

· 药物制剂与药品质量控制 ·

大孔树脂法富集黄芩籽种壳总黄酮^{*}

杨丽,王宏伟,李洪波,赵桂琴,张晓峰

(河北省中药研究与开发重点实验室、承德医学院中药研究所、河北省中医药抗痴呆重点研究室,承德 067000)

摘要 **目的** 优选富集纯化黄芩籽种壳总黄酮的大孔树脂及工艺条件。**方法** 采用高效液相色谱(HPLC)法测定野黄芩苷含量。以野黄芩苷作指标成分,运用吸附-解吸实验优选大孔树脂型号;以单因素设计和正交实验考察大孔树脂富集纯化黄芩籽种壳总黄酮工艺。**结果** AB-8型大孔树脂吸附-洗脱效率最高,较理想的纯化工艺条件为:上样浓度 $30.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,最佳吸附量 $0.3\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$,吸附流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,树脂柱径高比1:3,除杂需纯化水量20 BV,5 BV 70%乙醇洗脱。**结论** 该工艺条件下AB-8型大孔树脂富集纯化黄芩籽种壳总黄酮效率较高,工艺条件科学、简便,重复性好。

关键词 野黄芩苷;总黄酮;种壳;正交试验;大孔树脂

中图分类号 R282;TQ460.6

文献标识码 B

文章编号 1004-0781(2017)04-0420-05

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.04.016

Enrichment of Total Flavonoids from Seed Shell of *Scutellaria Baicalensis* by Macroporous Resin

YANG Li, WANG Hongwei, LI Hongbo, ZHAO Guiqin, ZHANG Xiaofeng (Institute of Chinese Traditional Materia Medica of Chengde Medical College, Key Laboratory of Study and Exploiture for Traditional Chinese Medicine, Hebei Province Key Research Office of Traditional Chinese Medicine Against Dementia, Chengde 067000, China)

ABSTRACT **Objective** To optimize enrichment and purification technology of total flavonoids from seed shell of *Scutellaria baicalensis* by macroporous resin. **Methods** Scutellarin was selected as the index, and its content was determined by HPLC. Types of macroporous resin were optimized by static adsorption elution tests. Enrichment and purification technology was investigated by orthogonal test and single-factor tests. **Results** AB-8 macroporous resin showed better effects than others. Optimum purification condition was as follows: sample concentration was $30.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, the best adsorption capacity was $0.3\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, adsorption velocity was $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, diameter-height ratio was 1:3, the eluting agent was 20 BV purified water, with the total polyphenols being desorbed by 5 BV of 70% ethanol. **Conclusion** The technology is scientific, simple and highly reproducible. It can be applied to enrich and purify total flavonoids from seed shell of *Scutellaria baicalensis* by macroporous resin.

KEY WORDS Scutellarin; Total Flavonoids; Seed shell; Orthogonal experiment test; Macroporous resin

黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi),亦称黄金荣、空心草,是多年生管状花目唇形科的草本植物。始载于《神农本草经》,具有清热燥湿,泻火解毒,止血,安胎之功效^[1],民间用于清肺热、解毒、泻火、退黄、利胆、抗炎等^[2-5]。中成药生产中常以黄芩提取物入药,而其中起药效作用的主要是黄酮类化合物。黄芩籽种壳中除含有碳水化合物外,还含有多种黄酮类化合物;其中黄酮类化合物以野黄芩苷为主。黄酮类化合物

(野黄芩苷)具有降低脑血管阻力、改善脑血循环、增加脑血流量及抗血小板凝集的作用^[6]。常用总黄酮的纯化工艺有碱溶酸沉法^[7],但该法实验中酸碱性的强弱与温度不易控制,且剧烈条件下某些化合物结构会发生不可逆变化,从而破坏药效。近年来大孔树脂吸附法用于总黄酮的纯化工艺已有报道^[8-11],表明其具有既不影响目标成分的含量又不会带入新杂质的特点。但大孔树脂吸附法应用于富集纯化黄芩籽种壳总黄酮的研究笔者尚未见报道,本实验报道大孔树脂富集纯化黄芩籽种壳总黄酮。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 RE52-99型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),SHD-Ⅲ型循环水式多用真空泵(保定高新区阳光科教仪器),TD2001型电子天平(天津市天马仪器厂,感量:十万分之一),Spectrum-752型紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司),Agilent1200高效液相色谱

收稿日期 2015-02-04 修回日期 2015-05-25

基金项目 *国家科技支撑计划项目(2011BAI07B04)

作者简介 杨丽(1989-),女,甘肃白银人,在读硕士,研究方向:天然抗病毒活性产物研究与开发。电话:0314-2291908,E-mail:1790113809@qq.com。

通信作者 赵桂琴(1971-),女,河北张家口人,教授,博士,研究方向:天然抗病毒活性产物研究与开发。电话:0314-2291908,E-mail:zhaoguiqin1971@sina.com.cn。

谱仪(自动进样器,四元泵,柱温箱,DAD 检测器,Agilent 公司,美国);CHRIST 实验室型冷冻干燥机(德国 MARTIN CHRIST);KQ-100E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HC-2062 高速离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司)。

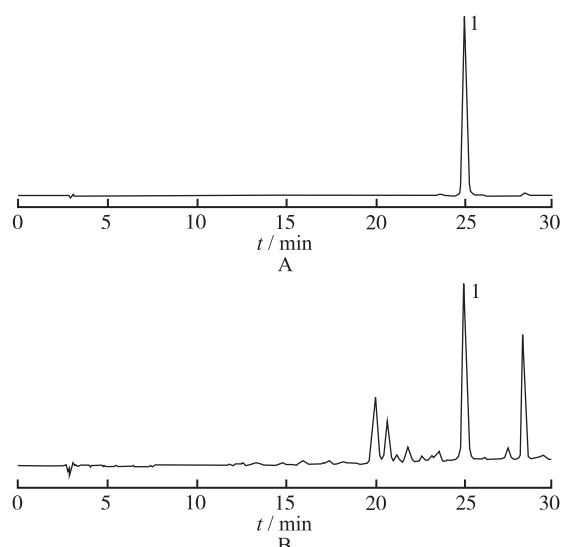
1.2 试药 干燥黄芩籽种壳(中国药材集团承德有限公司提供,由承德医学院中药研究所赵春颖副教授鉴定),新制纯化水,乙醇(分析纯),甲醇(色谱纯),野黄芩苷标准品(购于中国食品药品检定研究院,批号:110842-200605,含量 $\geq 98.99\%$),D-101,AB-8 型大孔树脂(天津兴南允能高分子技术有限公司),XDA-1,XDA-16 型大孔树脂(西安蓝晓科技新材料股份有限公司),D201,DM130,ADS-7,ADS-17 型大孔树脂(郑州勤实科技有限公司),HPD-100,HPD-400 型大孔树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司),ME-1,ME-2 型大孔树脂(天津欧瑞生物科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 野黄芩苷的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取野黄芩苷标准品 3.10 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度线处,摇匀,静置,即得。

2.1.2 色谱条件 色谱柱 ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相为甲醇:水:甲酸(20:80:0.4%),流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 20.0 °C,检测波长 335 nm,进样量 10.0 μL。在此色谱条件下,野黄芩苷与其他色谱峰可完全分离。见图 1。



A. 野黄芩苷对照品;B. 供试品;1. 野黄芩苷

图 1 黄芩籽种壳高效液相色谱图

A. scutellarin control;B. sample;1. scutellarin

Fig.1 HPLC chromatogram of seed shell of *Scutellaria baicalensis*

2.1.3 线性关系考察 设置野黄芩苷对照品溶液进样量分别为 2.0,4.0,6.0,8.0,10.0,12.0 μL,在上述色谱条件下,依次自动进样,记录色谱图、峰面积(A)。并以野黄芩苷质量(X)与对应峰面积值(Y)进行线性回归,得到回归方程: $Y = 2\,332.5X - 11.544$, $r = 0.999\,5$,表明野黄芩苷在 0.248 ~ 1.488 μg 范围内与相对应 A 值具有良好的线性关系。

2.1.4 总黄酮粗提物的制备 称取干燥黄芩籽种壳 1.0 kg,置提取设备中,以 60% 乙醇 8 L 回流 1.0 h,重复操作 2 次,滤过,合并,烘干,得黄芩籽种壳总黄酮干浸膏 371.2 g。

2.1.5 样品考察 取“2.1.4”项下干浸膏适量制备供试品溶液,分别于配液后 2.0,4.0,6.0,8.0,24.0 h 按照“2.1.2”项色谱条件自动进样 10.0 μL,检测对应不同时间下的色谱峰面积。结果显示供试品溶液中野黄芩苷峰面积的 RSD = 0.99%,表明供试品溶液在 24.0 h 内稳定性良好。

2.1.6 上样液的制备 精密称取“2.1.4”项下干粉适量,加入新制纯化水配成 30.0 g·L⁻¹ 的生药液,布氏漏斗抽滤,取抽滤液,即得(野黄芩苷质量浓度为 1.17 g·L⁻¹)。

2.2 树脂筛选

2.2.1 大孔树脂的预处理 分别称取 12 种不同型号大孔树脂适量,95% 乙醇浸泡 30 h 使充分溶胀,新制纯化水洗至流出液无白色浑浊且无醇味。置密闭容器,备用^[7-10]。

2.2.2 树脂型号的筛选 称预处理的 12 种大孔树脂各 10.0 g 于 100 mL 具塞锥形瓶中,分别加入“2.1.6”项下上样液 30 mL 静态吸附,室温放置 22 h,每 2.5 h 振摇一次。抽滤,取续滤液适量,高效液相色谱(HPLC)法测定野黄芩苷浓度,计算树脂吸附率。上述滤出树脂转置 100 mL 具塞锥形瓶,加 95% 乙醇 60 mL 静态解吸,室温放置 22 h,每 2.5 h 振摇一次。测定解吸液野黄芩苷浓度,计算洗脱率。计算公式:吸附率 = $(C_0V_0 - C_1V_1)/C_0V_0 \times 100\%$,洗脱率 = $C_2V_2/(C_0V_0 - C_1V_1) \times 100\%$;式中 C_0 为上样液野黄芩苷质量浓度, V_0 为上样液体积, C_1 为水洗液含野黄芩苷质量浓度, V_1 为水洗液体积, C_2 为洗脱液含野黄芩苷质量浓度, V_2 为洗脱液体积。结果见表 1。可见,XDA-16 和 AB-8 型大孔树脂的静态吸附效果明显好于其他 10 种大孔树脂,且两者吸附率和洗脱率相近,考虑生产实际,选择 AB-8 型大孔树脂更为经济。

2.3 AB-8 型大孔树脂富集纯化工艺优选

2.3.1 上样液浓度的确定 称取预处理的 AB-8 型

大孔树脂 4 份,每份 10.0 g,湿法装柱,分别配制 10.0, 20.0,30.0,40.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 生药浓度的药液上样,保持上样量和体积流量相同,考察不同上样液浓度对 AB-8 型大孔树脂动态吸附效果的影响,HPLC 法测定洗脱液中野黄芩苷浓度;结果见图 2。结果显示,上样浓度在 30.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时吸附率最高,若再增加浓度则吸附率明显降低,因此确定最适上样液浓度为 30.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [8]。

表 1 12 种大孔树脂的静态吸附-解吸实验结果
Tab.1 Results of static adsorption – desorption test for 12 kinds of macroporous resins

编号	树脂类型	极性分类	吸附率	洗脱率
			%	
1	D101	非极性	66.81	44.61
2	AB-8	弱极性	64.03	83.67
3	XDA-1	极性	45.97	79.63
4	XDA-16	极性	69.48	85.15
5	D201	弱极性	24.25	55.65
6	DM130	中极性	62.74	80.75
7	ADS-7	强极性	61.36	69.07
8	ADS-17	氢键	61.36	80.58
9	HPD-100	非极性	60.59	70.97
10	HPD-400	极性	62.12	71.70
11	ME-1	非极性	60.03	70.97
12	ME-2	弱极性	27.87	74.96

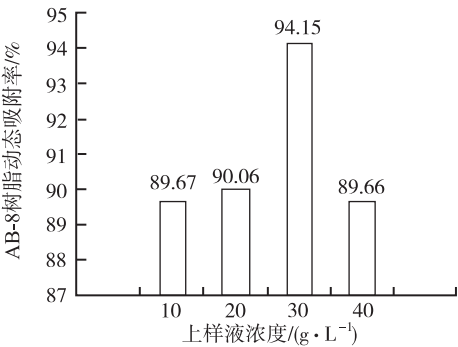


图 2 上样浓度对 AB-8 树脂吸附率的影响
Fig.2 Effect of sample concentration on the adsorption rate of AB-8 resin

2.3.2 上样量考察 称取已预处理 AB-8 型大孔树脂 10.0 g,配制生药浓度为 30.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的药液上样,分段收集流出液。每 3 mL 为一流份,收集 17 份。HPLC 法依次测定各个流份中野黄芩苷浓度。以流份为横坐标,流出液中野黄芩苷质量为纵坐标,绘制野黄芩苷泄露曲线,见图 3。由图 3 可知,第 1~10 份未检测到野黄芩苷,第 11 份开始有野黄芩苷少许泄露,提示已吸附饱和。为避免野黄芩苷泄露,选择 AB-8 型

大孔树脂对生药液的最适上样量为 30 mL(即每克树脂对提取物的最佳吸附量为 0.3 g)。

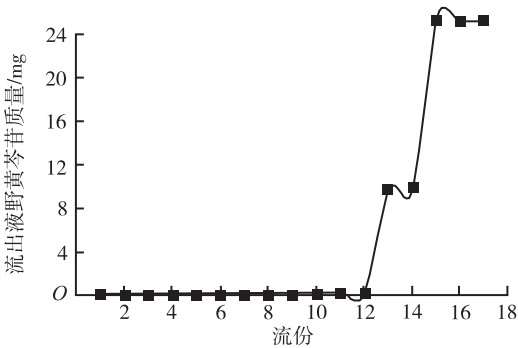


图 3 野黄芩苷泄露曲线
Fig.3 Leakage curve of scutellarin

2.3.3 正交实验考察 以径高比、吸附流速和洗脱流速为目标因素,设计 $L_9(3^4)$ 正交实验表进行考察,因素水平见表 2。

表 2 正交设计因素水平
Tab.2 Factors and levels of orthogonal design

水平数	径高比	吸附流速(B)	洗脱流速(C)	空白
	(A)	$(\text{mL}\cdot\text{min}^{-1})$		(D)
1	1 : 3	0.5	0.5	
2	1 : 5	1.0	1.0	
3	1 : 7	1.5	1.5	

称取已预处理 AB-8 型大孔树脂 10.0 g 共 9 份,按表 2 设计,湿法装柱,依次按 30.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 药液 30 mL 上样,加水除去杂质,70% 乙醇洗脱,HPLC 法测定洗脱液中野黄芩苷浓度。实验结果以洗脱液中野黄芩苷质量分数 W 计: $W = (C_0 V_0) / M \times 100\%$; 式中 W 为洗脱液中野黄芩苷质量分数, C_0 为洗脱液中野黄芩苷浓度, V_0 为洗脱液体积, M 为纯化后干粉质量。见表 3。从表 3 和表 4 看出,各考察因素对纯化工艺的影响程度为: $A > B > C$,即径高比 > 吸附流速 > 洗脱流速。表明 A、B 两因素即树脂柱径高比和吸附流速对纯化工艺有显著性影响($P < 0.05$)。一般来说,洗脱流速越慢,洗脱率越高,洗脱效果越好。但实际生产中洗脱流速过慢会延长生产周期,造成生产效率降低。综合以上因素,确定优化方案为 $A_1 B_2 C_2$,即:树脂柱径高比 1 : 3,吸附流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,洗脱流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.3.4 水洗体积考察 称取已预处理 AB-8 型大孔树脂 10.0 g(径高比 1 : 3),30.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 药液 30 mL 上样,吸附流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,加新制纯化水除杂,水洗

液每 4 BV(60 mL)收集 1 份,共 7 份,HPLC 法测定每份中野黄芩苷含量,结果见图 4。由图 4 知,从第 5 流份开始固含物中野黄芩苷含量基本为零,故确定最适水洗体积量为 20 BV。

表 3 正交实验及结果

Tab.3 Orthogonal test and its results

序列号	A (径高比)	B(吸附 流速)	C(洗脱 流速)	洗脱液中野黄芩 苷质量分数 W/%
1	1	1	1	61.80
2	1	2	2	62.05
3	1	3	3	58.19
4	2	1	2	61.11
5	2	2	3	60.88
6	2	3	1	57.91
7	3	1	3	58.74
8	3	2	1	60.69
9	3	3	2	56.12
K ₁	182.04	181.65	180.40	
K ₂	179.90	183.62	179.28	
K ₃	175.55	172.22	179.81	
k ₁	60.68	60.55	68.13	
k ₂	59.97	61.21	59.76	
k ₃	58.52	57.41	59.27	
R	2.16	3.80	0.86	

表 4 富集纯化工艺方差分析

Tab.4 Variance analysis on enrichment and purification technology

方差来源	SS	f	MS	F 值	P
径高比(A)	7.29	2	3.65	21.24	<0.05
吸附流速(B)	24.75	2	12.38	72.09	<0.05
洗脱流速(C)	1.12	2	0.56	3.28	
SE	0.34	2	0.17		

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

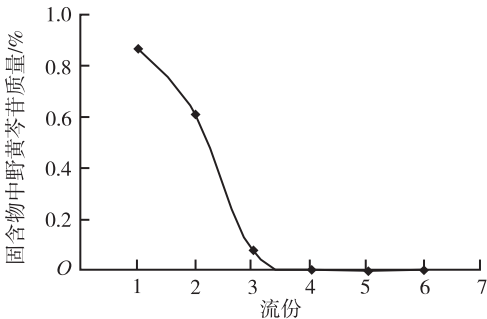


图 4 水洗体积量的选择曲线

Fig.4 Selected curve of the volumn of water scrubbing

2.3.5 洗脱剂考察 取 5 份上样液各 30 mL,按上述优化工艺条件上样,加新制纯化水 20 BV 除杂,分别用体积分数为 60%,65%,70%,75%,80% 乙醇溶液洗脱,收集洗脱液,46 ℃烘箱烘干,称重记录。加 15 mL 纯水溶解,HPLC 法测定野黄芩苷浓度,计算固含物中野黄芩苷质量,结果见图 5。结果显示,70% 乙醇洗脱效果最佳,故选择 70% 乙醇为洗脱剂。

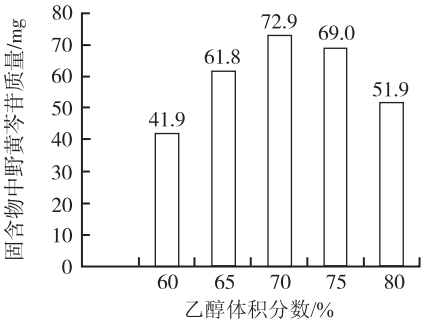


图 5 洗脱剂体积分数的选择曲线

Fig.5 Selected curve of volumn fraction of eluent

2.3.6 洗脱剂用量考察 称取已预处理 AB-8 型大孔树脂 10.0 g(径高比 1:3),30.0 g·L⁻¹药液 30 mL 上样,吸附流速 1.0 mL·min⁻¹,加新制纯化水 20 BV 除杂,70% 乙醇 1.0 mL·min⁻¹流速洗脱,每份收集 15 mL,共收集 8 份,旋蒸去乙醇,加纯化水 15 mL 溶解,HPLC 测定各个流份中野黄芩苷浓度,计算洗脱液野黄芩苷质量,结果见图 6。图 6 表明 5 BV 70% 乙醇能将绝大多数目标成分洗脱下来,故选择洗脱剂用量为 5 BV(每柱体积 15 mL)。

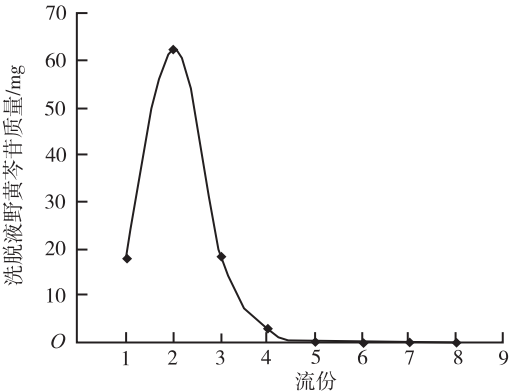


图 6 洗脱剂用量的选择曲线

Fig.6 Selected curve of the dosage of eluent

2.4 纯化工艺验证 称取 3 份已预处理 AB-8 型大孔树脂各 10.0 g(径高比 1:3),30.0 g·L⁻¹药液 30

mL 上样, 吸附流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 新制纯化水 20BV 除杂, 5 BV 70% 乙醇 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速洗脱, HPLC 测定各个流份中野黄芩苷浓度。经计算, 洗脱液中野黄芩苷质量分数分别为 59.72%, 58.67%, 59.12%; 洗脱液经干燥处理后, 野黄芩苷纯度分别为 61.94%, 60.82%, 60.79%。采用紫外分光光度 (ultraviolet spectrophotometry, UV) 法 335 nm 处测定回流提取物中总黄酮纯度分别为 8.26%, 7.78%, 8.00%, 而纯化后干粉中总黄酮纯度分别为 99.16%, 99.43%, 99.76%, 表明 AB-8 型大孔吸附树脂对黄芩籽种壳中总黄酮富集纯化效果良好, 且该工艺稳定可靠。

3 讨论

利用紫外分光光度法对黄芩籽种壳提取物的甲醇溶液和野黄芩苷对照品液进行全波长光谱扫描, 发现黄芩籽种壳提取物在 271 和 330 nm 附近有最大吸收; 野黄芩苷对照品在 335 nm 附近有最大吸收, 因此选择 335 nm 作为测定波长, 灵敏度好, 误差较小。在此波长处, 黄芩籽种壳提取物 HPLC 色谱图显示, 提取物中主要含有野黄芩苷等黄酮类化合物, 故选择野黄芩苷作为指标成分。

用大孔吸附树脂法研究了黄芩籽种壳总黄酮的纯化工艺。选择了 12 种不同极性、孔径、比表面积等性能参数各异的国产大孔吸附树脂, 比较其对黄芩籽种壳总黄酮的吸附-洗脱性能。静态吸附实验结果表明, 相比其他类型树脂, 弱极性的大孔吸附树脂对黄芩籽种壳总黄酮具有较好的吸附效果。选取静态吸附效果较理想的 AB-8 型大孔吸附树脂进行动态吸附-解吸工艺筛选, 优化后较为理想的纯化工艺条件为: 上样浓度 $30.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 最佳吸附量 $0.3 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, 吸附流速 1.0

$\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 树脂柱径高比 1:3, 除杂需纯化水量 20 BV, 70% 乙醇 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速洗脱, 收集洗脱液。该法优选的纯化工艺稳定性好, 提取效率高, 适于黄芩籽种壳总黄酮的富集纯化。

黄酮类化合物对光、热、湿敏感, 易分解变质^[11], 故经富集纯化制备的黄芩籽种壳总黄酮应以干粉状态避光、低温、干燥保存。

参考文献

- [1] 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: 283.
- [2] 李子, 郝近大. 黄芩本草考证[J]. 中药材, 2008, 31(10): 1584-1585.
- [3] 马继兴. 神农本草经辑注[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 215-216.
- [4] 郭继芬, 陈四平, 乔善义, 等. 黄芩总黄酮提取物的 HPLC-MS/MS 分析[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(3): 267-269.
- [5] 中国药材公司. 中国中药资源丛书-中国中药资源[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 33-36.
- [6] 刘翀, 吕玲春, 韦铁民, 等. 野黄芩苷抗血小板活化效应的评价[J]. 心脑血管病防治, 2012, 12(5): 371-373.
- [7] 史高峰, 祝娟娟, 陈学福, 等. 从黄芩茎叶粗提物中制备野黄芩苷的研究[J]. 中成药, 2012, 34(12): 2455-2457.
- [8] 朱欣婷, 刘云. 大孔树脂纯化无花果叶总黄酮[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 13-16.
- [9] 王春民, 刘刚, 费艳, 等. 大孔吸附树脂法纯化黄芩总黄酮工艺的研究[J]. 中草药, 2010, 41(1): 58-60.
- [10] 姚干, 何宗玉, 方积年. 黄芩总黄酮提取及纯化工艺的研究[J]. 中成药, 2006, 28(11): 1568-1571.
- [11] 初阳, 杨倩. 淡竹叶中竹叶黄酮的纯化工艺研究[J]. 医药导报, 2012, 31(5): 648-650.

《医药导报》对论文中实验动物描述的要求

根据国家科学技术部 1988 年颁布的《实验动物管理条例》和卫生部 1998 年颁布的《医学动物管理实施细则》, 《医药导报》杂志对论文中有关实验动物的描述, 要求描述以下事项: ①品种、品系及亚系的确切名称; ②遗传背景或其来源; ③微生物检测状况; ④性别、年龄、体质量; ⑤质量等级及合格证书编号; ⑥饲养环境和实验环境; ⑦健康状况; ⑧对动物实验的处理方式。医学实验动物分为四级: 一级为普通级; 二级为清洁级; 三级为无特定病原体 (SPF) 级; 四级为无菌级 (包括悉生动物)。