 中草药, 2003, 34(5): 402-403.
- [6] 李瑛琦, 于治国, 陆文超. HPLC 法测定藤茶中双氢杨梅黄素和杨梅黄素的含量 [J]. 中草药, 2003, 34(12): 1098-1100.
- [7] 周雪仙, 周天达. 江华瑶族藤茶的药理研究 [J]. 中国民族医药杂志, 1996, 2(4): 42.
- [8] 周天达, 周雪仙. 藤茶中双氢黄酮醇的分离结构鉴定及药理活性 [J]. 中国药理学杂志, 1996, 31(8): 458.
- [9] 梁婷, 吴春福, 吕艳青, 等. 二氢杨梅素对痤疮丙酸杆菌和脂多糖诱发小鼠肝损伤的保护作用及对中性粒细胞释放白三烯的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(1): 83-87.
- [10] 何桂霞, 杨伟丽, 裴刚, 等. 藤茶不同采收时期及不同部位的总黄酮考察 [J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(1): 13-15.