

大孔吸附树脂富集纯化雪松松针总黄酮工艺的优化

刘东彦¹, 石晓峰^{1,2*}, 胡鹏斌², 沈 薇¹

(1. 甘肃省医学科学研究院, 甘肃 兰州 730050; 2. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730030)

摘要: **目的** 优化大孔吸附树脂富集纯化雪松 *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud. 松针总黄酮工艺。**方法** 40% 乙醇回流提取总黄酮, 紫外分光光度法测定其含量。考察 12 种大孔吸附树脂 (D-101、NKA-9、HPD100、AB-8、D4020、ADS-17、HPD826、HPD450、DM130、XAD-16、HPD722、HP-20) 对总黄酮的吸附解吸能力; 以上样液质量浓度、上样液 pH 值、上样量为影响因素考察最佳树脂吸附能力; 以乙醇体积分数、除杂溶剂、乙醇洗脱用量为影响因素, 考察最佳树脂解吸能力, 优化富集纯化工艺。**结果** HPD722 大孔吸附树脂纯化效果最好, 最佳条件为上样液质量浓度 3.85 mg/mL, 上样液 pH 值 4.0, 上样量 4 BV, 乙醇体积分数 70%, 除杂溶剂 4 BV 水, 乙醇洗脱用量 2 BV, 总黄酮纯度达到 54.28%。**结论** 该方法合理可行, 可用于富集纯化雪松松针总黄酮。

关键词: 雪松; 松针; 总黄酮; 富集纯化; 大孔吸附树脂

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)02-0308-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.02.015

Optimization of enrichment and purification of total flavonoids from pine needles of *Cedrus deodara* by macroporous adsorption resin

LIU Dong-yan¹, SHI Xiao-feng^{1,2*}, HU Peng-bin², SHEN Wei¹

(1. Gansu Provincial Academy of Medical Sciences, Lanzhou 730050, China; 2. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730030, China)

KEY WORDS: *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud.; pine needles; total flavonoids; enrichment and purification; macroporous adsorption resin

雪松 *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud. 是松科雪松属植物的泛称, 包括雪松 *C. deodara* Loud、黎巴嫩雪松 *C. libani* Loud、短叶雪松 *C. brevifolia* Manetti 和北非雪松 *C. atlantica* Henry。中医认为, 雪松具有祛风活络、消肿生肌、活血止血功效^[1], 其针叶部位药用历史悠久, 主要化学成分为黄酮、苯丙素、有机酸、三萜、甾体、多糖、针叶胶等, 具有抗肿瘤、抗氧化、改善记忆、抗菌、抗病毒、杀虫等多种功效^[2]。前期研究发现, 黄酮类化合物是雪松松针中的主要成分, 以杨梅素、槲皮素、山柰酚、异鼠李素及其苷类为主^[3-6]。

课题组前期比较了雪松不同部位 4 种黄酮成分的含有量, 发现松针是最佳部位^[7], 并建立了总黄酮及四者含有量的测定方法^[8]。因此, 本实验利用大孔吸附树脂富集纯化雪松松针总黄酮, 为其抗肿瘤作用研究奠定基础。

1 仪器与材料

UV-240 紫外分光光度计 (日本岛津公司); AE260 电子天平 (万分之一, 瑞士 Mettler-Toledo 公司); CP225 电子天平 (十万分之一, 德国赛多利斯公司); QL-901 旋涡混合器 (海门市麒麟医药仪器厂); RE-5299 旋转蒸发仪 (巩义市予华仪器

收稿日期: 2016-07-08
基金项目: 甘肃省科技支撑计划项目 (1204FKCA152); 兰州市人才创新创业项目 (2014-RC-62); 甘肃省普通中医药科研项目 (GZK-2012-29)
作者简介: 刘东彦, 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为中药制剂及天然产物化学。Tel: 13919191634, E-mail: liudongyanliu@163.com
* 通信作者: 石晓峰, 男, 教授, 主任药师, 研究方向为中药制剂及天然产物化学。Tel: (0931) 2614521-6039, E-mail: shixiaofeng2005@sina.com

有限公司); HH-4 数显恒温水浴锅 (北京科伟永兴仪器有限公司); DZHW 调温电热套 (北京市永兴明医疗仪器厂); SK3310LHC 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司);

雪松松针于 2014 年 6 月采自兰州市市区, 经甘肃省医学科学研究院何福江研究员鉴定为雪松属植物雪松 *Cedrus deodara* 的针叶。

芦丁对照品 (批号 100080-200707, 含有量 91.7%, 中国食品药品检定研究院)。Diaion HP-20 树脂 (日本三菱公司); D101 树脂 (天津市海光化工有限公司); NKA-9、HPD100、AB-8、D4020、ADS-17、HPD826、HPD450、DM130、XAD-16、HPD722 树脂 (沧州宝恩吸附材料科技有限公司)。试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮提取^[8] 取雪松松针 (过 40 目筛) 30 g, 25 倍 40% 乙醇回流提取 2 次 (2、1 h), 合并提取液, 减压回收乙醇, 浸膏加蒸馏水超声溶解, 离心除去不溶性杂质, 即得总黄酮粗提液。

2.2 总黄酮含量测定^[8]

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取芦丁对照品 10 mg, 加 40% 乙醇溶解, 定容至 50 mL 量瓶中, 摇匀, 制成 0.183 mg/mL 对照品溶液。

2.2.2 线性关系考察 精密量取“2.2.1”项下芦丁对照品溶液 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL, 置于 10 mL 具塞比色管中, 加入 40% 乙醇至 5 mL, 摇匀, 加入 5% NaNO₂ 溶液 0.3 mL, 摇匀, 静置 6 min, 再加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL, 摇匀, 静置 6 min, 最后加入 4% NaOH 溶液 4 mL, 40% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 静置 15 min, 以 40% 乙醇为空白, 在 510 nm 波长处测定吸光度。以含有量为横坐标 (*X*), 吸光度为纵坐标 (*Y*) 进行回归, 绘制标准曲线。得到线性回归方程为 $Y=0.001\ 2X+0.004\ 8$ ($r=0.999\ 3$), 表明芦丁在 0~549 μg 范围内线性关系良好。

2.2.3 测定方法 精密吸取“2.1”项下总黄酮粗提液 1 mL, 定容至 10 mL, 摇匀, 吸取 0.2 mL, 置于 10 mL 具塞比色管中, 按“2.2.2”项下方法依次加入显色试剂, 以蒸馏水+显色剂为空白, 测定总黄酮含量。

2.3 大孔吸附树脂筛选

2.3.1 树脂预处理 取树脂适量, 95% 乙醇浸泡 24 h, 除去树脂碎片和杂物, 乙醇湿法装柱, 以乙醇冲柱, 检查流出液, 至与水混合不呈白色浑浊为

止, 再以大量蒸馏水洗涤至无醇味, 备用。

2.3.2 树脂静态吸附/解吸能力考察^[9] 称取预处理好的 12 种树脂 (D-101、NKA-9、HPD100、AB-8、D4020、ADS-17、HPD826、HPD450、DM130、XAD-16、HPD722、HP-20) 各 5.0 g, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入样品溶液 (1.12 mg/mL) 各 30 mL, 每隔 10 min 在漩涡混合器上振摇 2 min, 吸附 2 h 后, 静置 20 min, 布氏漏斗抽滤至干, 即得吸附液, 再将大孔树脂移入 100 mL 具塞锥形瓶中, 各精密加入 30 mL 70% 乙醇, 同法得到解吸液。按“2.2.3”项下方法测定吸附液和解吸液中总黄酮含量, 计算吸附率、解吸率和解析量, 结果见表 1。由表可知, 静态吸附及解吸效果较好的 4 种树脂为 D101、HPD722、AB-8 和 HPD450, 故选择四者进行动态试验考察。

表 1 12 种树脂静态吸附/解吸能力

Tab. 1 Static adsorption/desorption capacities of twelve macroporous resins

型号	极性	吸附率/%	解吸率%	解析量/mg
D101	非极性	85.80	68.57	19.77
HP-20	非极性	86.88	61.77	18.03
NKA-9	强极性	93.57	42.27	13.29
HPD100	非极性	88.30	38.42	11.40
AB-8	弱极性	84.29	67.16	19.02
D4020	非极性	91.70	56.48	17.40
ADS-17	中极性	89.73	47.76	14.40
HPD450	弱极性	81.34	68.28	18.66
HPD826	强极性	95.09	46.29	14.79
DM130	非极性	79.11	68.74	18.27
XAD-16	非极性	83.93	44.89	12.66
HPD722	弱极性	78.75	73.81	19.53

2.3.3 树脂动态吸附/解吸能力考察^[10] 精密称取预处理好的 D101、AB-8、HPD450、HPD722 树脂各 10.0 g, 装入层析柱中, 取样品溶液 (2.85 mg/mL) 各 15 mL, 以 2 BV/h 体积流量上样, 待样品流完后, 关柱 15 min, 用 4 BV 水除杂, 再用 2 BV 50% 乙醇解吸, 收集过柱液、水洗液和解吸液, 按“2.2.3”项下方法测定总黄酮含量, 回收乙醇, 计算纯化后总黄酮的回收率和纯度, 结果见表 2。由表可知, 动态解吸量最大、回收率和总黄酮纯度均较高的树脂为 HPD722, 故选择其作进一步工艺考察。

2.4 纯化工艺考察^[11-13]

2.4.1 吸附工艺

2.4.1.1 上样液质量浓度 取预处理好的 HPD722 树脂 10 g, 湿法装柱, 再精密量取总黄酮质量浓度分别为 1.43、2.85、4.28、5.70 mg/mL

表 2 4 种树脂动态吸附/解吸能力

Tab. 2 Dynamic adsorption/desorption capacities of four resins

型号	解吸量/mg	回收率/%	总黄酮纯度/%
HPD722	30.65	71.70	54.73
HPD450	30.16	70.55	43.09
AB-8	28.82	67.57	49.69
D101	25.23	59.03	54.86

的样品溶液各 15 mL，以 1 BV/h 体积流量上样，待样品流完后，关柱 15 min，用 4 BV 水除杂，再用 2 BV 50% 乙醇解吸附，收集过柱液和水洗液，按“2.2.3”项下方法测定总黄酮含有量，计算吸附率，重复 3 次，取其均值，结果见图 1。由图可知，上样液质量浓度在 2.85 ~ 4.28 mg/mL 范围内吸附效果较好，而当药材质量浓度为 0.1 g/mL 时，确定最佳上样液质量浓度为 3.85 mg/mL。

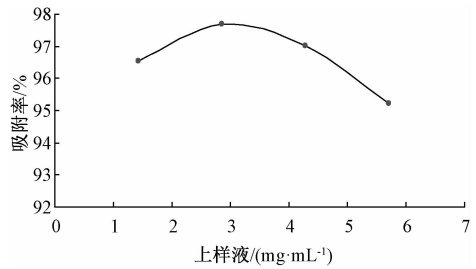


图 1 上样液质量浓度对吸附率的影响 (n=3)

Fig. 1 Effect of sample concentration on adsorption rate (n=3)

2.4.1.2 上样液 pH 值 量取 4 份总黄酮质量浓度为 3.85 mg/mL 得样品溶液各 15 mL，调节其 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0，同法上样、洗脱、检测，重复 3 次，取平均值，结果见图 2。由图可知，上样液 pH 值在 4.0 时吸附效果最好。

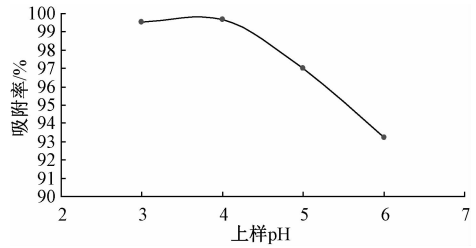


图 2 上样液 pH 值对吸附率的影响 (n=3)

Fig. 2 Effect of sample pH value on adsorption rate (n=3)

2.4.1.3 上样量考察 取总黄酮提取液 (3.85 mg/mL) 适量，pH 值 4.0，以 1 BV/h 体积流量上样，收集每 0.5 BV 的流出液，按“2.2.3”项下方法测定总黄酮含有量，重复 3 次，取平均

值，结果见图 3。由图可知，随着流份数的增加，总黄酮含有量不断上升，当收集到第 4 个流份时，其已接近上样液质量浓度的 10%，达到泄漏点^[10]。因此，确定最佳上样量为 4 BV。

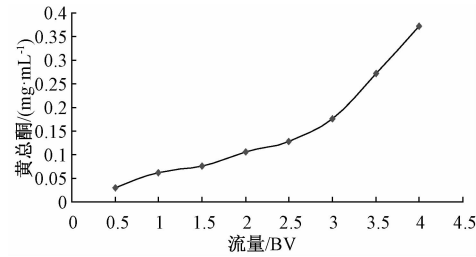


图 3 上样量对吸附率的影响 (n=3)

Fig. 3 Effect of sample volume on adsorption rate (n=3)

2.4.2 解吸工艺

2.4.2.1 乙醇体积分数 量取 3 份总黄酮质量浓度为 3.85 mg/mL 得样品溶液各 15 mL，依法上样、水洗，再分别用 4 BV 30%、50%、70% 乙醇解吸，收集解吸液，按“2.2.3”项方法测定总黄酮含有量，计算解析量、回收率和总黄酮纯度，重复 3 次，取平均值，结果见表 3。由表可知，70% 乙醇洗脱解吸量最大，回收率和总黄酮纯度均较高。

表 3 乙醇体积分数考察结果 (n=3)

Tab. 3 Results of ethanol concentration investigation (n=3)

乙醇/%	解吸量/mg	回收率/%	总黄酮纯度/%
30	127.3	55.11	51.54
50	169.9	73.55	51.64
70	176.3	76.32	51.70

2.4.2.2 除杂溶剂 量取 3 份总黄酮质量浓度为 3.85 mg/mL 的样品溶液各 15 mL，同法上样，分别用 4 BV 蒸馏水、8 BV 蒸馏水、8 BV 蒸馏水 + 2 BV 5% 乙醇冲洗后，再用 70% 乙醇解吸，收集解吸液，同法检测，重复 3 次，取平均值，结果见表 4。由表可知，4 BV 蒸馏水除杂效果较好。

表 4 除杂溶剂考察结果 (n=3)

Tab. 4 Results of impurity-removal solvent investigation (n=3)

除杂溶剂及用量	解吸量/mg	回收率/%	总黄酮纯度/%
4 BV 水	191.4	82.88	53.76
8 BV 水	176.3	76.32	51.70
8 BV 水 + 2BV 5% 乙醇	165.8	71.77	49.64

2.4.2.3 乙醇洗脱用量 量取总黄酮质量浓度为 3.85 mg/mL 的样品溶液 15 mL，同法上样、水洗，分别用 1、2、3、4 BV 70% 乙醇解吸，收集解吸液，同法检测，重复 3 次，取平均值，结果见表

5. 由表可知, 当乙醇用量达到 2 BV 时, 总黄酮解吸量已达到 98.65%, 故确定乙醇洗脱用量为 2 BV。

表 5 乙醇洗脱用量考察结果 (n=3)
Tab. 5 Results of ethanol's elution volume investigation (n=3)

洗脱剂用量/(BV·h ⁻¹)	解吸量/mg	总黄酮解吸量/%
1	128.9	63.87
2	70.19	34.78
3	2.71	1.30
4	0.02	0.05

2.4.3 验证试验 按最佳工艺条件进行验证, 即选择 HPD722 型大孔树脂, 上样液质量浓度 3.85 mg/mL, pH 值 4.0, 上样量 4 BV, 4 BV 蒸馏水除杂, 2 BV 70% 乙醇解吸, 重复 3 次, 结果见表 6, 可知总黄酮纯度由纯化前的 14.15% 提高到 54.28%, 表明该工艺可有效达到总黄酮的富集。

表 6 验证试验结果 (n=3)
Tab. 6 Results of verification tests (n=3)

编号	总黄酮纯度/%	平均值/%
1	54.26	54.28
2	53.52	
3	55.06	

3 讨论

本实验选择 NKA-9、HPD100、AB-8、D4020、ADS-17、HPD826、HPD450、DM130、XAD-16、HPD722、HP-20 和 D101 这 12 种大孔吸附树脂对雪松松针总黄酮的吸附与解吸进行研究, 由于树脂极性不同, 其对总黄酮的吸附和解吸也会有很大差别。结果显示, 吸附率依次为强极性树脂>中极性树脂>非极性树脂>弱极性树脂, 但解吸率基本上以弱极性树脂最强, 而其他树脂无明显规律。由于解吸量等于上样总黄酮量、吸附率、解析率三者的乘积, 故以解吸量为指标评价树脂吸附/解吸效果, 回收率和总黄酮纯度直接评价其对总黄酮的富集纯化效果, 发现弱极性树脂 HPD722 的相关作用最好。

上样液质量浓度对 HPD722 大孔吸附树脂纯化总黄酮的影响很大。在纯化前上样液需要进行处理, 在醇提水溶过程中总黄酮有所损失, 而上样液

质量浓度较低时, 总黄酮损失较少, 但上样前总黄酮纯度就低, 将影响纯化效果。因此, 增加总黄酮溶解度, 并优化上样液质量浓度, 最终确定药材和上样液质量浓度分别为 0.1 g/mL 和 3.85 mg/mL。

综上所述, 本实验所建立的大孔吸附树脂纯化工艺合理可行, 可使雪松松针总黄酮纯度高达 54.28%, 为其抗肿瘤作用的研究奠定基础, 也为雪松综合开发利用提供重要理论依据。

参考文献:

[1] 张军民, 石晓峰, 范 彬. 雪松的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中成药, 2009, 31(6): 928-933.

[2] 白朝辉, 石晓峰, 刘东彦, 等. 雪松松针的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国药师, 2012, 15(12): 1791-1793

[3] Liu D Y, Shi X F, Wang D D, et al. A new flavonoid in pine needles of *Cedrus deodara* [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2011, 3(1): 5-6.

[4] 刘东彦, 石晓峰, 李 冲, 等. 雪松松针黄酮类化学成分的研究[J]. 中草药, 2011, 42(4): 631-633.

[5] Liu D Y, Shi X F, Wang D D, et al. Two new myricetin glycosides from pine needles of *Cedrus deodara* [J]. *Chem Nat Compd*, 2011, 47(5): 704-707.

[6] 刘东彦, 石晓峰, 李 冲, 等. 雪松松针乙酸乙酯部位化学成分的研究[J]. 中草药, 2011, 42(10): 1921-1924.

[7] 刘东彦, 胡鹏斌, 石晓峰, 等. HPLC 法同时测定雪松不同部位中 4 个黄酮类化合物的含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2014, 31(12): 1510-1514.

[8] 胡鹏斌, 韩 涛, 刘东彦, 等. 雪松松针中总黄酮及 4 种指标成分的含量测定方法研究[J]. 中国药房, 2015, 26(3): 381-383.

[9] 袁 健, 李 辰, 王学军, 等. 大孔吸附树脂对沙棘叶黄酮静态吸附/解吸附性能的考察[J]. 中药材, 2007, 30(10): 1314-1316.

[10] 孙 静, 刘洁琼, 黎伟华, 等. 陕产黄花油点草总黄酮部位纯化工艺研究[J]. 中草药, 2013, 44(10): 1275-1279.

[11] 史高峰, 王红玉, 陈学福, 等. 甜叶菊渣中总黄酮的纯化工艺研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(1): 104-109.

[12] 申丽娜, 张永太, 王 芹, 等. 大孔吸附树脂富集天南星总黄酮部位的影响因素[J]. 中成药, 2014, 36(1): 76-81.

[13] 于鹤云, 刘汉清, 刘 嘉, 等. D-101 型大孔吸附树脂纯化黄蜀葵花总黄酮的工艺研究[J]. 中成药, 2014, 36(3): 520-525.