

石韦总黄酮的大孔树脂纯化工艺优选

汪涵源^{1,2}, 董金香¹, 董雪莲¹, 邱智东^{1*}

(1. 长春中医药大学, 长春 130117; 2. 长春市宽城区中医院, 长春 130051)

〔摘要〕 目的:优选石韦总黄酮的大孔树脂纯化工艺条件,为该成分的制剂开发提供参考。方法:采用紫外-可见分光光度法测定总黄酮含量,检测波长 510 nm。以总黄酮含量为指标,通过静态吸附-洗脱试验筛选大孔树脂型号,利用单因素试验考察上样量、径高比、洗脱剂用量等因素对石韦总黄酮大孔树脂纯化工艺的影响。结果:D101 型大孔树脂吸附-洗脱性能最好,最佳纯化工艺条件为树脂柱径高比 1:10~1:8,树脂-生药(1:2.73),上样液质量浓度 0.5 g·mL⁻¹,上样速度 2 BV·h⁻¹,加水 7 BV 洗脱,加 60% 乙醇 5 BV 以流速 4 BV·h⁻¹洗脱。石韦总黄酮纯度达 59.06%。结论:D101 型大孔树脂对石韦总黄酮具有良好的纯化效果,优选的纯化工艺合理、稳定可行。

〔关键词〕 石韦; 总黄酮; 大孔树脂; 芦丁

〔中图分类号〕 R283.6;R284.2 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2015)03-0027-03

〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030027

Optimization of Purification Technology for Total Flavonoids from Pyrrosiae Folium by Macroporous Resin
WANG Han-yuan^{1,2}, DONG Jin-xiang¹, DONG Xue-lian¹, QIU Zhi-dong^{1*} (1. Changchun Univercity of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Changchun City Kuancheng District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130051, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To optimize purification process of total flavonoids from Pyrrosiae Folium by macroporous resin. **Method:** The content of total flavonoids was determined by UV-visible spectrophotometry, detection wavelength was 510 nm. With the content of total flavonoids as index, types of macroporous resin were screened by static adsorption-elution test, single factor tests were adopted to optimize purification technology with sample volume, ratio of diameter to height, the amount of eluent and so on. **Result:** D101 macroporous resin showed better adsorption-elution effect than others, optimum purification technology was as following: height-diameter ratio of 6-10, ratio of resin to crude drug 1:2.73, the concentration of sample solution 0.5 g·mL⁻¹, absorption velocity 2 BV·h⁻¹, washed impurity with 8 BV of water, then eluted with 5 BV of 60% ethanol at 4 BV·h⁻¹, collected eluent. Under these conditions, purity of total flavonoids was 59.06%. **Conclusion:** D101 macroporous resin has good purification effects on total flavonoids from Pyrrosiae Folium, this optimized purification technology is reasonable, stable and feasible.

〔Key words〕 Pyrrosiae Folium; total flavonoids; macroporous resin; rutin

石韦具有利尿通淋、清肺止咳、凉血止血的功效,临床用于治疗热淋、血淋、石淋、淋漓涩痛、崩漏等证^[1],含有木犀草素、芒果苷、山柰酚苷、绿原酸、咖啡酸、蔗糖、挥发油等化学成分^[2-4],市场开发前景良好。大孔吸附树脂是近年发展迅速的分离纯化技术,结合了吸附性和筛选性,在中药研发及生产中应用广泛。在前期研究已优选石韦总黄酮提取工艺的基础上,本实验选取大孔树脂对石韦总黄酮进行纯化,通过单因素试验优化工艺条件,为石韦的基础研究和临床应用研究提供参考。

1 材料

UV-9200 型紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司),BP211D 型电子分析天平(德国赛多利斯公司)。石韦药材购自长春宏检药材公司,经

〔收稿日期〕 20140506(028)

〔基金项目〕 吉林省高技术产业发展项目(吉发改高技[2009] 633 号)

〔第一作者〕 汪涵源,硕士,主管药师,从事中药学研究,Tel:13578660652,E-mail:ccucmwhy@163.com

〔通讯作者〕 * 邱智东,博士,博士生导师,教授,从事中药制剂研究,Tel:0431-86172208,E-mail:yxycczy@126.com

长春中医药大学邓明鲁教授鉴定为水龙骨科植物有柄石韦 *Pyrrosia petiolosa* 的干燥叶;芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100080-200707),D101 型大孔吸附树脂(天津农药股份有限公司树脂分公司),AB-8 和 NKA 型大孔吸附树脂(南开大学化工厂),DM130 和 D312 型大孔吸附树脂(山东鲁抗股份有限公司树脂分公司),水为蒸馏水,试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮的含量测定 精密称取于 120 ℃干燥至恒重的芦丁对照品 10.06 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得储备液。吸取该储备液 1,2,3,4,5,6,7 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,加水 6 mL 和 5% 亚硝酸钠试液 1 mL,摇匀,放置 6 min;加入 10% 硝酸铝试液 1 mL,摇匀,放置 6 min;加 4.3% 氢氧化钠试液 10 mL,加水稀释至刻度,摇匀,放置 15 min。另取相同量甲醇,同法制备空白液。照紫外分光光度法于 510 nm 处测定吸光度(A)。以芦丁质量浓度(C)为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $A = 13.885C - 0.007$ ($r = 0.9999$),表明芦丁对照品在 8.048 ~ 56.336 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.2 树脂预处理^[5-6] 取各型号新树脂适量,加等量乙醇浸泡 24 h,湿法装柱,加 2 BV 乙醇浸泡 4 h,用乙醇洗至流出液加水不呈白色浑浊为止,加水洗净乙醇。加 5% 盐酸溶液 2 BV 浸泡 6 h,以流速 4 ~ 6 BV·h⁻¹ 通过树脂柱,加水洗至中性;加 2% 氢氧化钠溶液 2 BV 浸泡 6 h,以流速 4 ~ 6 BV·h⁻¹ 通过树脂柱,加水洗至中性,备用。

2.3 石韦提取液的制备 在前期研究基础上,石韦药材加 8 倍量 60% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h,滤过,合并滤液,回收乙醇,浓缩至 0.5 g·mL⁻¹,静置 24 h,抽滤,即得。

2.4 大孔树脂型号筛选

2.4.1 静态吸附试验 分别取经过预处理的 D101,AB-8,NKA,DM130,D312 型大孔树脂 10 g,取石韦提取液 40 mL 浸泡 6 h,每隔 1 h 搅拌 1 次,滤过,按 2.1 项下方法测定滤液中总黄酮含量,计算各树脂的饱和吸附量分别为 203.576,202.955,142.037,210.386,125.649 mg·g⁻¹,说明 D101,AB-8,DM130 型树脂静态吸附量高于 NKA,D312 型树脂。

2.4.2 动态吸附试验 分别取预处理好的 D101,AB-8,DM130 型大孔树脂 40 g,各 2 份,湿法装柱

(径高比 1:8),取石韦提取液 100 mL 分别加至树脂柱至吸附饱和,加水和 60% 乙醇各 8 BV(1 BV = 25 mL)以流速 4 BV·h⁻¹ 洗脱,收集乙醇洗脱液,按 2.1 项下方法测定石韦总黄酮含量。计算吸附量分别为 116.354,95.326,132.921 mg·g⁻¹,洗脱率分别为 92.20%,89.58%,83.70%。综合分析,选择 D101 型大孔吸附树脂进行纯化试验。

2.5 纯化工艺考察

2.5.1 树脂柱径高比 取经预处理的 D101 型大孔树脂 3 份,每份 40 g,湿法装柱,调节径高比分别为 1:10,1:8,1:6,吸取石韦提取液 40 mL 以流速 2 BV·h⁻¹ 上样,吸附 3 h 后加水 8 BV 洗脱,弃去洗脱液,加 60% 乙醇 8 BV 以 4 BV·h⁻¹ 的流速洗脱,收集乙醇洗脱液,总黄酮收率 = $(C \times V) / (C_1 \times V_1) \times 100\%$,式中 C 和 V 分别为洗脱液中总黄酮质量浓度和洗脱液体积,C₁ 和 V₁ 分别为吸附前溶液生药质量浓度和体积。计算总黄酮收率分别为 3.58%,3.59%,3.46%,在树脂高径比 10 ~ 6 倍间无差异。

2.5.2 上样液质量浓度 取 1.5,1.0,0.5 g·mL⁻¹ 的上样液 40,60,120 mL,分别以 2 BV·h⁻¹ 通过预处理好的 D101 型大孔树脂 40 g,吸附 3 h 后加水 8 BV 洗脱,弃去洗脱液,加 60% 乙醇 8 BV 以 4 BV·h⁻¹ 流速洗脱,收集洗脱液。计算总黄酮收率分别为 3.28%,3.58%,3.57%,故选择 0.5 g·mL⁻¹ 上样液。

2.5.3 洗脱剂 取 0.5 g·mL⁻¹ 石韦提取液 40 mL 以 2 BV·h⁻¹ 加至 D101 型树脂柱上,共 4 份,每份 40 g,各加水 8 BV 洗脱,弃去洗脱液,分别加 20%,40%,60%,80% 的乙醇溶液 4 BV 以 4 BV·h⁻¹ 流速洗脱,收集乙醇洗脱液。计算总黄酮质量分别为 475.992,614.501,671.121,673.633 mg,故选择 60% 乙醇为洗脱剂^[7]。

2.5.4 洗脱流速 取 0.5 g·mL⁻¹ 石韦提取液 40 mL 以 2 BV·h⁻¹ 加至 D101 型树脂柱上吸附 3 h,共 3 份,每份 40 g,各加水 8 BV 洗脱,弃去洗脱液,加 60% 乙醇 8 BV 分别以 2,4,6 BV·h⁻¹ 洗脱,收集乙醇洗脱液,计算总黄酮收率分别为 3.42%,3.43%,3.40%,故选择洗脱速度 4 BV·h⁻¹。

2.5.5 水洗用量 取 0.5 g·mL⁻¹ 石韦提取液 40 mL,以 2 BV·h⁻¹ 通过 D101 型树脂柱,吸附 3 h,加水洗脱,连续收集洗脱液,每 50 mL(2 BV) 为 1 份,将洗脱液浓缩并干燥至恒重,结果当收集洗脱液至第 8 份时,洗脱液近无色,当洗至第 7 份时,干燥物质量极少,说明已基本洗脱完全,故选择加水

7 BV洗脱。

2.5.6 乙醇用量 取经水 7 BV 洗脱的大孔树脂柱,用 60% 乙醇以 4 BV·h⁻¹洗脱,连续收集洗脱液,每 50 mL 为 1 份,共收集 7 份,按 2.1 项下方法测定每份洗脱液中总黄酮含量,结果前 5 份洗脱液中总黄酮质量 664.671 mg,第 6 份洗脱下来的总黄酮质量太少,洗脱意义不大,故 60% 乙醇用量选择 5 BV。

2.5.7 上样量 D101 型大孔树脂的最大吸附量 116.354 mg·g⁻¹,换算成生药量 2.875 g,即 D101 型大孔干树脂的最大吸附量 2.875 g·g⁻¹。选择最大吸附量的 100%,95%,90%,85% (干树脂-生药分别为 1:2.88,1:2.73,1:2.59,1:2.44) 生药提取物溶液上柱。取经预处理的 D101 型大孔湿树脂 40 g,共 4 份,湿法装柱(径高比 1:8),分别吸取 0.5 g·mL⁻¹石韦提取液(总黄酮 20.234 g·L⁻¹) 50,47,44,41 mL 以 2 BV·h⁻¹上样,吸附 3 h,加水 7 BV 洗脱,加 60% 乙醇 5 BV 以 4 BV·h⁻¹洗脱,收集洗脱液,测定每份洗脱液中总黄酮含量,结果洗脱率分别为 71.66%,74.62%,74.75%,76.21%,说明上柱量越小,洗脱率越高,结合生产效率考虑,选择最大吸附量的 95% 药材提取物溶液上柱,即树脂-生药(1:2.73)。

2.6 大孔树脂再生时间 取药材提取液加至处理好的大孔树脂上,按优选的工艺条件反复应用树脂纯化,重复 8 次,测定洗脱液中总黄酮含量。结果当树脂使用 6 个周期后,洗脱下来的总黄酮含量下降了 10%,且树脂颜色加深,考虑到大孔树脂的重复利用,提示树脂使用 6 次后应对树脂进行再生处理。

2.7 验证试验 取经预处理的 D101 型大孔树脂,按优选的工艺条件进行纯化,收集洗脱液,回收乙醇,减压干燥,结果石韦总黄酮质量分数分别为 60.29%,55.14%,61.74%,说明该纯化工艺稳定可行。

3 讨论

曾比较了大孔吸附树脂与聚酰胺的纯化作用,结果大孔树脂纯化效果优于聚酰胺,故采用大孔树脂纯化。试验使用的乙醇可回收重复使用,纯化成本较低,对环境不会造成污染。总黄酮含量采用硝酸铝络合法,显色试验中考察了 3 种试剂——亚硝

酸钠、硝酸铝、氢氧化钠,其中亚硝酸钠和氢氧化钠只是提供碱性环境,而起显色作用的是铝离子,铝离子与黄酮类化合物酚羟基反应产生络合物,经空白试验及方法学考察,证明该方法准确合理。

研究表明石韦黄酮类化合物具有活性作用^[8-9],但采用大孔树脂纯化石韦总黄酮的研究尚未见报道。经本文优选的工艺处理后,石韦提取物中总黄酮纯度>50%,一方面可为阐明物质基础的作用机制提供参考,为发现石韦中含有的新黄酮类化合物化学结构及其质量控制提供数据支持;另一方面为疗效确切的石韦复方制剂揭示组方原理、各化学成分间的相互作用及在人体内的作用机制提供实验依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:83-84.

[2] 李玉华,彭敬东,郑敏,等. HPLC 法同时测定石韦药材中绿原酸、芒果苷和木犀草素的质量浓度[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2011,36(2):104-107.

[3] 陈露,刘布鸣,马军花,等. 中药石韦的研究概况[J]. 广西医学,2011,33(11):1486-1489.

[4] Wang N,Wang J H,Li X,et al. Flavonoids from *Pyrrosia petiolosa* (Christ) Ching[J]. J Asian Nat Prod Res, 2006,8(8):753-756.

[5] 付艳丽,宋红,童志平,等. 大孔吸附树脂分离杭白菊中总黄酮的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(17):53-55.

[6] 尚志春,宋明明,史丽颖,等. HP-20 型大孔树脂富集纯化南山茶花总黄酮的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(7):11-13.

[7] 海平,苏雅乐其其格. 蒙药小白蒿中总黄酮的提取及其抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):59-63.

[8] 马越,畅洪昇. 石韦的临床应用和药理研究[J]. 江西中医学院学报,2011,23(4):87-90.

[9] Muruganandan S, Gupta S, Kataria M, et al. Mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats[J]. Toxicology, 2002, 176(3):165-173.

[责任编辑 刘德文]