

应用大孔树脂吸附分离技术制备地锦草总黄酮的研究

朱英,田晓琴*,童飞燕*(浙江中医药大学药学院,杭州 310053)

摘要:目的 研究大孔树脂 D_{A201} 和 D₁₀₁ 富集地锦草总黄酮的工艺条件和参数。方法 以总黄酮含量为指标,采用正交试验设计,考察 D_{A201} 和 D₁₀₁ 富集地锦草总黄酮的工艺条件。用分光光度法测定总黄酮含量。结果 D_{A201} 精制的最佳工艺为:90 mL 浓度约 0.65 mg · mL⁻¹ 的溶液(pH 7)上柱,吸附流速 2 BV · h⁻¹,洗脱剂为 40% 乙醇(pH 7),洗脱流速 2 BV · h⁻¹。D₁₀₁ 精制的最佳工艺为:100 mL 浓度约 0.65 mg · mL⁻¹ 溶液(pH 7)上柱,吸附流速 4 BV · h⁻¹,洗脱剂为 40% 乙醇(pH 9),洗脱流速 2 BV · h⁻¹。通过 D_{A201} 和 D₁₀₁ 精制工艺,平均吸附率分别为 83.38% 和 88.57%,平均洗脱率分别为 89.28% 和 87.21%,洗脱液干燥后的总固体中总黄酮平均含量分别为 14.48% 和 20.18%,分别高于原上样液总固体黄酮含量(8.49% 和 8.71%)。结论 D_{A201} 和 D₁₀₁ 对地锦草总黄酮都有良好吸附分离性能,而 D₁₀₁ 综合性能更好。
关键词: 大孔树脂;地锦草;总黄酮;正交试验法
中图分类号: R931.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-7693(2007)04-0253-04

Study on Preparation of *Euphorbia humifusa* Total Flavonoids by the Adsorption and Separation of Macroporous Resins

ZHU Ying, TIAN Xiao-qin, TONG Fei-yan(Department of Pharmacy, Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the optimal technological parameters of the enrichment process for total flavonoids of *Euphorbia humifusa* with macroporous resins D_{A201} and D₁₀₁. **METHODS** The technological conditions of the D_{A201} and D₁₀₁ enrichment process were studied by orthogonal experiment design with the content of total flavonoids from *Euphorbia humifusa* as indexes. Spectrophotometry was used for the determination of total flavonoids. **RESULTS** The optimum technological conditions of the D_{A201} refining were: 90mL of the solution concentration at 0.65 mg · mL⁻¹ (pH 7), the current velocity of adsorption 2BV · h⁻¹, the eluting reagent 40% ethanol (pH 7), the eluting velocity 2BV · h⁻¹. The optimum technological conditions of the D₁₀₁ refining were: 100mL of the solution concentration at 0.65 mg · mL⁻¹ (pH 7), the current velocity of adsorption 4BV · h⁻¹, the eluting reagent 40% ethanol (pH 9), the eluting velocity 2BV · h⁻¹. By means of refining technology of the D_{A201} or D₁₀₁, the average adsorbing rates of total flavonoids were 83.38% and 88.57%, the average elutive rate of total flavonoids were 89.28% and 87.21%, respectively, the average content of total flavonoids were 14.48% and 20.18% respectively in the total solid of the ethanol eluate. The average content after D_{A201} or D₁₀₁ refining were higher than the ones (8.49% and 8.71%) of original solution respectively. **CONCLUSION** The D_{A201} and D₁₀₁ type macroporous resins had the favourable performance for the adsorbing and separating the total flavonoids from *Euphorbia humifusa*. D₁₀₁ showed better comprehensive property.

KEY WORDS: macroporous resin; *Euphorbia humifusa*; total flavonoids; orthogonal test

基金项目: 本课题受浙江省自然科学基金项目资助(编号 Y205366)
作者简介: 朱英, 女, 副教授 Tel: (0571)86613657 13958013465 E-mail: zhuyinggww@sina.com
* 浙江中医药大学药学院 2002、2003 年级学生

地锦草为大戟科植物地锦 *Euphorbia humifusa* Willd. 或斑地锦 *Euphorbia maculata* L. 的干燥全草。具有清热解毒、凉血止血之功能。地锦草资源十分丰富,目前临床上多用于治疗菌痢、肠炎、病毒性肝炎等。药理研究表明,地锦草的抗菌抗炎作用明显,止血效果好^[1],有很强的清除和抑制自由基的作用,是一种较强的抗氧化植物^[2],而且对·OH 引发的 DNA 氧化损伤有一定的保护作用^[3]。地锦草水提液、醇提液均具有较强的黄酮反应,为了提高地锦草总黄酮纯度,本实验室在超声提取工艺研究及文献^[4]的基础上,对其大孔树脂精制工艺进行正交试验研究,并对 D_{A201} 和 D₁₀₁ 两种树脂材料进行了比较,为地锦草总黄酮的进一步纯化提供一定的基础。

1 仪器和药品

Lambda-12 型可见-紫外分光光度计(美国 PE 公司生产);KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);地锦草由浙江中医药大学中药饮片厂提供,经我院药植教研室陈锡林副教授鉴定为地锦 *Euphorbia humifusa* Willd. 和斑地锦 *Euphorbia maculata* L. 的混合物,其中地锦占 80%,斑地锦占 20%;芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号:0080-9705);其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 地锦草总黄酮的含量测定^[5]

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取经 120℃ 减压干燥到恒重的芦丁对照品 14.3 mg,置烧杯中加入适量 95% 乙醇溶解,定量转入 100 mL 量瓶中,室温下用 95% 乙醇稀释定容至刻度,摇匀,即得 0.143 mg·mL⁻¹ 的芦丁对照品溶液。

2.1.2 标准曲线的制备 精密吸取芦丁对照品溶液 0.1, 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.2, 2.6 mL, 分别置于具塞试管中,各加 45% 乙醇至总体积为 5 mL,摇匀,再分别加入 2.5% 三氯化铝溶液 3 mL, 10% 醋酸钾溶液 5 mL,摇匀,放置 60 min,同时以相应试剂作空白,在 421 nm 处测定吸收度,以浓度 C 为横坐标,吸收度 A 为纵坐标,进行线性回归,得回归方程 A = 31.6453C, r = 0.999 8,线性范围为 1.1 ~ 28.6 μg·mL⁻¹。

2.1.3 样品测定 精密吸取供试品溶液适量,按“2.1.2”项

表 2 D_{A201} 精制工艺中吸附条件正交试验结果

Tab 2 Results of adsorption conditions orthogonal tests in D_{A201} refining technology

试验号	A	B	C	D	吸附率/%	洗脱率/%	过柱后总固物 黄酮含量/%	综合评分
1	1	1	1	1	88.48	70.89	9.67	67.15
2	1	2	2	2	93.12	60.60	11.66	69.44
3	1	3	3	3	38.29	101.87	9.30	60.65
4	2	1	2	3	88.85	65.39	10.52	67.31
5	2	2	3	1	82.96	90.24	14.61	81.18
6	2	3	1	2	49.45	69.25	6.68	48.97
7	3	1	3	2	89.24	82.60	14.36	80.27
8	3	2	1	3	79.78	73.45	9.08	64.13
9	3	3	2	1	13.43	85.19	5.20	39.99
K ₁	65.75	71.58	60.08	62.77				
K ₂	65.82	71.58	58.91	66.23				
K ₃	61.46	49.87	74.03	64.03				
R	4.36	21.71	15.12	3.46				

下操作显色,测定吸收度,按回归方程计算供试品溶液中总黄酮的含量。

2.2 总黄酮样品溶液及上树脂用供试品溶液的制备

取地锦草用 5 倍量石油醚冷浸 2 次,每次 12 h,过滤,药渣挥去石油醚后超声提取 2 次,每次用 20 倍量 60% 乙醇超声 30 min,过滤,合并乙醇提取液,回收溶剂,残留物用 3 倍量蒸馏水分次溶解,用水饱和和正丁醇萃取(3 倍量×8),合并正丁醇层,减压回收正丁醇至干,残留物用 10 倍量 95% 乙醇溶解,即得地锦草总黄酮样品溶液。吸取一定量总黄酮样品溶液,回收乙醇后,用蒸馏水超声溶解,并加蒸馏水至一定体积,即得地锦草总黄酮上树脂用供试品溶液(简称“上柱液”)。

2.3 大孔树脂的预处理

以 95% 乙醇浸泡 24 h,充分溶胀后用 95% 乙醇洗至洗出液与蒸馏水混合(1:5)不呈白色浑浊现象,再以蒸馏水洗至无醇味,备用。

2.4 D_{A201} 对地锦草总黄酮的精制工艺

2.4.1 上样吸附条件正交试验 按表 1 因素水平,精密取样,按“2.4.2”项下上柱、吸附、洗脱并测定,其中洗脱条件均为 40% 乙醇(pH 7)以 2BV·h⁻¹ 流速洗脱。正交试验结果见表 2,总体评价时,三个指标各占 30 分,吸附率或洗脱率 100% 为 30 分,总固物总黄酮含量以 15% 为 30 分。方差分析见表 3。结果上样液 pH 和吸附流速有显著性影响,综合考虑上样吸附条件为 A₂B₂C₃,即浓度约 0.65 mg·mL⁻¹ (pH 7) 的溶液上样 90 mL,吸附流速 2BV·h⁻¹。

表 1 D_{A201} 精制工艺中吸附条件因素水平表

Tab 1 Tab of factors and levels for adsorption conditions in D_{A201} refining technology

水平	因素		
	上样量 A/mL	上样液 pH B	吸附流速 C/BV·h ⁻¹
1	80	5	4
2	90	7	3
3	100	9	2

表3 方差分析表

Tab 3 Table of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	显著性
A	37.3507	2	18.6754	2.04	不显著
B	942.8219	2	471.4110	51.42	$P<0.05$
C	424.6510	2	212.3255	23.16	$P<0.05$
D(误差)	18.3351	2	9.1676		

$F_{0.01}(2,2)=99.0$ $F_{0.05}(2,2)=19.0$ $F_{0.1}(2,2)=9.0$

2.4.2 洗脱条件正交试验 精密吸取浓度约 $0.65\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的“上柱液”一定量,加至 D_{A201} 柱($r10\times H150\text{mm}$,树脂 10 mL)上,吸附流速 $3\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$,静置 30 min ,过柱流出液再如此重复上柱吸附 2 次,测定最后过柱流出液总黄酮含量。树脂柱先用蒸馏水洗至 HCl-Mg 粉反应初显阳性(流速为 $3\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$),再按表 4 因素水平,用一定浓度、一定 pH 的乙醇以一定流速洗脱至洗脱液无色,收集洗脱液,调节 pH 至中性后回收乙醇,用 60% 乙醇溶解、定量转入并定容于 25mL 量瓶中,测定含量,计算洗脱率。另精密吸取 10 mL 于小烧杯中,水浴蒸干后低温烘至恒重,计算过柱后总固体总黄酮

表5 D_{A201} 精制工艺中洗脱条件正交试验结果

Tab 5 Results of elution conditions orthogonal tests in D_{A201} refining technology

试验号	A	B	C	D	吸附率/%	洗脱率/%	过柱后总固体 黄酮含量/%	综合评分
1	1	1	1	1	94.99	46.99	8.76	57.30
2	1	2	2	2	96.35	87.63	7.24	70.02
3	1	3	3	3	96.24	91.46	4.72	59.33
4	2	1	2	3	95.75	81.07	6.74	64.24
5	2	2	3	1	95.66	85.78	6.71	66.44
6	2	3	1	2	94.66	88.23	6.44	66.32
7	3	1	3	2	98.16	75.25	9.10	73.13
8	3	2	1	3	98.18	73.70	10.52	79.45
9	3	3	2	1	98.15	63.39	9.33	68.85
$\bar{K}_1$	62.22	64.89	67.69	64.20				
$\bar{K}_2$	65.67	71.97	67.70	69.82				
$\bar{K}_3$	73.81	64.83	66.30	67.67				
R	11.59	7.14	1.4	5.62				

表6 方差分析表

Tab 6 Tab of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	显著性
A	212.4903	2	106.2452	8.15	$P<0.05$
B	101.1096	2	50.5548	3.88	不显著
误差(列 3、4 合并)	52.1400	4	13.0350		

$F_{0.01}(2,4)=18.0$ $F_{0.05}(2,4)=6.94$ $F_{0.1}(2,4)=4.32$

2.5 D_{101} 对地锦草总黄酮的精制工艺

2.5.1 上样吸附条件正交试验 按表 7 因素水平,对 D_{101} 精制工艺中上样吸附条件进行正交试验,“上柱液”黄酮含量约 $0.65\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,按“2.4.2”项下上柱吸附,洗脱并测定,其中洗脱条件为 40% 乙醇($\text{pH } 9$),以 $2\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速洗脱,总体评价时,三个指标各占 30 分,吸附率或洗脱率 100% 为 30 分,总固体总黄酮含量以 25% 为 30 分。经方差分析,结果三

含量= $[(\text{最后量瓶内溶液总黄酮浓度}\times 10)\div\text{量瓶内 } 10\text{ mL 溶液恒重时的总固体物重量}]\times 100\%$ 。正交试验结果见表 5。因吸附率在 94.66%~98.18% 之间,相差较小,所以总体评价时,考虑洗脱率和过柱后总固体总黄酮含量各占 50 分,洗脱率 100% 为 50 分,总固体总黄酮含量以 12% 为 50 分,2% 为 0 分,按正交试验中多指标分析的公式法得综合评分,并进行直观分析,结果乙醇浓度有显著性影响,综合考虑洗脱条件为 $A_3B_2C_3$,即 40% 乙醇($\text{pH } 7$),以 $2\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速洗脱。方差分析见表 6。

表4 D_{A201} 精制工艺中洗脱条件因素水平表

Tab 4 Tab of factors and levels for elution conditions in D_{A201} refining technology

水平	因素		
	洗脱剂乙醇浓度 A/%	洗脱剂 pH B	洗脱流速 C/ $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$
1	20	5	4
2	30	7	3
3	40	9	2

个因素均无显著性影响,综合考虑上样吸附条件为 $A_1B_2C_1$,即浓度约 $0.65\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($\text{pH } 7$)的溶液上样 100 mL ,吸附流速 $4\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

表7 D_{101} 精制工艺中吸附条件因素水平表

Tab 7 Tab of factors and levels for adsorption conditions in D_{101} refining technology

水平	因素		
	上样量 A/mL	上样液 pH B	吸附流速 C/ $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$
1	100	5	4
2	110	7	3
3	120	9	2

2.5.2 洗脱条件正交试验 按表 8 因素水平,按“2.4.2”项下操作,对 D_{101} 精制工艺中洗脱条件进行正交试验,“上柱液”黄酮含量约 $0.65\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,因其吸附率均在 99% 以上,

所以总体评价时,考虑洗脱率和过柱后总固体总黄酮含量各占 50 分,洗脱率 80% 为 50 分,总固体黄酮含量 20% 为 50 分。经方差分析,结果三个因素均无显著性影响,综合考虑洗脱条件为 A₃B₃C₃,即 40% 乙醇(pH 9),以 2BV · h⁻¹ 流速洗脱。

表 8 D₁₀₁精制工艺中洗脱条件因素水平表

Tab 8 Tab of factors and levels for elution conditions in D₁₀₁ refining technology

水平	因素		
	洗脱剂乙醇浓度 A/%	洗脱剂 pH B	洗脱流速 C/ BV · h ⁻¹
1	20	5	4
2	30	7	3
3	40	9	2

2.6 验证试验

按优选的 D_{A201} 或 D₁₀₁ 吸附条件和洗脱条件分别进行验证试验,结果平均吸附率分别为 83.38% (RSD = 1.94, n = 4) 和 88.57% (RSD = 1.30, n = 4),平均洗脱率 89.28% (RSD = 2.54, n = 4) 和 87.21% (RSD = 1.72, n = 4),过柱后总固体总黄酮平均含量为 14.48% (RSD = 3.09, n = 4) 和 20.18% (RSD = 2.97, n = 4),分别高于原上样液总固体黄酮含量(8.49% 和 8.71%)。

3 讨论

3.1 本实验结果表明,优化后的 D_{A201} 或 D₁₀₁ 精制工艺稳定性都较好,达到了对地锦草总黄酮进一步富集的目的,两者的平均吸附率和平均洗脱率相差不大,但 D₁₀₁ 精制工艺中过柱后总固体黄酮含量较高,纯化效果比 D_{A201} 精制工艺好。这提示极性树脂 D_{A201} 在吸附地锦草总黄酮的同时,也吸附极性较大的杂质,而 D₁₀₁ 属于非极性大孔树脂,在吸附地锦草总黄酮的同时,对极性较小的杂质吸附力相对较大,当最后都采用 40% 乙醇洗脱时,D_{A201} 柱上极性较大的杂质被洗脱较

多,从而导致 D₁₀₁ 精制后的地锦草总黄酮含量较高,因此可选用 D₁₀₁ 精制地锦草总黄酮。

3.2 经动态吸附实验表明,浓度约 0.65 mg · mL⁻¹ 的地锦草总黄酮上样溶液在 D_{A201} 和 D₁₀₁ 树脂柱上的泄漏点分别为 8BV 和 10BV,所以选择 80,90,100 mL 为 D_{A201} 三个上样量水平,选择 100,110,120 mL 为 D₁₀₁ 三个上样量水平。而在动态洗脱实验中,考察了 10% ~ 100% 乙醇的洗脱能力,结果发现地锦草总黄酮在 D_{A201} 和 D₁₀₁ 柱分离时,都是 20%,30% 和 40% 乙醇洗脱液中总黄酮含量最高,所以选择 20%,30% 和 40% 作为洗脱剂乙醇浓度的三个水平。

参考文献

[1] CHU X L, LIAO W Y, LOU L Y, *et al.* The studies on pharmacological effects of Herba Euphorbiae humifusae[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2001, 12(3): 193-194.

[2] CAO R Z, ZHANG G W, XUE Y, *et al.* Effects of Herba Euphorbiae humifusae extracts on CAT and GSH-PX in blood of mice [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2002, 13(12): 724-725.

[3] ABUDUREYIMU, ABUDUAINI, HAMULATI, *et al.* Studies on scavenge of hydroxyl radical and protection of DNA damage by 5 different uighur medicinal herbs [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2001, 32(3): 236-238.

[4] ZHANG J X, LI J, CHENG G H. Study on Enrichment Process of Total Flavonoids from Euphorbia humifusa with Macroporous Resin [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2002, 25(2): 123-125.

[5] QIN M G, SHU W. Content determination of total flavonoids from Rosa roxburghii f. normalis [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 1999, 30(2): 106-107.