

合欢花总黄酮的分离纯化工艺

张慧, 林龙飞, 杨培, 申明睿, 董晓旭, 张晋, 倪健*
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] **目的:** 优选大孔吸附树脂法纯化合欢花总黄酮的工艺参数。**方法:** 以合欢花总黄酮含量为指标, 通过单因素试验考察树脂型号、上样液质量浓度、洗脱剂种类及用量、除杂溶媒种类及用量等对大孔树脂纯化工艺的影响。**结果:** 采用 AB-8 型大孔树脂, 优选的纯化工艺为上样液质量浓度 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 上样量 2 BV, 用 4 BV 水洗除杂, 4 BV 10% 乙醇洗脱, 5 BV 50% 乙醇洗脱, 收集 50% 乙醇洗脱液, 总黄酮纯度达 34.62%。**结论:** 优选的工艺条件可较好地分离、纯化合欢花总黄酮。

[关键词] 大孔吸附树脂; 合欢花; 总黄酮; 分离纯化

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0027-03

[doi] 10.11653/syfy2013180027

Separation and Purification Technology of Total Flavonoids from Albiziae Flos by Macroporous Resin

ZHANG Hui, LIN Long-fei, YANG Pei, SHEN Ming-rui, DONG Xiao-xu, ZHANG Jin, NI Jian*
(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology parameters of total flavonoids from Albiziae Flos by macroporous resin. **Method:** With the content of total flavonoids as index, purification technology was optimized by investigating the concentration of sample liquid, type and amount of eluent, impurity solvent, et al. **Result:** Optimum purification technology was as following: 2 BV sample liquid ($0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) passed AB-8 resin, eluted impurities with 4 BV water and 4 BV 10% ethanol, eluted by 5 BV 50% ethanol, collected eluate, purity of total flavones was up to 34.62%. **Conclusion:** This optimized technology had a better separation and purification capacity for total flavonoids from Albizia julibrissin.

[Key words] macroporous resin; Albiziae Flos; total flavonoids; separation and purification

合欢花具有解郁安神、通络止痛之功效, 主要用于治疗心神不安、忧郁失眠、肝郁胸闷、忧而不乐^[1-2]。药理研究表明合欢花的水煎液及醇提取物均表现出显著的抗抑郁作用^[3]。合欢花中含有黄

酮、多酚、多糖等活性成分, 已分离纯化得到的黄酮类化合物包括槲皮苷、异槲皮苷、芦丁等^[4]。黄酮类化合物具有提高免疫力^[5]、镇静、抗抑郁^[6]、抗氧化自由基等作用。大孔树脂法已被广泛用于黄酮类化合物等植物活性成分的提取和分离, 易于工业化大生产^[7]。本实验以总黄酮含量为考察指标, 采用大孔树脂吸附法纯化合欢花总黄酮部位, 通过单因素试验优选纯化工艺参数, 为合欢花资源的充分利用提供依据。

1 材料

TU-1810 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), BT125D 型 1/万电子天平(赛多利斯)。玻璃柱(1.5 cm × 30 cm, 北京鑫科奥商贸有限公司), AB-8 型大孔吸附树脂(河北沧州宝

[收稿日期] 20130304(023)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81173563); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09103201-026); 北京中医药大学复方中药制药创新团队项目(2011-CX70-13)

[第一作者] 张慧, 在读硕士, 从事中药制剂新剂型及新技术研究, Tel: 15811413689, E-mail: linda47@yeah.net

[通讯作者] *倪健, 教授, 博士生导师, 从事中药制剂新剂型及新技术研究, Tel: 010-84738607, E-mail: njtem@263.net

恩化工有限公司), 槲皮苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 111538-200504), 无水三氯化铝(AlCl_3 , 天津市福晨化学试剂厂), 乙腈、甲醇为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水, 其他试剂均为分析纯。合欢花购自北京同仁堂饮片厂, 经北京中医药大学刘春生教授鉴定为豆科植物合欢 *Albizia julibrissin* Durazz. 的干燥花序。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 取槲皮苷对照品适量, 精密称定, 用甲醇溶解, 制成 $0.142 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 称取合欢花适量, 加 12 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 过滤, 合并滤液, 减压回收乙醇, 水浴蒸干, 残渣用适量甲醇溶解, 转移至 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.3 标准曲线的制备^[8] 精密吸取对照品溶液 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 各加入 5% AlCl_3 无水乙醇溶液 1.0 mL, 摇匀, 放置显色 5 min, 加甲醇至刻度, 摇匀。另外以溶剂及显色试剂为参比溶液, 于 425 nm 处测定吸收度(A), 以 A 为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y = 49.317X - 0.0096 (r = 0.9997)$, 槲皮苷质量浓度在 $0.142 \sim 42.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 A 呈良好线性关系。

2.1.4 稳定性试验 精密量取同一对照品溶液, 按 2.1.3 项下方法显色, 每间隔 5 min 测定 1 次 A, 结果放置 60 min 后 A 的 RSD 1.88%。

2.1.5 精密密度试验 取供试品溶液 1 份, 平行测定 6 次, 结果 A 的 RSD 0.27%, 表明仪器精密密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批合欢花样品, 按 2.1.2 项下方法制备 6 份供试品溶液, 测定, 结果 A 的 RSD 1.53%, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 称取同一批号合欢花 6 份, 每份约 0.12 g, 精密称定, 精密加入槲皮苷对照品 2.50 mg, 置具塞锥形瓶中, 精密加入稀乙醇 50 mL, 称定质量, 加热回流 30 min, 放冷, 称定, 用稀乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 按 2.1.2 项下方法制备供试液, 测定合欢花总黄酮含量, 计算平均回收率 99.83%, RSD 1.70%, 表明该方法回收率良好。

2.2 大孔树脂纯化工艺优选

2.2.1 大孔树脂预处理^[9] 用 95% 乙醇浸泡大孔

吸附树脂, 使之充分溶胀, 用 95% 乙醇冲洗至取流出液加水不显白色浑浊为止, 用水冲至无醇味备用。

2.2.2 大孔吸附树脂的选择^[10-12] 分别量取已处理好的 AB-8, D101, HPD-100 型大孔吸附树脂 2 g, 分别置于 50 mL 锥形瓶中, 各加入 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上样液 20 mL, 置于气浴恒温振荡器中振荡 24 h ($25 \text{ }^\circ\text{C}$, $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 用水洗涤树脂, 合并抽滤液及水洗液, 定容于 50 mL 量瓶中, 摇匀, 测定合欢花总黄酮含量, 计算合欢花总黄酮比吸附量分别为 21.22, 16.19, 17.93 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。取静态吸附水洗后的树脂, 各加入 80% 乙醇 20 mL, 振荡 24 h, 测定解吸液中总黄酮含量, 计算解吸率分别为 74.17%, 64.06%, 68.01%。结果表明 3 种大孔吸附树脂均对合欢花总黄酮有一定的吸附能力, 其中 AB-8 型大孔吸附树脂性能最佳, 同时 AB-8 型树脂对槲皮苷的吸附能力也很强^[9], 故选用 AB-8 型大孔吸附树脂纯化合欢花总黄酮。

2.2.3 上样液质量浓度考察 取生药质量浓度分别为 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的上样液 40, 20, 8, 4 mL, 分别过已处理好的 AB-8 型大孔树脂柱, 以 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速进行动态吸附, 水洗除杂质至 Molish 反应呈阴性, 加 80% 乙醇 5 BV 洗脱, 洗脱流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 收集乙醇洗脱液, 计算总黄酮转移率分别为 81.97%, 87.97%, 87.29%, 73.92%, 总黄酮纯度依次为 18.91%, 20.35%, 19.08%, 17.16%, 故选择上样液质量浓度 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.4 上样量考察 取已处理好的 AB-8 型大孔树脂约 15 mL, 湿法装柱, 吸取 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上样液过柱, 控制吸附流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 进行动态吸附, 分段接收流出液, 测定总黄酮含量, 绘制泄露曲线, 见图 1, 故确定上样量 2 BV。

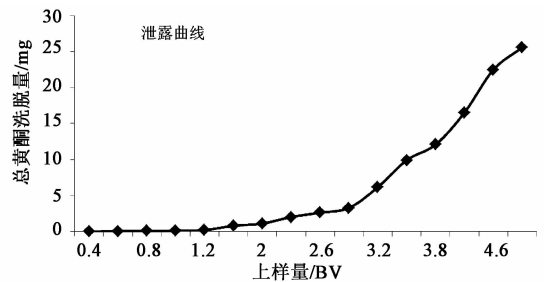


图 1 合欢花总黄酮的 AB-8 型大孔树脂纯化工艺泄露曲线

2.2.5 水洗体积考察 取已处理好的 AB-8 型大孔树脂约 20 mL, 装柱, 取 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上样液 2 BV 上样进行动态吸附, 加水洗脱, 用硫酸-苯酚法反应检测洗脱液, 观察颜色变化, 结果发现水洗至 4 BV 时, 洗液接近无色, 硫酸-苯酚法反应呈阴性。

2.2.6 乙醇洗脱曲线考察 取已处理好的 AB-8 型大孔树脂 4 份,每份 15 mL,分别量取上样液 2 BV 以 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 上柱,加 4 BV 水洗,洗脱液弃去,分别用体积分数 50%,60%,70%,80% 的乙醇梯度洗脱,洗脱速度 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,分段收集洗脱液,测定洗脱液中总黄酮含量,绘制洗脱曲线,见图 2,计算出膏率分别为 7.04%,7.71%,7.91%,8.22%,转移率分别为 91.41%,91.88%,89.67%,87.37%,合欢花总黄酮纯度分别为 21.87%,20.07%,19.10%,17.91%,故选择 50% 乙醇为洗脱溶剂,洗脱体积 5 BV。

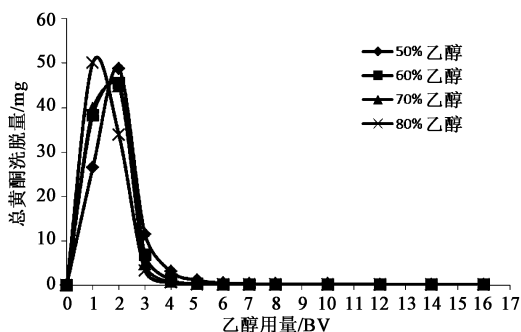


图 2 不同体积分数乙醇对合欢花总黄酮的 AB-8 型大孔树脂洗脱曲线

2.2.7 除杂乙醇体积分数及体积的确定 吸取上样液 2 BV 过 AB-8 型大孔树脂柱(1 BV = 15 mL),加 4 BV 水洗除杂,依次用 10% 乙醇,20% 乙醇,30% 乙醇洗脱至流出液颜色明显变浅,洗脱速度 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,分段收集洗脱液,每 BV 为 1 份,测定总黄酮含量,计算转移率及合欢花总黄酮纯度。结果表明当洗至 4 BV 时流出液颜色均明显变浅,故选择乙醇除杂洗脱体积为 4 BV。选择 20% 乙醇和 30% 乙醇为除杂溶剂时,合欢花总黄酮有一定量的泄漏,但出膏量(0.035,0.051,0.089 g)却未见显著上升,为达既除杂又避免总黄酮损失的效果,选择 10% 乙醇为除杂溶剂。

2.2.8 径高比考察 将已处理好的 AB-8 型树脂 4 份,分别装柱,树脂径高比分别为 1/6,1/7,1/8,1/10。分别吸取 2 BV 上样液以 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 上样,按优选的纯化参数进行洗脱,收集 50% 乙醇洗脱液,测得总黄酮纯度分别为 34.72%,33.35%,35.50%,34.88%,转移率分别为 76.09%,78.63%,77.11%,76.54%,故选择树脂径高比 1/8。

2.3 验证试验 取合欢花总黄酮上样液 3 份,按上述优选的工艺条件进行验证试验,测定洗脱液中总黄酮含量,计算平均出膏率 4.43% (RSD 0.48%),总黄酮平均纯度 34.62% (RSD 0.23%),平均转移

率 88.21% (RSD 0.60%),表明优选的纯化工艺条件稳定可行。

3 讨论

合欢花中总黄酮含量不高,富集合欢花总黄酮存在一定困难。采用大孔吸附树脂分离、纯化合欢花总黄酮,总黄酮纯度达 34.62%,通过 HPLC 测得槲皮苷纯度 20.03%^[1,13-14],为进一步开发和利用合欢花总黄酮提供参考。

[参考文献]

- [1] 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,2010:135.
- [2] 李作平,张媚丽,毛知娟,等. 中药合欢花抗抑郁活性部位的初步筛选研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(8):1388.
- [3] 李作平,赵丁,任雷鸣,等. 合欢花抗抑郁作用的药理实验研究初探[J]. 河北医科大学学报,2003,24(4):214.
- [4] 耿红梅. 合欢花黄酮类化学成分的研究[J]. 衡水学院学报,2011,13(1):28.
- [5] 唐浩国,魏晓霞,李叶,等. 竹叶黄酮对小鼠脾细胞免疫的分子机制研究[J]. 食品科学,2007,28(9):523.
- [6] 李云峰,杨明,袁莉,等. 槲皮素-3-芹菜糖基芦丁糖甙对小鼠的抗抑郁作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2000,14(2):125.
- [7] 张旭,王锦玉,全燕,等. 大孔树脂技术在中药提取纯化中的应用及展望[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):286.
- [8] 康健,李作平,沈立茹. 正交试验法优选合欢花提取工艺的研究[J]. 中成药,2007,29(6):902.
- [9] 黄月纯,黄樱华,刘翠玲,等. 大孔吸附树脂纯化侧柏叶总黄酮的工艺研究[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(1):75.
- [10] 董华群,张英慧,黄剑波,等. 荔枝黄酮提取和大孔树脂分离及其组分的 HPLC 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):111.
- [11] 方红英,庄让笑,王福根,等. 大孔树脂制备岩柏草总黄酮及其含量测定[J]. 中华中医药学刊,2011,29(12):2796.
- [12] 王丽婷,王丽娟. 大孔树脂分离纯化金银花叶中的总黄酮[J]. 华西药学杂志,2010,25(5):575.
- [13] 俞建平,马临科,郑建宝. HPLC 测定合欢花中槲皮苷的含量[J]. 中国现代应用药学,2008,25(6):539.
- [14] 徐建兰. 合欢花和合欢米中槲皮苷含量比较[J]. 中国药业,2012,21(12):43.

[责任编辑 全燕]