

大孔吸附树脂分离纯化香青兰提取液工艺研究

于 宁, 何承辉, 邢建国*, 曾 诚, 赵 军

新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830004

摘 要:目的 考察大孔吸附树脂分离纯化香青兰提取液的最佳工艺条件。方法 以总黄酮、田蓟苷、木犀草素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷、迷迭香酸为检测指标, 利用静态吸附实验对7种大孔吸附树脂进行筛选, 并通过与动态吸附实验相结合的方法, 优选大孔吸附树脂分离纯化香青兰提取液的最佳工艺条件。结果 HPD600型大孔树脂宜于香青兰提取液的纯化, 最佳纯化工艺参数为香青兰提取液质量浓度为80 mg/mL, 柱径高比为1:9, 上样量为生药0.32 g/mL树脂, 上样体积流量为1.5 BV/h (BV为柱体积), 吸附时间为12 h, 水除杂用量4 BV, 洗脱溶剂为70%乙醇, 洗脱体积为6 BV, 洗脱体积流量为1.5 BV/h, 纯化后总黄酮、田蓟苷、木犀草素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷和迷迭香酸的质量分数分别达到53%、5.5%、4.7%和2.5%以上。结论 HPD600型大孔树脂分离纯化香青兰提取液的方法可行。

关键词: 香青兰; 大孔吸附树脂; 总黄酮; 田蓟苷; 木犀草素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷; 迷迭香酸

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)04-0599-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.04.012

Research on separation and purification of extract from *Dracocephalum moldevica* with macroporous resins

YU Ning, HE Cheng-hui, XING Jian-guo, ZENG Cheng, ZHAO Jun

Xinjiang Institute of MeteriaMedica, Urumqi 830004, China

Abstract: Objective To investigate the technology for the separation and purification of extract in *Dracocephalum moldevica* (EDM) by macroporous resin. **Methods** Static and dynamic adsorption-desorption were used to select the best one from seven different type macroporous resins; With the content of total flavonoids, tilianin, luteolin-7-*O*- β -D-glucuronide, and rosmarinic acid as indexes, the purification technology parameters of EDM were optimized. **Results** HPD600 resin showed the best purifying profile, its optimum technology conditions were as follows: The optimum concentration of the sample liquid was 0.08 g/mL equivalent to raw material, the resin column diameter-height ratio was 1:9, the amount of used adsorption was 0.32 g dried medicinal herb/mL resin, sample flow rate was 1.5 BV/h, and adsorption time was 12 h. In the course of elution, the resin column chromatography was eluted with 6 BV of 70% ethanol after removing impurities with 4 BV of water by flow rate of 1.5 BV/h. The contents of total flavonoids, tilianin, luteolin-7-*O*- β -D-glucuronide, and rosmarinic acid were more than 53%, 5.5%, 4.7%, and 2.5%. **Conclusion** Macroporous resin HPD600 is suitable to separate and purify EDM.

Key words: *Dracocephalum moldavica* L.; macroporous adsorption resins; total flavonoids; tilianin; luteolin-7-*O*- β -D-glucuronide; rosmarinic acid

香青兰为唇形科植物香青兰 *Dracocephalum moldevica* L. 的干燥地上部分, 具有活血化瘀、补益心脑、通路开窍、止痛解毒等功效, 效果良好, 为维吾尔医学常用药, 在维吾尔医学和民间用于治疗冠心病、寒性神经性头疼等疾病^[1]。香青兰单味药材制剂(益心巴迪然吉布亚颗粒)收载于《中华

人民共和国卫生部药品标准·维吾尔药分册》1999年版。益心巴迪然吉布亚颗粒由香青兰药材通过简单的水提取后, 加入辅料制成颗粒剂, 其服用剂量大, 患者依从性差, 并且物质基础不清楚。为了使香青兰药材更好地发挥临床疗效, 亟需研究有效物质成分明确且质量分数高、依从性好的香青兰制剂。

收稿日期: 2015-09-15

基金项目: 国家科技重大专项“重大新药创制”课题(2012ZX09102201-009)

作者简介: 于 宁, 女, 助理研究员, 硕士, 研究方向为中药新药研究。Tel: (0991)2318172 E-mail: ynjy798@163.com

*通信作者 邢建国, 男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药新药研究。Tel: (0991)2300682 E-mail: xjguodd@163.com

香青兰的化学成分主要包括黄酮类^[2]、三萜类、苯丙素类、甾体类、环烯醚萜类和多糖类等^[3-4]。近年来,随着分离纯化技术的进步,对香青兰的化学成分有了新的认识,田蓟苷和木犀草素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷是香青兰中主要黄酮类活性成分,并且质量分数较高,具有扩张冠脉、降低冠脉血管阻力的作用^[5-8];迷迭香酸也是香青兰药材中质量分数较高的成分,具有明确的抗血栓和抗血小板凝集作用,对心血管系统具有明显保护作用^[9-10]。

目前,有文献报道采用大孔吸附树脂分离香青兰中有效成分^[11],以单一成分木犀草素为考察指标,忽视了提取液中组分的复杂性。本实验在前期研究的基础上,选择 LX-11、LX-17、XDA-6、AB-8、HPD100、HPD300、HPD600 7 种大孔吸附树脂,以总黄酮、田蓟苷、木犀草素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷和迷迭香酸为测定指标,对香青兰提取液进行分离纯化研究,初步筛选香青兰提取液分离方法,为后期香青兰制剂工艺的改进提供参考。

1 仪器与材料

SPD-10AVP 型高效液相色谱仪,日本岛津制造所;Millipore simplicity-185 超纯水器,美国密理博公司;LD4-2 离心机,北京医用离心机厂;SHB-IV 循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;LS-3120 超声波发生器,美国科学系统公司;SHA-B 水浴恒温振荡器,江苏金坛市亿通电子有限公司;EYELA 旋转蒸发仪 N-1000,上海爱朗仪器有限公司;72-1 型电热恒温干燥箱,湖北省黄石市医疗器械厂;色谱柱(30 cm $\times$ 1.4 cm),中国科学技术大学玻璃仪器厂。

木犀草素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷(LG)对照品,货号:YLS1169,质量分数大于 98%,购自上海一林生物科技有限公司;田蓟苷对照品为实验室自制,其结构通过 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献报道的数据比对确定,经 HPLC 归一法测定质量分数在 98%以上;迷迭香酸对照品(批号 111871-201001,质量分数 98.8%),购自中国食品药品检定研究院。LX-11、LX-17、XDA-6 型大孔吸附树脂,西安蓝晓科技有限公司;AB-8、HPD100、HPD300、HPD600 型大孔吸附树脂,沧州宝恩化工有限公司;乙腈,美国 Fisher 公司,色谱纯;蒸馏水,Millipore simplicity-185 超纯水器制备;其他试剂均为分析纯。

香青兰采自新疆吉木萨尔县,经新疆维吾尔自治区药物研究所何江副研究员鉴定为唇形科植物香

青兰 *Dracocephalum Moldevica* L. 的干燥地上部分,收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·维吾尔药分册》1999 年版。

2 方法与结果

2.1 指标性成分检测方法

2.1.1 紫外分光光度法测定总黄酮^[12]

(1) 对照品溶液的制备:精密称取田蓟苷对照品适量,置 25 mL 的量瓶中,加入 70%乙醇溶液,配制成含田蓟苷 395.2 μ g/mL 的对照品溶液。

(2) 线性关系考察:精密吸取上述田蓟苷溶液 0.30、0.50、1.0、2.0、3.0 mL,分别置 5 个 25 mL 量瓶中,加入 70%乙醇溶液稀释至刻度,配制成质量浓度分别为 4.742 4、7.904 0、15.808、31.616、47.424 μ g/mL 的溶液。按上述方法制备加试剂的空白溶液,在 200~400 nm 波长扫描,对照品溶液在 330 nm 处有最大吸收。将上述溶液在 330 nm 处测定吸光度(*A*)值,以 *A* 值为纵坐标,质量浓度为横坐标,进行线性回归,得回归方程 $Y=0.131 X-0.031 5$, $r=0.999 2$,表明田蓟苷在 4.742 4~47.424 μ g/mL 线性关系良好。

2.1.2 HPLC 法同时测定田蓟苷、LG、迷迭香酸^[13-14]

(1) 色谱条件:色谱柱为 Purospher[®] STAR LP RP₁₈ endcapped (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);柱温 35 $^{\circ}$ C;流动相为乙腈-0.5%甲酸水溶液,梯度洗脱:0~30 min, 17%乙腈;30~60 min, 17%~30%乙腈;60~75 min, 30%乙腈;体积流量为 1.0 mL/min;检测波长 330 nm;进样体积 10 μ L。

(2) 标准曲线绘制:分别精密称取 LG 对照品 3.74 mg、迷迭香酸对照品 5.184 mg 和田蓟苷对照品 9.88 mg,置 25 mL 量瓶中,加入 70%乙醇溶液稀释至刻度,制成含 LG 149.6 μ g/mL、迷迭香酸 207.2 μ g/mL、田蓟苷 395.2 μ g/mL 的混合对照品储备液。再分别精密吸取上述对照品储备液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL,分别置于不同的 10 mL 量瓶中,并分别加入 70%乙醇溶液稀释至刻度,得到田蓟苷、LG 和迷迭香酸对照品的系列混合对照品溶液,通过 HPLC 检测,以质量浓度对峰面积进行线性回归,得田蓟苷的回归方程为 $Y=30 882 X-6 629.5$, $r=0.999 5$,线性范围 19.76~158.08 μ g/mL;LG 回归方程为 $Y=14 784 X+4 201.2$, $r=0.999 7$,线性范围 7.48~59.84 μ g/mL;迷迭香酸回归方程为 $Y=36 953 X+651.62$, $r=0.999 6$,线性范围 10.36~82.88 μ g/mL。色谱图见图 1。

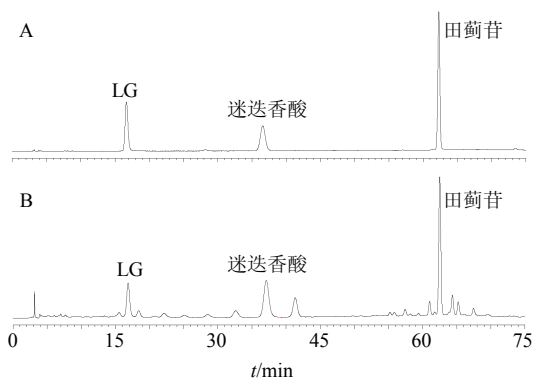


图 1 混合对照品 (A) 与样品 (B) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and sample (B)

2.1.3 香青兰提取液的制备 取香青兰粗粉, 加入 30 倍量 40%乙醇水溶液, 加热回流提取 1 次, 5 h, 滤过提取液, 将滤液减压回收乙醇, 浓缩至无醇味, 加入适量的蒸馏水, 搅拌均匀, 滤过, 制成适宜质量浓度的香青兰提取液 (含生药 80 mg/mL, 其中含总黄酮 1.120 mg/mL, 田蓟苷 334.0 μ g/mL, LG 291.4 μ g/mL, 迷迭香酸 154.1 μ g/mL), 备用。

2.2 香青兰提取液大孔吸附树脂分离纯化工艺研究

2.2.1 树脂的预处理 大孔吸附树脂用 95%乙醇浸泡树脂 24 h, 充分溶胀后, 取适量, 装柱, 然后用蒸馏水冲洗至无醇味。再用 3 BV 的 5% HCl 溶液, 以 4 BV/h 的体积流量通过树脂柱, 并浸泡 4 h, 再用蒸馏水以同样流速洗至流出液呈中性。然后用 3 BV 的 4% NaOH 溶液, 以 4 BV/h 的体积流量通过树脂层, 并浸泡 4 h, 最后用蒸馏水以同样流速洗至流出液呈中性。备用。

2.2.2 树脂干燥曲线的测定 取经预处理的 HPD600、HPD300、HPD100、LX-11、LX-17、XDA-6、AB-8 大孔吸附树脂, 各量取 5 mL, 置 40 $^{\circ}$ C 烘箱中放置 4 h, 每隔 0.5 h 测定树脂的质量。以时间为横坐标, 树脂的质量为纵坐标, 绘制上述 7 种大孔吸附树脂的干燥曲线。结果见图 2, 表明 40 $^{\circ}$ C 条件下, 干燥 2.0 h 时, 7 种大孔吸附树脂质量保持基本恒定, 因此, 干燥时间确定为 2.0 h。

2.2.3 树脂型号考察^[15-20] 取经预处理的 HPD 600、HPD300、HPD100、LX-11、LX-17、XDA-6、AB-8 大孔吸附树脂各 2 g, 分别加入 25 mL 质量浓度为 80 mg/mL 的香青兰提取液, 于摇床 (25 $^{\circ}$ C, 100 r/min) 中振摇 24 h, 分别于 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、10.0、12.0、14.0 h 取样, 并经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 得溶液 1; 取吸附饱

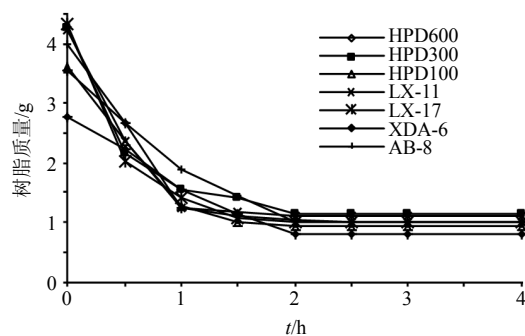


图 2 树脂的干燥曲线
Fig. 2 Drying curves of seven resins

和的 7 种大孔吸附树脂 (14 h 取样后的大孔吸附树脂), 沥干药液, 分别加入 70%乙醇溶液 100 mL, 于摇床 (25 $^{\circ}$ C, 100 r/min) 中振摇 12 h, 滤过, 得溶液 2。分别照“2.1.1”项和“2.1.2”项下方法测定溶液 1 和溶液 2 中总黄酮、田蓟苷、LG 和迷迭香酸的量, 根据下列公式, 分别计算上述 7 种大孔吸附树脂对各指标成分的吸附率和解吸率。以吸附时间为横坐标, 吸附率为纵坐标, 分别绘制上述 7 种树脂对各指标成分的静态吸附动力学曲线, 结果见图 3。饱和吸附率和解吸率结果见表 1。

$$\text{吸附率} = (C_0V_0 - C_1V_1) / C_0V_0$$

$$\text{解吸率} = C_2V_2 / (C_0V_0 - C_1V_1)$$

C_0 为香青兰提取液中指标成分的质量浓度, V_0 为香青兰提取液体积, C_1 为溶液 1 中指标成分的质量浓度, V_1 为溶液 1 体积, C_2 为溶液 2 中指标成分的质量浓度, V_2 为溶液 2 体积

由静态吸附动力学曲线可知, HPD600 大孔吸附树脂对香青兰提取液中总黄酮、田蓟苷、LG 和迷迭香酸的吸附率均较高, 并且各指标成分的吸附率在 8 h 内升高最快, 8 h 后吸附率趋于稳定, 基本达到吸附平衡。

由饱和吸附率和解吸率结果可确定选择 HPD600 大孔吸附树脂进行香青兰提取液下一步的纯化实验。

2.2.4 上样液质量浓度的考察 取经预处理好的 HPD600 大孔吸附树脂 4 g, 平行取 4 份, 湿法装柱。取质量浓度为 0.16 g/mL 香青兰提取液 40 mL, 平行取 4 份, 其中后 3 份分别加入一定量的蒸馏水, 稀释至质量浓度分别为 80、40、20 mg/mL, 以相同上样体积流量通过树脂柱, 完全吸附后, 依次用 80 mL 蒸馏水和 6 BV 70%乙醇冲洗, 分别照“2.1.1”项和“2.1.2”项下方法测定 70%乙醇洗脱液中总黄酮、田蓟苷、LG 和迷迭香酸的量, 计算解吸率,

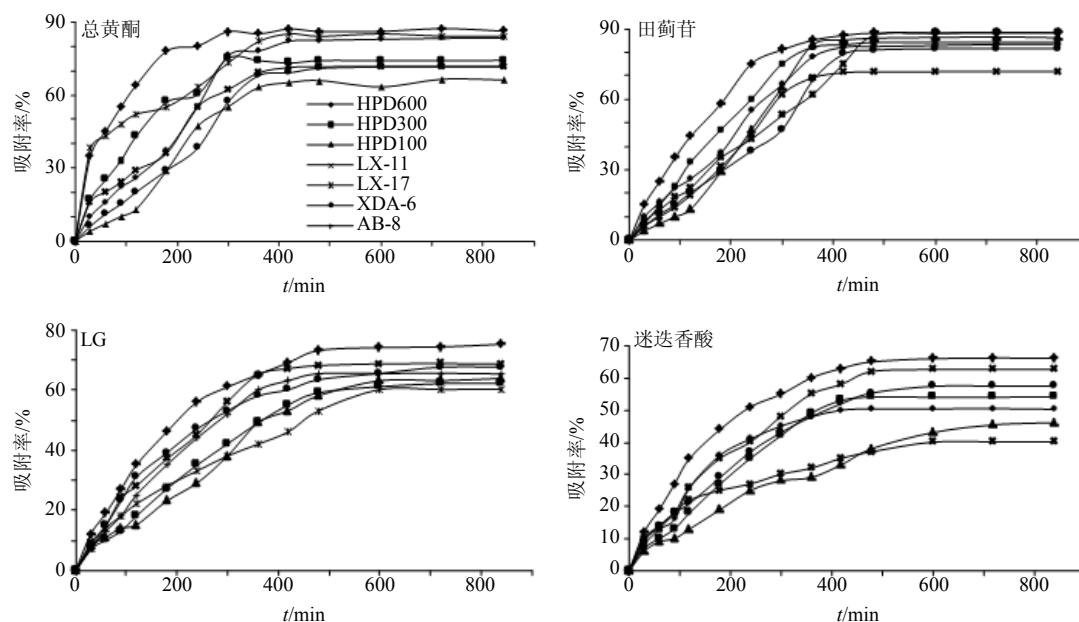


图 3 7 种大孔树脂的静态吸附动力学曲线

Fig. 3 Static adsorption kinetic curves on seven kinds of macroporous resins

表 1 7 种大孔吸附树脂对指标成分吸附率和解吸率

Table 1 Influence of seven macroporous adsorbing resins on adsorption and desorption rates

树脂型号	总黄酮		田菊苷		LG		迷迭香酸	
	吸附率/%	解吸率/%	吸附率/%	解吸率/%	吸附率/%	解吸率/%	吸附率/%	解吸率/%
HPD600	86.32	91.12	88.22	94.23	77.59	82.65	69.20	82.75
HPD300	66.53	86.23	84.21	99.22	62.20	91.43	54.24	88.25
HPD100	75.11	62.45	86.26	53.95	63.88	69.47	46.16	69.16
LX-11	85.15	92.62	71.69	90.94	68.72	77.58	62.70	73.21
LX-17	71.18	90.78	88.56	93.95	60.19	87.75	40.42	86.66
XDA-6	71.59	95.16	81.20	98.07	67.59	83.87	57.69	79.46
AB-8	83.43	81.19	83.43	88.33	65.33	77.55	50.34	80.21

结果见表 2。上样液质量浓度为 80、40、20 mg/mL 时, 各指标成分的解吸率均在 90% 以上, 由于上样液质量浓度越低, 导致吸附效率越低, 工作量增大。因此, 上样液质量浓度为 80 mg/mL 较合理。

表 2 不同上样液质量浓度对吸附性的影响

Table 2 Influence of different sample concentration on adsorption properties

药液质量浓度/ (g·mL ⁻¹)	解吸率/%			
	总黄酮	田菊苷	LG	迷迭香酸
0.16	85.23	83.88	91.26	78.93
0.08	90.56	95.36	97.42	96.73
0.04	91.89	94.79	98.70	97.95
0.02	91.72	95.68	97.74	98.97

2.2.5 上样量的考察 取经预处理好的 HPD600 大孔吸附树脂 4 g, 湿法装柱, 取质量浓度为 80 mg/mL 的香青兰提取液 160 mL, 进行动态吸附, 香青兰提取液以一定的体积流量上样, 分段收集流出液, 每份 10 mL, 收集 16 份。分别照“2.1.1”项和“2.1.2”项下方法测定每份流出液中总黄酮、田菊苷、LG 和迷迭香酸的量, 绘制泄漏曲线, 结果见图 4。当流出液收集到第 8 个 10 mL 的时候, 各指标成分均开始泄漏, 故最大上样量定为 80 mL, 则上样量为生药 0.32 g/mL 树脂。

2.2.6 上样体流量的考察 取经预处理好的 HPD600 大孔吸附树脂 4 g, 平行取 4 份, 湿法装柱。取质量浓度为 80 mg/mL 的香青兰提取液 80 mL 上柱, 以不同的体积流量 (1.0、1.5、2.0、2.5 BV/h)

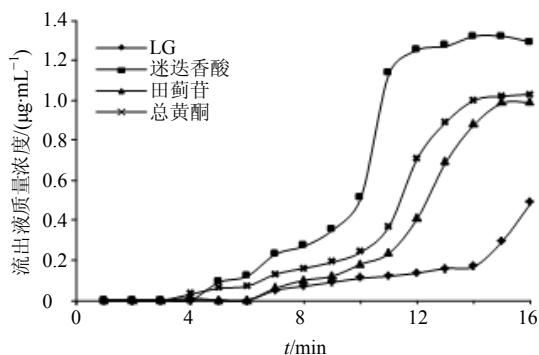


图 4 泄漏曲线

Fig. 4 Leakage curves

通过树脂柱，静置一定时间后，依次用 80 mL 蒸馏水和 6 BV 70%乙醇冲洗，分别按照“2.1.1”项和“2.1.2”项下方法测定 70%乙醇洗脱液中总黄酮、田蓯苢、LG 和迷迭香酸的量，计算解吸率，结果见表 3。上样体积流量越大，各指标成分的解吸率越低。上样体积流量为 1.0、1.5 BV/h 时，各指标成分解吸率均达到 93%以上，但上样体积流量过小，上样周期过长，因此，选择 1.5 BV/h 为最佳上样体积流量。

表 3 上样液不同吸附体积流量对吸附性能的影响

Table 3 Influence of different adsorption flow rates on adsorption properties

体积流量/(BV·h ⁻¹)	解吸率/%			
	总黄酮	田蓯苢	LG	迷迭香酸
1.0	94.12	95.12	95.51	95.49
1.5	93.89	96.85	96.84	96.44
2.0	90.32	96.03	95.70	95.90
2.5	87.67	80.78	86.82	87.37

2.2.7 吸附时间的考察 取经预处理好的 HPD600 大孔吸附树脂 4 g，平行取 5 份，湿法装柱。取质量浓度为 0.08 g/mL 的香青兰上样液 80 mL 上柱，进行动态吸附。上样体积流量为 1.5 BV/h，分别静置 0、3、6、9、12 h 后，依次用 80 mL 蒸馏水和 6 BV 70%乙醇冲洗，分别照“2.1.1”项和“2.1.2”项下方法测定 70%乙醇洗脱液中总黄酮、田蓯苢、LG 和迷迭香酸的量，计算解吸率，结果见表 4。表明吸附时间对总黄酮、LG 和迷迭香酸的解吸率有显著影响，对田蓯苢影响不大，随着吸附时间的延长各指标的解吸率呈上升趋势，吸附 9、12 h 时，各指标的解吸率均达到 92%以上，因此，为便于工业化操作，确定吸附时间为 12 h。

表 4 吸附时间对吸附性能的影响

Table 4 Influence of different adsorbing time on adsorption properties

吸附时间/h	解吸率/%			
	总黄酮	田蓯苢	LG	迷迭香酸
0	68.45	86.55	70.22	72.42
3	72.67	91.55	76.99	78.48
6	84.01	92.36	83.67	88.66
9	92.34	93.11	95.29	95.46
12	93.22	94.78	97.45	96.37

2.2.8 柱径高比的考察 取经预处理好的 HPD600 大孔吸附树脂 4 g，平行取 3 份，湿法装柱，分别装入径高比 1：6、1：9、1：12 的树脂柱。取质量浓度为 80 mg/mL 的香青兰提取液 80 mL 上柱，进行动态吸附。上样体积流量为 1.5 BV/h，吸附 12 h 后，依次用 80 mL 蒸馏水和 6 BV 70%乙醇冲洗，分别照“2.1.1”项和“2.1.2”项下方法测定 70%乙醇洗脱液中总黄酮、田蓯苢、LG 和迷迭香酸的量，计算解吸率，结果见表 5，确定柱径高比选择为 1：9。

表 5 不同径高比对吸附性能的影响

Table 5 Influence of different resin column diameter-height ratios on adsorption properties

柱径高比	解吸率/%			
	总黄酮	田蓯苢	LG	迷迭香酸
1：6	82.45	92.01	93.99	96.44
1：9	85.67	96.22	96.53	94.35
1：12	78.06	89.03	95.55	92.33

2.2.9 水洗脱体积的考察 取经预处理好的 HPD600 大孔吸附树脂 4 g，按上述优选的工艺参数上样，用 200 mL 蒸馏水冲洗，每 1 BV 接 1 份，按照“2.1.1”项和“2.1.2”项下方法测定每份流出液中的总黄酮、田蓯苢、LG 和迷迭香酸的量，并测定出膏率。结果表明，流出液中各指标成分的量均较低，且流出液出膏率逐渐降低，第 4 份流出液出膏率仅为 0.11%，因此，为节省工时，水洗脱体积为 4 BV。

2.2.10 洗脱剂体积分数的考察 取经预处理好的 HPD600 大孔吸附树脂 4 g，按上述优选的工艺参数上样，先用 4 BV (80 mL) 蒸馏水冲洗，再依次以 6 BV 的 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70% 乙醇进行梯度洗脱，洗脱液依次编号为 1~7 号。按照“2.1.1”项和“2.1.2”项下方法测定各洗脱液中

总黄酮、田蓟苷、LG 和迷迭香酸的量, 计算解吸率, 以不同洗脱溶剂 (编号) 为横坐标, 相应洗脱液中各指标成分的解吸率为纵坐标, 绘制洗脱曲线, 结果见图 5。表明 70%乙醇洗脱 6 BV 时, 各指标成分几乎完全洗脱并富集。

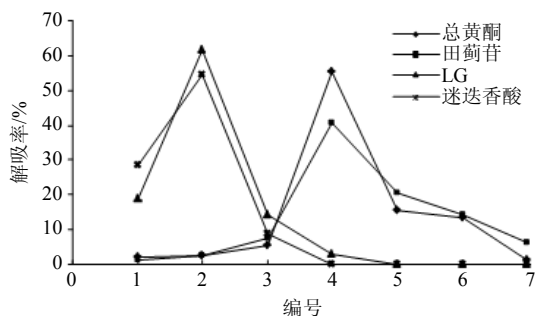


图 5 梯度洗脱曲线

Fig. 5 Gradient elution curves

2.2.11 洗脱剂用量的考察 取经预处理好的 HPD600 大孔吸附树脂 4 g, 平行取 4 份, 按上述优选的工艺参数上样, 先用 80 mL 蒸馏水冲洗, 再用 70%乙醇以一定的体积流量进行解吸, 前 80 mL (4 BV) 收集 1 份, 第 5、6、7 BV 分别收集, 按照“2.1.1”项和“2.1.2”项下方法测定各流份中总黄酮、田蓟苷、LG 和迷迭香酸的量, 分别计算各指标成分的解吸率, 结果见表 6。收集的第 7 BV 洗脱液中各指标成分解吸率均很低 (<2%), 因此, 确定洗脱剂用量为 6 BV。

表 6 洗脱剂用量的考察

Table 6 Investigation of eluant volume

指标成分	解吸率/%			
	前 4 BV	第 5 BV	第 6 BV	第 7 BV
总黄酮	82.12	6.99	3.01	0.88
田蓟苷	84.66	10.87	1.74	0.53
LG	85.78	7.34	3.73	1.77
迷迭香酸	90.23	4.58	2.57	1.91

2.2.12 洗脱体积流量的考察 取经预处理好的 HPD600 大孔吸附树脂 4 g, 平行取 4 份, 按上述优选的工艺参数上样, 先用 80 mL 蒸馏水冲洗, 再用 6 BV 70%乙醇分别以 1.0、1.5、2.0、2.5 BV/h 的体积流量解吸, 分别照“2.1.1”项和“2.1.2”项下方法测定 70%乙醇洗脱液中总黄酮、田蓟苷、LG 和迷迭香酸的量, 计算各指标成分的解吸率, 结果见表 7。表明洗脱体积流量越大, 各指标成分的解吸率越低, 洗脱体积流量在 1.0、1.5 BV/h 时, 各标成

表 7 洗脱体积流量对吸附性能的影响

Table 7 Influence of different elution rates on adsorption properties

洗脱体积流量/ (BV·h ⁻¹)	解吸率/%			
	总黄酮	田蓟苷	LG	迷迭香酸
1.0	93.12	94.69	94.73	95.56
1.5	92.09	97.02	97.39	94.93
2.0	89.34	95.32	96.02	94.86
2.5	85.21	86.66	91.46	89.46

分解吸率均较高, 但洗脱体积流量过小, 生产周期也会延长。因此, 选择 1.5 BV/h 为洗脱体积流量。

2.3 验证实验

取经预处理好的 HPD600 大孔吸附树脂 4 g, 平行取 3 份, 湿法装柱, 取质量浓度为 80 mg/mL 的香青兰提取液 80 mL 上柱, 按上述纯化工艺进行 3 次验证试验, 收集 70%乙醇洗脱液, 照“2.1.1”项和“2.1.2”项下方法测定 70%乙醇洗脱液中总黄酮、LG、迷迭香酸和田蓟苷的解吸率均在 92%以上, 蒸干后测定浸膏质量, 其中总黄酮质量分数分别为 54.55%、53.31%、55.22%, 平均为 54.36%; 田蓟苷质量分数分别为 5.67%、5.74%、5.56%, 平均为 5.66%; LG 质量分数分别为 4.85%、4.74%、4.73%, 平均为 4.77%; 迷迭香酸质量分数分别为 2.65%、2.74%、2.56%, 平均为 2.65%; 说明该纯化工艺重复性良好, 所选工艺稳定可行。

3 讨论

由于迷迭香酸、LG 和田蓟苷的结构中均具有酚羟基结构, 黄酮苷分子结构均有一个极性糖基和一个非极性黄酮母核 (呈弱酸性), 故它们有一定的极性和亲水性, 生成氢键能力较强, 可作为良好的氢键供体。因而, 易于与非极性和极性树脂发生吸附作用^[16-18]。中极性吸附树脂具有较低的比表面积, 带有孤电子对的羰基官能团, 羰基是良好的氢键受体, 能与上述指标化合物形成氢键作用, 从而大大提高了吸附选择性^[19-20], 因此, 本实验分别选用非极性、中极性和极性这 3 类树脂, 即选用 XDA-6、HPD100、HPD300、HPD600、AB-8、LX-11、LX-17 这 7 种不同类型的大孔树脂作为香青兰提取液的分离树脂。

本实验结果表明, 上述 7 种大孔吸附树脂中, HPD600 树脂比较适合于香青兰提取液的分离纯

化, 最佳纯化工艺参数为香青兰提取液质量浓度为 80 mg/mL, 柱径高比为 1:9, 上样量为生药 0.32 g/mL 树脂, 上样体积流量为 1.5 BV/h, 上样后吸附时间为 12 h, 水除杂用量为 4 BV, 用 70%乙醇为洗脱液, 洗脱体积为 6 BV, 洗脱体积流量为 1.5 BV/h, 总黄酮、田蓟苷、LG 和迷迭香酸的解吸率均达到 92%以上。70%乙醇洗脱液蒸干后测定干浸膏质量, 其中总黄酮、田蓟苷、LG 和迷迭香酸的质量分数分别达到 53%、5.5%、4.7%和 2.5%以上, 该工艺操作简单、重复性好, 可作为分离纯化香青兰提取液的有效方法, 对后期研究依从性较好的香青兰新制剂工艺有一定的应用价值。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准维吾尔药分册 [S]. 1999.
- [2] 姜雯, 彭克军, 陈强, 等. 香青兰总黄酮对小鼠腹腔巨噬细胞源性泡沫细胞形成的影响及其机制 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3432-3435.
- [3] 杨丽娜, 邢建国, 何承辉. 维药香青兰的化学成分与药理作用评价 [J]. 世界临床药物, 2013, 34(4): 226-230.
- [4] 冯长根, 李琼. 香青兰化学成分与药理活性研究综述 [J]. 中成药, 2003, 25(2): 154.
- [5] 马思萌, 刘睿, 任晓亮, 等. HPLC-DAD 法测定苦碟子中木犀草素 7-O- β -D-葡萄糖苷、木犀草素 7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷和芹菜素 7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(4): 377-380.
- [6] 邢建国, 曹文疆, 王新春, 等. 田蓟苷对 TNF- α 诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27(4): 17-20.
- [7] Dastmalchi K, Damien D, Laakso I, et al. Chemical composition and antioxidative activity of moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extracts [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2007, 40(9): 1655-1663.
- [8] Povilaityte V, Venskutonis P R, Cuvelier M E. Antioxidant constituents in moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) extracts [J]. *Food Technol Qual Eval*, 2001, 2003: 195-202.
- [9] 张玉杰, 徐文清, 沈秀, 等. 迷迭香酸的提取分离及药理学新发现 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(4): 434-437.
- [10] 王小平, 刘峰, 杨东华, 等. HPLC-MS 法测定大鼠注射丹红注射液后血浆中 3 种酚酸类成分 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 275-278.
- [11] 魏改芹, 邢建国, 何承辉, 等. HPD100 大孔吸附树脂分离纯化香青兰中木犀草素的研究 [J]. 中成药, 2008, 30(11): 1608-1611.
- [12] 姜雯, 何承辉, 邢建国. 香青兰总黄酮微丸制备工艺及释药机制研究 [J]. 中草药, 2013, 44(21): 3004-3010.
- [13] 于宁, 何承辉, 黄伟, 等. 香青兰有效成分提取工艺考察及不同产地香青兰中有效成分量的比较 [J]. 中草药, 2015, 46(6): 846-852.
- [14] 周军, 王杰, 蔡霞. 高效液相色谱法快速测定通宣理肺浓缩丸中 6 种成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(21): 1856-1859.
- [15] 徐家毅, 郭贤权. 大孔树脂孔结构的测定 [J]. 高分子通报, 1999(2): 57-60.
- [16] 刘江波. 大孔吸附树脂分离纯化黄酮类化合物的规律性研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [17] 郑云枫, 黄利, 魏娟花, 等. 不同类型树脂对 4 种丹参酚酸类成分的动态吸附研究 [J]. 中成药, 2013, 35(8): 1648-1652.
- [18] 吴博, 刘春梅, 刘冰, 等. 益智总黄酮大孔吸附树脂纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1321-1325.
- [19] 何伟, 李伟. 大孔树脂在中药成分分离中的应用 [J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(2): 134-136.
- [20] 屠鹏飞, 贾存勤, 张洪全. 大孔吸附树脂在中药新药研究和生产中的应用 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2004, 6(3): 22-28.