

大孔吸附树脂纯化紫菀总黄酮工艺

李园园, 李洪娟*, 侯桂革, 赵峰, 丛蔚, 辛文好, 郝聚伟, 王春华*
(滨州医学院药学院, 山东烟台 264003)

摘要: **目的** 探讨紫菀总黄酮的大孔吸附树脂纯化工艺。**方法** 通过静态吸附解吸实验考察总黄酮在 D101-I、HPD-300、HPD-450、HPD-600、NKA-9、HPD-826 型大孔吸附树脂上的吸附和解吸能力, 筛选最佳树脂, 考察其吸附动力学行为, 绘制吸附等温线。然后, 通过动态吸附解吸实验考察最佳分离工艺。**结果** HPD-300 树脂具有最强的吸附和解吸能力。总黄酮吸附动力学行为符合准二级动力学模型, 吸附等温数据符合 Langmuir、Freundlich 模型。最佳条件为上样质量浓度 60 mg/mL, 上样体积 7 BV, 先用 5 BV 蒸馏水冲洗杂质, 再用 5 BV50% 乙醇洗脱, 纯化后总黄酮纯度由 2.62% 提高到 40.01%, 收率为 81.25%。**结论** HPD-300 型大孔吸附树脂可有效纯化紫菀总黄酮。
关键词: 紫菀; 总黄酮; 纯化; 大孔吸附树脂
中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)03-0501-05
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.03.004

Purification process for total flavonoids in *Asteris Radix et Rhizoma* with macroporous absorption resin

LI Yuan-yuan, LI Hong-juan*, HOU Gui-ge, ZHAO Feng, CONG Wei, XIN Wen-yu, HAO Ju-wei, WANG Chun-hua*
(School of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China)

KEY WORDS: *Asteris Radix et Rhizoma*; total flavonoids; purification; macroporous absorption resin

紫菀是菊科紫菀属植物紫菀 *Aster tataricus* L. f. 的干燥根和根茎, 功效润肺下气、化痰止咳, 临床上常用于治疗痰多咳喘、痰中带血、新久咳嗽等症^[1-4]。研究表明, 紫菀中镇咳祛痰的药效物质包括紫菀酮、木栓醇等三萜皂苷类, 以及槲皮素、木犀草素、橙皮苷、山柰酚、芹菜素等黄酮类^[5-6]。近年来, 关于紫菀提取物药理活性的研究较多, 但鲜有总黄酮纯化工艺的报道。大孔吸附树脂是一种高分子吸附材料, 具有价廉、吸附性能好、能反复使用等优点, 广泛应用于中药及复方中化学成分分离与精制^[7-13]。本实验探讨紫菀总黄酮的大孔吸附树脂纯化工艺, 为该成分进一步应用提供依据。

1 材料

QYC-200 恒温振荡器 (上海福玛实验设备有

限公司); SHZ-D (Ⅲ) 循环水式真空泵 (巩义市予华仪器有限责任公司); 722N 紫外-可见分光光度计 (上海仪电分析仪器有限公司); KQ-400DB 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); EL204 电子天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]。
紫菀提取物 (自制, 总黄酮含量 2.62%); 芦丁对照品 (含量大于 98%) 购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; D101-I 型大孔吸附树脂购于郑州勤实科技有限公司; HPD-300、HPD-450、HPD-600、HPD-826 型大孔吸附树脂购于沧州宝恩吸附材料科技有限公司; NKA-9 型大孔吸附树脂购于天津南开和成科技有限公司, 物理参数见表 1。

收稿日期: 2018-10-30
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81703391); 烟台市科技计划资助项目 (2016ZH078)
作者简介: 李园园 (1991—), 女, 硕士生, 研究方向为药物化学。Tel: 18865625667, E-mail: 761284163@qq.com
* 通信作者: 李洪娟 (1981—), 女, 博士, 研究方向为天然药物化学。Tel: (0535) 6913406, E-mail: lhjczb@163.com
王春华 (1964—), 女, 硕士生导师, 研究方向为药物化学。Tel: (0535) 6913406, E-mail: chunhuawang508@126.com

表 1 大孔吸附树脂物理参数
Tab. 1 Physical parameters for macroporous absorption resins

型号	极性	平均孔径/nm	比表面积/(m ² ·g ⁻¹)
D101-I	非极性	—	≥650
HPD-300	非极性	5~5.5	800~870
HPD-450	中极性	9~11	500~550
HPD-600	极性	8	550~600
NKA-9	极性	15.5~16.5	170~250
HPD-826	氢键	9~10	500~550

2 方法

2.1 总黄酮含量测定 参照文献 [14] 方法并进行修正，以芦丁为对照品，紫外分光光度法测定总黄酮含量。

2.1.1 线性关系考察 精密称取干燥后的芦丁对照品适量，60% 甲醇溶解定容于 25 mL 量瓶中，精密吸取适量置于 25 mL 量瓶中，加入蒸馏水至 6 mL，再加入 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL，摇匀，接着加入 10% 硝酸铝溶液 1 mL，充分摇匀后静置 6 min，最后加入 4% 氢氧化钠溶液 10 mL，定容，摇匀，静置 15 min，于 510 nm 波长处测定吸光度。以对照品溶液质量浓度为横坐标 (X)，吸光度为纵坐标 (A) 进行回归，得方程为 $A = 0.012\ 7X - 0.023\ 4$ ($R^2 = 0.999\ 6$)，在 12.61~75.65 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.1.2 供试品溶液制备 精密称取提取物 5 份，每份 2.0 g，加入 50 mL 蒸馏水超声溶解，过滤，即得。

2.1.3 精密度试验 精密吸取供试品溶液 1.0 mL，按“2.1.1”项下方法测定吸光度 5 次，测得其 RSD 为 1.17%，表明仪器精密度良好。

2.1.4 重复性试验 精密吸取供试品溶液 1.0 mL，按“2.1.1”项下方法测定吸光度，测得其 RSD 为 0.87%，表明该方法重复性良好。

2.1.5 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 1.0 mL，按“2.1.1”项下方法于 0、15、30、45、60、90、120、180 min 测定吸光度，测得其 RSD 为 1.44%，表明溶液在 3 h 内稳定性良好。

2.1.6 加样回收率试验 精密吸取含有量已知的供试品溶液 6 份，每份 1.0 mL，精密加入芦丁对照品溶液 0.5 mL，按“2.1.1”项下方法测定吸光度，计算回收率。结果，芦丁平均加样回收率为 98.03%，RSD 为 1.33%。

2.2 静态吸附解吸实验 将预处理好的树脂滤干表面水分后称取 2.0 g，置于 100 mL 具塞锥形瓶

中，加入提取物溶液，于恒温振荡器中连续振摇 12 h (25 ℃、150 r/min)，吸附完成后过滤，测定总黄酮质量浓度，按照公式 $Q_e = \frac{(C_0 - C_e)V_0}{W}$ 计算

树脂吸附量。吸附饱和后的树脂，先用蒸馏水 100 mL 洗除表面样品，再加入 80% 乙醇 50 mL，恒温振荡器中振摇进行解吸，条件同上，解吸完成后过滤，测定解吸液中总黄酮质量浓度，按照公式

$Q_d = \frac{C_d V_d}{W}$ 、 $D = \left[\frac{C_d V_d}{(C_0 - C_e)V_0} \right] \times 100\%$ 计算树脂解吸量和解吸率。其中， Q_e 为树脂吸附量， C_0 、 C_e 分别为吸附前、后吸附液中总黄酮质量浓度， V_0 为吸附液体积， W 为树脂质量， Q_d 为树脂解吸量， D 为解吸率， C_d 为解吸液中总黄酮质量浓度， V_d 为解吸液体积。

2.3 吸附动力学实验 称取 HPD-300 树脂 2.0 g，按“2.2”项下方法吸附，在不同吸附时间取样，测定总黄酮质量浓度，计算吸附量，以吸附时间为横坐标，吸附量为纵坐标绘制吸附动力学曲线，用准一级、准二级动力学模型和颗粒内扩散模型对数据进行拟合，公式分别为 $\ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - K_1 t$ 、 $\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{K_2 Q_e^2} + \frac{t}{Q_e}$ 、 $Q_t = K_i t^{0.5} + C$ 。其中， Q_t 、 Q_e 分别为在吸附时间 t 、平衡时总黄酮吸附量， K_1 、 K_2 、 K_i 分别为准一级、准二级动力学模型和颗粒内扩散模型速率常数； C 为颗粒内扩散模型常数。

2.4 吸附等温线实验 称取 HPD-300 树脂 2.0 g，置于 100 mL 具塞锥形瓶中，加入不同质量浓度提取物溶液 50 mL，在 25~45 ℃ 下于恒温振荡器中振摇吸附，吸附完成后测定总黄酮质量浓度，计算吸附量，绘制吸附等温线，通过 Langmuir、Freundlich

吸附等温模型进行拟合，公式分别为 $\frac{C_e}{Q_e} = \frac{C_e}{Q_{\max}} +$

$\frac{1}{Q_{\max}K_L}$ 、 $\ln Q_e = \frac{1}{n} \cdot \ln C_e + \ln K_F$ 。其中， $Q_{\max}$ 为树脂最大量， K_L 为 Langmuir 常数， K_F 为 Freundlich 常数， $1/n$ 为吸附指数。

2.5 动态吸附解吸实验 称取 HPD-300 树脂 3 份，每份 15 g，湿法装入 3 根色谱柱中，取 40、60、80 mg/mL 提取物溶液，以 2 BV/h 体积流量上样，每 1 BV 收集 1 份流出液，测定总黄酮质量浓度，绘制泄漏曲线。然后，吸附饱和后的树脂柱，先用 5 BV 蒸馏水洗脱未吸附的样品及杂质，再依次用 10%、50%、70% 乙醇和纯乙醇各 5 BV 洗脱，每 1 BV 收集 1 份洗脱液，测定总黄酮质量浓度，绘制洗脱曲线。

3 结果

3.1 静态吸附解吸实验 图 1 显示，HPD-300、D101-I 树脂为非极性树脂，HPD-600、NKA-9 树脂为极性树脂，均对总黄酮具有较好的吸附效果，其中 HPD-300 树脂吸附能力最强，可能与它有较大的比表面积，能提供更多吸附位点有关，而且解吸能力也最强，故选择其用于分离。

3.2 吸附动力学实验 图 2A 显示，随着吸附时

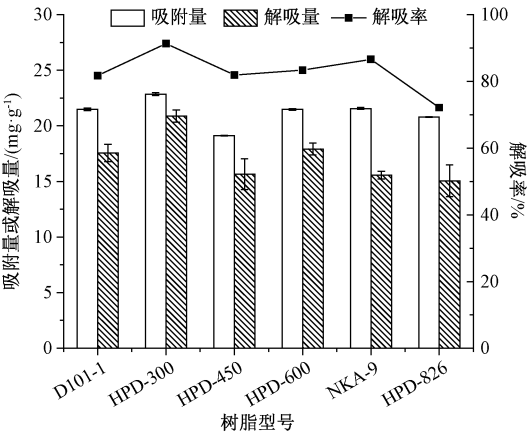


图 1 静态吸附解吸实验结果
Fig. 1 Results of static absorption/desorption tests

间延长总黄酮吸附量不断增加，在 0~120 min 上升幅度较大，可能是由于开始时树脂表面活性吸附位点较多，吸附速率较快，之后逐渐减少，黄酮从树脂表面进入树脂内部孔径时受到一定阻力，吸附速率开始减慢，约在 240 min 左右达到平衡。图 2B 显示，颗粒内扩散呈现多线性阶段，而且拟合曲线没有通过原点，表明吸附速率是由液膜扩散和颗粒内扩散步骤共同控制。

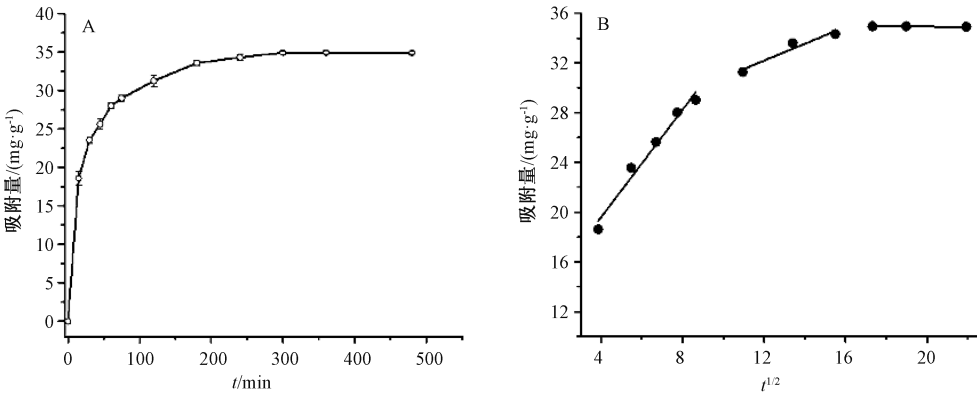


图 2 吸附动力学曲线 (A) 和颗粒内扩散模型拟合曲线 (B)
Fig. 2 Kinetic curve for absorption (A) and fitting curve for intraparticle diffusion model (B)

然后，通过准一级、准二级动力学模型进行拟合，结果见表 2。由表可知，总黄酮吸附更符合准

二级动力学模型。

表 2 总黄酮吸附动力学参数
Tab. 2 Absorption kinetics parameters for total flavonoids

模型	$Q_e/(mg \cdot g^{-1})$	K_1/K_2	R^2
准一级动力学	17.71	0.013 8	0.994 5
准二级动力学	36.49	0.001 6	0.999 7

3.3 吸附等温线实验 图 3 显示，吸附温度为 25 ℃ 时总黄酮吸附量最高，45 ℃ 时最低，表明低温有利于吸附，即为放热过程；同一温度下随着质

量浓度升高，总黄酮吸附量逐渐增加，说明样品质量浓度对树脂吸附能力也有较大影响。

然后，通过 Langmuir、Freundlich 吸附等温模

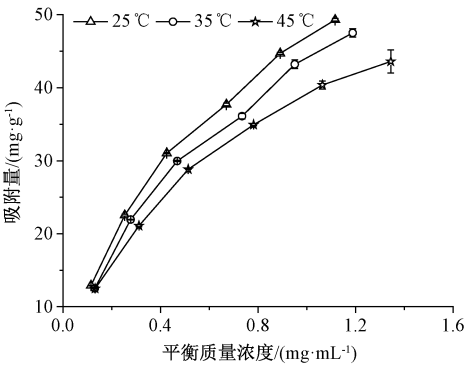


图3 总黄酮吸附等温线

Fig. 3 Absorption isotherms for total flavonoids

表3 总黄酮吸附等温参数

Tab. 3 Absorption isothermal parameters for total flavonoids

模型	温度/K	回归方程	$Q_{\max}$	K_L	R^2
Langmuir	298	$C_e/Q_e = 0.013\ 7C_e + 0.007\ 8$	72.992\ 7	1.756\ 4	0.992\ 5
	308	$C_e/Q_e = 0.013\ 9C_e + 0.009\ 0$	71.942\ 4	1.544\ 4	0.989\ 0
	318	$C_e/Q_e = 0.016\ 3C_e + 0.009\ 2$	61.349\ 7	1.771\ 7	0.995\ 7
Freundlich	298	$\ln Q_e = 0.584\ 0\ln C_e + 3.872\ 8$	48.076\ 8	1.712\ 3	0.992\ 1
	308	$\ln Q_e = 0.595\ 0\ln C_e + 3.794\ 0$	44.433\ 8	1.680\ 7	0.990\ 7
	318	$\ln Q_e = 0.545\ 1\ln C_e + 3.667\ 0$	39.134\ 3	1.834\ 5	0.992\ 5

高树脂利用率，并避免样品溶液浪费，选择 60 mg/mL作为上样质量浓度，上样体积 7 BV。

提高总黄酮纯度，选择 50% 乙醇作为洗脱溶剂，上样体积 5 BV。

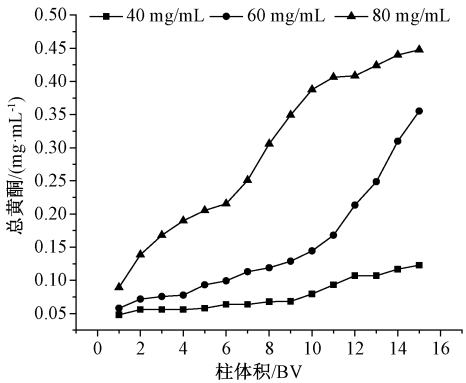


图4 总黄酮泄漏曲线

Fig. 4 Leakage curves for total flavonoids

3.5 洗脱曲线 吸附饱和后的 HPD-300 树脂，先用 5 BV 蒸馏水洗脱未吸附样品和部分水溶性杂质，再用不同体积分数乙醇洗脱，以洗脱液体积为横坐标，洗脱液中总黄酮质量浓度为纵坐标绘制洗脱曲线，见图 5。由图可知，30%、70% 乙醇及纯乙醇洗脱液中总黄酮质量浓度很低，无法破坏树脂和其之间的吸附作用力，该成分主要集中在 50% 乙醇洗脱液中，表明其洗脱能力较强。为了节省溶剂，

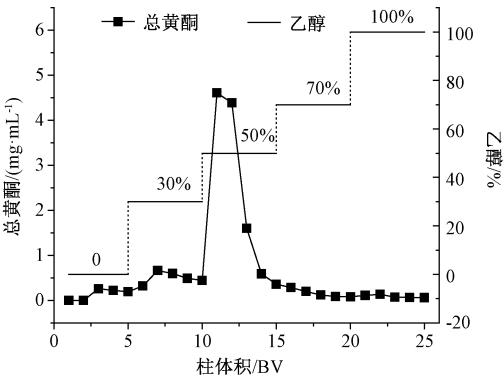


图5 总黄酮洗脱曲线

Fig. 5 Elution curves for total flavonoids

3.6 验证试验 将 7 BV 提取物溶液（60 mg/mL）上样到 HPD-300 树脂柱上吸附，吸附完成后先用 5 BV 蒸馏水洗脱杂质，再用 5 BV 50% 乙醇洗脱，收集洗脱液，减压蒸馏回收溶剂得纯化产物，测定总黄酮含量。结果，该成分含量由 2.62% 提高到 40.01%，较纯化前提高了 15 倍，收率为 81.25%，表明 HPD-300 树脂纯化效果良好，可将其其他非黄酮类杂质除去。

4 结 论

本实验显示, HPD-300 型大孔吸附树脂具有最大比表面积, 表现出较好的吸附性能; 紫菀总黄酮吸附过程符合准二级动力学方程, 由液膜扩散和颗粒内扩散步骤共同控制; 低温有利于吸附, 为放热反应; 吸附既符合 Langmuir 模型, 又符合 Freundlich 模型, 可能为单分子层吸附和优惠吸附; 最佳条件为上样质量浓度 60 mg/mL, 上样体积 7 BV, 先用 5 BV 蒸馏水冲洗杂质, 再用 5 BV 50% 乙醇洗脱, 纯化后总黄酮纯度由 2.62% 提高到 40.01%, 收率为 81.25%。

综上所述, 该方法合理有效, 在节省时间和溶剂的同时可获得高纯度紫菀总黄酮, 适合该成分的规模化制备。

参考文献:

[1] 万昶宸, 刘艳艳, 杨浩天, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定紫菀中 9 种化学成分[J]. 中草药, 2016, 47(14): 2534-2539.

[2] Liu X D, Cao P P, Zhang C F, *et al.* Screening and analyzing potential hepatotoxic compounds in the ethanol extract of *Asteris Radix* by HPLC/DAD/ESI-MSⁿ technique[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 67-68: 51-62.

[3] 谈 静, 盛 蓉, 宋 英. 咳喘口服液中紫菀的提取工艺研究[J]. 中成药, 2008, 30(11): 1707-1708.

[4] 林桂梅, 来有雪, 张子泉, 等. 蜜制紫菀饮片质量标准的优化研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(6): 1350-1352.

[5] 王甫成, 夏成凯, 栗进才, 等. HPLC 同时测定紫菀中 5 种黄酮类成分[J]. 中成药, 2012, 34(2): 306-309.

[6] 王 丹, 谭忠德, 王 瑛. UV 法测定紫菀中总黄酮类成分的含量[J]. 吉林医药学院学报, 2014, 35(1): 33-34.

[7] 王小芳, 张喜民, 邓月婷, 等. 大孔树脂分离纯化松潘乌头总生物碱研究[J]. 中成药, 2014, 36(4): 860-864.

[8] 李 岩, 赵 欣, 李晓静, 等. 大孔树脂分离纯化天仙子总生物碱的研究[J]. 中成药, 2015, 37(1): 89-94.

[9] 张若洁, 徐永霞, 王鲁峰, 等. 大孔树脂纯化芦笋总皂苷的工艺研究[J]. 中草药, 2012, 43(6): 1097-1100.

[10] 兰艳素, 李长江, 潘 乐. 大孔树脂纯化广豆根总黄酮工艺的优化[J]. 中成药, 2016, 38(7): 1644-1647.

[11] 叶殷殷, 曾元儿, 曹 骋, 等. 不同型号大孔树脂分离大黄蒽醌类成分的研究[J]. 中成药, 2011, 33(1): 168-170.

[12] Ren J, Zheng Y, Lin Z, *et al.* Macroporous resin purification and characterization of flavonoids from *Platycladus orientalis* (L.) Franco and their effects on macrophage inflammatory response[J]. *Food Funct*, 2017, 8(1): 86-95.

[13] Wan P, Sheng Z, Han Q, *et al.* Enrichment and purification of total flavonoids from *Flos Populi* extracts with macroporous resins and evaluation of antioxidant activities *in vitro* [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 945-946: 68-74.

[14] 王 丹, 谭忠德, 王 瑛. UV 法测定紫菀中总黄酮类成分的含量[J]. 吉林医药学院学报, 2014, 35(1): 33-34.