

为提取溶剂。考察回流法、超声提取法和煎煮法的提取效果,煎煮法的可控性较差,超声法和回流法提取效果相当,考虑到超声法操作简便,确定超声法为实验提取方法。

**3.2 色谱条件的优化** 本实验不仅要测落新妇苷和黄杞苷的含量,同时还要得到菝葜药材的指纹图谱。落新妇苷和黄杞苷的紫外最大吸收分别在 290 和 292 nm,指纹图谱要兼顾药材的整体性,因而要保证在所选波长下其他物质也要有较强吸收。由 DAD 检测器比较了波长在 210 ~ 400 nm 所测得的图谱,在 303 nm 下,基线平稳,出峰较多,信息较丰富,且落新妇苷和黄杞苷也有较大吸收,故选取 303 nm 作为测定波长。因菝葜成分中含有多羟基酚类化合物,在流动相中加入适量的磷酸,能使组分有较好的峰形和分离度<sup>[3]</sup>。样品浓缩后,用甲醇复溶,发现有峰前延现象,可能是由于样品溶解的溶剂与流动相极性相差较大,

容易出现“溶剂效应”,用甲醇-0.1% 磷酸溶液(30 : 70)复溶后前延峰消失,峰对称性良好。

本实验对 10 批菝葜药材进行了 HPLC 指纹图谱的构建和解析,同时对《中华人民共和国药典》的规定成分进行含量测定。指纹图谱有助于药材的定性,含量测定则有利于评价药材质量。本文中所建立的方法准确度高、精密度高、易于操作、适用性强,可用于菝葜药材的质量分析。

#### 参考文献

- [1] 陈东生,华小黎.菝葜的研究现状[J].中药材,2006,29(1):90-93.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2010:290.
- [3] 周艳林,严海,钟小清,等.菝葜药材脂溶性成分指纹图谱研究[J].中草药,2008,39(8):1246-1248.

DOI 10.3870/yydb.2012.04.024

## 大孔树脂纯化柞柳总黄酮工艺的研究

沈广志<sup>1</sup>,金艳霞<sup>2</sup>,于春光<sup>3</sup>

(1.牡丹江医学院药学院,黑龙江牡丹江 157011;2.黑龙江省中医药学校,哈尔滨 151500;3.哈尔滨乐泰药业有限公司,150025)

**摘要** 目的 研究 D-101 大孔吸附树脂分离纯化柞柳总黄酮的工艺条件。方法 以柞柳总黄酮为指标,对上样量、吸附时间、洗脱速度、乙醇浓度和上样药液 pH 进行考察。结果 大孔树脂分离柞柳总黄酮的最佳工艺条件为上样量 15 mL, pH 6 ~ 7, 吸附 30 min, 流速 3 BV · h<sup>-1</sup>, 乙醇浓度 70%, 乙醇用量 3 BV。结论 D-101 大孔吸附树脂能有效分离纯化柞柳总黄酮。

**关键词** 柞柳;黄酮;大孔树脂

中图分类号 TQ460.6

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2012)04-0477-03

### Study on the Technology for Extracting Flavonoids in *Tamarix chinensis* Lour by Macroporous Resin

SHEN Guang-zhi<sup>1</sup>, JIN Yan-xia<sup>2</sup>, YU Chun-guang<sup>3</sup> (1. School of Pharmacy, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine of Heilongjiang Province, Harbin 151500, China; 3. Loctite Harbin Pharmaceutical Co. Ltd., Harbin 150025, China)

**ABSTRACT Objective** To study the conditions for isolating and purifying flavonoids in *Tamarix chinensis* Lour by D-101 type of macroporous adsorption resin. **Methods** The total flavonoids in *Tamarix chinensis* Lour was taken as a reference index. The sample volume, adsorption time, eluting velocity, ethanol concentration and pH value of the sample solution were investigated. **Results** The optimum conditions for isolating and purifying flavonoids in *Tamarix chinensis* Lour by D-101 type of macroporous adsorption resin were as follows: pH = 6-7, 15 mL sample of the original liquid, adsorption time of 30 min, 70% ethanol as an eluting reagent, and an eluting velocity of 3 BV · h<sup>-1</sup>. **Conclusion** D-101 macroporous adsorptive resin can effectively isolate and purify total flavones from *Tamarix chinensis* Lour.

**KEY WORDS** *Tamarix chinensis* Lour; Flavonoids; D-101 Macroporous resin

怪柳又称西河柳,本草记载始于《日华子》,名赤怪木。怪柳作为药材,是指怪柳科植物怪柳(*Tamarix chinensis* Lour)的嫩枝叶。其味甘、辛,性平,归肺、胃、心经。有疏风、解表、透疹、解毒之功效。主治风热感冒,麻疹初起,疹出不透,风湿痹痛,皮肤瘙痒<sup>[1-3]</sup>。怪柳主产于辽宁、河南、河北、山东等地,其主要含有黄酮、甾体、脂肪酸、醚类、鞣质以及三萜类等成分<sup>[4]</sup>。大孔树脂在中草药化学成分分离、富集中的应用越来越受到人们的重视<sup>[5-9]</sup>。笔者在本实验采用 D-101 大孔吸附树脂对怪柳总黄酮进行纯化工艺研究。

**1 仪器与试剂**

紫外可见分光光度计,旋转蒸发仪,超声波清洗仪。芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100080-200707),怪柳(安国市光明饮片,批号:8001015),大孔吸附树脂(天津市光复精细化工研究所,批号:20100315),所用试剂均为分析纯。

**2 方法与结果**

**2.1 标准曲线的建立** 准确称取芦丁标准品 10 mg,置于 100 mL 量瓶中,用 60% 乙醇定容。分别取 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 标准液置于 10 mL 量瓶中,补加 60% 乙醇至 5.0 mL。加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min;加入 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min;加入 4% 氢氧化钠溶液 2.0 mL,用水稀释至刻度,放置 10 min。以空白试剂作参比,测定 510 nm 波长处吸光度(A),以浓度对吸光度绘制标准曲线,得到回归方程为  $A = 0.0844C + 0.0061$  ( $r = 0.9994$ )。结果表明,芦丁浓度在 10 ~ 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内有良好的线性关系。

**2.2 供试液制备和总黄酮含量测定** 怪柳粉碎过筛孔内径 0.425 mm(40 目)筛,精确称取 10 g,以 60% 乙醇 300 mL 作溶剂,利用微波合成/萃取仪,设定参数(功率 600 W, 70  $^{\circ}\text{C}$ , 20 min)提取,过滤,浓缩,定容至 200 mL 作为样品液,备用。吸取样品液 0.2 mL,按“2.1”项方法测定吸光度,测得样品液总黄酮含量为  $7.45 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.3 树脂的预处理** 树脂用乙醇浸泡 24 h,充分溶胀,用乙醇洗至流出液加适量纯化水无白色浑浊,再用纯化水洗至无醇味,备用。

**2.4 树脂的筛选** 取样品液,分别通过不同型号的已预处理好的树脂柱,静置 30 min,依次用纯化水、70%

乙醇洗脱,将洗脱液浓缩蒸干,测定洗脱物中总黄酮量,计算总黄酮回收率。AB-8、D-101 树脂的回收率分别为 52.98% 和 73.88%。因此,选择 D-101 树脂为分离纯化怪柳总黄酮的树脂。

**2.5 D-101 树脂富集怪柳总黄酮的工艺参数考察**

**2.5.1 吸附时间的考察** 精密量取 4 份样品液各 15 mL,分别上树脂柱,吸附时间分别为 5, 15, 30, 60 min,放出残液,以纯化水洗脱至无色,用 70% 乙醇以  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  速度洗脱,计算总黄酮回收率及纯度。确定最佳吸附时间为 30 min。结果见表 1。

表 1 吸附时间的考察 ( $n=3$ )

**Tab.1 The investigation of adsorption time**

吸附时间/min	回收率/%	纯度/%
5	46.84	17.61
15	68.96	19.34
30	75.13	20.45
60	62.14	18.63

**2.5.2 洗脱剂浓度的考察** 取 4 份 pH 6 ~ 7 样品液各 15 mL,分别通过树脂柱,吸附时间 30 min,以纯化水洗脱至无色,分别用 50%, 60%, 70%, 90% 乙醇  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  速度洗脱,计算总黄酮回收率及纯度。确定最佳洗脱剂浓度为 70% 乙醇。结果见表 2。

表 2 乙醇浓度的考察 ( $n=3$ )

**Tab.2 The investigation of ethanol concentration**

乙醇浓度	回收率	纯度
50	55.32	17.76
60	62.93	20.23
70	76.97	21.36
90	73.42	19.27

**2.5.3 上样浓度的考察** 取不同浓度的上样液,调节 pH 6 ~ 7,以  $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  速度通过树脂柱,70% 乙醇洗脱,收集流出液,计算黄酮的吸附率。结果表明,当浓度分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,其吸附率分别为 78.6%, 86.4%, 83.3%, 82.5% 和 80.1%。从上样考察结果可知,当上样液浓度为 0.2  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时上样最佳。

**2.5.4 上样量的考察** 分别量取样品液 5, 10, 15, 20, 30 mL 上树脂柱,吸附时间 30 min,先以纯化水洗脱至洗脱液近无色,后以 70% 乙醇  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  速度洗脱,计算总黄酮回收率及纯度。由表 3 可知,15 mL 为饱和上柱

收稿日期 2011-08-05 修回日期 2011-10-26

作者简介 沈广志(1979-),男,黑龙江牡丹江人,讲师,硕士,从事药物化学教学与科研工作。电话:0453-6984380, E-mail:yx361@163.com。

量,上柱量过低或过高均达不到最佳吸附效果。

表 3 上样量考察( $n=3$ )

Tab. 3 The investigation of sample volume

取样量/mL	回收率/%	纯度/%
5	68.83	15.87
10	71.53	19.35
15	73.11	20.11
20	66.14	18.32
30	59.38	18.17

**2.5.5 pH 的考察** 取样品液 15 mL 平行 4 份稀释 5 倍,分别用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液和  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液调 pH 至 2~3,4~5,6~7,8~9,分别通过 20 mL 树脂柱,吸附时间分别为 30 min,放出残液,以纯化水洗脱至无色,再用 70% 乙醇  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  速度洗脱,计算总黄酮回收率及纯度,确定 pH 为 6~7。结果见表 4。

表 4 pH 的考察( $n=3$ )

Tab. 4 The investigation of pH

pH	回收率/%	纯度/%
2~3	50.88	13.61
4~5	64.95	15.41
6~7	75.93	19.67
8~9	71.01	18.17

**2.5.6 洗脱速度的考察** 取桉柳样品液 15 mL 平行 4 份稀释 5 倍,分别通过树脂柱,吸附时间均为 30 min,放出残液,以纯化水洗脱至无色,分别以 1,2,3,4  $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$  速度用 70% 乙醇洗脱,计算总黄酮回收率及纯度。确定最佳洗脱速度为  $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。结果见表 5。

表 5 洗脱速度的考察( $n=3$ )

Tab. 5 The investigation of elution speed

洗脱速度/ $(\text{BV} \cdot \text{h}^{-1})$	回收率/%	纯度/%
1	60.78	15.91
2	74.37	18.25
3	76.82	19.77
4	70.31	19.32

**2.5.7 洗脱终点的考察** 取桉柳样品液 15 mL,上树脂柱,用 70% 乙醇  $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  的速度洗脱,按树脂床体

积收集洗脱液,计算总黄酮含量。结果表明,当洗脱剂用量分别为 1,2,3,4,5,10 BV。每份洗脱液中总黄酮含量分别为 0.82,5.71,14.49,9.78,7.15 和 0.51 mg。从上样考察结果可知,确定洗脱剂用量为 3 倍树脂床体积数。

**2.5.8 分离的桉柳总黄酮纯度考察** 取桉柳样品液 15 mL,平行 3 份,稀释 5 倍,加于树脂柱上,按实验方法收集洗脱液,计算总黄酮回收率及纯度。总黄酮回收率达到 80%,纯度达 20%,且具有良好的重复性。

### 3 讨论

通过考察,D-101 树脂对黄酮的吸附量大,吸附率较高,易解析,是一种理想的黄酮吸附剂,适宜于对黄酮的提取分离。实验确定了分离桉柳总黄酮的最佳工艺条件为上样量 15 mL,pH6~7,吸附时间:30 min,乙醇浓度:70%,乙醇用量:3 BV,流速: $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。采用该工艺条件进行桉柳总黄酮类化合物的分离纯化,回收率达到 80%,纯度达 20%。影响大孔树脂分离的因素较多,各种因素对桉柳总黄酮分离纯化的影响还需进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 宴亦林. 桉柳总黄酮提取方法研究[J]. 中药材,2003,36(11):811-812.
- [2] 王斌,任舒文,李国强,等. 桉柳抗肿瘤甾体和黄酮类化合物研究[J]. 中国药学杂志,2009,44(8):576-580.
- [3] 吴彩霞,刘广河,康文艺. 桉柳挥发性成分研究[J]. 中国药房,2010,21(15):1406-1407.
- [4] 张媛,屠鹏飞. 桉柳属药用植物研究进展[J]. 中草药,2008,39(6):947-951.
- [5] 刘颖,刘树民,于栋华,等. 大孔树脂纯化穿山龙总皂苷的工艺优化[J]. 医药导报,2011,30(5):635-637.
- [6] 陈立江,段洪云,张胜,等. 大孔树脂对赤芍总苷吸附的初步研究[J]. 中国现代应用药学,2011,28(5):458-462.
- [7] 陈龙浩,邹江冰,蒋琳兰. 西番莲叶中总黄酮的大孔树脂纯化工艺研究[J]. 医药导报,2010,29(1):85-87.
- [8] 黄月纯,黄樱华,刘翠玲,等. S-8 型大孔吸附树脂纯化泽兰总黄酮(酚酸)的工艺研究[J]. 中国现代应用药学,2010,27(8):694-698.
- [9] 曹骋,王术玲,陈丰连,等. 不同型号大孔吸附树脂对何首乌二苯乙烯苷的吸附性考察[J]. 医药导报,2011,30(2):202-204.

DOI 10.3870/ydyb.2014.04.025