

益智总黄酮大孔吸附树脂纯化工艺研究

吴博¹, 刘春梅¹, 刘冰¹, 赵旭¹, 毕开顺², 贾英^{1*}

1. 沈阳药科大学中药学院 沈阳市中药药效物质基础筛选与评价重点实验室, 辽宁 沈阳 110016

2. 沈阳药科大学中药学院 中药质量控制关键技术国家地方联合工程实验室, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 目的 研究优化大孔吸附树脂纯化益智总黄酮的最佳工艺。方法 以吸附率和解吸率为指标, 利用静态吸附试验对15种大孔吸附树脂进行筛选, 并通过与动态吸附相结合的方法, 优选树脂的最佳分离纯化条件。结果 HP20大孔吸附树脂宜于FAOF的提纯, 最佳纯化工艺为上样液黄酮质量浓度为1.518 mg/mL, 上样体积流量为1.0 mL/min, 上样量为50 mL, 洗脱溶剂为30%乙醇, 洗脱体积流量为1.0 mL/min, 洗脱体积为6 BV, 纯化后黄酮量高达51.68%。结论 HP20大孔吸附树脂能有效分离纯化益智中的总黄酮。

关键词: 益智; 黄酮; 大孔吸附树脂; 工艺优化; 吸附率; 解析率

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)09-1321-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.09.012

Purification technology for flavone from *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* with macroporous resins

WU Bo¹, LIU Chun-mei¹, LIU Bing¹, ZHAO Xu¹, BI Kai-shun², JIA Ying¹

1. Key Laboratory of Active Components of Chinese Medicine Screening and Evaluation, School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. The Engineering Laboratory of National and Local Union of Quality Control for Traditional Chinese Medicine, School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: **Objective** To optimize the purification technology for flavone from *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* (FAOF) with macroporous resins. **Methods** Static and dynamic adsorption-desorption were used to select the best one from 15 different type macroporous resins; With the content of flavone as index, the purification technology parameters of flavone were optimized. **Results** HP20 type resin showed the best purifying profile, its optimum technology conditions were as follows: sample injection concentration was 1.518 mg/mL, sample flow rate was 1.0 mL/min, quantity of adsorption was 50 mL, desorption rate was 1.0 mL/min, eluted by 6 BV 30% ethanol. **Conclusion** The flavone could be isolated from *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* by HP20 macroporous resins.

Key words: *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*; flavone; macroporous resin; optimum process; absorption rate; desorption rate

益智是姜科多年生植物益智 *Alpinia oxyphylla* Miq. 的干燥成熟果实, 为中国四大南药之一, 卫生部认定的药食同源的品种之一, 主产于广东、海南等地; 具有温肾固精缩尿、温脾开胃摄痰之功效^[1]。本课题组前期工作已经对益智不同极性部位的提取物进行了药效学筛选^[2], 并对其有效层氯仿部位^[3]和正丁醇部位^[4]的神经保护与抗氧化方面的活性进行了研究, 效果均较为明显。

到目前为止, 益智中分离得到化学成分主要有萜类、黄酮类、酚类、甾醇类和二苯庚烷类化合物等^[5-8], 其中, 黄酮类化合物为目前较为公认的具有明显抗氧化活性的一类化合物, 郑义等^[9]对超声辅助技术提取益智总黄酮(FAOF)的方法进行了优化并发现质量分数为0.50%的FAOF具有较好的体外抗氧化活性。然而, 有关益智中较高纯度总黄酮类成分富集的提取工艺鲜有报道, 本研究拟用15种大

收稿日期: 2014-12-27

基金项目: 国家自然科学基金项目—基于活性筛选和谱效表征的益智抗阿尔茨海默病药效物质基础研究(81403065); 辽宁省自然科学基金—基于体内过程的中药镇静催眠活性组分筛选研究(2014020076); 中药药效物质基础筛选与评价重点实验室(F13-287-1-00)

作者简介: 吴博, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制。E-mail: liubing9246@sina.com

*通信作者 贾英, 教授, 女, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础与质量控制。Tel: (024)23986933 E-mail: jiajingsyphu@126.com

孔吸附树脂,采用静态吸附和动态吸附相结合的方法,从中筛选出一种对FAOF富集效果最好的大孔吸附树脂,并优化其方法,得到富集后纯度较高的FAOF,旨在为开发以FAOF类化合物为主的药品及功能食品提供理论依据。

1 仪器与材料

RE-52A型旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;HH-4型数显电热恒温水浴锅,国华电器有限公司;SHA-CA型水浴恒温振荡器,金坛市宏华仪器厂;UV-1700紫外可见分光光度计,日本岛津公司;Varioskan Flash酶标仪,赛默飞世尔科技公司。

益智药材购自辽宁省沈阳市同仁堂药房,经沈阳药科大学生药学教研室贾英教授鉴定为姜科植物益智 *Alpinia oxyphylla* Miq. 的干燥成熟果实,密封存放于阴凉干燥处。芦丁对照品,质量分数 $\geq 98\%$,批号10080-200707,购自大连美仑科技有限公司;亚硝酸钠(NaNO_2)、硝酸铝 $[\text{Al}(\text{NO}_3)_3]$ 、氢氧化钠(NaOH)等试剂均购于山东禹王化学试剂有限公司;所用15种大孔吸附树脂(HPD450、D2530、HP20、HPD-BJQH、NKA-9、HPD600、HPD722、DM130、AB-8、ADS-17、HPD500、HPD826、NKA、D101、HPD100)均购于河北省沧州宝恩吸附材料科技有限公司,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 FAOF的测定方法

按照郑义等^[9]、杨艳俊等^[10]的方法建立FAOF的测定方法。

2.1.1 对照品溶液的制备 芦丁对照品置于120℃烘箱里干燥至恒定质量,取恒定质量的芦丁约10.0 mg,精密称定,置于50 mL量瓶中,加入适量的无水乙醇,置水浴上微热,溶解后放冷,以无水乙醇稀释至刻度,摇匀,即得含芦丁0.200 mg/mL的对照品溶液。

2.1.2 测定波长的选择 精密量取芦丁对照品溶液5.0 mL,利用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 方法进行显色处理,在200~800 nm波长内扫描,测定最大吸收波长,确定510 nm为最佳检测波长。

2.1.3 线性关系考察 精密吸取芦丁标准溶液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,分别置于7只25 mL量瓶中,各加50 mg/mL亚硝酸钠溶液1 mL,摇匀,静置6 min,加100 mg/mL三氯化铝试液1 mL,摇匀,静置6 min,再加50 mg/mL的氢氧化钠溶液10 mL,无水乙醇定容至刻度,摇匀,静置

15 min。以空白试剂做参比,在510 nm波长处测定吸光度(A)值。以芦丁质量浓度(C)为横坐标, A 值为纵坐标,绘制标准曲线,其线性回归方程为 $A=0.0067C+0.041$, $r=0.9993$ 。

2.1.4 样品溶液的制备 益智干燥果实800 g,粉碎,10倍量60%乙醇回流提取3次,每次2 h,合并滤液得益智总提物,浸膏共149.8 g,实验前用蒸馏水溶解浓缩得含有FAOF的样品溶液。

2.2 大孔吸附树脂的选择

2.2.1 树脂的预处理 大孔吸附树脂用95%乙醇浸泡24 h,充分溶胀后,用95%乙醇淋洗至流出液与水(1:3)混合不呈白色浑浊为止,然后以大量蒸馏水洗尽乙醇,以吸水纸吸去树脂表面水分,备用。

2.2.2 大孔吸附树脂静态吸附率的测定 精密称取预处理好的15种大孔吸附树脂各2 g(滤纸吸干树脂表面的水分)至150 mL具塞锥形瓶中,分别加入上清液溶液30 mL(黄酮质量浓度为1.772 mg/mL),28℃恒温恒速振荡器振荡吸附24 h后,分别测定各上清液中的总黄酮质量浓度,计算各型号树脂的静态吸附率。将上述吸附饱和的树脂用滤纸吸干表面残留的溶液,置于锥形瓶中,准确加入70%乙醇30 mL,置于恒温恒速振荡器振荡,振摇6 h,充分洗脱,滤过,得滤液,按下式测定总黄酮的量,计算各大孔吸附树脂的静态解吸率。

吸附率=(吸附前总黄酮质量浓度-吸附后总黄酮质量浓度)/吸附前总黄酮质量浓度

解吸率=解吸后总黄酮质量浓度/(吸附前总黄酮质量浓度-吸附后总黄酮质量浓度)

富集总黄酮回收率=吸附率 $\times$ 解吸率

结果见表1。以吸附率为主要影响因素,结合FAOF回收率,选出HP20、NKA-9、AB-8、DM130、HPD600 5种大孔吸附树脂进行下一步的动态吸附实验。

2.2.3 动态吸附-洗脱性能试验 取处理好的HP20、NKA-9、AB-8、DM130、HPD600 5种大孔吸附树脂各5 g,装于450 mm $\times$ 15 mm柱内,将FAOF质量浓度为1.410 mg/mL的上样液50 mL加于柱顶(树脂吸附饱和),以1.0 mL/min的体积流量进行动态吸附,预吸附50 min,过柱液重吸附1次后放置过夜。加5 BV水以2 BV/h的体积流量洗脱,收集过柱液和水洗液,定容。用50%乙醇以2 BV/h的体积流量洗脱至不再有黄酮流出,按“2.1.3”项下方法测定并计算吸附率及解吸率,结果见表2。

表 1 大孔吸附树脂对 FAOF 的静态吸附与解吸性能
Table 1 Static absorption and desorption capabilities of FAOF by different macroporous resins

树脂种类	吸附率/%	吸附量/ (mg·g ⁻¹)	解吸率/%	总黄酮回 收率/%
HPD450	67.90	17.99	93.2	63.29
D253 0	69.76	18.48	92.7	64.66
HP20	78.87	20.89	86.2	67.99
HPD-BJQH	68.24	18.08	99.6	67.93
NKA-9	73.82	19.55	89.0	65.72
HPD600	73.95	19.59	83.9	62.02
HPD722	69.09	18.30	99.9	68.99
DM130	70.57	18.69	96.9	68.36
AB-8	70.21	18.60	96.2	67.51
ADS-17	59.85	15.85	97.3	58.21
HPD500	70.06	18.56	86.6	60.64
HPD826	68.43	18.13	91.4	62.55
NKA	68.79	18.22	89.2	61.38
D101	69.38	18.38	95.2	66.03
HPD100	68.92	18.25	99.2	68.38

表 2 5 种大孔吸附树脂对 FAOF 的动态吸附与解吸性能
Table 2 Dynamic absorption and desorption capabilities of FAOF by different macroporous resins

树脂种类	吸附率/%	解吸率/%
NKA-9	77.23	95.32
HP20	83.73	99.87
AB-8	78.02	96.73
DM130	77.07	92.35
HPD100	81.51	88.51

根据实验结果,选择 HP20(中性)大孔吸附树脂进行下一步的纯化实验。

2.3 大孔吸附树脂纯化工艺的优选

2.3.1 样品质量浓度的考察 精密称取处理好的 HP20 大孔吸附树脂 5.0 g(保留体积约为 8 mL),4 份,装柱。将 FAOF 质量浓度分别为 3.046、1.518、0.759、0.385 mg/mL 的 FAOF 粗品药液 15、30、60、120 mL,以相同体积流量通过树脂柱,完全吸附后测定吸附后溶液中 FAOF 的质量浓度,计算该树脂的吸附率,结果吸附率分别为 76.84%、79.55%、78.69%、77.24%。当 FAOF 质量浓度为 1.518 mg/mL 时,吸附率达最大值,过高或过低都会降低吸附率,此上样质量浓度为工业生产提供参考。

2.3.2 上样体积流量的考察 精密称取处理好的 HP20 大孔吸附树脂 5.0 g,4 份,湿法装柱。选取 FAOF 质量浓度为 1.518 mg/mL 的黄酮粗品药液 50 mL 上柱,以不同体积流量(0.5、1.0、2.0、4.0 mL/min)通过树脂,分别收集流出液,测定流出液 FAOF 质量浓度,计算吸附率,结果吸附率分别为 82.30%、81.28%、70.23%、50.24%。上样体积流量越大,吸附率越低。当上样体积流量为 0.5 mL/min 时,吸附率最高,但上样体积流量过小,在上样过程周期过长,因此选择 1.0 mL/min 为上样体积流量,既保证了上样进度,又能得到较好的吸附率。

2.3.3 上样量的考察 精密称取处理好的 HP20 大孔吸附树脂 5.0 g,选取 FAOF 质量浓度为 1.518 mg/mL 的黄酮粗品 100 mL,进行动态吸附。样品加入体积流量为 1.0 mL/min,分段收集流出液,体积流量同样为 1.0 mL/min,每份 5 mL,收集 20 份。测定 20 份样品的 FAOF 的量。结果见图 1,当流出液收集到第 5 个 5 mL 的时候,黄酮液开始大量泄漏,当收集到第 10 个 5 mL 的时候,流出液 FAOF 质量浓度基本达到峰值且不再改变,提示当 FAOF 质量浓度为 1.518 mg/mL 的样品液为 50 mL 的时候,基本达到饱和,建议上样量为 50 mL。

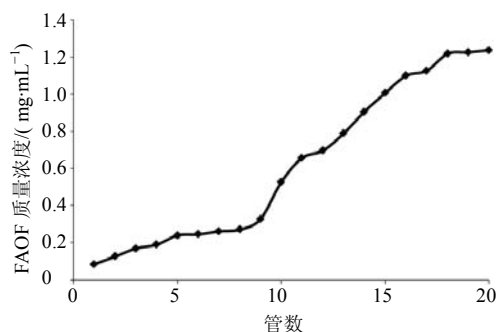


图 1 泄漏曲线

Fig. 1 Leakage curve

2.3.4 洗脱剂体积分数的考察 精密称取处理好的 HP20 大孔吸附树脂 5.0 g,取 FAOF 质量浓度为 1.518 mg/mL 的样品液 50 mL 进行动态吸附,吸附完全后,先用 100 mL 水冲洗,再依次以 30%、50%、95%乙醇各 100 mL 进行梯度洗脱(水为每管 20 mL,收集 5 管;乙醇为每管 10 mL,收集 10 管),测定每管 FAOF 的量,以管号为横坐标,FAOF 质量浓度为纵坐标,绘制洗脱曲线。结果见图 2,FAOF 主要集中在 30%乙醇的洗脱液中(6~10 号),为在实际生产中获得更高的转移率,故选择 30%乙醇为

洗脱剂。

2.3.5 洗脱剂用量的考察 精密称取处理好的 HP20 大孔吸附树脂 5.0 g, 取 FAOF 质量浓度为 1.518 mg/mL 的黄酮粗品 50 mL 进行动态吸附, 吸附完全后用 150 mL 水洗, 用 30% 乙醇以 1.0 mL/min 的体积流量进行解吸, 每 8 mL 流出液收集 1 份 (约 1 BV), 以保留体积数量为横坐标, FAOF 质量浓度为纵坐标绘制曲线。结果见图 3, 由图可知, 当洗脱体积为 6 BV 时, FAOF 基本洗脱完全。

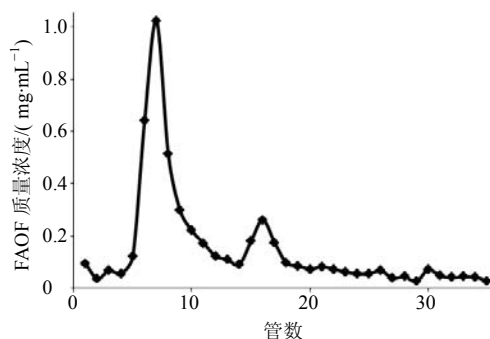


图2 梯度洗脱曲线

Fig. 2 Gradient elution curve

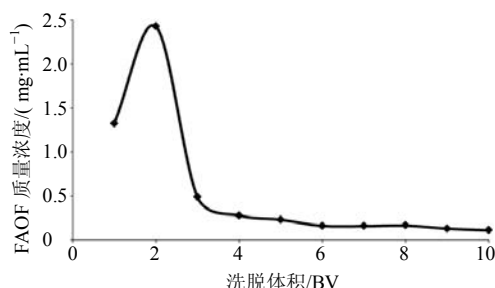


图3 洗脱剂用量的考察

Fig. 3 Investigation of eluant volume

2.3.6 洗脱体流量的考察 精密称取处理好的 HP20 大孔吸附树脂 5.0 g, 4 份, 分别装柱。选取 FAOF 质量浓度为 1.518 mg/mL 的黄酮粗品药液 50 mL 上柱, 先用 100 mL 蒸馏水洗脱, 再用 100 mL 30% 乙醇分别以 0.5、1.0、2.0、4.0 mL/min 的体积流量解吸, 计算回收率, 结果回收率分别为 85.98%、82.36%、72.50%、60.23%。洗脱体流量越大, 回收率越低。当洗脱体流量为 0.5 mL/min 时, FAOF 回收率最高, 但洗脱体流量过小, 生产周期也会延长, 因此选择 1.0 mL/min 为洗脱体流量, 既提高了回收率又加快了生产周期。

2.3.7 验证试验 精密称取处理好的 HP20 大孔吸附树脂 5.0 g, 3 份, 分别装柱, 按照各项下优选后的 FAOF 质量浓度为 1.518 mg/mL 的黄酮粗品药液

50 mL 上柱, 按上述纯化工工艺进行 3 次验证试验, 收集 30% 乙醇洗脱液, 蒸干后测定浸膏质量, FAOF 回收率分别为 82.2%、82.4%、81.9%, 质量分数分别为 51.26%、51.08%、52.69%, 说明该纯化工工艺重复性良好。

3 讨论

大孔吸附树脂的极性、孔径、比表面积是影响吸附性能的重要因素。遵从相似相溶原则, 极性较大的树脂适合用于在弱极性溶液中吸附极性大的物质, 极性小的树脂适合用于在强极性溶液中吸附极性小的物质。本实验采用 HP20 (中极性) 的大孔吸附树脂对益智中的黄酮类化合物进行富集, 选取 FAOF 质量浓度为 1.518 mg/mL, 上样液 50 mL 上样, 洗脱溶剂为 30% 乙醇, 洗脱体积流量为 1.0 mL/min, 洗脱体积为 6 BV, 得到了质量分数为 51.68% 的 FAOF, 纯度较高, 建议采用该种大孔吸附树脂进行富集。黄酮类化合物是益智的主要活性物质之一^[11], 目前已从益智中分离出多种黄酮类物质, 如白杨素、杨芽黄素、伊砂黄素、山柰酚-4'-O-甲醚等^[12-15]。黄酮类化合物具有结构优越性, 其抗氧化等方面的活性备受国内外瞩目, 富集后的 FAOF 可用于多方面的实验研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 石绍淮, 张晨宁, 刘冰, 等. 益智仁不同极性提取物抗老年痴呆作用的研究 [J]. 中国药房, 2013, 24(27): 2507-2510.
- [3] Shi S H, Zhao X, Liu B, et al. The effects of sesquiterpenes-rich extract of *Alpinia oxyphylla* Miq. on amyloid- β -induced cognitive impairment and neuronal abnormalities in the cortex and hippocampus of mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, Article ID 451802, 11 pages, 2014. doi:10.1155/2014/451802.
- [4] Shi S, Zhao X, Liu A J, et al. Protective effect of *n*-butanol extract from *Alpinia Oxyphylla* on learning and memory impairments [J]. *Physiol Behav*, 2014, 139(11): 13-20.
- [5] 石绍淮, 张晨宁, 刘爱敬, 等. 益智仁化学成分的分选与鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17): 97-100.
- [6] 邸磊, 王治元, 王志, 等. 益智仁的化学成分 [J]. 植物资源与环境学报, 2011, 20(2): 94-96.
- [7] 吕秀香, 张连学. 益智化学成分及药理作用研究进展 [J]. 吉林农业, 2011(4): 330-331.
- [8] 冯淑香, 刘耀明, 董俊兴. 中药益智仁化学成分与药理

- 研究进展 [J]. 现代中药研究与实践, 2003, 17(5): 58-61.
- [9] 郑义, 邵颖, 陈安徽, 等. 益智仁总黄酮超声辅助提取工艺优化及其抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2014, 35(6): 44-49.
- [10] 杨艳俊, 王亚红, 王君龙. 景天三七总黄酮大孔吸附树脂纯化工艺研究 [J]. 北方园艺, 2014(7): 144-147.
- [11] 张俊清, 王勇, 陈峰, 等. 益智的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(2): 280-287.
- [12] Morikawa T, Matsuda H, Toguchida I, *et al.* Absolute stereostructures of three new sesquiterpenes from the fruit of *Alpinia oxyphylla* with inhibitory effects on nitric oxide production and degranulation in RBL-2H3 cells [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(10): 1468-1474.
- [13] 刘楠, 于新宇, 赵红, 等. 益智仁化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 29-32.
- [14] 徐俊驹, 谭宁华, 曾广智, 等. 益智仁化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(8): 990-993.
- [15] 陈萍, 王培培, 焦泽沼, 等. 益智仁的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 617-623.