

# HP-20 型大孔树脂富集纯化桑白皮总黄酮的工艺优选

杨晶, 刘嘉琪, 王宝昌, 史丽颖, 唐玲, 王永奇\* (大连大学药物研究所, 辽宁大连 116622)

**摘要** [目的] 优选桑白皮总黄酮的富集工艺条件。[方法] 以总黄酮含量和洗脱率为指标, 采用单因素试验考察 HP-20 型大孔树脂的静态饱和吸附量、动态饱和吸附量、乙醇浓度和乙醇用量等工艺条件。[结果] 桑白皮经醇提浓缩后, 以 HP-20 型大孔树脂为吸附剂, 以 3 BV 蒸馏水洗脱, 浓度 15% 乙醇 3 BV, 浓度 40% 乙醇以 2 BV/h 流速进行洗脱, 收集 12 BV 洗脱液, 总黄酮纯度达到 52.95%, 总黄酮洗脱率为 31.89%。[结论] HP-20 型大孔树脂能够有效的富集桑白皮总黄酮, 工艺操作简单、效果好。

**关键词** 桑白皮 (CORTEX MORI); HP-20 型大孔吸附树脂; 总黄酮; 工艺条件

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)23-09610-02

## Study on the Purification of Total Flavonoids from CORTEX MORI with HP-20 Macroporous Resin

YANG Jing et al (Institute of Materia Medica of Dalian University, Dalian, Liaoning 116622)

**Abstract** [Objective] To study on the purification of total flavonoids from CORTEX MORI. [Method] With the content of total flavonoids and the elution rate as index, the single-factor test was adopted to investigate technique conditions of static saturated adsorption capacity, dynamic adsorption capacity, ethanol concentration and dosage of HP-20 macroporous resin. [Result] HP-20 had the best separating efficiency when the volume of drug was 9 BV, washed with 3 BV of distilled water, and eluted with 3 BV of 15% ethanol and eluted with 12 BV of 40% ethanol. Under these process conditions, purity of total flavonoids was 52.95%, elution rate of total flavonoids was 31.89%. [Conclusion] DiaionHP-20 macroporous resin has good effect of purification of total flavonoids from CORTEX MORI.

**Key words** CORTEX MORI; HP-20 macroporous resin; Total flavonoids; Technology condition

桑白皮 (CORTEX MORI) 为桑科植物桑 (*Morus alba* L.) 的除去栓皮后的干燥根皮。药用可追溯到《神农本草经》, 列为中品, 为历版药典和历代本草所记载<sup>[1-3]</sup>。近年来的研究发现, 桑的药用部位及提取物有降血糖、降血脂、降血压、抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抑菌及抑制心脑血管疾病等作用<sup>[4]</sup>。其中有效成分为黄酮类化合物<sup>[5]</sup>。前期试验证明, 桑的 4 大药用部位即桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮中黄酮含量最高的是桑白皮, 且乙醇提取物为其有效部位。笔者采用 HP-20 型大孔树脂对桑白皮中总黄酮富集条件考察, 以期开发利用桑白皮资源提供一些前期基础工作。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 研究对象。** 桑白皮, 购自安徽省本草国药饮片有限公司, 经鉴定为桑 (*Morus alba* L.) 的除去栓皮后的干燥根皮。

**1.1.2 主要仪器。** Jasco v-560 紫外可见分光光度计, 购自日本 Jasco 公司; Unico7200 可见分光光度计, 购自尤尼柯上海仪器有限公司; Laborata 4000 型旋转蒸发器, 购自德国 Heidolph 公司; 水浴锅 HH24, 购自国华电器有限公司; BP210S 十万分之一电子天平, 购自 Sartorius 公司。

**1.1.3 主要试剂。** 桑辛素 (Morusin) 对照品, 购自成都曼思特生物科技有限公司, 纯度  $\geq 98\%$ ; HP-20 型大孔树脂, 购自日本三菱化学公司; 试验用水为蒸馏水; 其余试剂均为分析纯, 市售。

### 1.2 方法

**1.2.1 样品溶液的制备。** 准确称取 10.000 g 桑白皮, 置于

500 ml 圆底烧瓶中, 按照料液比为 1:25 (W/V, g/ml, 下同) 加入浓度 90% 乙醇, 在 95 °C 回流提取 3 次, 每次 3 h, 合并浸提液, 浓缩至膏状, 置于水浴锅上烘干至恒重, 作为供试品浸膏备用。

**1.2.2 总黄酮含量的测定方法<sup>[6]</sup>。**

**1.2.2.1 对照品溶液的制备。** 精确称取干燥的桑辛素对照品 5.00 mg, 至于 50 ml 容量瓶中用无水甲醇溶解至刻度, 摇匀, 得浓度为 0.10 mg/ml 的对照品溶液, 待用。

**1.2.2.2 供试品溶液的制备。** 准确称取按上述试验处理后的桑白皮干燥浸膏 50 mg, 用无水甲醇溶解并定容至 10 ml 容量瓶中, 摇匀, 得浓度为 5.00 mg/ml 的溶液, 待用。

**1.2.2.3 最佳波长的选择。** 取桑辛素对照品溶液和供试品溶液各 1.5 ml, 加 2.0 ml 浓度 0.1 mol/L 氯化铝溶液和 3.0 ml 浓度 0.1 mol/L 醋酸钠-醋酸溶液, 加入无水甲醇稀释至刻度, 摇匀, 放置 10 min 显色后, 在紫外可见分光光度计上, 于 200~600 nm 波长下扫描, 确定总黄酮的最佳检测波长。

**1.2.2.4 方法学考察。** (1) 线性关系考察。分别精确吸取 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 和 5.0 ml 桑辛素对照品溶液, 分别置于 10 ml 容量瓶中, 按“1.2.2.3”法处理并显色, 于 400 nm 处测定吸光度值。以吸光度 *A* 为横坐标, 浓度 *C* (mg/ml) 为纵坐标绘制标准曲线, 计算线性回归方程。(2) 精密密度试验。取 4.0 ml 桑辛素对照品, 按“1.2.2.4”中所述试验方法操作并显色, 测定吸光度值, 平行测定 5 次, 计算 *RSD*。(3) 重现性试验。取同一提取物 6 份, 按“1.2.2.2”法配制供试品溶液, 按“1.2.2.3”法操作并显色, 在 400 nm 处测定吸光度 *A*, 平行测定 6 次, 代入线性方程中, 计算黄酮含量的 *RSD*。

**1.2.2.5 样品中总黄酮的测定。** 精确吸取供试品溶液一定体积于 10 ml 容量瓶中, 按“1.2.2.3”试验操作方法并显色, 于 400 nm 处测定吸光度值 *A*, 各平行测定 5 次, 计算样品中总黄酮的含量。

**作者简介** 杨晶 (1989-), 女, 内蒙古鄂尔多斯人, 硕士研究生, 研究方向: 天然活性物质, E-mail: dldxyjing@126.com。\* 通讯作者, 教授, 博士, 从事天然活性物质的研究, E-mail: dalianwyq@163.com。

**收稿日期** 2013-07-10

### 1.2.3 大孔树脂富集工艺研究。

**1.2.3.1** HP-20 型大孔树脂预处理<sup>[7-8]</sup>。取一定量 HP-20 型大孔树脂,用浓度 95% 乙醇浸泡 24 h,充分溶胀,湿法装柱,并用浓度 95% 乙醇冲洗,检验乙醇流出液,直至流出液按 1:3 倍量加水混合无白色混浊,再用蒸馏水冲洗至无醇味。继续加浓度 5% HCl 浸泡 4~8 h,湿法装住并洗脱,然后用蒸馏水以同样流速洗至中性,加浓度 5% NaOH 浸泡 8 h,洗脱,蒸馏水洗至中性,浸泡于蒸馏水中备用。

**1.2.3.2** 静态饱和和吸附量的确定。准确称取预处理的 HP-20 型大孔树脂 3.000 g 和供试品溶液 100 ml (总黄酮浓度为 0.029 5 mg/ml),置于 250 ml 具塞锥形瓶中,室温条件下连续振荡 24 h,静置,待吸附完全后,过滤,测定残余溶液中总黄酮含量。根据下式计算平衡吸附量<sup>[9]</sup>: $Q = (C_0 - C)V/G$ 。式中: $C_0$  和  $C$  分别表示吸附前和吸附平衡后供试品溶液中总黄酮质量浓度(mg/g); $V$  为供试品溶液的体积(ml); $G$  为树脂质量(g),计算桑白皮静态饱和和吸附量。

**1.2.3.3** 动态饱和和吸附量的确定。取“1.2.3.1”项下的 HP-20 型大孔树脂 20.00 g,湿法装柱,取总黄酮浓度为 0.029 5 mg/ml 的供试品溶液控制流速为 2 BV/h 通过树脂柱,每 1.5 BV 流出液收集 1 次,测定其各自的总黄酮质量浓度。

**1.2.3.4** 乙醇浓度的考察。取“1.2.3.1”项下的 HP-20 型大孔树脂 20.00 g,湿法装柱,称取干燥至恒重的浸膏 1.150 g,适量蒸馏水溶解,过滤后上柱,待完全吸附后,先加入蒸馏水再依次加入浓度分别为 10%、20%、30%、40%、50%、70% 和 80% 的乙醇溶液,以 2 BV/h 流速梯度洗脱,分别洗至无色,收集各梯度下的洗脱液,浓缩成膏状,干燥至恒重并进行含量测定。

**1.2.3.5** 乙醇洗脱剂用量的考察。取“1.2.3.1”项下的 HP-20 型大孔树脂 20.00 g,湿法装柱,上样量为 9 BV 溶液,待完全吸附后。分别用 3 BV 的蒸馏水,3 BV 的浓度 15% 乙醇冲洗后,继续用浓度 40% 乙醇以 2 BV/h 流速进行洗脱,直至流出液为无色,每 1.5 BV 收集 1 次浓度 40% 乙醇流出液,测定各收集液中总黄酮含量。

## 2 结果与分析

**2.1 最佳波长的选择** 扫描结果发现,溶液在波长为 400 nm 处有强吸收。所以,选定总黄酮的最佳检测波长为 400 nm。

**2.2 方法学考察** (1)线性关系考察。计算得线性回归方程为: $Y = 0.082 0X - 0.000 3 (R^2 = 0.999 9)$ 。试验结果表明,在 0.025~0.050 mg/ml 范围内,桑辛素浓度与吸光度的线性关系良好。(2)精密性试验。计算得  $RSD$  为 0.54%,表明精密性良好。(3)重现性试验。计算得黄酮含量的  $RSD$  为 0.36% ( $n = 6$ ),表明重现性良好。

### 2.3 大孔树脂富集工艺研究。

**2.3.1** 静态饱和和吸附量的确定。根据公式计算得桑白皮静态饱和和吸附量为 50.14 mg/g。

**2.3.2** 动态饱和和吸附量的确定。试验结果表明,上样量分别为 30、60、90、120、150、180 和 210 ml 时,流出液中总黄酮质

量浓度对应为 0.008 9、0.016 7、0.019 2、0.024 7、0.035 8、0.041 6 和 0.037 8 mg/ml。即上样量为 180 ml(9 BV)时,HP-20 型大孔树脂达到饱和状态。

**2.3.3** 乙醇浓度的考察。由表 1 可知,浓度 20% 乙醇洗脱处总黄酮的洗脱率最高(11.12%),浓度 40% 乙醇洗脱时得到的总黄酮含量最高(24.65%)。继续探索用蒸馏水,浓度 15% 乙醇洗脱,再用浓度 40% 乙醇控制流速为 2 BV/h 洗脱,直至流出液为无色,收集流出液测定黄酮含量,结果发现在浓度 40% 洗脱液中黄酮含量达到 52.95%,洗脱率为 31.89%。

表 1 桑白皮总黄酮乙醇浓度的考察

乙醇浓度/%	洗脱量/mg	总黄酮含量/%	总黄酮的洗脱率/%
10	51.06	9.40	3.06
20	93.71	18.63	11.12
30	30.32	20.38	3.94
40	28.91	24.65	4.54
50	14.61	18.21	1.69
70	18.04	9.79	1.12
80	14.58	11.44	1.06

**2.3.4** 乙醇洗脱剂用量的考察。试验结果表明,浓度 40% 乙醇用量为 12 BV 时,能将总黄酮基本洗脱完全,洗脱液总黄酮达到 53.14%,洗脱率 30.23%。故确定浓度 40% 乙醇用量为 12 BV。

## 3 结论与讨论

桑白皮中黄酮类化合物是降血压的有效成分。因此,试验考察了 HP-20 型大孔树脂对桑白皮总黄酮富集纯化的工艺条件。试验优选乙醇浓度时,采用蒸馏水、浓度 40% 乙醇洗脱,测得浓度 40% 乙醇的洗脱液中总黄酮纯度达 31.36%,但是黄酮含量还没有达到 50%。继续分别用 3 BV 蒸馏水和浓度 15% 乙醇及 12 BV 浓度 40% 乙醇梯度洗脱,发现浓度 40% 乙醇的洗脱液中总黄酮纯度可达 52.95%。推测可能是 3 BV 蒸馏水和浓度 15% 乙醇能有效的洗去水溶性杂质和其他杂质,以提高总黄酮的相对含量。因此,最佳富集工艺为:上样量为 9 BV,依次用 3 BV 蒸馏水和浓度 15% 乙醇以 2 BV/h 流速冲洗,再用 12 BV 的浓度 40% 乙醇同样以 2 BV/h 流速洗脱,浓度 40% 乙醇的流出液中总黄酮含量由 31.36% 提高至 53.14%,样品总黄酮的洗脱率也提高到 30.23%。

HP-20 型大孔树脂具有吸附性强、解吸容易、再生后可反复使用等优点。因此,利用 HP-20 型大孔树脂对桑白皮总黄酮进行富集纯化既降低试验成本,又达到好的效果。

## 参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(下册)[S]. 上海:上海科学技术出版社, 2008:1963-1968.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:2 册 5 卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:520-533.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:279-281.
- [4] 周吉银,王稳,周世文. 桑的不药用部位药理学研究进展[J]. 中国新药与临床杂志,2009,28(12):895-899.
- [5] 李群. 桑白皮化学成分、质量控制、药理及炮制研究进展[J]. 齐鲁药事,2011,30(10):596-602.

**2.2.3 第三产业。**成都市林业第三产业整体开发水平较高。2010年全年第三产业产值为38.1亿元,占全市林产业总值的24.9%。第三产业虽然整体水平较高,但尚待开发的成熟森林旅游资源仍然存在,东部森林生态旅游需要加紧建设。

### 3 成都市林业产业可持续发展对策

**3.1 完善林业产业保障措施** ①加强产业发展总体规划,政府要在充分调研的基础上,根据市场需求、区域经济特点和林业产业现状,提出符合该市的产业发展方向,引导林业产业健康发展。②增强政策扶持力度,保证林业产业长期稳定发展,一方面建立完备的投融资体系,形成多元化投资格局,首先要加大政府资金投入,建立林业产业发展专项基金。充分发挥政府财政资金的引导功能,鼓励企业资金、民间资金和外资等社会资金流向林业产业开发项目,全面推进林业产业快速发展。另一方面给予必要的信贷支持,争取延长贷款期和宽限期,实行优惠利率,稳定财政贴息政策,落实林地、林木资源抵押政策。逐步把林业产业发展贷款纳入政策性银行贷款范围。

**3.2 加强科技支持力度** 提高科技含量是林业可持续发展的关键,因此必须强化科技在林业产业发展中的作用,促进林业产业科技创新,延长产业链。①抓好良种壮苗和树种结构调整,充分利用先进的技术,提高良种苗培育水平;②通过技术承包、技术转让、技术服务、联合开发、创办经济实体等形式,加快科技成果的转化;③研究高新技术改造传统的木材加工、制造、利用技术,尽快提升木材工业总体技术水平,增加木材和林产品的经济价值,增强市场竞争力<sup>[3]</sup>。

**3.3 科学决策树种配置** 在品种上要发展名特优新品种,做到“有、新、优”,既要注重乡土树种的培育,也要加强外来优良品种的引进,同时还要加强新品种的选育。在配置上要根据全市各个区域的特点、条件、经营方向对树种、树龄进行科学规划,以天然林的结构要素来发展林业产业,保证林地内不同树种、树龄的树木杂居生长,这样既可以保证物种多样性,还可以防止大规模的病虫害的发生,另外将不同树龄的树木种在一起可以在利用与更新培育相结合的基础上进行立体开发,短期、中期、长期发展兼顾,保证林地中树木资源的平衡利用,避免狭隘的发展。

**3.4 以现代理念拓展林业产业发展模式** 现代林业是多目标经营、多功能利用、多领域拓展、多效能发挥、多需求满足的林业,林业产业发展的领域和空间已不再局限于对森林和木质资源的利用,传统的木头经济已经不是林业产业的主体,需要用新视野拓展林业产业建设的新空间,开创林业产

业发展的新领域,要以林为主,林农结合,多种经营,逐步建成具有经济、生态和社会效益的林业产业发展模式,达到以林养林的目的。如实行林草结合、林药结合、林菌结合、林禽结合、林菜结合、林果结合、林粮结合等种植模式,提高林地产出和经济收益。

**3.5 提升产品质量,加强林业产业品牌建设** 企业要制订和实施品牌战略<sup>[4]</sup>,提升产品质量,加快新产品的研发,形成以名牌产品带动的产业发展机制,林业产业中的企业或产品一旦形成品牌,会有巨大的品牌效应,有助于消费者对延伸产品形成好感,减少新品牌导入市场的阻力和风险。另外,品牌扩展战略可以方便新产品的定位,缩短新产品被市场和消费者接受的时间,增强林业产业的竞争力。

**3.6 加强林业人才工作,提高林业产业参与者的素质** 科学技术的进步、科技成果的转化以及新产品的开发都需要专业人才<sup>[5]</sup>。目前成都市林业产业参与者多是农民,而农民与企业几乎是无法衔接的,林业产业发展迫切需要熟悉市场经济规律、懂法律、善经营、会管理、能创新的复合型人才和专业人才。要提高林业产业参与者的素质,必须立足现有人才,大力培养、引进紧缺和急需人才,加强培训,更新知识,提高队伍整体能力。①对基层林业技术人员开展培训,提高其推广应用林业科技成果的能力;②实施林农和林业技能人才培训工程,采取重点培训与普及教育相结合的方法,迅速提高林农生产经营的能力,一方面使其增强市场经济观念,提高对林产品生产、销售的决策能力,避免盲目的群体效应;另一方面使广大林农增强信息意识,教会林农获取信息、分析信息的方法,进而把握市场动向;③抓好关键岗位人员培训,提高其管理水平和综合素质。④开展工程管理和技术培训,培养大批熟悉工程项目管理,以及建设规划、工程设计、现场施工到检查验收各环节业务的林业工程管理人员和专业技术人员;⑤面向现有广大林业专业技术人员,还需要开展以林业新理论、新知识、新技术为重点的继续教育。

### 参考文献

- [1] 成都市林业和园林管理局. 成都市林业产业“十二五”总体规划[Z]. 2011.
- [2] 杨加猛,张智光. 论林业产业链的多维拓展思路[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(20): 10938 - 10940.
- [3] 黄福晶,王志明. 小议解决阻碍我国林业可持续发展的对策[J]. 黑龙江科技信息, 2009(4): 109 - 110.
- [4] 贾雷. 江苏林业产业链可持续发展评价与对策研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2008.
- [5] 国家林业局关于加强林业人才工作的意见[R]. 2005.
- [6] 徐有琪,潘正良,陈德传,等. 浅述开发利用生态能源促进林业可持续发展对策[J]. 内蒙古农业科技, 2011(3): 17 - 37.

(上接第9611页)

- [6] 史丽颖,于大永,冯宝民,等. 葫芦茶根和叶中化学成分定量分析[J]. 中草药, 2009, 40(S1): 289 - 292.
- [7] 黄志宏,蒋东旭,赖小平. 大孔吸附树脂法富集纯化荆芥穗总黄酮的工艺研究[J]. 中药材, 2010, 33(9): 1476.

- [8] 朱欣婷,刘云. 大孔树脂纯化无花果叶总黄酮[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 13.
- [9] 林红景,吴小娟,唐前,等. Diaion HP-20 富集纯化南山茶种种子抗原发埋骨骨质疏松有效部位的研究[J]. 中国药房, 2009, 20(3): 183.