

## 陕产黄花油点草总黄酮部位纯化工艺研究

孙静<sup>1</sup>, 刘洁琼<sup>1</sup>, 黎伟华<sup>1</sup>, 夏新华<sup>2</sup>

1. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046

2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410028

**摘要:** 目的 优选大孔吸附树脂纯化陕产黄花油点草总黄酮部位的最佳工艺。方法 以紫外分光光度法测定总黄酮的量。采用每克树脂纯化转移总黄酮的量为指标, 通过考察动态吸附-解吸附、静态吸附-解吸附过程, 对 AB-8、D-101、HPD-450、HPD-600、HPD-700 大孔树脂进行了优选; 再进一步考察提取药液质量浓度、洗脱剂用量、径高比、药液的 pH 值对树脂纯化工艺的影响, 确定最佳工艺条件, 并对优选工艺条件进行了验证试验。结果 药液质量浓度为 1.2 g/mL, 径高比为 1:5, 药液 pH 6.47, 生药材-树脂为 1:3, 上样体积流量为 1 BV/h, 洗脱液为 40%乙醇, 洗脱体积流量为 1 BV/h, 洗脱体积为 2 BV。结论 该工艺科学合理, 可有效实现总黄酮部位的富集。

**关键词:** 黄花油点草; 总黄酮部位; AB-8 树脂; 分离纯化; 富集

**中图分类号:** R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)10-1275-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.10.013

## Purification technology of total flavonoids in *Tricyrtis maculata* produced in Shaanxi province

SUN Jing<sup>1</sup>, LIU Jie-qiong<sup>1</sup>, LI Wei-hua<sup>1</sup>, XIA Xin-hua<sup>2</sup>

1. Shaanxi College of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410028, China

**Abstract: Objective** To optimize the purification technology of total flavonoids in *Tricyrtis maculata* (TFTM) produced in Shaanxi province using macroporous adsorption resin. **Methods** The content of TFTM was determined with ultraviolet spectrophotometry. Taking the content of total flavonoids purified and transferred by per gram of resin as the indicator, the processes of dynamic adsorption-desorption and static adsorption-desorption were observed, and five macroporous resins, AB-8, D-101, HPD-450, HPD-600, and HPD-700 were optimized. The parallel investigations were carried out to study the effects of the concentration of extracted liquor, eluent dosage, ratio of diameter to height, and pH value of liquor on the purification technology of macroporous adsorption resin, and to determine the best technological condition. The verification was performed on the optimized extraction conditions. **Results** The ratio of diameter to height was 1:5, the liquid concentration was 1.2 g/mL, the pH value of liquor was 6.47, the raw material to resin was 1:3, the concentration of eluent was 40%, the sample loading velocity was 1 BV/h, the eluant velocity was 1 BV/h, and the elution volume was 2 BV. **Conclusion** The technology has the scientific rationality and could be used to enrich TFTM effectly.

**Key words:** *Tricyrtis maculata* (D. Don) Machride; total flavonoids; AB-8 macroporous resin; separation and purification; enrichment

黄花油点草 *Tricyrtis maculata* (D. Don) Machride 性味甘、淡、平, 具有安神除烦、活血消肿之功效, 是陕西省民间用于跌打损伤的重要习用品种之一<sup>[1-3]</sup>。在前期基础研究过程中, 本课题组采用了系统溶剂法对该药材大类成分进行了研究, 结

合各类成分现代研究情况, 对其黄酮部位、不含黄酮成分部位进行了小鼠微循环、大鼠血栓、大鼠急性脑梗阻实验, 结果显示其黄酮部位具有较强作用, 其余部位作用不明显<sup>[1-2]</sup>。基于此, 本课题组对总黄酮类成分进行纯化工艺研究, 以期为该药材的进一

收稿日期: 2012-12-12

基金项目: 陕西省科学技术发展计划项目 (2012SF2-07); 陕西省教育厅中药制药省级重点建设学科资助项目 (100800)

作者简介: 孙静 (1978—), 副教授, 研究方向为中药制剂新技术与新剂型研究。Tel: 13609146333 E-mail: ph.175@163.com

网络出版时间: 2013-03-28 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130328.2013.015.html>

步研究奠定基础。

## 1 仪器与材料

UV—2550 紫外分光光度计(岛津制作所制作), RE—3000 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), 雷磁 pH—3C pH 计(上海精密科学仪器有限公司), FA2204B 电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

药材采于秦岭南坡, 经陕西中医学院药学院标本馆王继涛教授鉴定为百合科植物黄花油点草 *Tricyrtis maculata* (D. Don) Machride。

芦丁对照品(批号 10080-200702, 中国生物制品检定所)。AB-8 树脂(上海树脂厂有限公司, 生产批号 20080505), D-101(西安电力树脂厂, 生产批号 20110105), HPD-450、HPD-700(上海摩速科学器材公司, 生产批号 20100603), HPD-600(陕西电子精细化工有限公司, 生产批号 20110315), 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 总黄酮的提取<sup>[1]</sup>

称取原药材 200.08 g, 加入 45 倍量水浸泡 15 min, 煎煮 1 h, 第 2、3 次再分别加入 40 倍量水煎煮 0.5 h, 共 3 次, 合并煎煮液, 浓缩至含原药材 1.05 g/mL, 冷却至室温后, 加 95%乙醇至药液含醇量为 70%, 低温静置 24 h 后, 滤过, 用 70%乙醇润洗滤渣, 滤液回收乙醇, 浓缩至原药材 1.2 g/mL, 即得样品溶液, 备用。

### 2.2 总黄酮的测定

**2.2.1 最大吸收波长的确定** 将芦丁对照品于 400~600 nm 作全程扫描, 其最大吸收波长在 510 nm 左右, 所以选择 510 nm 为检测波长。

**2.2.2 对照品溶液的配制** 精密称量芦丁对照品 5.0 mg, 用水溶解, 并定容至 25 mL, 摇匀, 即得 200.0 μg/mL 对照品储备液, 备用。

**2.2.3 线性关系考察** 精密移取“2.2.2”项下对照品溶液 0、1、2、3、4、5、6 mL 置于 25 mL 量瓶中, 加入去离子水 6 mL, 加 5%亚硝酸钠 0.3 mL, 摇匀, 静置 6 min, 加入 10%硝酸铝 0.3 mL, 摇匀, 静置 6 min, 加入 4%氢氧化钠 4 mL, 摇匀, 静置 15 min 后, 定容至刻度。以空白溶液作对照, 测定各溶液的吸光度(A)值, 以对照品质量浓度为横坐标(X)、A 值为纵坐标(Y)进行线性回归, 得回归方程为  $Y=9.7281X+0.0593$ ,  $r=0.9998$ , 线性范围为 8.0~48.0 μg/mL。

**2.2.4 样品测定<sup>[4-5]</sup>** 精密吸取原药材水提液 1 mL

定容至 10 mL, 再吸取稀释药液 1 mL 稀释至 25 mL, 摇匀, 按照“2.2.3”项下依次加入显色试剂, 以去离子水加显色剂作为空白溶液, 测得该原药液总黄酮的量为 7.058 7 mg/mL, 即生药材中含总黄酮 5.882 2 mg/g。

### 2.3 大孔树脂的筛选

**2.3.1 树脂的预处理** 取 D-101、HPD-450、HPD-600、HPD-700、AB-8 大孔树脂, 95%乙醇浸泡 24 h, 充分溶胀, 分别进行 3 次超声(30 min/次)处理后湿法装柱, 用 95%乙醇洗脱树脂, 控制适当的洗脱体积流量, 当洗脱液与水(1:3)混合不产生浑浊为止, 再用蒸馏水洗至无醇味即可, 备用。

**2.3.2 树脂静态吸附性能的考察** 取 5 种已处理好的大孔树脂, 称取约 2 g, 精密称定后, 置 50 mL 锥形瓶中, 分别加入总黄酮的量为 7.058 7 mg/mL 的样品溶液 1.5 mL, 置于摇床上(120 r/min、25 °C)振摇 2 h, 静置 24 h 后, 滤过, 收集滤液, 定容至 1 mL。再依次向各树脂中加入 10 mL 去离子水、15 mL 80%乙醇, 置于摇床上(120 r/min、25 °C)振摇 2 h, 静置 24 h 后, 滤过, 收集各部位水溶液、醇溶液, 并分别浓缩至 5 mL。依次精密量取一定量的各部位溶液置 15 个 10 mL 量瓶中, 以空白试剂为对照, 按照“2.2.3”项下方法测定样品溶液 A 值, 通过计算得到静态吸附量、解吸率和每克树脂纯化总黄酮量, 结果见表 1。可以看出静态吸附量、解吸率、平均每克树脂纯化黄酮量均是 AB-8 型大孔吸附树脂为最佳。

表 1 5 种大孔吸附树脂静态吸附效果比较

Table 1 Comparison on static adsorption effects of five macroporous adsorption resins

树脂类型	吸附量 / mg	解吸率 / %	每克树脂纯化黄酮量 / (mg·g <sup>-1</sup> )
AB-8	8.712 5	89.875 6	5.362 0
D-101	7.688 5	64.075 5	3.401 0
HPD-450	3.868 9	54.932 4	1.463 7
HPD-600	3.830 7	62.188 6	2.181 0
HPD-700	3.771 9	52.256 7	1.350 1

**2.3.3 树脂动态吸附性能的考察** 取 5 根直径均为 2.5 cm 的树脂柱, 以湿法分别加入等高的已经处理好的 AB-8、D-101、HPD-450、HPD-600、HPD-700 树脂, 备用。将水提药液浓缩至含生药材 1.6 g/mL, 精密量取 5 mL, 共 5 份, 以 1 BV/h 体积流量分别

在上述树脂柱中上样,待药液流至树脂柱的砂芯时,关闭活塞,静置 30 min。分别用 2 BV 蒸馏水洗杂,用 80%乙醇洗脱,以氢氧化钠、醋酸铅反应阴性为洗脱终点,收集水洗液及醇洗液,并分别浓缩至 25 mL。精密量取各样品溶液一定量置 10 个 25 mL 量瓶中,以空白试剂为对照,按照“2.2.3”项下方法显色并测定样品溶液  $A$  值,计算动态吸附量、解吸率和每克树脂纯化总黄酮量,结果见表 2。等量的不同类型的树脂,AB-8 型大孔吸附树脂解吸率虽与 D-101 相当,但 AB-8 型大孔吸附树脂吸附量、平均每克树脂纯化转移的总黄酮量优势突出,故选择 AB-8 型大孔吸附树脂作为纯化黄花油点草总黄酮的树脂。

表 2 5 种大孔吸附树脂动态吸附效果比较  
Table 2 Comparison on dynamic adsorption effects of five macroporous adsorption resins

树脂类型	吸附量 / mg	解吸率 / %	每克树脂纯化黄 酮量 / (mg·g <sup>-1</sup> )
AB-8	45.789 4	78.110 3	1.952 2
D-101	43.155 2	79.156 2	1.535 3
HPD-450	44.534 3	67.666 0	1.262 4
HPD-600	44.491 6	70.858 2	1.358 8
HPD-700	44.426 4	65.999 9	1.213 8

## 2.4 AB-8 大孔吸附树脂纯化工艺的考察<sup>[6-11]</sup>

**2.4.1 药液质量浓度对树脂吸附的影响** 取 3 根直径为 2.5 cm 的干燥树脂柱,湿法装入等量的 AB-8 型大孔吸附树脂。精密移取样品溶液 3 mL,配制成质量浓度为 1.0、1.2、1.5 g/mL 的溶液,分别以 1 BV/h 上样,待药液流至砂芯处,关闭活塞,静置 30 min。打开活塞用去离子水洗至检识反应为阴性,收集水洗脱液,浓缩至 25 mL,备用。精密移取各浓缩液 1 mL,加入至 10 mL 量瓶中,按照“2.2.3”项下显色测定其  $A$  值,计算总黄酮的吸附量和吸附率。结果吸附量分别为 11.928 6、19.316 8、18.323 1 mg,吸附率分别为 56.330 5%、91.220 1%、86.527 3%。当药液质量浓度为 1.2 g/mL 时,总黄酮吸附率最大,故选择 1.2 g/mL 作为上样药液质量浓度。

**2.4.2 树脂用量的考察** 量取质量浓度为 1.2 g/mL 的样品溶液 3 mL,3 份,备用。取 3 根直径为 2.5 cm 的干燥树脂柱,湿法装入一定量的 AB-8 型大孔吸附树脂,使其树脂-生药材比分别为 1:1、2:1、3:1。以 1 BV/h 的体积流量上样后,静置 30 min,再以去

离子水洗至检识反应为阴性,收集水洗液,浓缩至 25 mL,备用。精密移取各浓缩液 1 mL,加入至 10 mL 量瓶中,按照“2.2.3”项下显色测定其  $A$  值,计算总黄酮的吸附量和吸附率。结果吸附量分别为 14.678 6、17.710 3、19.618 3 mg,吸附率分别为 69.316 8%、83.633 6%、92.643 8%。不同树脂用量对总黄酮吸附作用影响较大,故选择树脂-生药量之比为 3:1。

**2.4.3 上样体流量的考察** 量取质量浓度为 1.2 g/mL 的样品溶液 3 mL,3 份。取 3 根直径为 2.5 cm 的干燥树脂柱,湿法装入 3 倍药材量的树脂,备用。将样品溶液分别以 1、2、3 BV/h 进行上样,静置 30 min,再以去离子水洗至检识反应为阴性,收集水洗液,浓缩至 25 mL,备用。精密移取各浓缩液一定量,加入至 10 mL 量瓶中,按照“2.2.3”项下显色测定其  $A$  值,计算总黄酮的吸附量和吸附率。结果吸附量分别为 19.618 3、15.609 9、12.069 1 mg,吸附率分别为 92.643 8%、73.714 9%、56.994 0%。当上样体流量为 1 BV/h 时,吸附率最高,故选择 1 BV/h 为上样体流量。

**2.4.4 径高比的考察** 取 3 根直径都为 2.5 cm 干燥树脂柱,湿法加入一定量 AB-8 树脂,使其径高比分别为 1:2、1:5、1:8,并以树脂-生药量 3:1 加入质量浓度为 1.2 g/mL 的样品溶液,以 1 BV/h 的体积流量上样后,静置 30 min,水洗至颜色检识反应为阴性,收集水洗液,浓缩至 25 mL。精密移取各洗脱液 0.5 mL,置 10 mL 量瓶中,按照“2.2.3”项下显色测定其  $A$  值,计算总黄酮的吸附量和吸附率。结果吸附量分别为 13.836 5、44.122 1、79.095 4 mg,吸附率分别为 65.340 3%、89.296 3%、80.038 5%;径高比为 1:5 效果较好,故选择 1:5 为树脂柱的径高比。

**2.4.5 药液 pH 值的考察** 选择 3 根直径是 2.5 cm 的色谱柱,按照树脂-生药量 3:1,径高比为 1:5 填柱,精密量取 1.2 g/mL 的药液 7 mL,其中 2 份分别用盐酸、氢氧化钠将其调整至 pH 5.37、8.20,另 1 份用原药液,以 1 BV/h 速度上样,静置 30 min 后,水洗除杂至颜色检识反应为阴性,收集水洗脱液浓缩至 25 mL。精密移取洗脱液 0.5 mL 置 10 mL 量瓶中,按照“2.2.3”项下方法显色并测定其  $A$  值,计算总黄酮吸附量和吸附率。结果吸附量分别为 34.418 2、44.122 1、39.964 0 mg,吸附率分别为 69.657 2%、89.296 3%、80.881 0%。药液 pH 值对

吸附有较大的影响,原液的pH值吸附效果最好,其次是酸性条件,碱性条件吸附最差。因此,药液不需要调节pH值。

**2.4.6 乙醇体积分数的考察** 选择4根直径是2.5 cm的色谱柱,按照树脂-生药量3:1,径高比为1:5填柱,精密量取1.2 g/mL的药液7 mL,以1 BV/h上样,待药液流至砂芯处,关闭活塞,静置30 min。加入去离子水后,打开活塞,洗至检识反应为阴性,继而分别选用40%、60%、80%、95%乙醇分别洗脱至显色反应为阴性时,收集洗脱液,回收乙醇并浓缩至50 mL。精密移取各浓缩液0.5 mL置于4个25 mL量瓶中,按照“2.2.3”项下进行显色,测定其A值,计算总黄酮的解吸率,结果解吸率分别为81.623 2%、71.917 3%、60.645 2%、38.722 2%。结果表明不同体积分数的乙醇对总黄酮解析率影响显著,其中以40%乙醇洗脱效果最好,解析率可以达到81.623 2%,故选择40%乙醇作为洗脱液。

**2.4.7 洗脱液用量的考察** 选择直径为2.5 cm的色谱柱,按照树脂-生药量3:1,径高比为1:5填柱,精密量取1.2 g/mL的药液7 mL,以1 BV/h上样,待药液流至砂芯处,关闭活塞,静置30 min。加入去离子水后,打开活塞,洗至检识反应为阴性,继而选用40%乙醇洗脱,收集洗脱液,每份10 mL,直至显色反应为阴性时,共收集洗脱液30份。按照“2.2.3”项下进行显色,测定其A值,计算样品总黄酮的量,绘制洗脱曲线,结果见图1。可以看出,1~12份总黄酮量为27.477 0 mg,占洗脱总黄酮的95%以上。因此选择2 BV树脂柱体积的80%乙醇进行总黄酮类成分的洗脱。

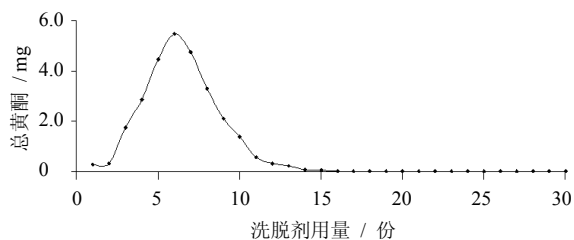


图1 洗脱曲线图

Fig. 1 Elution curve

**2.4.8 洗脱体积分数的考察** 选择3根直径是2.5 cm的色谱柱,按照树脂-生药量3:1,径高比为1:5填柱,精密量取1.2 g/mL的药液7 mL,以1 BV/h上样,待药液流至砂芯处,关闭活塞,静置30 min。加入去离子水后,打开活塞,洗至检识反应为阴性,

继而选用2 BV 40%乙醇,分别以1、2、3 BV/h的体积流量洗脱,收集洗脱液,回收乙醇并浓缩至50 mL。精密移取各浓缩液0.5 mL置于3个25 mL量瓶中,按照“2.2.3”项下进行显色,测定其A值,计算总黄酮的洗脱率,结果洗脱率分别为87.694 7%、81.623 2%、74.139 5%。总黄酮解析率随体积分数的增大而减小,其中以1 BV/h洗脱效果最好,解析率可以达到87.694 7%,故选择1 BV/h作为洗脱体积分数。

本实验通过静态吸附、动态吸附优选AB-8大孔吸附树脂作为纯化黄花油点草的有效部位的树脂类型。并通过平行试验、正交试验,优选了纯化工艺参数,即药液质量浓度为1.2 g/mL,树脂-生药量3:1,药液pH值为6.47,径高比为1:5,洗脱液为40%乙醇,上样体积流量为1 BV/h,洗脱体积分数为1 BV/h,洗脱体积为2 BV。

## 2.5 验证试验

根据优选工艺参数,分别进行3批工艺验证试验,结果显示3批药材经过提取后,其浸膏中总黄酮分别为7.1%、6.9%、7.2%,经过本工艺纯化后总黄酮质量分数分别为48.9%、50.8%、51.8%,得率分别为78.3%、79.7%、82.0%。结果表明,优选工艺可以有效实现总黄酮部位的富集,且工艺稳定、合理、可行。验证实验表明,该工艺能够有效地增加黄花油点草总黄酮的富集,达到纯化总黄酮部位的目的。

## 3 讨论

### 3.1 树脂的优选

本实验在优选树脂类型时,经过查阅资料,结合树脂的特性,集中选择了工业生产较为常用的D-101、AB-8、HPD-450、HPD-600、HPD-700大孔吸附树脂类型,通过静态吸附、解吸附与动态吸附、解吸附过程较为合理的评价了5种树脂对于纯化该药材总黄酮部位的性能,其中AB-8型大孔吸附树脂较为适宜。

### 3.2 评价指标的选择

在前期优选树脂类型时,由于考察的重点不同,加入药液量、树脂量的差异性,在评价指标上不仅选择了吸附量、解吸附率等指标,还结合了每克树脂纯化转移的总黄酮量作为另一个评价指标,能够较为科学地评价各种树脂纯化性能。

### 参考文献

[1] 孙静,刘洁琼,夏新华,等. 陕产黄花油点草总黄酮

- 部位提取工艺实验研究 [J]. 中药材, 2012, 35(4): 641-644.
- [2] 孙 静, 刘洁琼, 张丽梅. 陕产黄花油点草化学成分初步研究 [J]. 陕西中医, 2012, 33(5): 605-606.
- [3] 孙 静, 寇文龙, 刘文文, 等. 陕产黄花油点草的生药鉴别 [J]. 中药材, 2012, 35(5): 717-719.
- [4] 景 怡, 景荣琴, 任 远, 等. AB-8 大孔树脂吸附树脂分离纯化玉米须中总黄酮的研究 [J]. 中医药学报, 2010, 38(1): 75-78.
- [5] 王春明, 刘 刚, 费 艳, 等. 大孔吸附树脂法纯化黄芩总黄酮工艺的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 58-60.
- [6] 陈乃富, 张 莉. 金樱子黄酮类化合物的初步研究 [J]. 中国林副特产, 2005(5): 2-4.
- [7] 李俊松, 徐德生, 冯 怡, 等. 甘草中黄酮的纯化方法和含量测定 [J]. 中成药, 2007, 29(7): 997-1000.
- [8] 高红宁, 金万勤, 郭立玮, 等. AB-8 树脂对苦参总黄酮的吸附性能研究 [J]. 中草药, 2001, 32(10): 887-889.
- [9] 欧阳玉祝, 车少林, 黄伟涛. 大孔树脂吸附法分离海金沙总黄酮的研究 [J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(6): 40-44.
- [10] 黄丽容, 陆金环, 谭健星, 等. AB-8 大孔吸附树脂纯化降香总黄酮的工艺研究 [J]. 广东药学院学报, 2006, 22(3): 270-271.
- [11] 贝伟剑, 彭文烈, 罗 杰. 柿叶黄酮的大孔吸附树脂分离提纯富集 [J]. 中成药, 2005, 27(3): 257-261.