

阴离子交换树脂分离纯化绵马贯众总多酚的工艺研究

曹广尚, 王 信, 杨培民*

山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250014

摘要: 目的 研究阴离子交换树脂分离纯化绵马贯众总多酚的工艺条件。方法 分别以绵马贯众素 ABBA、绵马贯众总多酚的比吸附量、洗脱率、质量分数为指标, 优选绵马贯众总多酚的最佳纯化工艺。结果 最佳工艺为绵马贯众药材提取液以 6 BV/h 的体积流量通过 201×7 氢氧型阴离子交换树脂柱(柱径与柱高比为 1:7), 树脂饱和后, 水洗至中性, 再用 3% 氯化钠的 60% 乙醇溶液以 6 BV/h 的体积流量洗脱, 洗脱 9 倍量树脂柱体积。绵马贯众素 ABBA 及绵马贯众总多酚洗脱率分别为 90.1% 和 91.1%, 绵马贯众素 ABBA、绵马贯众总多酚的质量分数分别为 29.4%、49.2%。结论 采用 201×7 氢氧型阴离子交换树脂纯化绵马贯众总多酚效率高, 成本低, 具有广阔的应用前景。

关键词: 绵马贯众; 总多酚; 阴离子交换树脂; 纯化; 绵马贯众素 ABBA

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)09-1265-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.09.013

Separation and purification of total poly phenol from *Dryopteris crassirhizoma* with anion exchange resin

CAO Guang-shang, WANG Xin, YANG Pei-min

Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

Abstract: **Objective** To optimize the separation and purification of the total poly phenol from *Dryopteris crassirhizoma* with anion-exchange resin. **Methods** The rates of elution and absorption, contents of dryocrassin ABBA, and total poly phenol were used as makers to optimize the purification conditions of total poly phenol. **Results** The extracting solution of *D. crassirhizoma* passed through 201×7 hydrogen-oxygen the anion-exchange resin column (column diameter-column height, 1:7) at the rate of 6 BV/h in reverse direction, then the resin column was flushed with water at the rate of 6BV/h to pH value 6—7 in forward direction. At last, the column was eluted at the rate of 6 BV/h to obtain poly phenol with 9BV 3% salt water in 60% alcohol. The elution ratio of dryocrassin ABBA is 90.1%, and the total poly phenol is 91.1%. The content of dryocrassin ABBA is 29.4% and the content of the total poly phenol is 49.2%. **Conclusion** The separation and purification of the total poly phenol from *D. crassirhizoma* with 201×7 hydrogen-oxygen anion-exchange resin can achieve the satisfactory results which have wide application prospects.

Key words: *Dryopteris crassirhizoma* Nakai; total poly phenol; anion-exchange resin; purification; dryocrassin ABBA

绵马贯众系为鳞毛蕨科植物粗茎鳞毛蕨 *Dryopteris crassirhizoma* Nakai 的干燥根茎及叶柄残基, 具有清热解毒、止血、杀虫等功效, 临床主要用于时疫感冒、风热头痛、温毒发斑、疮疡肿毒、崩漏下血、虫积腹痛^[1]。现代研究表明, 绵马贯众具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗疟等作用, 其主要活性成分为绵马贯众素等多酚类衍生物^[2-3], 目前对绵马贯众素等多酚类物质的分离纯化工艺研究报道较少, 本研究选用选择性高、吸附量大、价格低廉

的阴离子交换树脂对绵马贯众总多酚进行分离纯化, 为绵马贯众总多酚的工业化生产及同类多酚类物质的纯化提供实验依据。

1 仪器与材料

Aglient 1200 型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司); BT02 型蠕动泵(重庆杰恒蠕动泵有限公司); AL204 型万分之一天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); UV2600 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司); FE—20K 型 pH 计(瑞士梅特勒-

收稿日期: 2013-11-25

基金项目: 山东省科技攻关计划(2012GGB14018)

作者简介: 曹广尚, 硕士, 主管中药师, 主要从事中药制剂工艺及质量标准的研究。Tel: (0531)68617919 E-mail: cgs198041@163.com

*通信作者 杨培民, 教授, 博士生导师, 主要从事中药新制剂、新技术研究。Tel: (0531)68617607 E-mail: jnyym7777@126.com

托利多仪器有限公司);DC-NSG—10型提取浓缩机组(上海达程实验设备有限公司)。

绵马贯众素 ABBA (质量分数>98%, 购自上海源叶生物科技有限公司, 批号 10438-070234); 绵马贯众药材购自济南建联中药店, 经山东中医药大学药学院生药系李峰教授鉴定为鳞毛蕨科植物粗茎鳞毛蕨 *Dryopteris crassirhizoma* Nakai 的干燥根茎及叶柄残基。201×2.5、201×7、201×15 型阴离子交换树脂(购自山东鲁抗树脂厂), 乙腈、异丙醇、磷酸为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 上样液制备

取绵马贯众粗粉 1 kg, 依次加 8、6、6 倍量 0.1% 碳酸钠水溶液, 提取 3 次, 每次 1 h, 滤过, 合并得 17.6 L 滤液。

2.2 绵马贯众素 ABBA 和绵马贯众总多酚的测定

2.2.1 绵马贯众素 ABBA 的测定^[4] 采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-氯仿-异丙醇-0.3%磷酸溶液 (50:10:35:15) 为流动相, 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 286 nm; 柱温 25 °C。经测定上样液中绵马贯众素 ABBA 为 728.5 μg/mL。

2.2.2 绵马贯众总多酚的测定^[5] 采用可见分光光度法测绵马贯众总多酚, 以绵马贯众素 ABBA 为对照品, 0.5% 坚牢蓝 BB 盐溶液为显色剂, 室温放置 20 min 显色, 在 476 nm 波长下测定吸光度, 用标准曲线法计算供试品中总多酚的量。经测定药材提取液中绵马贯众总多酚为 1.060 5 mg/mL。

2.3 树脂的预处理

树脂以去离子水浸泡过夜, 并洗至去离子水近无色; 先加入 6 倍量树脂体积的 7% 盐酸溶液浸泡 1 h 左右, 随时搅拌, 用去离子水洗至近中性; 后加入 6 倍量树脂体积的 8% 氢氧化钠溶液浸泡 1 h 左右, 随时搅拌, 再用去离子水洗至近中性; 最后加入 5 倍量树脂体积的 7% 盐酸溶液或 8% 氢氧化钠溶液浸泡 2 h, 使阴离子交换树脂转为氯型或氢氧型, 并用去离子水洗至近中性, 即可装柱使用。

2.4 树脂的筛选

本研究采用碱水提取绵马贯众总多酚, 药液中绵马贯众多酚以阴离子形式存在, 其可被阴离子交换树脂的氢氧根离子或氯离子交换而被吸附在树脂之上, 由于绵马贯众多酚亲脂性强, 酸性较弱, 故选用强碱性阴离子交换树脂进行研究。本研究以绵

马贯众素 ABBA 及绵马贯众总多酚的比吸附量和洗脱率为指标, 对 201×2.5、201×7、201×15 氢氧型和氯型不同阴离子交换树脂的纯化能力进行了比较。取树脂 50 mL, 湿法装柱 (柱径-柱高 1:7), 取上样液 1 500 mL 以 4 BV/h 的体积流量逆向通过树脂柱, 水洗至中性, 用 3% 氯化钠 60% 乙醇溶液进行洗脱, 收集 5 BV 洗脱液, 计算绵马贯众素 ABBA 及绵马贯众总多酚的比吸附量 [比吸附量 = (上样液中多酚量 - 过柱液中多酚量) / 树脂体积]、洗脱率 (洗脱率 = 洗脱液中多酚的量 / 树脂吸附多酚量), 结果见表 1。201×7 氢氧型阴离子交换树脂效果较好, 综合实际生产情况及树脂抗压能力, 选择此类型树脂做后续研究。

表 1 不同类型离子树脂的动态吸附能力

Table 1 Dynamic adsorption capacity of different types of ion resin

树脂型号	绵马贯众素 ABBA		总多酚	
	比吸附量 / 洗脱率 / (mg·mL ⁻¹)	%	比吸附量 / 洗脱率 / (mg·mL ⁻¹)	%
201×2.5 氢氧型	17.8	29.3	24.9	32.9
201×7 氢氧型	13.6	44.6	20.4	50.6
201×15 氢氧型	7.9	58.9	12.6	54.1
201×2.5 氯型	13.1	28.8	18.9	33.7
201×7 氯型	10.5	43.6	15.5	51.7
201×15 氯型	6.2	55.1	9.3	58.6

2.5 树脂纯化工艺的研究

2.5.1 上样液 pH 的选择 以绵马贯众素 ABBA、绵马贯众总多酚的比吸附量为考察指标, 比较上样液不同 pH 值的影响。取 50 mL 树脂, 湿法装柱 (柱径-柱高 1:7), 取上样液 1 500 mL, 分别调节 pH 值为 7.0、8.0 (原液)、9.0、10.0, 以 4 BV/h 的体积流量反向通过树脂柱, 计算绵马贯众素 ABBA、绵马贯众总多酚的比吸附量。结果绵马贯众素 ABBA 的比吸附量分别为 6.6、12.7、13.9、13.5 mg/mL, 总多酚的比吸附量分别为 10.9、21.6、22.8、21.4 mg/mL。结果表明, 上样液 pH 值在 8.0~10.0 对总多酚吸附影响差别较小, 为方便操作, 选择原液直接上样。

2.5.2 上样方式的选择 考察指标同“2.5.1”项下, 比较逆向和正向上样对树脂吸附能力的影响。取 50 mL 树脂, 湿法装柱 (柱径-柱高 1:7), 上样液 1 500 mL 以 4 BV/h 的体积流量正向或逆向通过离子树脂

柱, 计算绵马贯众素 ABBA、绵马贯众总多酚的比吸附量。结果绵马贯众素 ABBA 的比吸附量分别为 7.6、14.5 mg/mL, 总多酚的比吸附量分别为 11.4、23.2 mg/mL。结果表明, 上样方式对树脂的总多酚吸附能力影响较大, 逆向上样由于药液中成分与树脂接触充分, 能够充分进行交换吸附, 因此选择逆向上样方式。

2.5.3 树脂柱径高比的选择 考察指标同“2.5.1”项下, 比较不同树脂径高比对总多酚吸附的影响。取 50 mL 树脂, 湿法装柱, 控制柱径-柱高为 1:5、1:7、1:9, 取上样液 1 500 mL 以 4 BV/h 的体积流量逆向通过树脂柱, 计算绵马贯众素 ABBA、绵马贯众总多酚比吸附量。结果绵马贯众素 ABBA 的比吸附量分别为 10.7、14.5、15.2 mg/mL, 总多酚的比吸附量分别为 15.3、23.2、24.5 mg/mL。结果表明, 树脂柱径高比 1:9 绵马贯众素 ABBA 及绵马贯众总多酚的比吸附量最高, 但与径高比为 1:7 时差别不大, 考虑到大生产实际情况及树脂的耐压能力, 选择树脂柱径高比为 1:7 进行研究。

2.5.4 上样体流量的选择 考察指标同“2.5.1”项下, 比较不同上样体流量 (4、6、8、10 BV/h) 对树脂吸附能力的影响。取 50 mL 树脂, 湿法装柱 (柱径-柱高 1:7), 取上样液 1 500 mL 以不同体积流量逆向通过树脂柱, 计算绵马贯众素 ABBA、绵马贯众总多酚比吸附量。结果绵马贯众素 ABBA 的比吸附量分别为 13.6、12.3、8.9、5.4 mg/mL, 总多酚的比吸附量分别为 27.4、25.5、15.1、10.1 mg/mL。结果表明, 4、6 BV/h 上样体流量对多酚的吸附量影响不大, 8、10 BV/h 上样体流量偏快, 不利于多酚的吸附, 吸附量相对减少, 在保证高吸附量和高效率的前提下, 优选 6 BV/h 作为药液上样体流量。

2.5.5 上样动态吸附曲线 考察指标同“2.5.1”项下。取 50 mL 树脂, 湿法装柱 (柱径-柱高 1:7), 上样液以 6 BV/h 逆向通过树脂柱, 流出液每 150 mL 收集 1 份, 测定绵马贯众素 ABBA、绵马贯众总多酚的量, 以上样液体积为横坐标, 流出液中绵马贯众素 ABBA、绵马贯众总多酚的量为纵坐标绘制吸附曲线。结果见图 1。当上样量达到 1 000 mL 时, 绵马贯众素 ABBA 及总多酚已出现较大的泄漏, 流出液中成分量约为上样液中的 10%, 根据相关文献, 此时树脂已饱和, 可停止上样, 因此, 201×7 离子树脂可吸附药材 1.14 g/mL。

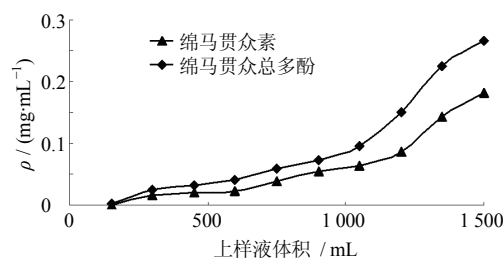


图 1 201×7 氢氧型阴离子交换树脂动态吸附曲线

Fig. 1 Dynamic adsorption curves of 201×7 hydrogen-oxygen anion-exchange resin

2.5.6 洗脱溶剂的选择

(1) 不同浓度氯化钠溶液洗脱效果的比较: 取 50 mL 树脂, 湿法装柱 (柱径-柱高 1:7), 树脂柱上样至饱和, 分别用不同质量分数 (5%、10%、15%) 氯化钠溶液进行洗脱, 洗脱体流量为 4 BV/h, 收集 5 倍柱体积洗脱液, 测定绵马贯众素 ABBA 及总多酚洗脱率。结果绵马贯众素 ABBA 洗脱率均为 0, 总多酚洗脱率分别为 0.2%、0.5%、0.3%。结果表明, 不同质量分数氯化钠溶液对绵马贯众素 ABBA 及总多酚几乎无洗脱能力。

(2) 不同浓度乙醇-氯化钠溶液洗脱效果比较: 取 50 mL 树脂, 湿法装柱 (柱径-柱高 1:7), 树脂柱上样至饱和, 分别用不同质量分数氯化钠乙醇溶液进行洗脱, 洗脱体流量为 4 BV/h, 收集 5 倍柱体积洗脱液, 测定绵马贯众素 ABBA 和总多酚的洗脱率、质量分数 [质量分数=提取物中多酚的质量/提取物的质量], 结果见表 2。3%氯化钠的 60%乙醇洗脱液总多酚洗脱率相对较高, 且绵马贯众素

表 2 不同浓度氯化钠乙醇溶液的洗脱效果

Table 2 Elution effect of ethanol solution of sodium chlorid at different concentration

洗脱液	绵马贯众素 ABBA		总多酚	
	洗脱率 / 质量分 %	数 / %	洗脱率 / 质量分 %	数 / %
1%氯化钠-40%乙醇	25.3	7.3	26.2	11.8
3%氯化钠-40%乙醇	31.4	6.9	35.1	11.0
5%氯化钠-40%乙醇	33.6	8.2	36.9	13.2
1%氯化钠-60%乙醇	40.1	13.3	47.6	19.5
3%氯化钠-60%乙醇	51.4	17.9	56.3	27.4
5%氯化钠-60%乙醇	53.2	18.2	55.6	26.5
1%氯化钠-80%乙醇	42.4	11.7	50.1	16.9
3%氯化钠-80%乙醇	53.3	17.3	58.9	26.1
5%氯化钠-80%乙醇	58.7	16.9	57.2	24.9

ABBA 和总多酚酸质量分数也较高, 最终选择 3% 氯化钠的 60%乙醇溶液为洗脱液。

2.5.7 洗脱体流量的选择 取 50 mL 树脂, 湿法装柱(柱径-柱高 1:7), 树脂柱上样饱和后, 用 3% 氯化钠的 60%乙醇溶液以不同洗脱体流量(4、6、8、10 BV/h) 进行洗脱, 收集 5 倍柱体积洗脱液, 测绵马贯众素 ABBA 及总多酚的洗脱率, 结果绵马贯众素 ABBA 洗脱率分别为 53.1%、56.8%、47.4%、40.3%, 总多酚洗脱率分别为 57.1%、59.2%、45.2%、44.7%。结果表明, 洗脱体流量越慢, 多酚洗脱率越高。4、6 BV/h 洗脱效果相当, 考虑实际生产的效率问题, 最终选择 6 BV/h 作为洗脱体流量。

2.5.8 洗脱动态曲线 取 50 mL 树脂, 湿法装柱(柱径-柱高 1:7), 树脂柱上样至饱和, 用 3%氯化钠的 60%乙醇溶液进行洗脱, 洗脱体流量为 6 BV/h, 每 50 mL 收集 1 份洗脱液, 测定绵马贯众素 ABBA 和总多酚的洗脱率, 以洗脱液体积为横坐标, 绵马贯众素 ABBA、绵马贯众总多酚的洗脱率为纵坐标绘制洗脱曲线, 结果见图 2。随着洗脱液体积的增加, 绵马贯众素 ABBA 及总多酚的洗脱率逐渐增加, 当洗脱至 450 mL (9 BV) 时, 洗脱率已达 90% 左右, 继续洗脱, 洗脱效果已变化不大, 为节省成本, 选择洗脱 9 BV 即可。

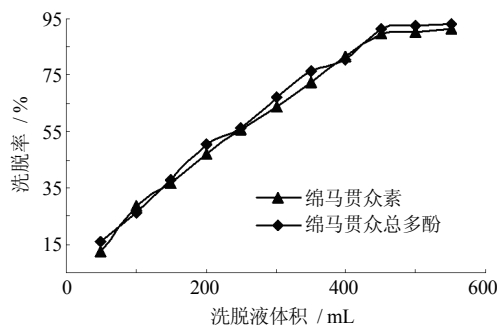


图 2 201×7 氢氧型阴离子交换树脂动态洗脱曲线
Fig. 2 Dynamic desorption curves of 201 × 7 hydrogen oxygen anion-exchange resin

2.6 验证试验

通过对 201×7 氢氧型阴离子树脂纯化绵马贯众总多酚的研究, 得最佳纯化工艺为绵马贯众药材提取液以 6 BV/h 的体流量逆向通过 201×7 氢氧型阴离子交换树脂柱(柱径-柱高 1:7), 上样至树脂饱和, 水洗至中性, 再用 3%氯化钠的 60%乙醇溶液以 6 BV/h 的体流量洗脱, 洗脱 9 倍量树脂柱体积, 洗脱液经回收乙醇及除盐干燥后, 即得绵马贯众总多酚提取物。在最佳吸附和洗脱条件下, 重复试验 3 次, 结果见表 3。从结果可以看出, 在最佳实验条件下, 绵马贯众素 ABBA 和绵马贯众总多

表 3 最佳工艺验证试验

Table 3 Experimental validation of optimal technology

试验号	绵马贯众素 ABBA				总多酚			
	比吸附量 / (mg·mL ⁻¹)	洗脱率 / %	质量分数 / %	收率 / %	比吸附量 / (mg·mL ⁻¹)	洗脱率 / %	质量分数 / %	收率 / %
1	11.2	90.2	29.3	84.2	28.9	91.3	49.4	85.1
2	12.6	88.9	28.7	82.1	30.2	89.9	47.6	83.6
3	11.8	91.3	30.1	85.7	29.6	92.0	50.5	87.1

收率 = 提取物中多酚的质量 / 上样液中多酚的质量

Yield yieldt = quality of polyphenols in extract / quality of polyphenols in extracting solution

酚在 201×7 氢氧型阴离子交换树脂上吸附和洗脱重现性好, 说明此工艺条件稳定, 结果可靠。

2.7 洗脱液处理及除盐工艺

洗脱液中含有大量的 OH⁻及氯化钠, 需要进行中和及除盐处理。经考察, 确定将洗脱液用稀盐酸溶液调至近中性, 然后将药液减压浓缩至有大量氯化钠固体析出, 移至烘箱中减压干燥, 将干燥品用无水乙醇加热回流提取 4 次进行脱盐。经脱盐剩余的氯化钠可循环利用, 不仅安全环保, 而且降低了

生产成本。最后将所得的乙醇提取液经减压回收乙醇后, 浓缩, 干燥。即得绵马贯众总多酚提取物。

2.8 离子树脂的再生

树脂每次使用后, 用去离子水逆向洗去乙醇及氯化钠, 然后逆向加 8%氢氧化钠浸泡过柱面, 浸泡, 待 4~5 h 后, 正向加水冲洗至流出液 pH 值为 5~7 时, 即可进行下一次上柱交换, 树脂可多次循环使用, 生产成本经济, 且不需反复装柱, 应用简便。

3 讨论

目前有文献报道^[7]采用乙醇提取-大孔树脂分离纯化绵马贯众素 ABBA, 其工艺成本较高, 实际应用受限, 而本研究首次采用阴离子交换树脂分离纯化绵马贯众素 ABBA, 成本低, 适宜大生产, 具有较好的应用前景。

结合本实验室其他相关研究成果^[8], 采用一定浓度的盐醇液进行洗脱, 绵马贯众素 ABBA 等多酚成分洗脱率高, 且产物中绵马贯众素 ABBA 质量分数较高, 盐醇洗脱液经济、安全, 适合工业化生产。

本研究前期发现不同产地绵马贯众药材中绵马贯众素 ABBA 量差别较大, 相关文献报道^[9]绵马贯众久置后绵马贯众素 ABBA 量降低, 其可能与原药材中含有分解绵马贯众素 ABBA 等多酚类物质的活性酶有关, 本研究将进一步对原药材的产地加工进行研究, 为本研究奠定相关基础。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 高增平, 陆蕴如, 江佩芬, 等. 绵马贯众部位 II 的抗疟

作用和急性毒性实验研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2002, 25(2): 52-54.

[3] Kapadia G J, Tokuda H, Konoshima T, *et al.* Anti-tumor promoting activity of *Dryopteris phlorophenone* derivatives [J]. *Cancer Lett*, 1996, 105(2): 161-163.

[4] 肖国军, 叶利明, 吴纯洁, 等. HPLC 法测定绵马贯众中绵马贯众素的含量 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(5): 502-504.

[5] 高增平, 苏雨雪. 商品贯众中总间苯三酚含量测定方法研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(4): 259-262.

[6] 冯建光. 大孔吸附树脂分离纯化朝鲜蓴叶中洋蓟素的研究 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1109-1113.

[7] 王海宁, 谢印芝, 樊飞跃, 等. 绵马贯众中绵马贯众素大孔树脂纯化工艺研究 [J]. 中国药师, 2008, 11(7): 765-768.

[8] 王 信, 代 龙, 孙志强, 等. 阳离子交换树脂分离纯化钩藤总生物碱的工艺研究 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 1973-1975.

[9] 张思巨, 艾铁民, 杨立新. 绵马贯众贮存时间与药材质量相关性研究 [J]. 中国中药杂志, 1996, 21(4): 206-207.