

白花蛇舌草总黄酮的大孔树脂纯化工艺

曾永长, 梁少瑜, 邢学峰, 俞励平, 罗佳波*

(南方医科大学中药新药重点实验室 广东省中药制剂重点实验室, 广州 510515)

[摘要] 目的: 为提高白花蛇舌草(HD)总黄酮的纯度, 筛选适宜 HD 总黄酮纯化的大孔树脂, 确定 HD 总黄酮纯化工艺参数。方法: 采用静态与动态吸附-解吸附方法对 HD 总黄酮进行纯化, 以吸附率与洗脱率等指标优化工艺, 利用紫外-可见分光光度计测量 HD 总黄酮的含量。结果: HPD-826 型大孔树脂纯化效果最好, 其最佳工艺为上样流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 上样液 pH 5, 上样浓度 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 洗脱剂 pH 7, 乙醇浓度 80% 与洗脱速度 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$; 纯化后总黄酮含量高达 91.24%。结论: 该工艺操作简单、稳定可行, 重复性好, 适合 HD 总黄酮纯化。

[关键词] 总黄酮; 白花蛇舌草; 大孔树脂; 纯化

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0026-03

Purification Process of Total Flavonoids from *Hedyotis diffusa* with Macroporous Resins

ZENG Yong-chang, LIANG Shao-yu, YU Li-ping, LUO Jia-bo*

(Southern University Key Lab of Traditional Chinese Medicine and New Drug, Guangdong Provincial Key Lab of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** Purify the total flavonoids from *Hedyotis diffusa* with macroporous resin and establish optimum process for separating and purifying total flavonoids from *H diffusa*. **Method:** The optimal techniques of separation and purification of flavonoid were obtained by static adsorption and elution tests, and the separation techniques were evaluated by measuring the concentration of total flavonoids from *H diffusa* with ultraviolet spectrophotometer. **Result:** The HPD-826 macroporous resin gave the best effect of separation with the sampling rate $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, concentration $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5 respectively, and the concentration of elution was 80% alcohol, eluting velocity $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, with pH 7. **Conclusion:** HPD-826 resin could be applied to purify total flavonoids from *H diffusa*.

[Key words] total flavonoids; *Hedyotis diffusa*; macroporous resins; purification

白花蛇舌草(HD)为茜草科耳草属植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 又名 *Oldenlandia diffusa* Roxb. 的全草, 始载于《广西中药志》, 具有清热解毒、利尿消肿、活血止痛之功。现代研究表明白花蛇舌草具有增强非特异性免疫及抗氧化作用, 临床用于治疗各种癌症及炎症^[1-2], 且对多药耐药肿瘤细胞有效^[3]。作者通过体外多种细胞筛选试验与小鼠体

内抑制 S180 肉瘤试验发现总黄酮部位是 HD 抗肿瘤有效部位之一。HD 总黄酮的纯化工艺鲜有报道, 故对 HD 总黄酮纯化工艺进行系统研究十分必要。大孔树脂因具有吸附容量大、吸附速度快、选择性好、再生处理简单快速等特点, 在天然产物提取精制中广泛应用。本研究选用 8 种不同型号大孔树脂对 HD 初提取物中总黄酮进行纯化工艺研究, 为进一步研究奠定基础。

1 材料

UV-HP8453 紫外-可见光分度仪(美国惠普), CP2250 微量电子天平; 白花蛇舌草(广东省药材公司)经南方医科大学中药鉴定室张宏伟教授鉴定为茜草科耳草属植物白花蛇舌草 *H diffusa*; 大孔树脂

[收稿日期] 20100519(005)

[第一作者] 曾永长, 博士, 执业药师, 从事复方药效物质基础与新制剂开发研究, Tel: 13070275602, E-mail: zyc1199@126.com

[通讯作者] * 罗佳波, 教授, 博士生导师, 国家杰出贡献中青年专家, 从事中药复方与新制剂开发研究。

HPD-826, NKA-9, D101, HPD-700, HPD-400, HPD-600, HPD-100, ADS-17 (河北沧州宝恩吸附材料有限公司); 芦丁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 200707); 乙醇、亚硝酸钠、三硝酸铝、氢氧化钠等均为分析纯。

2 方法^[4-5]

2.1 HD 粗提液的制备 取 HD 粗粉, 以 8 倍量 80% 乙醇提取 2 次, 过滤, 合并提取液, 回收乙醇, 适量石油醚萃取除去叶绿素, 冷藏备用。

2.2 总黄酮测定

2.2.1 检测波长的确定 参照《部颁标准》白花蛇舌草注射液中黄酮含量测定的方法, 以芦丁为对照品, 在 200 ~800 nm 扫描芦丁标准品及样品处理前后最大吸收波长, 确定 510 nm 处为最佳检测波长。

2.2.2 芦丁标准曲线的绘制 精密称取 60 减压干燥至恒重的芦丁对照品 8.46 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加 95% 乙醇, 超声溶解, 放冷, 定容至刻度, 即得浓度为 0.846 g·L⁻¹ 的芦丁标准品溶液。精密量取已制备的标准品溶液 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 分别加 50% 乙醇 2mL, 加 5% 亚硝酸钠 0.4 mL, 放置 6 min, 再加 10% 硝酸铝溶液 0.4 mL, 放置 6 min, 加 4% 氢氧化钠 4 mL, 加 50% 乙醇溶液定容, 按紫外-可见分光光度测定法(附录 V A), 采用紫外扫描确定在 510 nm 波长处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线。得回归方程为 $Y = 0.6616X + 0.0343$, $R^2 = 0.9991$ 。

2.3 HD 总黄酮含量的测定 精密量取一定量的样品液于 10 mL 的量瓶中, 按 2.2 操作, 测定并计算总黄酮的含量。

2.4 大孔树脂的预处理 将 D101, ADS-17, HPD-400, HPD-600, HPD-700, HPD-826, HPD-100, NKA-9 8 种依次用 4 BV 5% NaOH 水溶液浸泡 24 h, 4 BV 去离子水洗至中性, 4 BV 10% 盐酸液浸泡 6 h, 用去离子水冲洗至中性, 乙醇浸泡 12h, 用 95% 乙醇洗脱, 至流出乙醇液与水混合不产生白色浑浊为止, 用足量的去离子水洗至无醇味备用。

2.5 大孔树脂的筛选 静态吸附 准确称量 8 种处理好的大孔树脂(湿)各 5.0 g, 加入 HD 粗提液 40 mL, 适时振摇, 浸泡 24 h, 按 2.2 测定各树脂的每克吸附量。静态解吸附 静态吸附后的树脂过滤抽干, 加 50 mL 95% 乙醇解吸附, 置于摇床上, 8 h 后测定各树脂对 HD 总黄酮的解吸率。

计算公式:

$$\text{每克吸附量} = (C_0 V_0 - C_1 V_1) / W$$

$$\text{吸附率} = (C_0 V_0 - C_1 V_1) / C_0 V_0 \times 100\%$$

$$\text{解吸率}(P) = C_2 V_2 / (C_0 V_0 - C_1 V_1) \times 100\%$$

式中 C_0 : 上样质量浓度(g·L⁻¹); C_1 : 吸附后剩余液的质量浓度(g·L⁻¹); C_2 为解吸液的质量浓度; V_0 : 上样的体积(mL); V_1 : 吸附后剩余溶液体积(mL); V_2 为解吸液体积(mL); W : 树脂质量(g)。

2.6 大孔树脂静态吸附曲线绘制 通过静态吸附与解吸附试验筛选出效能最好的树脂作为纯化 HD 总黄酮的树脂。准确称取经过预处理的该树脂(湿) 5.0 g, 置于 100 mL 锥形瓶中, 加样品液 60 mL, 每 30 min 震荡 2 min, 静置。每 1 h 吸取上清液测定总黄酮含量, 至吸附饱和停止测定, 根据所得数据绘制出静态吸附曲线。

2.7 大孔树脂柱层析纯化总黄酮的工艺参数考察

通过筛选实验, 确定分离 HD 总黄酮的树脂, 准确称取等份经过预处理的理想树脂, 每份(湿) 5.0 g, 分别湿法装入(1 cm ×40 cm) 具阀色谱柱中, 考察上样液流速、浓度、pH, 洗脱剂体积分数, 洗脱 pH 等参数对纯化 HD 总黄酮的影响, 优化工艺。

2.8 纯度计算

$$\text{纯度} = C \times V / M \times 100\%$$

式中 C 为纯化后黄酮质量浓度(g·L⁻¹), V 为黄酮溶液体积(mL), M 为黄酮物质干重(mg)。

3 结果与分析

3.1 大孔树脂的筛选 在筛选的树脂中, HPD-826 为新型氢键吸附型树脂, D101, HPD-100, HPD-700 为非极性树脂, HPD-400 为中等极性树脂, HPD-600, ADS-17, NKA-9 为极性树脂。由表 1 可知, HPD-826 对 HD 总黄酮的分离较理想, 故选择 HPD-826 对 HD 总黄酮进行分离纯化。

表 1 不同型号大孔树脂对 HD 总黄酮吸附性能的比较

树脂型号	吸附量 /mg·g ⁻¹	吸附率 /%	解析率 /%
D101	6.83	69.4	62.4
ADS-17	6.21	63.1	66.7
HPD-400	8.16	80.9	76.6
HPD-600	6.12	62.2	82.4
HPD-700	6.11	62.1	63.6
HPD-826	8.08	82.1	88.1
HPD-100	7.21	70.3	73.8
NKA-9	6.46	65.6	82.1

3.2 HPD-826 静态吸附曲线绘制 HPD-826 对 HD 总黄酮的吸附率和解析率均较高, 因此, 进一步考察

HPD-826 对 HD 总黄酮静态吸附动力学行为。由图 2 可知, HPD-826 树脂对 HD 总黄酮的吸附为快速平衡型, 2 h 时基本达到平衡, 表现出良好的静态吸附动力学特性, 适用于 HD 总黄酮纯化。

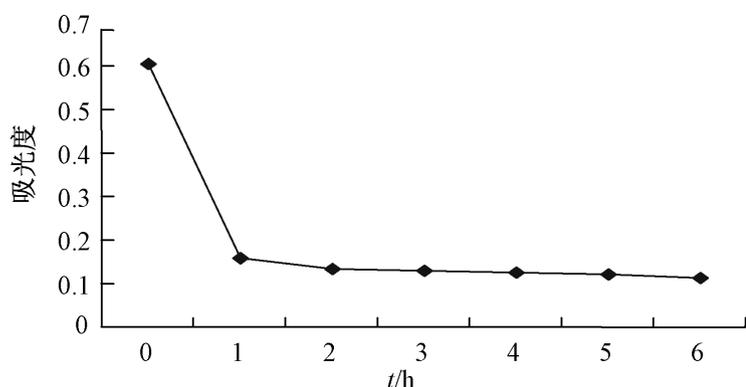


图 2 HPD-826 对 HD 总黄酮的静态吸附曲线

3.3 HPD-826 动态吸附 HD 总黄酮的工艺参数

3.3.1 上样浓度的优化 上样液的浓度对大孔树脂的吸附有一定影响, 量取已知总黄酮质量浓度的 HD 提取液, 分别用去离子水配置成不同质量浓度上样溶液, 以相同的速度通过层析柱 (树脂体积 20 mL) 进行动态吸附试验, 测定吸附率。由图 3 可知, 上样质量浓度越大, 吸附率就越低, 上样质量浓度为 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时吸附率最高。

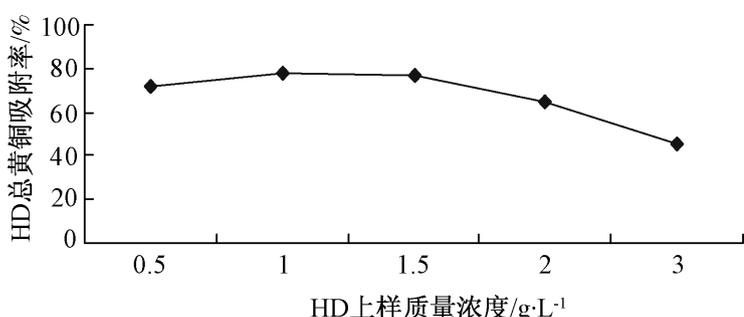


图 3 HD 上样浓度对吸附率的影响

3.3.2 上样流速的优化 上样流速是影响吸附的一个重要因素, 以 1, 2, 3, 4, 5 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 不同流速上样, 测定吸附率, 结果见图 4。流速越小吸附越充分, 但上样周期延长。综合考虑时耗, 吸附率, 控制上样流速为 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 较适宜。

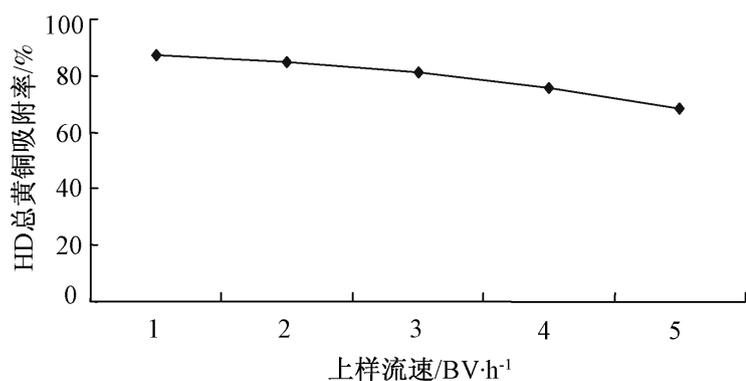


图 4 上样流速对吸附率的影响

3.3.3 上样液 pH 的优化 酸碱度可直接影响黄酮的存在形式, 进而影响吸附效果。将浓度相同的上样

液调 pH 分别为 4, 5, 6, 7, 8, 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上样, 用相应 pH 的去离子水淋洗柱子, 测定吸附率。结果见图 5: 随 pH 减少, 吸附率越大, 当 pH 为 4 时, 解吸液中总黄酮含量最高; pH 6, 吸附量急剧下降。这可能与被分离成份的酸碱度有关, HD 提取物为弱酸性 (pH 6.0)。综合考虑酸液对化学成分、树脂使用寿命、吸附效率的影响, 确定最佳吸附 pH 为 5。

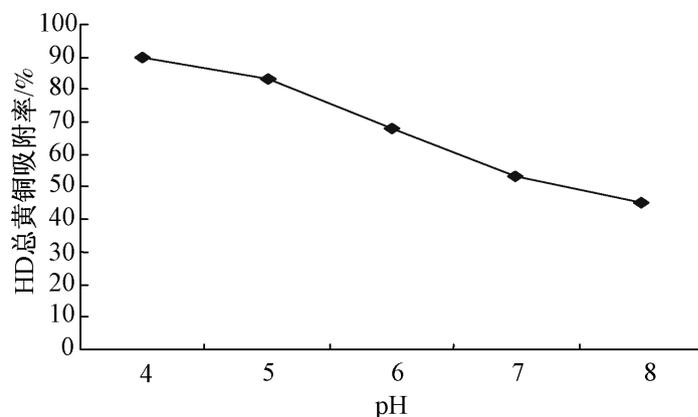


图 5 上样液 pH 对吸附率的影响

3.4 HPD-826 树脂动态解吸附的工艺参数优化

3.4.1 洗脱乙醇浓度优化 不同浓度乙醇对总黄酮的洗脱能力不同, 由图 6 可知, 当乙醇体积分数小于 80%, 随浓度加大, 解吸率加大; 体积分数为 80% 时, 解吸率为 84.5%, 体积分数为 90% 时, 解吸率为 86.1%。综合考虑成本、解吸率等因素, 以 80% 乙醇为宜。

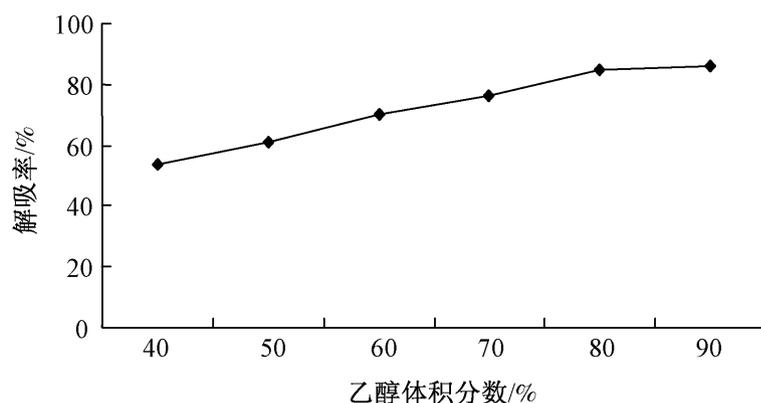


图 6 不同浓度乙醇对 HD 总黄酮洗脱力的影响

3.4.2 洗脱液酸碱度优化 根据 3.4.1 优选的结果, 以 80% 乙醇为洗脱液, 调 pH 6, 7, 8, 9, 测定解吸率及黄酮的纯度。结果见图 7, 解吸率随洗脱液 pH 的增加而增加, 但是总黄酮纯度正好相反, 当 pH 7 时, 解吸率与纯度都最大, 是最佳洗脱液 pH。

3.4.3 洗脱流速的优化 洗脱流速不同, 达到相同洗脱效果所需洗脱剂用量不同。将样品按优化了的吸附条件上柱吸附, 淋洗, 以 pH 7 的 80% 乙醇分别以 1, 2, 3, 4, 5 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱, 每 1BV 收集 1 次, 用 $\text{NaNO}_2 - \text{AL}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 反应判断洗脱终点, 计算洗脱液的用量, 结果见图 8: 洗脱流速越快所用洗脱液的量就越大, 当流速为 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 用 5 BV 即可洗脱完