

DM130 型大孔树脂分离纯化野菊花总黄酮的工艺研究

刘承萍,高峰,曹骋,曾元儿

(广州中医药大学 中药学院,广东 广州 510006)

摘要:目的 研究大孔吸附树脂从野菊花提取液中分离纯化总黄酮的工艺条件。方法 以总黄酮回收率为指标,采用静态和动态试验考察大孔吸附树脂对野菊花总黄酮的分离纯化效果及影响因素。结果 DM130 型大孔吸附树脂对野菊花总黄酮的最佳纯化工艺条件为:上柱样品溶液总黄酮质量浓度为 2.78 mg/mL, pH 3~4,以 80% (体积分数)乙醇洗脱,洗脱流速为 2 mL/min,洗脱剂用量为 5 倍柱体积。总黄酮的回收率为 79.19%,纯度为 37.31%。结论 经过优化的工艺稳定可行,DM130 型大孔吸附树脂能较好地分离纯化野菊花总黄酮。

关键词:野菊花;总黄酮;大孔树脂;纯化

中图分类号:R284.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1006-8783.2011.01.011

文章编号:1006-8783(2011)01-0044-04

Purification of the total flavonoids from *Chrysanthemum indicum* with DM130 macroporous resin

LIU Cheng-ping, GAO Feng, CAO Cheng, ZENG Yuan-er

(School of Traditional Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: Objective To investigate the conditions of purifying total flavonoids from *Chrysanthemum indicum* with macroporous adsorption resin. **Methods** Static and dynamic tests of macroporous resin were employed to study on the purification effect and influencing factors with the recovery rate of total flavonoids as index.

Results The purification conditions of DM130 resin were as follows: the concentration of total flavonoids was 2.78 mg/mL at pH 3~4, 80% alcohol eluting for 5 times as much as the resin volume, and the elution velocity was 2 mL/min. The recovery of total flavonoids was 79.19%, and the purification rate was 37.31%. **Conclusion** The optimum technology is stable and feasible, and DM130 resin is suitable for separating and purifying total flavonoids from *Chrysanthemum indicum*.

Key words: *Chrysanthemum indicum*; total flavonoids; macroporous resin; purification

野菊花为传统用药,为菊科菊属多年生草本植物野菊(*Chrysanthemum indicum* L.)及其同属植物的干燥头状花序。现有研究表明黄酮类化合物是野菊花中含量最多、最主要的活性成分,具有广谱抗菌、抗病毒、降血压、利胆保肝、抗氧化等多种生物活性^[1]。常用的野菊花提取液纯化方法有水提醇沉

法^[2]和 AB-8 型大孔树脂纯化法^[3],但实验中发现经醇沉处理后野菊花黄酮类成分损失较大,而 AB-8 型大孔树脂纯化效果不如 DM130 型大孔树脂。本试验以总黄酮回收率为考察指标,研究探讨 DM130 型大孔树脂分离纯化野菊花总黄酮的最佳工艺,从而为有效开发利用野菊花总黄酮、更好地发挥野菊

收稿日期:2010-09-20

作者简介:刘承萍(1985-)女,硕士研究生 Email: jieqiong718@126.com; 通讯作者:曾元儿(1966-)男,教授,主要从事中药分析及中药制剂质量标准研究工作 电话:020-39358082 Email: zengyuaner@126.com。

网络出版时间:2011-01-21 16:24 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1413.R.20110121.1624.018.html>

花经济效益提供科学依据。

1 仪器与试剂

Genesys™ 2 型紫外-可见分光光度计(Thermo Spectronic 公司); 芦丁对照品(中国药品生物制品检定所 批号: 100080-200707); NKA-9、D101、AB-8、DM301、DM130 型大孔树脂(天津海光化工有限公司); 其余试剂均为分析纯 水为蒸馏水。

野菊花购于湖北麻城市黄土岗镇,经广州中医药大学中药鉴定教研室黄海波副教授鉴定为菊科菊属植物野菊(*Chrysanthemum indicum* L.) 的干燥头状花序。

2 方法与结果

2.1 野菊花样品溶液的制备

称取野菊花粗粉 100 g,加入 10 倍量的 50%(体积分数) 乙醇,80 ℃ 水浴回流提取 3 次,每次 1.5 h,滤过,合并滤液,60 ℃ 减压回收乙醇至约 400 mL,放置冰箱(4 ~ 10 ℃) 冷藏过夜,抽滤除去沉淀,收集滤液,置 500 mL 量瓶中,加水至刻度,作为贮备液,临用前以水为溶剂配制成一定质量浓度的样品溶液。

2.2 总黄酮的含量测定

2.2.1 标准曲线的绘制 采用硝酸铝-亚硝酸钠比色法^[4],以芦丁为对照品,在 510 nm 处测定,得吸光度(*A*) 与芦丁质量浓度(ρ) 的回归方程为:

$A = 12.867\rho - 0.0134$ $r = 0.999\ 0$,芦丁质量浓度在 7.9 ~ 47.6 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内呈良好线性关系。

2.2.2 样品溶液的测定 将野菊花样品溶液加水

稀释至相当于 0.01 g 生药/mL 的溶液,按上述方法测定吸光度,计算各样品溶液中总黄酮的含量。

2.3 大孔吸附树脂的预处理

将各型号大孔吸附树脂用乙醇浸泡 24 h,充分溶胀,抽滤除去细小杂质,水洗除去树脂碎屑和水溶性杂质。装入色谱柱中,用乙醇以 2 mL/min 流速冲洗,至流出液加 5 倍量水无白色浑浊现象止,再用水冲洗至无醇味,备用。

2.4 大孔吸附树脂类型的筛选

分别取经预处理并抽滤至干的各型号大孔树脂 2.0 g,平行 2 份,分别置 150 mL 具塞磨口锥形瓶中,精密加入野菊花样品溶液(总黄酮质量浓度为 1.39 mg/mL) 20.0 mL,于室温下持续振荡 12 h 后静置 12 h,滤过,收集滤液,加水定容至 25 mL,测定吸附残液中总黄酮含量,按式(1) 计算各树脂的静态吸附率。将吸附饱和的大孔树脂水洗至糖的 Molish 反应为阴性,再用乙醇 20.0 mL 进行静态解吸 24 h,滤过,收集滤液,加乙醇定容至 25 mL,测定解吸液中总黄酮含量,按式(2) 计算解吸率。各树脂的静态吸附、解吸结果见表 1。

吸附率 = $(C_0V_0 - C_1V_1) / C_0 \times V_0 \times 100\%$ (1)

解吸率 = $C_2V_2 / (C_0V_0 - C_1V_1) \times 100\%$ (2)

式中: C_0 为吸附前样品溶液中总黄酮质量浓度,mg/mL; C_1 为吸附残液中总黄酮质量浓度,mg/mL; C_2 为解吸液中总黄酮质量浓度,mg/mL; V_0 为吸附前加入的样品溶液体积, mL; V_1 为吸附残液体积, mL; V_2 为解吸液体积, mL。

表 1 各树脂的静态吸附率和解吸率的比较

Table 1 Results of adsorption and desorption rates of different resins($n = 2$)

树脂型号	NKA-9	D101	AB-8	DM301	DM130
吸附率	55.85 ± 0.57	76.6 ± 0.18	77.12 ± 0.26	76.6 ± 0.23	80.62 ± 0.35
解吸率	66.18 ± 0.45	69.97 ± 0.25	70.81 ± 0.58	70.92 ± 0.70	71.18 ± 0.29

由表 1 可知,在树脂用量相同的情况下,不同型号树脂对野菊花样品溶液中总黄酮静态吸附解吸效果不一,DM130 型树脂具有较高的吸附率和解吸率。

2.5 上柱样品溶液 pH 值的考察

取野菊花样品溶液(总黄酮质量浓度为 2.78 mg/mL) 5 份,分别用 1 mol/L 的 HCl 溶液调节 pH 值为 3、4、5、6、7,精密移取各溶液 5.0 mL 置已处理好的 DM130 型树脂柱上,在相同条件下进行动态解吸,结果见表 2。

表 2 上柱样品溶液 pH 对 DM130 型树脂吸附量的影响

Table 2 Effects of pH on adsorption capacity of DM130

样品溶液 pH 值	3	4	5	6	7
总黄酮回收率/ %	76.34	76.34	69.21	62.61	58.11

注: 总黄酮回收率 = 洗脱液中总黄酮量/ 上柱样品溶液中总黄酮量 $\times 100\%$

由表 2 可知,上柱样品溶液 pH 为 3 ~ 4 时,野菊花总黄酮吸附效果较好,有较大回收率;随着 pH 值的增大,回收率减小。因此动态吸附时应调节上

柱样品溶液 pH 为 3~4。

2.6 上柱样品溶液质量浓度的考察

精密移取不同质量浓度的野菊花样品溶液(总黄酮含量相同)以相同流速上样,在相同条件下进行动态解吸,测定洗脱液中总黄酮含量,计算回收率,结果见表 3。

表 3 上柱样品溶液质量浓度对 DM130 型树脂吸附量的影响

Table 3 Effects of different concentrations on the adsorption capacity of DM130					
$\rho_{\text{上柱药液}} / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	5.56	4.17	2.78	1.85	1.39
总黄酮回收率 / %	76.34	76.93	80.13	79.55	79.20

由表 3 可知,野菊花样品溶液总黄酮质量浓度为 2.78 mg/mL 时,DM130 型树脂对野菊花黄酮的吸附量最大,而后随着上柱样品溶液质量浓度的增加,吸附效果有所减弱。

2.7 上样量的考察

取野菊花样品溶液(总黄酮质量浓度为 2.78 mg/mL, pH=4),以 1 mL/min 的流速上树脂柱(柱体积 9 mL)。用试管以柱体积分段收集流出液,并跟踪测定每个流份的野菊花总黄酮含量至呈稳定状态,以流份管数为横坐标,未吸附率(未吸附率=流出液中成分含量/上柱前样品溶液成分含量×100%)为纵坐标绘制总黄酮泄露曲线,见图 1。

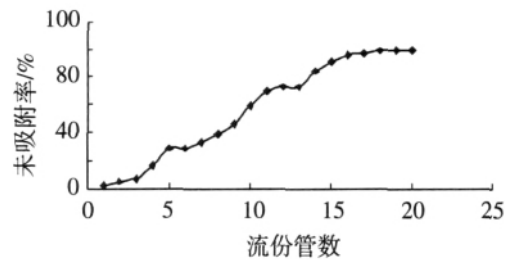


图 1 总黄酮的泄露曲线图
Figure 1 The leak curve of total flavonoids

由图 1 可知,上样量超过 3 倍柱体积以后,总黄酮的泄露量开始显著增大,说明树脂柱开始不能完全吸附样品溶液中的黄酮类成分,故确定 3 倍柱体积为最大上样量。而收集 19 管后,流分中总黄酮质量浓度趋向稳定,即树脂柱吸附完全饱和。

2.8 上柱样品溶液流速的考察

精密移取野菊花样品溶液(总黄酮质量浓度为 2.78 mg/mL) 20.0 mL,分别以 1、2、3 mL/min 的流速上柱,以相同条件洗脱。野菊花总黄酮回收率依

次为 78.67%、78.38%、72.16%,说明上柱样品溶液流速为 1~2 mL/min 时,回收率变化不大;但流速为 3 mL/min 时,回收率有所下降。

2.9 洗脱剂体积分数的考察

将已吸附好的树脂柱用水冲洗至糖的 Molish 反应为阴性,弃去水洗液,依次用 5 倍柱体积的 20%、40%、60%、80%、95%(φ)乙醇洗脱,测定各洗脱液中总黄酮含量,计算回收率,见图 2。

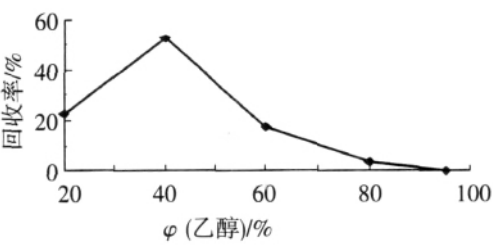


图 2 不同体积分数乙醇的洗脱曲线图
Figure 2 Elution curve of different concentrations of ethanol

当乙醇体积分数为 80% 时,洗脱液中总黄酮含量已明显降低,可认为树脂上的黄酮类物质已基本洗脱完全,故选用 80% 乙醇为洗脱剂。

2.10 洗脱剂用量的考察

将已吸附好的树脂柱用水冲洗至 Molish 反应为阴性,弃去水洗液,用 80% 乙醇以 1 mL/min 的流速进行洗脱,按柱体积(9 mL)分段收集洗脱液,共收集 9 份,并跟踪测定每份洗脱液的吸光度 A。见表 4。

表 4 洗脱剂用量的考察结果
Table 4 Results of different eluent volumes

洗脱液管数	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0.356	0.984	0.032	0.012	0	0	0	0	0

由表 4 可知,当洗脱剂用量为 5 倍柱体积时,可基本将野菊花黄酮类成分洗脱完全。

2.11 洗脱剂流速的考察

对已吸附饱和的树脂柱用水冲洗至 Molish 反应为阴性,弃去水洗液,再用 5 倍柱体积的 80% 乙醇分别以 1、2、3 mL/min 的流速进行洗脱。得野菊花总黄酮回收率依次为 78.65%、77.95%、72.28%,说明洗脱速度越慢解吸效果越好,但过慢会使工作周期延长;而洗脱剂流速为 3 mL/min,回收率相对较低,因此选择洗脱速度为 2 mL/min。

2.12 验证试验

确定 DM130 型大孔树脂纯化野菊花总黄酮的

工艺条件为:采用质量浓度为 2.78 mg/mL 的野菊样品溶液($\text{pH}=3\sim4$),以 2 mL/min 流速上样,先用水洗至 Molish 反应为阴性,再用 5 倍柱体积 80% 乙醇以 2 mL/min 洗脱。按该工艺平行 3 次试验,收集洗脱液,测定总黄酮含量,计算回收率和纯度(纯度 = 洗脱液中总黄酮量/干膏质量 $\times 100\%$)。结果平均回收率为 79.19%, RSD 为 0.75%;平均纯度为 37.31%, RSD 为 0.97%。

3 讨论

3.1 黄酮类化合物多具酚羟基,显弱酸性,适宜的 pH 值使得上柱样品溶液的黄酮类成分以分子形式存在,利于树脂吸附纯化。但当上柱样品溶液 pH 偏大时,野菊花总黄酮类成分有离子化趋势,从而使回收率降低。本实验结果表明,DM130 型树脂分离纯化野菊花总黄酮上柱样品溶液的最佳 pH 值为 3~4。

3.2 上柱样品溶液质量浓度的考察结果表明,并非质量浓度越大吸附效果越好,实际应用过程中要结合药液的澄清度,因药液中的沉淀会堵塞树脂柱,影响吸附效果。随着上柱样品溶液质量浓度的增加,与黄酮类物质竞争吸附的杂质也可能随之增加,使黄酮类物质与树脂分子的亲和力减弱,从而影响黄

酮类物质被树脂吸附;且树脂的吸附能力有限,若样品溶液质量浓度超出了树脂吸附极限,会导致黄酮类物质过早流出,使回收率降低。上柱样品溶液质量浓度以野菊花总黄酮计算,可消除野菊花药材产地、品种等不同造成的总黄酮含量的差异。野菊花样品溶液最佳质量浓度(以总黄酮计)为 2.78 mg/mL,且上样量以 3 倍柱体积为宜。

3.3 上柱样品溶液流速为 3 mL/min 时,回收率有所下降。分析可能是因为流速过快时,黄酮类物质未来得及被树脂吸附,过早流出,从而导致野菊花总黄酮的回收率降低。

参考文献:

- [1] 石兰萍,田琳琳,袁劲松,等.野菊花的研究概况[J].中西医结合心脑血管病杂志,2005,3(5):434.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会.WS3—B3925—98—232.国家药品标准[S].1998.
- [3] 陈文明,汪燕燕,陆维丽,等.大孔吸附树脂纯化野菊花总黄酮[J].安徽医科大学学报,2006,41(4):406.
- [4] 彭小冰,胡皓东.野菊花不同炮制品中总黄酮含量的分析[J].贵阳中医学院学报,2005,27(2):61.

(责任编辑:刘晓涵)

美国 FDA 批准芬太尼透黏膜片剂用于控制成人癌症患者的突破性疼痛

美国 FDA 于 2011 年 1 月 7 日批准芬太尼(fentanyl,商品名为 Abstral)透黏膜片剂用于控制成年癌症患者的突破性疼痛。芬太尼速释透黏膜制剂一般在口腔(颊内、牙龈、舌)、鼻道或咽喉的黏膜给药。

Abstral 为严格限制处方药,只有具备相关资质的医生才具有此药物的处方权。它适用于 18 岁及以上全天候使用阿片类止痛药以及需要和能够安全使用更高剂量阿片类药物的癌症患者控制突破性疼痛。突破性疼痛是一种突然发作、持续时间很短的疼痛,患者的标准用药通常无法缓解。

正式获批之前,Abstral 的安全性通过了测试。311 名对阿片类止痛药耐受良好的有突破性疼痛症状的癌症病人参加了试验,其中 270 名患者服用多剂止痛药进行治疗,服药期限从 1 d 到 405 d 不等,平均 131 d,其中有 44 名患者服药时间至少有 12 个月。

Abstral 常见不良反应包括恶心、便秘、嗜睡和头痛。使用其他速释透黏膜芬太尼产品的患者出现其他严重不良反应包括死亡的案例也有报道,但患者死亡的主要原因为药物选择不当和/或剂量不当。Abstral 由位于新泽西州 Bedminster 的 ProStraken 公司生产。

(来源:美国 FDA 政府公告 2011-01-07 夏训明编译)