

红花总黄酮大孔树脂纯化工艺

于国峰, 丁嘉信, 王超, 吕志强, 田景振*
(山东中医药大学药学院, 济南 250355)

[摘要] 目的: 研究大孔树脂精制红花总黄酮的工艺条件。方法: 以红花总黄酮吸附率与解析率为指标, 考察 6 种不同型号的大孔树脂对红花总黄酮的吸附与解析能力, 确定 AB-8 为最佳树脂。对 AB-8 大孔树脂的纯化条件进行优化。结果: 最佳工艺条件为以 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质量浓度 (药液 pH 2.0)、 $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样, 药液最佳上样体积为 3.3 BV (树脂量), 以 3 BV 30% 乙醇 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速率洗脱。经 AB-8 处理后的红花总黄酮纯度达 54.04%, 羟基红花黄色素 A 纯度达 28.76%, 分离效果良好。结论: AB-8 型大孔吸附树脂能较好地纯化富集红花总黄酮。

[关键词] 红花; 总黄酮; 大孔树脂

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0039-04

Purification Technology of Total Flavonoids from *Carthamus tinctorius* by Macroporous Resin

YU Guo-feng, DING Jia-xin, WANG Chao, LV Zhi-qiang, TIAN Jing-zhen*

(College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To study on purification technology conditions of total flavonoids from *Carthamus tinctorius* by macroporous resin. **Method:** Absorption rate and desorption rate of total flavonoids were taken as indexes, investigated absorption and desorption ability of 6 different types macroporous resin to safflower flavonoids, determined AB-8 was optimum macroporous resin. Purification conditions of AB-8 macroporous resin were optimized. **Result:** Optimum technology conditions were as follows: liquid concentration was $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 2), flow rate of sample was $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$; eluted with 3 BV the amount of 30% ethanol by speed of $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$. After purified with AB-8 macroporous resin, purity of total flavonoids was up to 54.04%, purity of hydroxysafflor yellow A was up to 28.76%, separation effect was good. **Conclusion:** AB-8 resin was fit for separating and purifying of total flavonoids from safflower.

[Key words] *Carthamus tinctorius*; total flavonoids; macroporous resin

红花功能活血、润燥、止痛、散肿通经。从红花中分离得到的化学成分^[1]有醌式查尔酮苷类、黄酮类、生物碱类、木脂素类、甾醇类、有机酸类、烷基二醇类及多炔类化合物等。红花的活性成分为黄酮类化合物, 有抗心肌缺血、抑制血小板聚集、抗氧化等

作用^[2]。大孔树脂吸附技术作为近些年来发展起来的新的分离纯化技术, 用于中药精制可明显提高中药制剂中有效成分的相对含量, 本文以红花总黄酮、羟基红花黄色素 A 的含量为指标, 采用大孔树脂吸附法精制红花总黄酮。

1 材料

1100 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent), Kromasil_{C18} 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 200 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), UV3010 型紫外分光光度计 (日本日立), BS110S 型 1/10 万电子分析天平 (梅特勒公司)。

红花购于济南建联药店, 经山东中医药大学中药鉴定室周凤琴教授鉴定为菊科植物红花

[收稿日期] 20110511(002)

[第一作者] 于国峰, 在读硕士研究生, 从事中药制剂的研究工作, Tel: 0531-89628597, E-mail: ygf86 @ yahoo.com.cn

[通讯作者] * 田景振, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型、新技术的研究, Tel: 0531-89628597, E-mail: tianjingzhen@163.com

Carthamus tinctorius L. 的干燥花。芦丁(批号 760706, 含量 > 98%)、羟基红花黄色素 A (HYSA) (批号 11562-200504, 含量 > 98%) 对照品均购自中国药品生物制品检定所, 甲醇、乙腈均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 红花总黄酮含量测定 精密量取芦丁对照品溶液(0.2 g·L⁻¹) 2.50, 3.75, 5.00, 6.25, 7.5, 10 mL 置 25 mL 量瓶中, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 10% 硝酸铝溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 4.3% 氢氧化钠试液 10 mL, 再加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 以相应试剂为空白, 照紫外-可见分光光度法, 510 nm 波长处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线 $Y = 0.0951X + 0.0047$ ($r = 0.9999$)。结果芦丁在 0.02 ~ 0.08 g·L⁻¹ 有良好的线性关系良好。

2.2 HYSA 测定方法 按 2010 年版《中国药典》中的 HYSA 的含量测定方法^[3]。以峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归, 得回归方程 $Y = 2117.3X - 38.484$ ($r = 0.9999$), 即 HYSA 质量浓度在 0.132 ~ 1.32 g·L⁻¹ 与峰面积呈良好线性关系。

2.3 大孔树脂型号的选择

2.3.1 大孔树脂静态饱和吸附量考察^[4-5] 分别称取 AB-8, D101, HPD100, HPD400, HPD600, DM130 6 种型号大孔树脂各 1.0 g(湿重), 放入 100 mL 锥形瓶中, 准确加入红花上样提取液(50 g·L⁻¹) 100 mL, 密塞, 置于水浴振荡器中, 振荡频率为 80 r·min⁻¹ 条件下, 振荡 12 h, 充分吸附后, 过滤, 测得其吸附量分别为 58.9, 63.6, 60.2, 29.8, 30.7, 33.3 mg·g⁻¹, 结果可知 AB-8, DM130, HPD100 3 种型号的大孔树脂黄酮吸附量明显高于其他 3 种型号。

2.3.2 大孔树脂静态解析量考察^[6] 将静态吸附后的 AB-8, DM130, HPD100 3 种型号树脂滤过, 并用适量蒸馏水冲洗, 抽干, 置 100 mL 干燥的锥形瓶中, 分别精密加入 95% 乙醇溶液各 50 mL。放入水浴振荡器中, 振荡 12 h(80 r·min⁻¹), 过滤, 其解析率分别为 96.34%, 78.67%, 80.64%, 90.43%, 89.54%, 94.04%。由结果可知 AB-8, DM130, HPD400 3 种型号的大孔树脂对红花总黄酮的静态解析率明显好于其他几种。结合静态吸附试验最终选择 AB-8, DM130 大孔树脂对其进行动态吸附解析试验。

2.3.3 树脂动态饱和吸附量考察^[7] 取 AB-8, DM130 型大孔吸附树脂各 2 g 上柱, 各上样 100

mL, 水洗至流出液无 Molish 反应, 合并流出液, 浓缩至 250 mL, 吸附量分别为 70.36, 40.63 mg·g⁻¹, 说明 AB-8 型大孔吸附树脂其动态吸附量明显高于 DM130 型大孔树脂。

2.3.4 树脂动态洗脱率考察 将 2.3.3 项下已达动态饱和和吸附的树脂, 95% 乙醇洗脱至流出液经 FeCl₃ 反应呈阴性, 合并流出液, 浓缩至 250 mL, 其动态解析率分别为 92.75%, 87.76%, 综合考虑静态吸附解吸试验和动态吸附试验, 最终确定选用 AB-8 型大孔树脂对红花提取液进行精制。

2.4 上柱条件研究 确定树脂型号后, 对红花上柱条件进行了考察。通过文献[8]可知, 影响大孔树脂吸附的主要因素有上柱药液质量浓度、上柱药液 pH、流速等。根据影响吸附效果的因素, 采用正交试验法, 以总黄酮的比吸附量为指标, 考察了药液质量浓度、流速、pH 值等因素对其的影响, 优选出最佳的上柱条件。因素水平见表 1。

表 1 红花提取药液上柱条件考察正交试验因素水平

水平	A 上柱药液质量浓度 /(g·L ⁻¹)	B 流速 /BV·h ⁻¹	C pH
1	25	2	2
2	50	4	3
3	75	6	4

2.4.1 正交试验 分别量取质量浓度为 25 g·L⁻¹ 的药液 300 mL, 50 g·L⁻¹ 的药液 150 mL, 75 g·L⁻¹ 的药液 100 mL, 通过 AB-8 大孔树脂柱 30 mL(2 cm × 9.5 cm), 流速、pH 按正交表中的设计操作, 收集洗脱液; 继以 100 mL 水洗脱, 流速 2 BV·h⁻¹, 收集水洗脱液。测定流出液、水洗脱液中总黄酮的含量, 以总黄酮的比吸附量为指标优选出最佳的上柱条件, 结果见表 2, 方差分析见表 3。

对各指标进行方差分析可知, 以总黄酮为指标其中 C 因素对试验结果有显著性影响, A, B 因素对结果影响较小。根据正交试验结果以及结合实际生产的需要, 确定最佳提取条件 A₂B₂C₁, 即上柱药液 50 g·L⁻¹, 用 1 mol·L⁻¹ 的盐酸调 pH 2.0, 以 4 BV·h⁻¹ 的流速通过大孔树脂柱。

2.4.2 验证试验 对正交试验优选出最佳工艺进行验证。结果总黄酮比吸附量分别为 82.7, 83.1, 83.8 mg·g⁻¹ 树脂。可知正交试验优选出的最佳上柱条件稳定可行。

2.5 最佳上样量考察 取离心后的药液(50 g·L⁻¹),

表2 红花提取药液上柱条件正交试验安排

No.	A	B	C	D	总黄酮比吸附量 /mg·g ⁻¹
1	1	1	1	1	83.1
2	1	2	2	2	75.3
3	1	3	3	3	60.7
4	2	1	2	3	79.3
5	2	2	3	1	62.4
6	2	3	1	2	76.8
7	3	1	3	2	61.6
8	3	2	1	3	81.5
9	3	3	2	1	70.3
K ₁	73.0	74.7	80.5	71.9	
K ₂	72.8	73.1	75.0	71.2	
K ₃	71.1	69.3	61.6	73.8	
R	0.19	0.54	1.89	2.6	

注:比吸附量=(上柱药液总含量-流出液中总含量)/树脂质量;
2. 流出液中总含量=上柱流出液中含量+水洗脱液中含量。

表3 红花总黄酮方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	6.54	2	3.27	0.60	
B	46.16	2	23.08	4.25	
C	567.02	2	283.51	52.21	<0.05
误差	10.86	2	5.43	1.00	

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

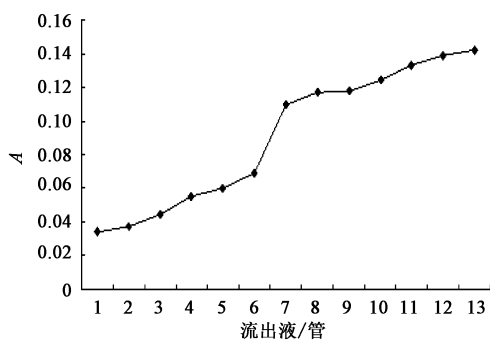


图1 总黄酮泄露曲线

用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸调 pH 2.0, 以 $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速通过 AB-8 大孔树脂柱 30 mL (2 cm × 9.5 cm), 收集流出液, 每 20 mL 收集 1 管, 测定流出液中总黄酮的含量, 绘制泄露曲线, 见图 1。

由图 1 可以看出, 当上柱药液体积达到 120 mL 时, 总黄酮开始出现明显泄露, 故确定上样量为 30 mL 大孔树脂上样 100 mL。

2.6 洗脱溶剂的考察 精密吸取离心后的药

液^[9-10] ($50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 150 mL, 用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl pH 2.0, 以 $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速通过 AB-8 大孔树脂柱 30 mL (2 cm × 9.5 cm), 100 mL 水洗脱后, 分别用 10% 乙醇、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇洗脱, 测定醇洗脱液中总黄酮含量分别为 35.58%, 54.04%, 38.29%, 40.35%, 其中 30% 乙醇洗脱总黄酮含量最高, 故确定洗脱乙醇体积分数为 30%。

2.7 洗脱溶剂用量的考察 按 2.6 方法操作, 150 mL 水冲洗, 30% 乙醇洗脱, 洗脱液流速为 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 收集醇洗脱液, 每 15 mL 收集 1 管, 测定流出液中总黄酮的含量, 绘制洗脱曲线 (图 2)。通过洗脱曲线可以看出, 30% 乙醇洗脱至 90 mL 即 3 BV 时, 总黄酮已达到洗脱终点, 最终确定 30% 乙醇洗脱用量为 3 BV。

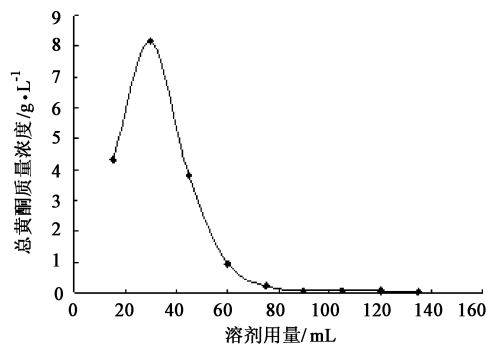


图2 总黄酮洗脱曲线

2.8 大孔树脂精制工艺验证试验 按上述优选工艺条件, 进行验证试验, 测定大孔吸附树脂精制前后干膏率分别为 6.76%, 3.01%, 总黄酮质量分数分别为 25.18%, 54.04%, HYSA 质量分数分别为 14.56%, 28.76%, 精制后总黄酮转移率为 89.14%。

3 讨论

本文通过建立紫外-可见分光光度法和高效液相色谱法相结合的含量测定方法对红花总黄酮和羟基红花黄色素 A 进行含量测定, 能够更准确的测定有效成分的含量。

本文通过对 AB-8 型大孔吸附树脂对红花总黄酮分离富集条件的优化, 确定了其分离富集条件为: 最佳工艺条件为以 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质量浓度 (药液 pH 2.0)、 $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样, 最佳上样量为 100 mL (30 mL 树脂), 3 BV 30% 乙醇 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速率洗脱。经 AB-8 处理后的红花总黄酮纯度达 54.04%, 羟基红花黄色素 A 纯度达 28.76%, 分离效果良好。该工艺具有操作简单、重复性好等优点, 具有较好的推广应用前景。

丹参总酚酸大孔树脂纯化工艺

魏冬青¹, 陈绍民², 苗建武¹, 丁嘉信¹, 陈智³, 田景振^{1*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东省食品药品监督管理局,
济南 250013; 3. 济南市第二人民医院, 济南 250001)

[摘要] 目的:研究大孔树脂分离纯化丹参总酚酸的工艺条件及参数。方法:以丹参总酚酸的含量和转移率为指标,确定提取液中总酚酸的最佳分离纯化条件。结果:HPD100型大孔吸附树脂纯化丹参酚酸的最佳工艺条件为上样液质量浓度48 g·L⁻¹,树脂-药液比3:2,树脂柱径高比1:3,20%乙醇洗脱,用量8 BV。丹参总酚酸纯度可达60%以上,转移率约45%。结论:该工艺具有操作简单、节省溶剂等优点,具有较好的推广应用前景。

[关键词] 丹参总酚酸;大孔树脂;分离纯化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0042-03

Purification Technology of Total Phenolic Acids from *Salvia miltiorrhiza* by Macroporous Resin

WEI Dong-qing¹, CHEN Shao-min², MIAO Jian-wu¹, DING Jia-xin¹, CHEN Zhi³, TIAN Jing-zhen^{1*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;
2. Food and Drug Administration, Shandong Province, Ji'nan 250013, China;
3. Second People's Hospital of Ji'nan, Ji'nan 250001, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize technology conditions and parameters of separation and purification for total phenolic acids from *Salvia miltiorrhiza* by macroporous resin. **Method:** Based on the content and transfer rate of total phenolic acids from *S. miltiorrhiza* as indexes, determined optimum separation and purification conditions of total phenolic acids from extract. **Result:** Optimum purification conditions were as follows: HPD100 macroporous resin was used by 20% ethanol as elution agent with ratio of resin to material drug 3:2, ratio of diameter to height of

[收稿日期] 20110515(006)

[第一作者] 魏冬青, 硕士研究生, 从事中药制剂研究, Tel:0531-89628597, E-mail: weidongqing_ngu@126.com

[通讯作者] * 田景振, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型、新技术研究, Tel:0531-89628597, E-mail: tianjingzhen@163.com

[参考文献]

[1] Takahashi Y, Miyassaka N, Tasaka S H, et al. Constitution of two coloring matters in the flower petals of *carthamus tinctorius* L [J]. *Tetrahedron Lett*, 1982, 23 (49):5163.

[2] 施峰, 刘焱文. 红花的化学成分及药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(9):1666.

[3] 中国药典. 一部[S]. 2010:141.

[4] 曹群华, 瞿伟菁, 李家贵. 大孔树脂吸附纯化沙棘籽渣总黄酮的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(3):225.

[5] 彭亮, 李知敏. 大孔吸附树脂分离紫葳中总黄酮的工

艺研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(2):352.

[6] 袁崇均, 王筋, 陈帅. 大孔树脂对槐角总黄酮分离纯化工艺研究[J]. 四川中医, 2008, 26(3):40.

[7] 花蕾, 张文清, 夏玮. 桑叶总黄酮的大孔树脂纯化工艺[J]. 中成药, 2007, 29(12):1758.

[8] 刘斌, 石任兵, 余超. 影响大孔吸附树脂吸附分离中草药化学成分的因素[J]. 中草药, 2002, 33(5):475.

[9] 于智峰, 王敏. 大孔树脂精制苦荞总黄酮工艺[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(7):585.

[10] 盛华刚, 朱立俏, 张超, 等. 金荞麦提取液的大孔树脂分离纯化工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 32(15):1832.

[责任编辑 仝燕]