

景天三七总黄酮大孔吸附树脂纯化工艺研究

杨艳俊, 王亚红, 王君龙

(吉林化工学院 化学与制药工程学院, 吉林 吉林 132022)

摘要:以景天三七为试材,研究了 AB-8、HPD-100、D-101、DM-301、DM130 5 种吸附树脂对景天三七总黄酮的静态吸附及解吸性能,并以景天三七总黄酮纯度为指标,通过单因素试验考察其吸附和洗脱条件,研究 DM-301 大孔吸附树脂分离纯化景天三七总黄酮的最优工艺条件。结果表明:优选的工艺条件为上样液 pH 为 3.0,质量浓度约为 1.63 mg/mL,吸附速率 2 BV/h,用 70%乙醇溶液以 2 BV/h 解吸速率解吸,解吸液体积为 5 BV 时解吸较完全,纯化后干浸膏中总黄酮由原来的 8.99%提高到 25.60%,树脂富集倍数约为 3 倍;DM-301 型大孔树脂用于富集景天三七总黄酮效果较好,优选的工艺操作简单、方法可靠。

关键词:景天三七;总黄酮;纯化;大孔吸附树脂;DM-301

中图分类号:R 284.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)07-0144-04

景天三七(*Sedum aizoon* L.)为景天科景天属多年生草本植物的全草,又名土三七、土人参、马三七、墙头三七、养心草、救心草、六月淋、吐血草、活血丹、蝎子草等,在我国东北、华北、西北及长江流域各省区均有分布^[1]。景天三七味甘、微酸、性平,归心、肝经,有活血化瘀、止血等功效,临床用于治疗跌打损伤吐血、便血、外伤出血、安神补血、清热凉血^[2-3],还用于治疗神经衰弱、失眠、烦躁不安等^[4]病症。近年来,民间常用于降血脂、降血压及心脏疾病,被称为“救心草”或“救心菜”^[5]。现代药理研究表明,景天三七含有的有效成分为多种酚酸、谷甾醇^[6]、齐墩果酸^[7]、槲皮素、槲皮苷、杨梅素、杨梅苷、山奈酚、山奈酚葡萄糖苷^[8-9]、二十六烷酸、胡萝卜苷、红景天苷和大黄酚葡萄糖苷^[10]等。景天三七含有多种营养成分,作为一种新兴的保健蔬菜进一步得到了重视与推广^[11-12],王小会^[13]研究了使用景天三七配制茶饮。黄酮类化合物具有抗肿瘤、抗癌、解热、保肝、抗衰老等作用^[14],景天三七具有较好的抗氧化活性^[15],该试验通过对景天三七中总黄酮的提纯条件进行研究,以期为进一步研究景天三七的药用价值及工业化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试景天三七购于河北安国市冷背药材有限公司。

供试试剂:芦丁(自制,含量 $\geq 96\%$),无水乙醇、盐

酸、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝等均为分析纯。AB-8、HPD-100、D-101、DM-301、DM130 由天津市海光化工有限公司生产。

供试仪器:紫外可见分光光度计(T6 新世纪,北京普析通用仪器有限责任公司)、电热鼓风干燥箱(CS101-AB,中国重庆实验设备厂)、电子天平(JY2002,上海精密科学仪器有限公司)等。

1.2 试验方法

1.2.1 对照品溶液的配制 精密称取干燥至恒重的芦丁 10 mg,加入适量 60%的乙醇,超声处理使之溶解,用 60%的乙醇定容至 100 mL,配制成浓度为 0.1 mg/mL 的芦丁溶液,备用。

1.2.2 供试品溶液的制备 将景天三七用粉碎机粉碎,过 40 目筛,取 50 g,加入 15 倍生药量的 80%乙醇,85℃加热微沸回流提取 2 次,每次 5 h,合并提取液,过滤,旋转蒸发至无醇味,即得景天三七提取液,备用。

1.2.3 线性关系考察 精确称取 0.1 mg/mL 芦丁标准溶液 0.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 mL 分置 25 mL 容量瓶中,加入 5% NaNO_2 溶液 0.8 mL,摇匀,放置 6 min,加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.8 mL,放置 6 min 后再加入 1 mol/L NaOH 溶液 10 mL,摇匀显色,定容,以零管为空白^[16]。在最大波长 510 nm 处测定吸光度,结果进行直线回归,得回归方程: $A = 9.8429C - 0.0183$, $R^2 = 0.9997$ 。式中 C (mg/mL),结果表明在 0.008 ~ 0.048 mg/mL 范围内呈良好的线性关系。

1.2.4 精密度试验 取 1.2.3 中加入 8 mL 芦丁标准品溶液,依照紫外分光光度法在 510 nm 处连续测定 6 次,吸光度平均值为 0.298, RSD 为 0.2272%,结果表明精密

第一作者简介:杨艳俊(1974-),女,硕士,助教,现主要从事天然产物有效成分的提取和精制。E-mail:532101728@qq.com。

基金项目:吉林化工学院资助项目。

收稿日期:2013-11-13

度较好。

1.2.5 静态吸附及静态解吸的考察 取处理后的树脂 AB-8、HPD-100、D-101、DM-301、DM-130 各 4 g 置于 50 mL 锥形瓶内,加入 40 mL 总黄酮浓度为 3.2393 mg/mL 景天三七提取液,每 10 min 振摇 1 次,振摇约 30 s,共 2 h,静止 48 h,滤过。分别吸取各树脂吸附后的药液,在 510 nm 处测量吸光度 A,计算各树脂对景天三七总黄酮的吸附率。将静态吸附的树脂抽滤至干,室温条件下,加入 70%乙醇 60 mL 解吸,每 10 min 振摇 1 次,约 30 s,共 2 h,然后静止 48 h。分别取各解吸液于 510 nm 处测定吸光度,计算各种树脂对景天三七总黄酮的解吸率,5 种不同型号的树脂在相同条件下经过 48 h 的静态吸附及解吸,分别计算出其对景天三七总黄酮的静态吸附率和解吸率。

1.2.6 DEM-301 型大孔吸附树脂工艺优化 不同浓度上柱药液对景天三七总黄酮纯化的影响:取已处理好的 DM-301 型吸附树脂 5 份,各 15 g,湿法装柱,分别加入景天三七提取原液(总黄酮浓度为 3.2393 mg/mL)以及稀释了 1、2、3、4 倍的样品溶液各 50 mL,先以 2 BV/h 的流速进行吸附后,分别收集过柱液;再用 70%乙醇各 60 mL 以 2 BV/h 的流速进行解吸,分别收集洗脱液,于 510 nm 处测定吸光度,计算吸附率及解吸率。不同吸附速率对景天三七总黄酮纯化的影响:取已处理好的 DM-301 型吸附树脂 5 份,各 15 g,湿法装柱,分别加入总黄酮浓度为 1.6297 mg/mL 的景天三七上柱液各 50 mL,分别以 1、2、3、4、5 BV/h 的流速进行吸附,分别收集过柱液;再用 70%乙醇各 60 mL 以 2 BV/h 的流速进行解吸,分别收集洗脱液。对过柱液及解吸液分别取样进行含量测定,计算吸附率及解吸率。不同解吸液浓度对景天三七总黄酮纯化的影响:取已处理好的 DM-301 型吸附树脂 5 份,各 15 g,湿法装柱,分别加入景天三七上柱液(总黄酮浓度为 1.6147 mg/mL)各 50 mL,以 2 BV/h 的流速进行吸附,收集过柱液;再分别用 10%、30%、50%、70%、95%乙醇各 60 mL 以 2 BV/h 的流速进行解吸,分别收集洗脱液;各吸附后液体及解吸液分别取样进行含量测定,得出各液体总黄酮浓度,计算吸附率及解吸率。不同洗脱速率对景天三七总黄酮纯化的影响:取已处理好的 DM-301 型吸附树脂 5 份,各 15 g,湿法装柱,分别加入景天三七上柱液(总黄酮浓度为 1.6024 mg/mL)各 50 mL,以 2 BV/h 的流速进行吸附,收集过柱液;再用 70%乙醇各 60 mL,分别以 1、2、3、4、5 BV/h 的流速进行洗脱,分别收集洗脱液;各吸附后液体及解吸液分别取样进行含量测定,得出各液体总黄酮浓度,计算吸附率及解吸率。不同洗脱终点对景天三七总黄酮纯化的影响:取已处理好的 DM-301 型吸附树脂 15 g,湿法装柱,

加入景天三七上柱液(总黄酮浓度为 1.5824 mg/mL) 50 mL,以 2 BV/h 的流速进行吸附,收集过柱液;用 70%乙醇以 2 BV/h 的流速进行解吸,分别按不同倍树脂床体积收集洗脱液,解吸液分别取样进行含量测定,计算总黄酮的含量,确定洗脱终点。不同上柱药液 pH 值对景天三七总黄酮纯化的影响:取已处理好的 DM-301 型吸附树脂 5 份,各 15 g,湿法装柱,准备景天三七上柱液(总黄酮浓度分别为 1.6034 mg/mL) 50 mL 5 份,使用 4% HCl 溶液和 3% NaOH 溶液分别调 pH 为 1、2、3、4、5,分别加入柱内,以 2 BV/h 的流速进行吸附,收集过柱液;再用 70%乙醇各 100 mL 以 2 BV/h 的流速进行解吸,收集解吸液;各吸附后液体及解析液分别取样进行含量测定,得出各液体总黄酮浓度,计算吸附率及解吸率。

1.2.7 验证试验 为了考察上述优化工艺的稳定性,进行了 3 次验证性试验,取 pH 为 3 的景天三七上柱液,总黄酮浓度为 1.6060 mg/mL、90 mL,及经过上述考查的最优条件进行吸附及解吸的洗脱液各 90 mL 倒入称重后的蒸发皿中水浴加热挥出溶剂进行浓缩,再放入温度调为 60℃的电热鼓风干燥箱中干燥。待其干燥至恒重后称重做差,得浸膏质量,计算干浸膏中总黄酮的纯度。

2 结果与分析

2.1 静态吸附及静态解吸的结果

从表 1 可以看出,5 种树脂中,AB-8 的吸附率最低,HPD-100 解吸率最低,其余 3 种树脂中,DM-301 吸附率明显高于其它树脂,所以选择 DM-301 树脂进行研究。

表 1 静态吸附及静态解吸结果

Table 1 The results of static adsorption and desorption

树脂种类	吸附后总黄酮浓度 $C_1/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	吸附率 /%	解吸液总黄酮浓度 $C_2/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	解吸率 /%
AB-8	0.5514	58.56	0.2470	63.04
HPD-100	0.4710	69.29	0.2501	58.94
D-101	0.5048	62.25	0.2750	66.99
DM-301	0.3711	75.76	0.3014	64.96
DM-130	0.4888	63.49	0.2618	62.80

2.2 DM-301 型大孔吸附树脂工艺优化研究

2.2.1 不同浓度上柱药液对景天三七总黄酮纯化的影响 由表 2 可知,上柱药液浓度对景天三七总黄酮纯化的影响很明显,浓度过高时,药液浪费情况严重,吸附率过低;浓度过低时,药液中总黄酮量过少,不足树脂吸附,可导致吸附量计算不准确,影响试验结果。在其它纯化条件相同时,随着上柱药液浓度的减小,解吸率先增大后又减小。综合吸附率和解吸率结果看,最佳景天三七总黄酮纯化浓度为稀释 1 倍时的提取液浓度,即浓度为 1.620 mg/mL 左右。

表 2 不同浓度上柱药液对景天三七总黄酮纯化的影响

Table 2 The effect of different *Macroporous Adsorption Resin* concentrations on purification process of total flavonoids

稀释倍数	上柱液浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	吸附率/%	解吸率/%
0	3.2393	80.20	80.65
1	1.6197	93.32	84.83
2	1.0798	93.38	82.78
3	0.8098	94.05	79.80
4	0.6479	93.71	75.56

2.2.2 不同吸附速率对景天三七总黄酮纯化的影响

由表 3 可以看出,随着吸附速率的加快,树脂对景天三七总黄酮的吸附率依次减小,这是由于吸附速率较快时,树脂尚未完全吸附,黄酮类化合物就已随吸附液流出树脂柱。从吸附率和解吸率综合考虑,确定最佳景天三七总黄酮吸附速率为 2 BV/h。

表 3 不同吸附速率对景天三七总黄酮纯化的影响

Table 3 The effect of different adsorption rates on purification process of total flavonoids

吸附速率/ $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$	吸附后药液吸光度 A_1	解吸液吸光度 A_2	吸附率/%	解吸率/%
1	0.311	0.406	94.86	83.86
2	0.391	0.414	93.60	86.59
3	0.399	0.398	93.48	83.50
4	0.297	0.381	92.96	80.53
5	0.256	0.397	85.72	90.83

2.2.3 不同解吸液浓度对景天三七总黄酮纯化的影响

由表 4 可知,解吸液浓度对景天三七总黄酮纯化有较高的影响,解吸液浓度增加,解吸率先是大幅度增加,之后缓慢下降。解吸液为 70%乙醇时解吸率最高,所以确定解吸液最佳乙醇浓度为 70%。

表 4 不同解吸液浓度对景天三七总黄酮纯化的影响

Table 4 The effect of different desorption solution concentrations on purification process of total flavonoids

乙醇浓度/%	吸附后药液吸光度 A_1	解吸液吸光度 A_2	吸附率/%	解吸率/%
10	0.387	0.467	93.63	9.78
30	0.381	0.306	93.72	32.68
50	0.359	0.333	94.07	70.57
70	0.391	0.407	93.57	85.63
90	0.365	0.392	93.97	82.41

2.2.4 不同洗脱速率对景天三七总黄酮纯化的影响

洗脱速率过快会导致洗脱不完全、浪费溶剂等问题;洗脱速率过慢导致洗脱时间延长、生产效率降低等问题。由表 5 可以看出,在其它纯化条件相同时,解析率在洗脱速率为 2 BV/h 时较高,依据试验结果确定最佳景天三七总黄酮吸附速率为 2 BV/h。

表 5 不同洗脱速率对景天三七总黄酮纯化的影响

Table 5 The effect of different elution rates on purification process of total flavonoids

洗脱速率/ $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$	吸附后药液吸光度 A_1	解吸液吸光度 A_2	吸附率/%	解吸率/%
1	0.402	0.389	93.33	82.98
2	0.383	0.392	93.65	83.38
3	0.424	0.388	92.99	79.52
4	0.372	0.361	93.81	76.82
5	0.431	0.342	92.87	73.75

2.2.5 不同洗脱终点对景天三七总黄酮纯化的影响

由表 6 可知,当解吸液用量为 5 倍树脂柱体积,即 5 BV 时,已基本将景天三七总黄酮解吸完毕。解吸液体积过小,不能够将景天三七总黄酮解吸完全,若解吸液体积过大,则会造成不必要的浪费。因此,选择适当的解吸液体积,可以满足试验要求又不会造成试剂浪费现象。综上,在试验条件不变的情况下,使用 100 mL 解吸液已接近洗脱终点,所以体积选用 100 mL。

表 6 不同洗脱终点对景天三七总黄酮纯化的影响

Table 6 The effect of different desorption ends on purification process of total flavonoids

序号	解吸液体积 V_2 /mL	测量取样量 /mL	吸光度 A	解吸量 m_2 /mg
1#	20	0.5	0.251	27.3600
2#	20	0.5	0.331	35.4900
3#	20	2.0	0.214	5.9000
4#	20	10.0	0.223	1.2258
5#	20	10.0	0.073	0.4638
6#	20	10.0	0.023	0.2100
7#	20	10.0	0.021	0.1996
8#	20	10.0	0.024	0.2148

2.2.6 不同上柱药液 pH 值对景天三七总黄酮纯化的影响

上柱药液的 pH 值不同也会影响树脂对总黄酮的纯化效果,该试验中分别考察了 pH 为 1~5 对纯化效果的影响,由表 7 可知,在其它纯化条件相同时,随着上柱药液值增大,解吸率有逐渐减小的趋势,但解吸率在 pH 为 3 时处于较高水平,所以综合吸附率和解吸率,上柱药液 pH 值选择 3。

表 7 不同上柱药液 pH 值对景天三七总黄酮纯化的影响

Table 7 The effect of different sample pH values on purification process of total flavonoids

药液 pH 值	吸附后药液吸光度 A_1	解吸液吸光度 A_2	吸附率/%	解吸率/%
1	0.074	0.437	98.53	73.19
2	0.154	0.462	97.27	77.77
3	0.161	0.508	97.16	85.81
4	0.294	0.463	92.96	82.02
5	0.201	0.429	88.42	80.13

2.3 验证试验

从表 8 可以看出,经 DM-301 大孔吸附树脂处理景天三七醇提液后,干膏中总黄酮纯度由 8.99% 提高到 25.60%,并具有较好的重现性。

表 8 DM-301 型大孔吸附树脂纯化景天三七总黄酮工艺验证数据

Table 8 Confirmation results of total flavonoids purified by DM-301 resin

试验次数	解吸液吸光度 A	做浸膏所用体积/mL	总黄酮浓度 /mg · mL ⁻¹	浸膏中总黄酮质量/mg	浸膏质量 /g	纯度 /%
上柱液	0.612	90	1.6060	144.54	1.6073	8.99
1#	0.498	90	0.6557	59.013	0.2305	25.60
2#	0.504	90	0.6633	59.697	0.2286	26.11
3#	0.502	90	0.6595	59.355	0.2365	25.10

3 结论

景天三七总黄酮的纯化选用中极性大孔树脂 DM-301,其纯化景天三七总黄酮的最佳工艺条件为上柱药液总黄酮浓度约为 1.6297 mg/mL, pH 为 3,吸附速率为 2 BV/h,用 70% 乙醇溶液以 2 BV/h 解吸速率解吸,解吸液用量为 5 倍树脂柱体积,即 5 BV 时解吸较完全,纯化后干浸膏中总黄酮由原来的 8.99% 提高到 25.60%,树脂富集倍数约为 3 倍,表明 DM-301 型大孔树脂对景天三七总黄酮具有一定的纯化性能。

参考文献

[1] 刘晔峰,马峥嵘,吴晓琴,等. 养心草的有效成分及功能性化合物研究进展[J]. 中华中医药杂志,2012,27(8):2135-2137.

- [2] 车苏容,郭素华,竺叶青. 景天三七的药学研究进展[J]. 福建中医药,2004,35(3):51-53.
- [3] 凌桂梅,黄子冬,时宗泽. 土三七的现代研究进展[J]. 浙江中医药大学学报,2012,36(3):353-355.
- [4] 林珠灿,黄华花,陈达炜,等. 养心草宁心安神活性部位的化学成分研究[J]. 中华中医药杂志,2011,12(26):3000-3002.
- [5] 车苏容,郭素华,竺叶青. 养心草的生药学研究[J]. 福建中医学院学报,2005,15(5):27-30.
- [6] 付煜荣,陈桂敏. 景天三七中总酚酸提取条件及含量分析研究[J]. 河北北方学院学报(自然科学版),2005,21(6):25-27.
- [7] 陈建琴,许雪琴. 养心草中齐墩果酸的含量测定[J]. 莆田学院学报,2009,16(2):46-48.
- [8] 于志斌,杨广义,吴霞,等. 救心草的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2007(19):67-69.
- [9] 郭素华,林珠灿,张志炜. 养心草中山奈酚成分的 HPLC-MS/MS 分析及含量测定[J]. 中华中医药杂志,2007,22(6):360-363.
- [10] 李卫林,荆云,罗秋燕,等. 景天三七的化学成分研究[J]. 新乡医学院学报,2008,25(6):558-561.
- [11] 王二丽,郭素华,蔡扬帆. 养心草的药用价值及开发前景[J]. 海峡药学,2010,22(9):79-81.
- [12] 秦爱英. 美蔬新秀-养心草[J]. 蔬菜,2006(8):13-14.
- [13] 王小会. 景天三七叶茶及其饮料的加工技术研究[D]. 泰安:山东农业大学,2012:1-51.
- [14] 郭芳彬. 蜂产品中黄酮类化合物的保健作用[J]. 养蜂科技,2005(2):28-31.
- [15] 李园园,王俊霞,曹乃峰,等. 河南产景天三七抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2011,23(2):337-340.
- [16] 李加林,吴素珍,卑占宇. 盐肤木总黄酮提取工艺研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(5):1117.

Study on the Purification Process of Total Flavonoids of *Sedum aizoon* L. by Macroporous Adsorption Resin

YANG Yan-jun, WANG Ya-hong, WANG Jun-long

(Chemical and Pharmaceutical Engineering Institute, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin, Jilin, 132022)

Abstract: Taking *Sedum aizoon* L. as material, the dynamic adsorption and desorption performances of five kinds of macroporous adsorption resin including AB-8, HPD-100, D-101, DM-301, DM-130 were researched to choose resin type; With the concentration of total flavonoids as indexes, adsorption and desorption conditions were investigated by single factor experiments. The technological conditions of the purification process of total flavonoids from *Sedum aizoon* L. by macroporous adsorption resin was investigated. The results showed that DM-301 resin was selected to optimum purification technology, the conditions were: sample solution pH value was 3.0, the concentration was 1.63 mg/mL, the adsorption rate was 2 BV/h, 2 BV/h desorption rate using was 70% ethanol solution, desorption solution was 5 BV. The total flavonoids of dry extract was purified from 8.99% to 25.6%, the enrichment ratio was about 3 times. DM-301 macroporous resin used for enriching the total flavonoids of *Sedum aizoon* L. was better, the optimized operation was simple, the method was reliable.

Key words: *Sedum aizoon* L.; total flavonoids; purification; macroporous adsorption resin; DM-301