

大孔吸附树脂富集纯化广金钱草总黄酮的工艺研究

张 蕾¹, 韩 坚¹, 冯志强², 李庆国¹, 关世侠¹, 廖琼峰^{1*}

1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006

2. 中山大学药学院, 广东 广州 510080

摘 要: 目的 对大孔树脂富集纯化广金钱草总黄酮的工艺条件进行初步探索。方法 采用紫外-可见分光光度法, 以总黄酮吸附率、解吸率为评价指标, 通过考察树脂类型、原料液质量浓度、pH 值、上样体积流量、解吸溶剂、水除杂用量、最佳上样量、醇洗脱体积流量、洗脱体积及绘制树脂静态吸附平衡曲线、泄露曲线和动态解吸曲线, 综合评判确定最优工艺。结果 DM-130 树脂富集纯化效果较好, 其对广金钱草总黄酮的适宜吸附和解吸条件为: 吸附原料液质量浓度为 8.0 mg/mL, pH 值为 4.0~6.0, 上样体积流量为 3 BV/h; 解吸先用 4 BV 的水除杂, 再用 50%乙醇洗脱, 洗脱剂用量为 5 BV, 体积流量为 2.0 BV/h。结论 DM-130 树脂可用于广金钱草总黄酮的富集纯化, 该方法具有操作简单、成本低廉、精制效果突出等特点, 具有较高的工业生产应用价值。

关键词: 广金钱草; 总黄酮; 大孔树脂; 富集纯化; 紫外-可见分光光度法

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)12-2442-05

Enrichment and purification technology for total flavonoids from aerial part of *Desmodium styracifolium* by macroporous resin

ZHANG Lei¹, HAN Jian¹, FENG Zhi-qiang², LI Qing-guo¹, GUAN Shi-xia¹, LIAO Qiong-feng¹

1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Abstract: **Objective** To primarily study the enrichment and purification technology of total flavonoids from *Desmodium styracifolium* with macroporous resin. **Methods** Taking the adsorption rate and desorption rate as the appraisal target, the ultraviolet-visible spectrophotometry was applied for studying the optimal enrichment technique through evaluating the impact of resin type, original concentration, pH value, flow rate, desorption solvent, water used for purification, the optimal sample amount, flow rate, solvent volume, static adsorption equilibrium curve, overload curve, and dynamic desorption curve. **Results** It was proved that DM-130 resin could effectively enrich the total flavonoids from *D. styracifolium*. The preferred condition for the procedure was as following: original concentration of 8.0 mg/mL, pH value of 4.0—6.0, flow rate for sampling of 3 BV/h, removing impurities by 4 BV of water and then eluting the total flavonoids with 50% ethanol for 5 BV at flow rate of 2.0 BV/h. **Conclusion** DM-130 resin can be used for purification and enrichment of total flavonoids from *D. styracifolium*, which has the characteristics of easy operation, low cost, highlight purification effect, and high industrial production value.

Key words: aerial part of *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr.; total flavonoids; macroporous resin; enrichment and purification; ultraviolet-visible spectrophotometry

广金钱草为豆科植物广金钱草 *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr. 的干燥地上部分, 主产于广西、广东、福建等省^[1-2], 具有清热除湿、利尿通淋之功效^[3-4]。文献记载广金钱草化学成分有黄酮、生物碱、酚类、鞣质等, 其中黄酮类成分为其主要药效成分^[5-7]。近年来, 国内外对广金钱草黄酮类成分

的研究主要集中在单体化合物的分离和结构鉴定方面, 但关于该部位的富集和纯化研究尚未见报道。大孔树脂以其吸附快、吸附容量大、解吸率高及再生简便等优点, 而被广泛应用于中药化学成分分离纯化^[8-10]。本实验系统考察了 7 种大孔树脂对广金钱草总黄酮的吸附、解吸性能, 并对筛选出的

收稿日期: 2011-04-02

作者简介: 张 蕾, 副教授, 博士, 研究方向为中药药效物质基础和中药药动学。Tel: (020)39358081 E-mail: zhanglei261291@yahoo.com.cn

*通讯作者 廖琼峰 Tel: 13729840080 E-mail: liaoqf2075@yahoo.com

DM-130 型树脂的精制分离工艺做了进一步的研究, 确定了适宜的吸附、解吸的工艺条件。

1 仪器和材料

WFZ UV—2100 型紫外-可见分光光度计(尤尼柯仪器有限公司); XS225A 型分析天平(瑞士普利赛斯公司); GKC21CR4 可控硅恒温水浴锅(上海锦屏仪器仪表有限公司); HY—4 调速多用振荡器(江苏金坛市宏华仪器厂); DA-201、NKA-II、DM-301、DM-130、NKA-9、AB-8、D-101 型大孔吸附树脂(天津海光化工有限公司); 芦丁对照品(批号 080-9303, 中国药品生物制品检定所); 广金钱草药材购自广州致信药业有限公司, 经广州中医药大学药用植物学教研室周劲松副教授鉴定为豆科植物广金钱草 *Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr. 的干燥地上部分; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 分析方法^[1]

2.1.1 对照品溶液的制备 取芦丁对照品适量, 精密称定, 用 50%乙醇溶解并稀释成 51.4 μg/mL 对照品溶液。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密吸取芦丁对照品溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 分别置 6 个 10 mL 量瓶中, 加入 0.1 mol/L AlCl₃ 溶液 1.0 mL, HAc-NaOH 缓冲溶液 (pH 5.5) 1.0 mL, 用 50%乙醇稀释至刻度, 摇匀, 在 272 nm 处测定吸光度 (*A*) 值, 以对照品 *A* 值为纵坐标, 质量浓度 (*C*) 为横坐标, 绘制标准曲线。结果表明芦丁在 2.57~25.70 μg/mL 与 *A* 值呈良好线性关系, 回归方程为 $A=0.0378C+0.0132$, $r=0.9999$ 。

2.1.3 供试品溶液的制备及测定方法 取广金钱草药材粉末 (40 目, 总黄酮质量分数为 2.34%) 适量, 于 80 °C 水浴中, 用 20 倍量 50%乙醇回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 提取液经滤纸滤过后, 稀释至适宜的质量浓度, 备用。精密吸取原液、经静态和动态吸附后药液适量, 置于 10 mL 量瓶中, 按“标准曲线的绘制”项下操作, 经 AlCl₃-HAc 显色后在 272 nm 处测定 *A* 值, 计算总黄酮的量。

2.2 树脂的筛选

精密称取表 1 中各型号树脂约 1.0 g (干质量), 置 150 mL 具塞三角瓶中, 精密加入广金钱草供试液 (含总黄酮 8.0 mg/mL) 20 mL、去离子水 20 mL, 置恒温摇床中振摇 24 h 后, 测定溶液中总黄酮的量, 计算树脂吸附量 (*Q*) 及吸附率; 取上述 7 种吸附

后的树脂, 依次加入水 25 mL、60%乙醇 50 mL, 置于恒温摇床中依次振摇 24 h 后测定各解吸液中总黄酮的量, 计算解吸率。结果表明 (表 1), 广金钱草总黄酮纯化工艺研究宜选用 DM-130 型大孔吸附树脂作为富集和纯化的载体。

$$Q=(C_0-C_a) \times V_s/W$$

$$\text{吸附率}=(C_0-C_a)/C_0$$

$$\text{解吸率}=(C_dV_d)/(WQ)$$

*C*₀ 为原液质量浓度, *C*_a 为吸附后溶液中总黄酮质量浓度, *C*_d 为解吸液中总黄酮质量浓度, *V*_s 为供试液体积, *V*_d 为解吸液体积, *W* 为树脂质量 (以干质量计算)

表 1 7 种型号大孔吸附树脂对总黄酮静态吸附率和解吸率的影响

Table 1 Influence of seven resins on absorption and desorption rates of total flavonoids

树脂类型	吸附率/%	水解吸率/%	60%乙醇解吸率/%
DA-201	64.7	7.5	80.0
NKA-II	67.5	3.1	65.0
DM-301	65.0	8.0	69.0
DM-130	70.5	5.5	80.3
NKA-9	40.5	14.9	65.7
AB-8	69.1	7.6	69.7
D-101	75.3	10.1	71.5

2.3 DM-130 型大孔吸附树脂对广金钱草总黄酮吸附性能的考察

2.3.1 样品总黄酮质量浓度对树脂吸附率的影响 取 DM-130 型大孔吸附树脂适量, 精密称定, 置 150 mL 具塞三角瓶中, 分别加入质量浓度约为 2.0、4.0、8.0、16.0、24.0、32.0 mg/mL 的供试液 (以每毫升中含总黄酮质量计算), 置于恒温摇床中振摇 24 h 后测定树脂的静态吸附率。结果 (表 2) 表明, 随着上样质量浓度的增加, 树脂的吸附率也增加, 当样品质量浓度达到 8.0 mg/mL 后, 随着质量浓度的

表 2 DM-130 型大孔树脂对不同质量浓度总黄酮吸附率的影响

Table 2 Influence of DM-130 resin on adsorption rate at different sample concentrations of total flavonoids

总黄酮/(mg·mL ⁻¹)	吸附率/%	总黄酮/(mg·mL ⁻¹)	吸附率/%
2.0	60.8	16.0	49.4
4.0	63.7	24.0	41.3
8.0	66.4	32.0	31.6

增加,树脂的吸附率反而下降。因此,广金钱草总黄酮的最佳吸附质量浓度为 8.0 mg/mL。

2.3.2 样品质量浓度对 Q 值的影响 在室温下,用含不同质量浓度总黄酮的广金钱草供试液来探讨样品中总黄酮质量浓度对 DM-130 树脂 Q 值的影响。由表 3 可知,树脂的 Q 值随着吸附平衡时总黄酮质量浓度的增加而增加,并逐步趋于最大值。这说明 DM-130 树脂对广金钱草的吸附符合 Langmuir 模型,属于单分子层吸附,平衡溶液的质量浓度与 Q 值可用下式表示:

$$C_f/Q = C_f/Q_\infty + 1/(Q_\infty \cdot b)$$

Q 为吸附量 (mg/g), b 为吸附平衡常数, Q_∞ 为饱和吸附量 (mg/g), C_f 为平衡时溶液中总黄酮质量浓度 (mg/mL)

以 C_f/Q 对 C_f 作线性回归,得回归方程 $C_f/Q = 0.0024 C_f + 0.0056$ ($r=0.9964$),由直线斜率求得饱和吸附量 Q_∞ 为 416.7 mg/g,由截距可求得平衡常数 b 为 0.43。

表 3 总黄酮吸附平衡后质量浓度对 DM-130 型树脂 Q 值的影响

Table 3 Influence of concentrations after adsorption equilibrium of total flavonoids on Q amount of DM-130 resin

吸附平衡后总黄酮/(mg·mL ⁻¹)	Q /(mg·g ⁻¹)
0	0
0.689	122.5
1.507	188.8
2.790	196.6
8.393	293.0
14.610	367.0
22.672	375.2

2.3.3 样品 pH 值对树脂吸附率的影响 将总黄酮质量浓度为 8.0 mg/mL 的广金钱草样品溶液调 pH 值分别为 2、4、5 (原液)、6、8,分别精密吸取 25 mL,置装有 DM-130 型大孔吸附树脂的具塞三角瓶中,恒温摇床中振摇 24 h 后,测定树脂的静态吸附率,并以 pH 值对吸附率作图。结果 (表 4) 表明随着 pH 值的增大,大孔树脂对总黄酮的吸附率逐渐增大,在 pH 4~6 时基本达到平衡,其后随着 pH 值的增大,吸附率降低,故吸附的最佳 pH 值为 4~6。

2.3.4 树脂静态吸附平衡曲线的测定 取 DM-130 型大孔吸附树脂适量,精密称定,加入总黄酮质量浓度为 8.0 mg/mL 的广金钱草供试液 50 mL,置于恒温摇床中振摇,分别于 0.5、1、2、3、4、6、8、

10、12、24、28 h 取样,测定树脂对总黄酮的吸附率,以吸附率对时间作图,绘制 DM-130 树脂对总黄酮的静态吸附平衡曲线 (图 1)。结果表明吸附 12 h 后树脂对总黄酮吸附率基本不再变化,表明 DM-130 树脂对总黄酮的吸附速率较慢,至少静置 12 h 方能达到吸附平衡。

表 4 pH 值对总黄酮吸附率的影响

Table 4 Influence of pH values on adsorption rates of total flavonoids

上样液 pH 值	吸附率/%	上样液 pH 值	吸附率/%
2	37.4	6	64.4
4	65.8	8	30.8
5	67.1		

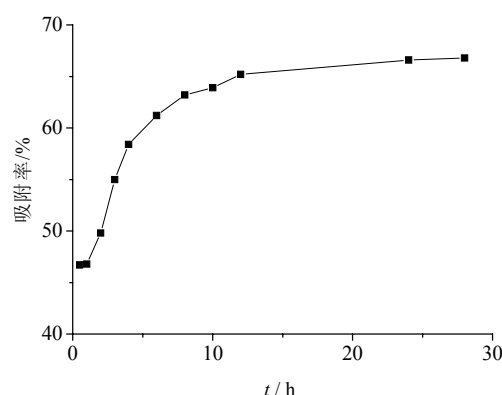


图 1 树脂静态吸附平衡曲线

Fig. 1 Equilibrium curve of static adsorption

2.3.5 上样体积流量对树脂吸附率的影响 将等量的供试液分别以 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 BV/h 的体积流量通过 DM-130 树脂色谱柱,以 Q 值为指标,考察不同体积流量对 Q 值的影响。结果 (表 5) 表明低体积流量时,体积流量对 Q 值影响不大,但当体积流量超过 3.0 BV/h 后,随着体积流量的增加, Q 值逐渐下降,故最佳吸附体积流量为 3.0 BV/h。

2.3.6 广金钱草总黄酮在 DM-130 上的泄露曲线

表 5 体积流量与 Q 值的关系

Table 5 Relationship between flow rate and Q amount

上样液体积流量/(BV·h ⁻¹)	Q 值/(mg·g ⁻¹)
1.0	176.0
2.0	177.9
3.0	175.0
4.0	167.9
5.0	145.7

将供试液加到装有树脂的色谱柱中,进行动态吸附,控制体积流量 3.0 BV/h,按保留体积分段收集流出液,并跟踪测定流出液中总黄酮质量浓度,当树脂达到吸附饱和时,停止上样,记录上样量,并以流出液中总黄酮质量浓度对上样体积作图,绘制泄露曲线。由图 2 可知,DM-130 型树脂处理 1 倍以上树脂体积的上样溶液时即开始有部分总黄酮成分泄露,预示水对部分强极性黄酮苷类成分有较强的洗脱能力。当处理 5 倍树脂床体积后,流出液中总黄酮的质量浓度基本不再增加,表明 DM-130 型大孔吸附树脂对总黄酮的吸附量达到吸附平衡。

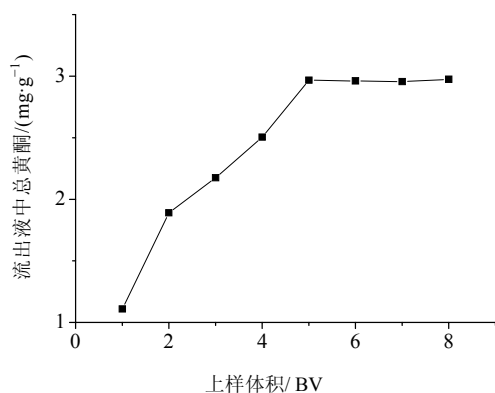


图 2 DM-130 型大孔树脂的泄露曲线

Fig. 2 Leakage curve of DM-130 resin

2.4 广金钱草总黄酮在 DM-130 型大孔吸附树脂上解吸特性的考察

2.4.1 最佳解吸溶剂的确定 向充分吸附总黄酮后的 DM-130 型大孔吸附树脂中精密加入 25 mL 水,置于恒温摇床中振摇 24 h 后,测定水解吸液中总黄酮的量。向水解吸后树脂中分别加入 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%乙醇溶液 40 mL,同法操作,测定醇解吸液中总黄酮的量,计算解吸率。结果(表 6)表明,水溶液对总黄酮有一定的解吸作用,需要对其洗脱量进行考察,以减少总黄酮的损失;50%乙醇对总黄酮的解吸率可达到 83.0%,

表 6 不同洗脱剂对总黄酮解吸率的影响

Table 6 Relationship between solvents and desorption rate of total flavanoids

洗脱剂	解吸率/%	洗脱剂	解吸率/%
水	6.25	40%乙醇	68.66
10%乙醇	29.79	50%乙醇	82.99
20%乙醇	43.87	60%乙醇	84.45
30%乙醇	66.01	70%乙醇	84.71

确定 50%乙醇为最佳洗脱溶剂。

2.4.2 水洗脱用量的考察 用足量水洗脱已达到吸附平衡的大孔吸附树脂柱,按树脂床体积分段收集洗脱液,测定洗脱液中总黄酮和总固形物的量,分别以固形物及总黄酮解吸率对洗脱体积作图,绘制洗脱曲线。由图 3 可知水洗脱 ≥ 4 BV 时已基本除去水溶性杂质。因为洗脱过程一直伴随有总黄酮类成分的泄露,为减免总黄酮的损失,故洗脱用水量确定为 4 BV。

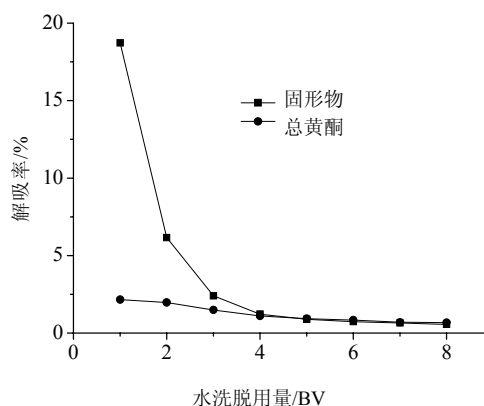


图 3 固形物和总黄酮水洗脱曲线

Fig. 3 Elution curves of solids and total flavanoids by water

2.4.3 醇解吸曲线的绘制 将已达到吸附平衡并用 4 BV 水洗脱后的大孔吸附树脂柱以 50%乙醇解吸,体积流量为 2 BV/h,按树脂床体积分段收集洗脱液,测定洗脱液中总黄酮质量浓度,计算解吸率。以解吸率对洗脱体积作图,绘制乙醇洗脱曲线。结果(图 4)表明,大于等于 4 倍树脂床体积的 50%乙醇可将广金钱草总黄酮基本解吸完全。

2.4.4 最佳上样量、洗脱体积流量和洗脱体积的确定 在上述研究基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,

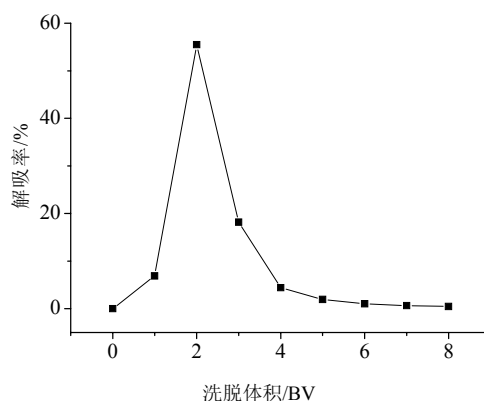


图 4 总黄酮 50%乙醇解吸曲线

Fig. 4 Elution curve of total flavanoids by 50% ethnol

对广金钱草总黄酮纯化工艺中的洗脱溶剂体积流量(A, 1、3、2 BV/h)、上样量(B, 3:1、5:1、2:1)和解吸溶剂用量(C, 6、5、4 BV) 3个因素进行优化筛选。测定各条件下解吸液中总黄酮收率和质量分数, 并以两者的综合评分(综合评分=总黄酮收率 $\times$ 0.5+总黄酮质量分数 $\times$ 0.5)为指标, 考察各因素的影响和水平的最佳组合。直关分析结果(表7)表明, 这3种因素对试验结果的影响大小顺序为B>A>C。最佳纯化工艺条件为A₃B₁C₂, 即上样量为药材与树脂质量之比为3:1, 50%乙醇以2 BV/h的体积流量解吸附, 收集5 BV洗脱液。通过方差分析(表8), 树脂与药材量的比值对实验结果具有显著性影响, 而洗脱溶剂用量和洗脱体积流量则无显著性影响。

2.4.5 最佳工艺的验证 根据确定的树脂类型和最

佳工艺, 用3根树脂柱同时进行广金钱草总黄酮纯化试验, 初步确定广金钱草的富集纯化工艺为: 采用DM-130树脂, 湿法装柱, 上样质量浓度相当于含总黄酮8.0 mg/mL, pH值4~6, 上样量为药材与树脂质量之比为3:1, 室温下以3.0 BV/h的体积流量进行吸附饱和; 解吸时, 先以4 BV的水洗脱(弃去), 再用50%乙醇洗脱, 收集5 BV洗脱液。树脂纯化后的总黄酮收率为76.2%, 质量分数为63.5%, 工艺稳定可行。

3 讨论

树脂纯化的主要工艺步骤为“上样-吸附-洗脱”, 故本实验主要围绕上述步骤进行考察, 设定的工艺参数也便于实际操作和应用。广金钱草经DM-130大孔吸附树脂处理后, 总黄酮收率在70%以上, 质量分数大于60%。本实验所建立的方法与其他纯化方法相比, 具有较高的富集和纯化效率, 更利于工业大生产的实际应用, 可为利用广金钱草总黄酮进行新药开发提供依据。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2010.
- [2] 曹进, 陈孟莉, 叶兆波, 等. 广金钱草药材的质量相关性研究[J]. 中草药, 2010, 41(4): 643-647.
- [3] 田代华. 实用中药辞典[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [4] 莫琰, 莫刘基, 梁峰, 等. 尿石通丸治疗尿路结石气滞湿阻证的临床研究[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(2): 141-142.
- [5] 李晓亮, 汪豪, 刘戈, 等. 广金钱草的化学成分研究[J]. 中药材, 2007, 30(7): 802-805.
- [6] 杨美华, 卢尧伟, 匡岩巍, 等. 柱色谱-紫外分光光度法测定广金钱草中总黄酮的含量[J]. 中草药, 2004, 35(6): 688-690.
- [7] 刘学, 崔健, 陈新. 广金钱草现代研究进展[J]. 长春中医药大学学报, 2006, 22(4): 84-85.
- [8] 韦敏, 杨中林, 吴建民. 大孔吸附树脂法分离纯化橘红中柚皮苷的研究[J]. 中成药, 2007, 29(3): 352-354.
- [9] 张鹏, 李娟, 张国欣, 等. 大孔吸附树脂分离纯化湖北贝母总生物碱的研究[J]. 中成药, 2007, 29(1): 51-55.
- [10] 刘艳, 田吉, 何兵, 等. 大孔吸附树脂纯化槐木总皂苷的工艺研究[J]. 中草药, 2011, 42(4): 694-697.
- [11] 王晓林, 钟方丽, 李敦猛, 等. 广金钱草中总黄酮提取工艺研究[J]. 中药材, 2008, 31(6): 900-902.

表7 总黄酮纯化工艺L₉(3⁴) 正交试验结果
Table 7 L₉(3⁴) orthogonal test of total flavanoids purification

试验号	因素				总黄酮		综合评分
	A	B	C	D	收率/%	质量分数/%	
1	1	1	1	1	72.8	63.7	68.3
2	1	2	2	2	64.9	56.6	60.8
3	1	3	3	3	71.3	59.5	65.4
4	2	1	2	3	82.4	63.1	72.7
5	2	2	3	1	64.7	57.5	61.1
6	2	3	1	2	70.5	62.2	66.3
7	3	1	3	2	78.0	61.3	69.7
8	3	2	1	3	66.7	58.4	62.5
9	3	3	2	1	77.6	63.1	70.3
K ₁	64.83	70.23	65.70	66.57			
K ₂	66.70	61.47	67.93	65.60			
K ₃	67.50	67.33	65.40	66.87			
R	2.67	8.77	2.53	1.27			

表8 方差分析
Table 8 Analysis of variance

因素	平方和	自由度	均方	F值	显著性
A	11.2	2	5.62	4.27	P<0.05
B	119.7	2	59.84	45.53	
C	11.5	2	5.75	4.37	
D(误差)	2.63	2	1.31		

$$F_{0.05}(2, 2)=19.0 \quad F_{0.01}(2, 2)=99.0$$