

大孔吸附树脂分离纯化芫花黄酮苷元工艺研究

夏林波, 李博, 邓仕任*, 贾天柱, 英锡相
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的: 研究考察大孔吸附树脂用于芫花中 2 种主要黄酮苷元-芹菜素和芫花素的分离纯化效果。方法: 采用静态和动态吸附法, 利用高效液相对芹菜素和芫花素进行定量分析, 筛选最佳分离纯化工艺。结果: 最佳工艺条件为 AB-8 树脂, 上样液的质量浓度 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 吸附流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 上样体积 5 BV。再以 $9 \text{ BV} \text{ 95\% 乙醇}$ 洗脱, 洗脱流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 体积 9 BV。经树脂处理后 2 种黄酮苷元纯度均达到 20% 以上。结论: 大孔树脂对芫花中芹菜素和芫花素具有较好分离纯化效果, 优选工艺操作简单、稳定可行。

[关键词] 大孔吸附树脂; 芫花; 芹菜素; 芫花素

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0013-04

Studies on Separation and Purification of Flavonoid Aglycone from Flos Genkwa by Macroporous Adsorption Resin

XIA Lin-bo, LI Bo, DENG Shi-ren*, JIA Tian-zhu, YING Xi-xiang

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the purification method of two main flavonoid aglycones (apigenin and

[收稿日期] 20101223(011)

[基金项目] 辽宁中医药大学药学人才基金 (yxrc0916)

[第一作者] 夏林波, 博士, 讲师, 从事中药药效物质基础研究及中药质量评价研究, Tel: 0411-87586006, E-mail: xialb@lnutcm.edu.cn

[通讯作者] * 邓仕任, 博士, 副教授, 从事中药药效物质基础研究及中药质量评价研究, Tel: 0411-87586007, E-mail: dengsr@lnutcm.edu.cn

分数, 结果分别为 2.12, 3.16, 3.86 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

由结果可知, 洗脱溶剂的用量为 12 倍的吸附原液体积时洗脱效果最好, 但综合考虑洗脱溶剂用量及回收溶剂等因素, 最后选 8 倍量 (40 mL) 的洗脱溶剂。

2.4.5 工艺验证试验 取 $0.25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 四逆散吸附原液 5 mL, 通过 15 mL 阳离子树脂, 用 4% 氨水乙醇 (含乙醇 50%) 40 mL 洗脱, 其余按照 **2.3.2.1** 和 **2.3.2.2** 项下操作, 测定 3 份样品的平均总生物碱质量分数为 $3.73 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 说明工艺稳定、可行。

3 讨论

曾采用 HPLC 测定四逆散中辛弗林的含量, 由于辛弗林保留时间短, 流动相常加入缓冲盐和十二烷基磺酸钠等离子对试剂^[5], 不容易平衡, 对色谱柱

也有损害。UV 法简单经济, 且能反映四逆散中多种生物碱的含量, 故试验选择了本法。

[参考文献]

- [1] 陈长勇. 四逆散的临床应用[J]. 陕西中医, 2002, 23(11): 1039.
- [2] 王伟, 毕宏伟. 四逆散的临床应用进展[J]. 中医药信息, 2006, 23(5): 56.
- [3] 彭国平, 牛贺明, 徐丽华. 枳实活性成分的研究[J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2001, 17(2): 91.
- [4] 孙静, 张明, 张小飞. 延胡索总生物碱纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 40.
- [5] 中国药典. 一部[S]. 2010: 230.

[责任编辑 仝燕]

genkwanin) from Flos Genkwa by macroporous resin. **Method:** HPLC was used to determine the content of apigenin and genkwanin, and the purification conditions were selected by static and dynamic adsorption. **Result:** AB-8 resin was selected because it gave the most effective of separation. The optimum process for the purification was as follows: the concentration of sample solution was $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the dosage was 5 BV, adsorption flow rate was $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, and eluted with 95% ethanol by 9 BV, elution flow rate was $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$. The purity of two flavonoid aglycones was more than 20% after processing. **Conclusion:** Apigenin and genkwanin were purified effectively with macroporous resin. The optimum process is simple, stable and feasible.

[**Key words**] macroporous adsorption resin; Flos Genkwa; apigenin; genkwanin

中药芫花为瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾, 为泻下逐水药, 具有泻水逐饮、解毒杀虫的功效^[1]。近年来研究表明, 芫花中的黄酮成分具有多种药理活性^[2-3], 值得深入研究及进一步开发。大孔树脂吸附是一种广泛应用于天然产物成分提取的方法, 具有成本低、效率高、毒性低等特点^[4-5]。目前大孔树脂用于芫花黄酮成分, 特别是黄酮苷元的分离纯化研究较少, 本试验首次考察了大孔树脂用于分离纯化芫花中主要黄酮苷元成分——芹菜素及芫花素的工艺条件, 为芫花黄酮成分的分离制备和开发利用提供科学依据及参考资料。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪, 包括在线真空脱气机、低压四元梯度泵、柱温箱、紫外检测器、Agilent LC 色谱工作站(美国安捷伦科技有限公司), AR2140 型电子分析天平(上海力能电子仪器有限公司), Milli Q 型纯水系统(美国密理博公司), U-3010 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。

芫花药材经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为瑞香科植物 *D. genkwa* 的干燥花蕾, 芫花素对照品(中国中医科学院中药研究所毛淑杰研究员提供, 自制, 纯度大于 95%), 芹菜素对照品(中国药品生物制品检验所, 批号 11191-201002), HP-20(日本三菱化学株式会社), D-312(山东鲁抗立科药物化学有限公司), DM-301, HPD-600, AB-8 树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司), 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件 Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水(80:20), 检测波长 338 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 精密吸取 10

μL 样品溶液注入色谱仪, 测定峰面积, 计算样品中芹菜素、芫花素含量。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取芹菜素、芫花素对照品 1.04, 1.06 mg, 置于同一 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解至刻度, 作为混合对照品溶液(芹菜素 $104 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 芫花素 $106 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2.1.3 线性关系考察 取混合对照品溶液 2, 4, 8, 16, 20 μL , 注入高效液相色谱仪中, 按 2.1 项下色谱条件测定色谱峰面积, 以进样量为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y) 作图, 得回归方程分别为芹菜素 $Y = 2935X + 284.3 (r = 0.9996)$, 线性范围 0.208 ~ 2.08 μg ; 芫花素 $Y = 3216X - 68.59 (r = 0.9997)$, 线性范围 0.212 ~ 2.12 μg 。

2.1.4 芫花样品的含量测定 精密吸取芫花样品溶液 10 μL , 注入高效液相色谱仪中, 按 2.1 项下色谱条件测定色谱峰面积, 按 2.3 项下计算芹菜素、芫花素的含量。

2.2 大孔树脂的筛选

2.2.1 药材浸膏的制备 取芫花药材粉末(过 40 目筛)500 g, 加 10 倍量 95% 乙醇回流提取 0.5 h, 过滤, 取滤液, 滤渣重复回流提取 2 次, 合并 3 次滤液后减压蒸干溶剂, 得芫花药材浸膏, 备用。

2.2.2 大孔树脂的预处理 5 种型号的大孔树脂依次用 3 BV 3% NaOH 水溶液浸泡 24 h, 去离子水洗至中性, 3 BV 3% 盐酸溶液浸泡 24 h, 用去离子水冲洗至中性, 2 BV 95% 乙醇浸泡 12 h, 用 95% 乙醇冲洗, 至流出乙醇液与水混合不产生白色浑浊为止, 用足量的去离子水洗至无醇味备用。

2.2.3 树脂型号的选择 采用静态吸附、静态解析法进行树脂的筛选。等量称取 5 份浸膏(每份相当于 5 g 生药, 含芹菜素 16.04 mg, 芫花素 13.70 mg), 分别以 50 mL 水溶解, 加入 5 种处理好的大孔树脂各 1 g, 适时振摇, 浸泡 24 h 后, 分别吸取上层液测

定芹菜素和芫花素的含量,计算饱和吸附量和吸附率;将静态吸附后的树脂过滤抽干,各加入 50 mL 95% 乙醇解析,测定解析液中芹菜素和芫花素的含量,计算解析率。结果见表 1,2。

饱和吸附量 = (上样液黄酮质量 - 吸附后剩余液黄酮质量) / 树脂质量

吸附率 = (上样液黄酮质量 - 吸附后剩余液黄酮质量) / 上样液黄酮质量 × 100%

解析率 = 解析液黄酮质量 / 饱和吸附量 × 100%

表 1 不同型号大孔树脂对芹菜素吸附、解析性能的比较

树脂型号	饱和吸附量 /mg·g ⁻¹	吸附率 /%	解析率 /%
HP-20	5.08	31.7	89.9
D-312	2.86	17.8	78.1
AB-8	9.75	60.8	73.8
DM-301	6.24	38.9	63.9
HPD-600	6.70	41.8	66.3

表 2 不同型号大孔树脂对芫花素吸附、解析性能的比较

树脂型号	饱和吸附量 /mg·g ⁻¹	吸附率 /%	解析率 /%
HP-20	3.99	29.1	96.3
D-312	1.75	12.8	92.8
AB-8	7.18	52.4	48.8
DM-301	4.29	31.3	80.8
HPD-600	6.96	50.8	56.3

由表 1,2 可知,弱极性的 AB-8 大孔树脂,对芹菜素和芫花素均有较好的吸附和解析能力,故选择 AB-8 树脂对芫花黄酮苷元进行分离纯化。

2.3 AB-8 大孔树脂柱色谱纯化黄酮苷元的工艺研究

2.3.1 上样液浓度的优化 等量称取 3 份浸膏(每份相当于 5 g 生药),分别加水溶解为相当于生药材 0.05,0.10,0.20 g·mL⁻¹ 溶液,加至 10 mL AB-8 树脂柱上,以 1 BV·h⁻¹ 流速吸附,继用 5 BV 蒸馏水以 2 BV·h⁻¹ 流速冲脱,弃去水洗部分,再用 5 BV 95% 乙醇以 1 BV·h⁻¹ 洗脱,收集乙醇洗脱液,测定洗脱液中芹菜素、芫花素的质量浓度,计算转移率,结果随着上样液浓度的增大,芹菜素转移率分别为 72.3%,82.7%,56.7%;芫花素转移率依次为 49.6%,52.6%,44.6%。由结果可知,当上样浓度相当于生药 0.10 g·mL⁻¹ 时药液转移率最高,效果最好。

转移率 = 洗脱液黄酮质量 / 上样液黄酮质量 × 100%

2.3.2 上样流速的优化 等量量取 0.10 g·mL⁻¹ (生药质量浓度)芫花样品溶液 50 mL,共 4 份,上大孔树脂柱,分别以 1,2,3,4 BV·h⁻¹ 流速吸附,继用 5 BV 蒸馏水以 2 BV·h⁻¹ 流速冲脱,弃去水洗部分,再用 5 BV 95% 乙醇以 1 BV·h⁻¹ 洗脱,测定洗脱液中芹菜素、芫花素的质量浓度,计算转移率,结果芹菜素转移率分别为 82.7%,82.9%,78.3%,65.1%;芫花素转移率依次为 52.6%,52.3%,44.5%,34.9%。由结果可知,当上样流速为 1~2 BV·h⁻¹ 时转移率较高,综合考虑采用 2 BV·h⁻¹ 吸附流速。

2.3.3 泄露曲线考察 取 0.10 g·mL⁻¹ 芫花样品溶液 200 mL,以 2 BV·h⁻¹ 的流速上样到 10 mL AB-8 树脂柱上,以每 1 BV 为 1 个流分,连续接取。对流分进行检测,以流出液体积为横坐标,以每份流出液中的芹菜素、芫花素质量浓度为纵坐标绘制泄露曲线,结果见图 1。

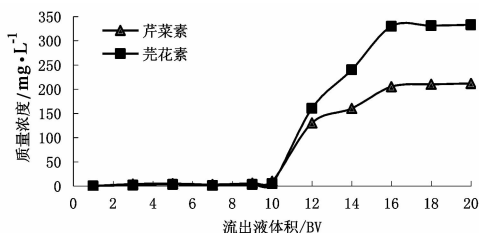


图 1 芫花样品泄露曲线

根据泄露曲线可知,当上样量达到 10 BV 时,芹菜素和芫花素均开始泄露,且均在 16 BV 时达到吸附饱和。综合考虑上样量为 2:1 (大孔树脂:生药量)。

2.3.4 洗脱剂考察 量取 0.10 g·mL⁻¹ 芫花样品溶液 50 mL,以 2 BV·h⁻¹ 的流速上样到 10 mL AB-8 树脂柱上,吸附后,依次用 10 BV 10%,20%,35%,40%,45%,50%,60%,65%,70%,95% 乙醇洗脱,于高效液相测定吸附洗脱液中芹菜素、芫花素的含量,计算累积转移率,结果见图 2。

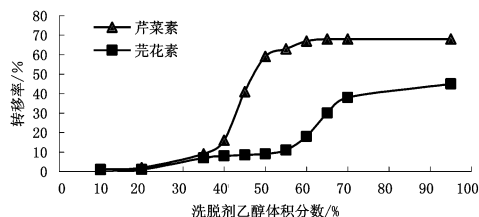


图 2 不同洗脱剂的洗脱曲线

由图 2 可知,70% 乙醇洗脱液可基本洗脱芹菜

素,但芫花素要 95% 乙醇方可洗脱完全,因此选用 95% 乙醇洗脱。此外,由图 2 还可知,20% 乙醇洗脱液中黄酮苷元极少,可用于除杂洗脱剂。

2.3.5 除杂洗脱剂用量考察 将吸附饱和的 10 mL AB-8 树脂以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速经 20% 乙醇洗脱,按树脂床体积数收集流出液,于高效液相测定洗脱液中主要杂质峰(主要为黄酮苷类物质)面积。结果显示,洗脱量为 20 BV 时杂质峰浓度不再降低,且黄酮苷元损失较少,故确定除杂洗脱体积为 20 BV。

2.3.6 洗脱流速的考察 等量量取 $0.10 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (生药质量浓度)芫花样品溶液 50 mL,共 4 份,上大孔树脂柱,以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速吸附,继用 20 BV 20% 乙醇以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱除杂,再用 10 BV 95% 乙醇分别以 1,2,3,4 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱,测定洗脱液中芹菜素、芫花素的浓度,计算转移率,结果芹菜素转移率分别为 84.9%,86.5%,72.3%,65.1%;芫花素转移率依次为 63.4%,70.3%,51.5%,34.9%。由结果可知,当洗脱流速为 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 时转移率最高,综合考虑采用 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱流速。

2.3.7 洗脱曲线的考察及洗脱终点的确定 将芫花提取液按照上述所确定的吸附和洗脱条件,进行上柱、吸附和洗脱,以每 1 BV 为 1 个流分,连续接取。对流分进行检测,以流出液体积为横坐标,以每份流出液中的芹菜素、芫花素的质量浓度为纵坐标绘制洗脱曲线,结果见图 3。

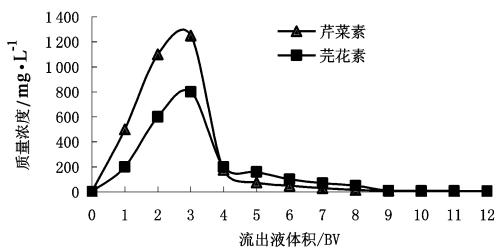


图 3 2 种成分的乙醇洗脱曲线

由图 3 可知,用 9 BV 的 95% 乙醇可基本将芹菜素、芫花素洗脱完全。

2.3.8 大孔树脂纯化工艺的确定 取 $0.10 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 芫花样品溶液 50 mL,以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速吸附上柱(柱床体积 10 mL),继用 20 BV 20% 乙醇以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱除杂,再用 9 BV 95% 乙醇以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速

洗脱,收集洗脱液减压浓缩至干,即得芫花黄酮苷元精提物。

2.3.9 验证试验 等量称取 3 份浸膏(芹菜素、芫花素的质量分数分别为 19.8% 和 13.5%)配置成 $0.10 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 样品溶液,按 2.3.8 项下方法进行分离纯化试验。所得芫花黄酮苷元精提物中芹菜素质量分数分别为 29.4%,32.7%,31.5%;芫花素质量分数依次为 20.1%,21.9%,20.8%。由结果可见,经 AB-8 大孔树脂处理后的 2 种黄酮苷元含量均可达 20% 以上,达到了富集纯化的效果,且具有良好的重现性。

3 讨论

AB-8 型为一种弱极性的大孔树脂,该树脂对黄酮类化合物的选择性较好,适合对黄酮苷元类物质进行纯化^[6]。本试验通过对不同型号树脂的静态筛选,进一步证明了 AB-8 型树脂对芹菜素和芫花素具有较好的吸附和解析性能。

本试验以芹菜素和芫花素的含量为指标,采用单因素试验法确定最终纯化工艺,经本法处理后 2 种黄酮苷元纯度均达到 20% 以上,本研究同时为进一步分离得到较高纯度的芹菜素及芫花素单体提供了前期工艺路线及工艺优化条件参考。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:148.
- [2] 魏志文,高晓雯,郑维发.芫花根总黄酮抗肿瘤活性研究[J].解放军药学学报,2008,24(2):116.
- [3] 李玲芝,宋少江,高品一.芫花的化学成分及药理作用研究进展[J].沈阳药科大学学报,2007,24(9):587.
- [4] 杨荣平,王宾豪,方艾权,等.大孔树脂分离葛根总黄酮工艺优化[J].中成药,2004,26(10):784.
- [5] 曾永长,梁少瑜,邢学峰,等.白花蛇舌草总黄酮的大孔树脂纯化工艺[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(18):26.
- [6] 于智峰,王敏.大孔吸附树脂在黄酮类化合物分离中的应用[J].中药材,2006,29(12):1380.

[责任编辑 全燕]