

D101 型大孔吸附树脂分离纯化沙苑子总黄酮工艺研究

汤如莹, 王玉杰, 李 伟, 张建军, 王景霞, 王林元*

北京中医药大学, 北京 100029

摘 要:目的 优选大孔吸附树脂分离纯化沙苑子总黄酮 (ACSTF) 的工艺。方法 以 ACSTF 出膏率、总黄酮质量分数、工艺转移率为指标, 采用正交设计法优选水煎煮提取沙苑子的工艺参数、D101 型大孔树脂分离纯化 ACSTF 的工艺参数。结果 最优提取工艺为加水煎煮提取 3 次, 每次 0.5 h, 加水量分别为 10、6、6 倍药材量。D101 树脂分离纯化 ACSTF 的优化工艺条件为上样液 ACSTF 质量浓度为约 1.0 mg/mL, 径高比为 1 : 5, 上样体积流量 1 BV/h, 比上样量为 0.6 g/mL (药材/湿树脂); 水洗脱体积流量 1 BV/h, 水洗脱体积为 4 BV; 乙醇洗脱体积分数为 70%, 乙醇洗脱体积流量为 1 BV/h, 乙醇洗脱体积为 5 BV。制成的沙苑子总黄酮提取物出膏率为 2.65%, 总黄酮质量分数为 56.24%, 工艺转移率为 68.37%。结论 该方法简单、可行, 能够用来分离纯化 ACSTF。

关键词: 大孔吸附树脂; 分离纯化; 沙苑子; 总黄酮; 沙苑子苷 A; 出膏率; 转移率; 正交试验

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)16-3342-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.16.014

Purification of total flavonoids extracted from *Astragali Complanati Semen* using D-101 macroporous adsorption resin

TANG Ru-ying, WANG Yu-jie, LI Wei, ZHANG Jian-jun, WANG Jing-xia, WANG Lin-yuan

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To optimize the purification technology of total flavonoids from *Astragali Complanati Semen* (ACS) by macroporous adsorption resin. **Methods** The process parameters of water decoction extraction of ACS and purification of total flavonoids extracted from ACS by D-101 macroporous adsorption resin were optimized by orthogonal experiment design method. **Results** The optimal extraction process were as follows: water decoction extract for three times, each time 0.5 h, water addition of 10, 6, and 6 times amount of the medicine respectively. The optimized technology conditions of D-101 macroporous adsorption resin were as follows: The flavonoids concentration of sample liquid of ACS was about 1.0 mg/mL, the diameter ratio was 1 : 5, the sample flow rate was 1 BV/h, the rate of sample weight was 0.6 g/mL (herbs/resin); The velocity of water elution was 1 BV/h and its elution volume was 4 BV; The elution concentration, elution velocity, and elution volume were 70%, 1 BV/h, and 5 BV, respectively. The content paste rate of made ACS of total flavonoids was 2.65%, the mass fraction of total flavonoids was 56.24%, and the process transfer rate was 68.37%. **Conclusion** The method is simple and feasible for purification of total flavonoids extracted from ACS.

Key words: macroporous adsorption resin; separation and purification; *Astragali Complanati Semen*; total flavonoids; complanatoside A; extraction rate; transference rate; orthogonal experiment design

沙苑子 *Astragali Complanati Semen* (ACS) 为豆科植物扁茎黄芪 *Astragalus complanatus* R. Br. 的干燥成熟种子。秋末冬初果实成熟尚未开裂时采割植株, 晒干, 打下种子, 除去杂质, 晒干。本品甘,

温, 归肝、肾经, 具有补肾助阳、固精缩尿、养肝明目的功能, 可用于肾虚腰痛、遗精早泄、遗尿尿频、白浊带下、眩晕、自暗昏花^[1]。

现代研究表明沙苑子主要含有黄酮类、三萜皂

收稿日期: 2017-07-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673617)

作者简介: 汤如莹 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新技术与新制剂的研究与应用。

Tel: (010)64286099 E-mail: m18810688705@163.com

*通信作者 王林元 (1961—), 男, 硕士生导师, 研究方向为中药新技术与新制剂的研究与应用。

Tel: (010)64286099 E-mail: 13381002202@vip.163.com

苷类、油脂等成分，其中黄酮类是沙苑子的主要有效成分^[2-4]。药理研究表明，沙苑子提取物具有改善血液流变学指标，降血压、调血脂、保肝、抑制血小板聚集、增加免疫功能等作用^[5-7]。本实验以沙苑子总黄酮（ACS total flavonoids，ACSTF）转移率为指标，采用正交设计法^[8-9]优选沙苑子水煎煮法的最佳提取工艺；利用 D101 型大孔树脂法分离纯化 ACSTF 并对树脂工艺参数进行优选。

1 仪器与材料

752 型紫外分光光度计，上海精密科学仪器厂；BT-125D 十万分之型电子天平，北京塞多利斯仪器系统有限公司；DZ-2BCII 真空干燥箱，天津市泰斯特仪器有限公司。

无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、硫酸、 α -萘酚均为国产分析纯；D101 大孔树脂，天津市海光化工有限公司。沙苑子购自河北安国药材市场，批号 20160401，经北京中医药大学中医学院中药教研室鉴定为豆科植物扁茎黄芪 *Astragalus complanatus* R. Br. 的干燥成熟种子；沙苑子苷 A 对照品，批号 111803-201403，质量分数以 97.6% 计，中国食品药品检定研究院。

2 方法与结果

2.1 总黄酮定量测定^[10]

2.1.1 药材供试品溶液制备 精密称取沙苑子粉末（过 20 目筛）0.5 g，置具塞锥形瓶中，精密加入 60% 乙醇 25 mL，称定质量，加热回流 1 h，取出放冷称定质量，补充 60% 乙醇至原质量，混匀，滤过，取滤液，备用。

2.1.2 提取物供试品溶液制备 精密称取“2.2.2”项下 ACSTF 水提取物干膏粉（过 20 目筛）0.1 g，加 60% 乙醇 50 mL 超声 30 min 使溶解，滤过，取滤液，备用；精密量取“2.3.2”项下上样液 1 mL，加 60% 乙醇 10 mL 稀释，备用；精密称取“2.3.6”和“2.4”项下 ACSTF 干膏粉（过 20 目筛）0.1 g，加 60% 乙醇 500 mL 超声 30 min 使溶解，滤过，取滤液，备用。

2.1.3 对照品溶液的制备 精密称取沙苑子苷 A 对照品 2 mg 置 2 mL 量瓶中，加 60% 乙醇溶解，定容至刻度，摇匀。精密移取 1 mL 置 10 mL 量瓶中，用 60% 乙醇定容至刻度，制成约 100 $\mu\text{g/mL}$ 的沙苑子苷 A 对照品溶液，即得。

2.1.4 线性关系考察 准确吸取沙苑子苷 A 对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 分别置 10 mL

量瓶中，用 60% 乙醇定容后摇匀，于 266 nm 处测定吸光度（A）值。以沙苑子苷 A 质量浓度为横坐标（X），A 值为纵坐标（Y），绘制标准曲线，进行线性回归，得回归方程 $Y=0.035\ 2\ X-0.000\ 9$ ， $r=0.999\ 8$ ，结果表明沙苑子苷 A 在 5.562~33.375 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.1.5 总黄酮定量测定 分别精密吸取药材供试品溶液、提取物供试品溶液 0.5 mL，以 60% 乙醇定容至 50 mL，于 266 nm 处测定 A 值，以沙苑子苷 A（ $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$ ）计算总黄酮量及其提取率。沙苑子药材（批号 20160401）总黄酮量为 2.18%。

2.2 ACSTF 的提取工艺优选

2.2.1 药材吸水量的测定 取干燥药材 50 g，加 10 倍药材量的水，经测定药材吸收 4 倍量的水，因此所有实验第 1 次加水量均较第 2、3 次多 4 倍。

2.2.2 正交设计法优选 ACSTF 提取工艺 取沙苑子药材 50 g，水煎煮提取 ACSTF，各组试验合并滤液，浓缩，干燥，粉碎得 ACSTF 水提取物干膏粉，测定总黄酮量。按照下列因素水平表，对加水量（A，倍量）、提取次数（B）、提取时间（C）3 个因素进行考察，以总黄酮转移率（Y）作为指标，按 $L_9(3^4)$ 正交表进行实验。实验设计及结果见表 1，方差分析见表 2。结果表明，以 Y 作为考察指标，根据方差分析结果 A、B 因素有显著差异（ $P<0.05$ ）；根据极差 R，结合实际生产，A 因素 3 水平与 2 水平无差异，且 3 水平明显优于 1 水平，故选 A_2 ；B 因素 3 水平优于 1、2 水平，故选 B_3 ；C 因素各水平

表 1 正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of orthogonal test

试验号	A/倍	B/次	C/h	D(空白)	Y/%
1	8、4、4(1)	1(1)	0.5(1)	(1)	10.81
2	8、4、4(1)	2(2)	1.0(2)	(2)	46.83
3	8、4、4(1)	3(3)	1.5(3)	(3)	50.85
4	10、6、6(2)	1(1)	1.0(2)	(3)	42.03
5	10、6、6(2)	2(2)	1.5(3)	(1)	72.03
6	10、6、6(2)	3(3)	0.5(1)	(2)	79.83
7	12、8、8(3)	1(1)	1.5(3)	(2)	49.84
8	12、8、8(3)	2(2)	0.5(1)	(3)	71.54
9	12、8、8(3)	3(3)	1.0(2)	(1)	75.35
K_1	108.49	102.68	162.18	158.19	
K_2	193.89	190.40	164.21	176.50	
K_3	196.73	206.03	172.72	164.42	
R	88.24	103.35	10.54	18.31	

表 2 方差分析
Table 2 Variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	1 676.391 5	2	29.014 7	$P<0.05$
B	2 068.924 2	2	35.808 6	$P<0.05$
C	20.848 1	2	0.360 8	
D(误差)	57.777 3	2		

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

间无差异, 故选择 C_1 ; 确定最佳提取工艺定为 $A_2B_3C_1$, 即加水煎煮提取 3 次, 每次 0.5 h, 加水量分别为 10、6、6 倍。

2.2.3 验证实验 按优选的最佳工艺对 ACSTF 的提取进行 3 次验证实验, 结果 ACSTF 的提取率分别为 79.91%、78.62%、80.03%, 与正交试验结果一致, 表明工艺可行。

2.2.4 浸泡时间的考察 取沙苑子药材 3 份, 各 50 g, 分别浸泡 0、1、2 h 后按上述确定的最佳工艺进行提取, 结果沙苑子浸泡总黄酮提取率分别为 79.85%、79.98%、80.02%。结果表明, 浸泡时间对 ACSTF 提取率无影响, 故沙苑子不浸泡, 加水煎煮提取。

根据以上结果, 本实验不浸泡直接取沙苑子药材煎煮 3 次, 加 10、6、6 倍药材量的水依次煎煮, 每次煎煮 0.5 h, 收集合并滤液, 备用。

2.3 D101 型大孔吸附树脂的吸附工艺优化

2.3.1 大孔树脂的预处理 取上述 D101 大孔树脂用 95%乙醇湿法装柱, 以 95%乙醇进行洗脱, 至流出液与 95%乙醇在 254 nm 处两者的紫外吸收值一致, 表明树脂基本处理干净^[11]。之后用大量蒸馏水洗至无醇味, 备用。

2.3.2 正交试验优化 D101 型树脂上样参数 取沙苑子按上述确定的工艺, 加水煎煮提取总黄酮, 合并水提液, 备用 (经测定总黄酮为 1.03 mg/mL); 装置 D101 大孔树脂柱, 收集流出液, 测定总黄酮量; 以比泄漏量 (流出液中总黄酮量/上柱液中总黄酮量) 不超过 10%为指标, 确定上样终点, 计算比上柱量 (药材量/柱体积); 以比上柱量为指标, 按下列因素水平表, 采用正交设计法对上样质量浓度 (A)、径高比 (B)、体积流量 (C) 进行考察, 按 $L_9(3^4)$ 正交表进行实验。

沙苑子水提液中有较多黏液质, 经浓缩后易产生沉淀, 过树脂柱时易出现阻塞, 因此采用沙苑子水煎煮液及其稀释液上样; 实测上样体积流量最高

为 1 BV/h; 依据工业生产的要求, 径高比设定为不超过 1:5。实验设计与结果见表 3, 方差分析见表 4。结果表明, 以不超过 10%比泄漏量作为考察指标, 根据方差分析 A、B 因素有显著差异 ($P<0.05$); A、B 两个因素均为 3 水平优于 2、1 水平, 故选 A_3 、 B_3 ; C 因素各水平间无差异, 为提高生产效率, 故选 C_3 ; 确定最佳上样工艺参数为 $A_3B_3C_3$, 即上样液质量浓度约为 1 mg/mL、径高比为 1:5、上样体积流量为 1 BV/h, 比上样量为 0.66 g/mL (药材/湿树脂)。

表 3 正交试验设计与结果
Table 3 Design and results of orthogonal test

试验号	A/ (mg·mL ⁻¹)	B	C/ (BV·h ⁻¹)	D (空白)	比上柱量/ (g·mL ⁻¹)
1	0.257 5 (1)	1:3 (1)	0.50 (1)	(1)	0.46
2	0.257 5 (1)	1:4 (2)	0.75 (2)	(2)	0.49
3	0.257 5 (1)	1:5 (3)	1.00 (3)	(3)	0.54
4	0.515 0 (2)	1:3 (1)	0.75 (2)	(3)	0.51
5	0.515 0 (2)	1:4 (2)	1.00 (3)	(1)	0.55
6	0.515 0 (2)	1:5 (3)	0.50 (1)	(2)	0.62
7	1.030 0 (3)	1:3 (1)	1.00 (3)	(2)	0.53
8	1.030 0 (3)	1:4 (2)	0.50 (1)	(3)	0.61
9	1.030 0 (3)	1:5 (3)	0.75 (2)	(1)	0.66
K_1	1.49	1.50	1.69	1.67	
K_2	1.68	1.65	1.66	1.64	
K_3	1.80	1.82	1.62	1.66	
R	0.31	0.32	0.07	0.03	

表 4 比上柱量方差分析结果
Table 4 Results of column quantity variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.016 288 89	2	104.714 3	$P<0.01$
B	0.017 088 89	2	109.857 1	$P<0.01$
C	$8.222 2 \times 10^{-4}$	2	5.285 7	
D(误差)	$1.555 6 \times 10^{-4}$	2		

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

2.3.3 验证实验 按优选的最佳工艺对 ACSTF 的上柱参数进行 3 次验证实验, 以不超过 10%比泄漏量为指标, 结果比上柱量分别为 0.68、0.67、0.65 g/mL (药材/湿树脂), 与工艺结果一致, 表明工艺可行。

2.3.4 水洗脱量考察 按上述优选的最佳树脂工艺上柱, 用蒸馏水洗, 体积流量为 1 BV/h, 以 1/4 柱

体积为 1 个流分, 收集各个流分依次进行编号, 并依次进行 Molisch 反应, 待反应呈阴性时停止收集。确定水洗脱量为 4 BV。

2.3.5 乙醇体积分数考察 按上述优选的最佳树脂工艺上柱, 4 BV 的蒸馏水洗后用不同体积分数(30%、50%、70%、95%)乙醇依次洗脱, 体积流量为 1 BV/h, 每个体积分数梯度各洗脱 10 倍柱体积。收集各个体积分数梯度的乙醇洗脱液并分别测定各洗脱液的总黄酮占总洗脱液总黄酮的比例, 结果分别为 40%、35%、15%、1%。由结果可知乙醇体积分数为 70%时可将 ACSTF 完全洗脱(树脂首次使用时存在少量目标成分无法解吸附现象, 树脂重复使用时无此现象), 因此确定使用 70%乙醇进行洗脱。

2.3.6 洗脱剂乙醇用量考察 按上述优选的最佳工艺上柱, 4 BV 的蒸馏水洗后, 用 70%乙醇进行洗脱, 每个柱体积为 1 个流分(本实验约为 100 mL/BV), 收集各流分分别浓缩、干燥, 测定干膏质量; 粉碎, 测定干膏粉总黄酮质量分数, 以总黄酮洗脱率为指标, 确定 70%乙醇洗脱用量, 结果见表 5。结果表明, 70%乙醇洗脱用量为 5 BV。

2.4 D101 型大孔吸附树脂纯化 ACSTF 工艺放大验证实验

按以上优选的最佳工艺进行放大实验, 所得 70%乙醇洗脱液各浓缩, 干燥, 称定干膏质量计算出膏率; 粉碎, 测定干膏粉总黄酮质量分数。结果出膏率、总黄酮质量分数及工艺转移率稳定, 表明工艺可行, 结果见表 6。

表 5 ACSTF 洗脱结果

Table 5 Results of ACSTF elution

流分/BV	干膏中总黄酮质量分数/(g·g ⁻¹)	干膏质量/g	总黄酮质量/g	总黄酮洗脱率/%
1	0.07	0.12	0.008 4	0.01
2	0.63	0.79	0.497 7	0.40
3	0.99	0.53	0.524 7	0.42
4	0.84	0.23	0.193 2	0.15
5	0.35	0.09	0.031 5	0.03
6	0.18	0.00	0.000 0	0.00

表 6 ACSTF 工艺放大验证实验数据

Table 6 ACSTF scale-up experimental data

树脂柱直径/cm	树脂柱高/cm	柱体积/mL	药材量/g	出膏率/%	总黄酮质量分数/%	工艺转移率/%
5	25	490	323	2.66	56.23	68.61
10	50	3 925	2 590	2.67	56.24	68.88
20	100	31 400	20 724	2.69	56.28	69.45

3 讨论

大孔吸附树脂吸附分离技术是通过物理吸附从中药及其复方提取液中有选择性地吸附其中的有效部分, 去除无效部分的一种提取纯化工艺, 可以达到分离、富集中药有效部位或有效成分的目的^[12-15]。黄酮类是沙苑子主要的活性成分, 大孔树脂法分离纯化黄酮类物质已经有许多成功的案例报道^[16-19]。本实验用 D101 型大孔树脂法对沙苑子分离纯化的工艺条件进行优选, 结果该方法简单、可行, 能够用来分离纯化 ACSTF。

实验中采用 HPLC 法^[20]测定沙苑子苷 A 量时出现其提取量超过 100%的结果, 考虑到沙苑子苷 A 可能存在受热转化。对比药材热压处理与未处理的

沙苑子苷 A 的谱图, 发现有 3 个色谱峰消失, 2 个色谱峰增高, 沙苑子苷 A 量明显增加, 但其总黄酮量不变。具体的受热转化的机制有待进一步实验研究。据此, 本实验不宜使用单一沙苑子苷 A 作为工艺优选的指标, 应以 ACSTF 的转移率为工艺优选的指标并采用紫外分光光度法进行测定。

中药传统应用大多以水煎煮为主, 在对煎煮工艺进行考察优化时考察指标的选择至关重要。应选择在加热提取过程中稳定不变的指标方可得到准确可靠的结果。本实验没有选择《中国药典》2015 年版规定的沙苑子苷 A 为考察指标, 而是选择了稳定的总黄酮进行工艺优选, 为 ACSTF 的提取精制提供了可行的工艺, 也为同类研究提供了借鉴。本研

究也提示,沙苑子的质量控制不仅要以单一成分为指标,还应制定总黄酮的控制指标。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 刘春宇, 胡延维, 孙雄华, 等. 以沙苑子苷为对照品测定沙苑子总黄酮含量 [J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(4): 57-59.
- [3] 李洪娟. 沙苑子的化学成分研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3): 545-546.
- [4] 吴 晓, 刘银芳, 刘春宇. 沙苑子化学成分研究 [J]. 安徽中医药大学学报, 2014, 33(3): 91-94.
- [5] 国家中医药管理局. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [6] 刘春宇, 顾振纶, 杜崇民, 等. 沙苑子抗肿瘤活性部位体外筛选 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 1052-1054.
- [7] 白 勇, 孙安盛, 吴 芹. 沙苑子总黄酮和百草酸的体内抗肿瘤作用 [J]. 中成药, 2014, 36(4): 684-689.
- [8] 陈 静, 程 怡, 郑品劲, 等. 去唾液酸糖蛋白受体配体胆固醇-半乳糖苷的酶促合成优化研究 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 502-506.
- [9] 陈小云, 张振海, 胡 琴, 等. 辅料羟丙基甲基纤维素-硬脂酸作为辣椒素透皮凝胶基质的研究 [J]. 中草药, 2013, 44(3): 296-300.
- [10] 刘银芳, 吴文倩, 刘春宇, 等. 沙苑子黄酮提取工艺研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1401-1402.
- [11] 贾存勤, 李阳春, 屠鹏飞, 等. D-101 型大孔吸附树脂预处理方法的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 193-196.
- [12] 刘 玥. 大孔吸附树脂在中药提取纯化中的应用进展 [J]. 世界中医药, 2013, 8(2): 232-234.
- [13] 娄 嵩, 刘永峰, 白清清, 等. 大孔吸附树脂的吸附机理 [J]. 化学进展, 2012, 24(08): 1427-1436.
- [14] 崔言坤, 杨世林, 许琼明, 等. 鹿茸草中 3 种苯乙醇苷的分离制备工艺研究 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 288-293.
- [15] 陈丛瑾. 大孔吸附树脂分离纯化黄酮类化合物的研究进展 [J]. 化学与生物工程, 2010, 27(11): 1-4.
- [16] 张素军, 冯尚彩. 大孔树脂提取沙苑子总黄酮工艺研究 [J]. 海峡药学, 2012, 24(2): 13-16.
- [17] 吴 晓, 周礼明, 马 威, 等. 大孔树脂纯化沙苑子总黄酮工艺优选 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(1): 54-57.
- [18] 于鹤云, 刘汉清, 刘 嘉, 等. D-101 型大孔吸附树脂纯化黄蜀葵花总黄酮的工艺研究 [J]. 中成药, 2014, 36(3): 520-525.
- [19] 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.
- [20] 张建军, 闫兴丽, 张玉杰, 等. HPLC 测定沙苑子中沙苑子苷 A 的含量 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(8): 600-602.