

聚酰胺-大孔树脂联用富集苦参总黄酮

张 蕾¹, 廖琼峰^{1*}, 谢智勇², 冯志强², 曾元儿¹

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 中山大学药学院, 广东 广州 510080

摘要: 目的 寻找一种有效富集苦参总黄酮的方法并对工艺条件进行初步探索。方法 样品溶液以聚酰胺吸附, 水洗除杂, 将除杂后的聚酰胺加于大孔吸附树脂顶部, 以一定体积分数的乙醇溶液洗脱富集总黄酮。结果 聚酰胺与 AB-8 大孔树脂联用能有效富集总黄酮, 且可与其生物碱类成分有效分离。最佳工艺条件为浸膏与聚酰胺比为 1:1, 与树脂比为 1:3, 以 80% 乙醇洗脱, 收集洗脱液 3 BV, 富集总黄酮质量分数 (53.6 ± 2.2)%, 收率为 (72.1 ± 3.7)%。结论 该方法优于目前常用的黄酮富集方法, 且工艺简单, 具有良好的应用前景。

关键词: 苦参; 总黄酮; 生物碱; 富集方法; 聚酰胺-大孔树脂联用

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)10-1968-05

Enrichment of total flavonoids from *Sophora flavescens* with polyamide-macroporous resin

ZHANG Lei¹, LIAO Qiong-feng¹, XIE Zhi-yong², FENG Zhi-qiang², ZENG Yuan-er¹

1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Abstract: **Objective** To explore the enriching method for the total flavonoids from *Sophora flavescens* with polyamide-macroporous resin. **Methods** Polyamide adsorbed with sample was washed with water first to eliminate the impurities and then was loaded on the top of macroporous resin. The total flavonoids were enriched by eluting with ethanol. **Results** AB-8 resin combined with polyamide could effectively enrich the total flavonoids and separate them thoroughly from the alkaloid compounds. The preferred condition for the procedure was as following: the weight of polyamide and dry AB-8 resin was one and three times of the extract weight (1:1 and 1:3), respectively. The volume of 80% ethanol for elution was 3 times of the column volume. The purity of total flavonoids reached to (53.6 ± 2.2)% and the recovery rate was (72.1 ± 3.7)%. **Conclusion** The method is not only superior to the others for enriching total flavonoids but also more convenient, which has a good application foreground.

Key words: *Sophora flavescens* Ait.; total flavonoids; alkaloids; enriching method; polyamide-macroporous resin

苦参为豆科槐属植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根, 具有清热燥湿、祛风杀虫之功效。临床上主治热痢便血、黄疸尿闭、湿毒疮疡等症^[1]。植物化学研究表明, 苦参中的药效成分主要为生物碱和黄酮两大类, 且黄酮类化合物结构中大部分存在异戊烯基侧链^[2]。黄酮的异戊烯基化增加了化合物的亲脂性, 使其在生物体内更容易通过细胞膜达到靶器官^[3-4]。目前, 国内外对苦参黄酮类化合物的

研究十分活跃^[5-6], 但关于其总黄酮的富集和纯化研究报道较少^[7-9]。笔者对苦参总黄酮的溶解性进行了考察, 结果表明有相当部分的黄酮类成分难溶于水, 这使得目前以大孔吸附树脂为主体的纯化方法^[10]很难对这部分黄酮进行富集和纯化。本实验首次对聚酰胺-大孔树脂联用技术进行了探讨, 解决了水难溶性黄酮类成分的上样问题, 并使富集物纯度大幅度提高, 其效果优于目前常用的黄酮纯化技术。

收稿日期: 2010-12-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30901953); 国家教育部新教师基金项目 (20094425120001); “重大新药创制”国家科技重大专项 (2009ZX09304-003, 2009ZX09501-017)

作者简介: 张 蕾, 讲师, 博士, 研究方向为中药药效物质基础和中药药理学。

Tel: (020)39358081 13418063060 E-mail: zhanglei261291@yahoo.com.cn

*通讯作者 廖琼峰 Tel: 13729840080 E-mail: liaoqf2075@yahoo.com

1 仪器与材料

UV—2100 型紫外可见分光光度计 (上海龙尼柯仪器有限公司); XS225A型分析天平 (瑞士普利赛斯公司); GKC21CR4 可控硅恒温水浴锅 (上海锦屏仪器仪表有限公司); NKA-II、DM-301、DM-130、NKA-9、AB-8、D-101 大孔吸附树脂 (天津市海光化工有限公司), 柱色谱用聚酰胺 (60~90 目); 槐属二氢黄酮G对照品 (自制, 质量分数>98.0%), 苦参药材购自广州致信药业有限公司, 经广州中医药大学药用植物学教研室周劲松副教授鉴定为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根; 所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 分析方法

2.1.1 对照品溶液的制备 取槐属二氢黄酮G对照品适量, 精密称定, 用70%乙醇溶解并稀释成含槐属二氢黄酮G 58 μg/mL 的对照品溶液。

2.1.2 线性关系考察 精密吸取槐属二氢黄酮G对照品溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL, 分别置6个加有300 mg 镁粉的具塞刻度试管中。将试管置冷水浴 (15 ℃左右) 中, 缓慢滴加浓盐酸 3 mL, 并不时振摇试管。加70%乙醇补足至10 mL, 摇匀, 置沸水浴中加热60 min, 迅速冷却至室温, 补足体积至10 mL。在478 nm处测定槐属二氢黄酮G的吸光度 (*A*) 值。以 *A* 值为纵坐标, 质量浓度为横坐标进行线性回归, 得回归方程: $Y=0.026\ 2\ X-0.004\ 9$, $r=0.999\ 8$ 。结果表明槐属二氢黄酮G在5.8~29.0 μg/mL 与 *A* 值呈良好线性关系。

2.1.3 供试品溶液的制备及测定方法 取苦参药材粉末 (40 目) 适量, 于80 ℃水浴中用20倍量80%乙醇回流提取1.0 h, 滤过, 减压回收溶剂。残渣用80%乙醇溶解, 并稀释至终质量浓度为0.1 g/mL (按浸膏量计), 作为上柱供试液, 并按照文献方法^[11]测定药材中总黄酮的量为 (2.01±0.13) %。

2.2 聚酰胺-大孔树脂联用富集法

2.2.1 聚酰胺洗脱分析 精密量取上柱供试液适量 (约相当于2.0 g 浸膏), 拌入2 g 干燥聚酰胺粉末, 挥去溶剂后置于小渗漉筒中, 依次用水及20%、40%、60%、80%、95%乙醇洗脱, 分别收集洗脱液6 BV, 将洗脱液干燥后称质量, 计算洗脱液中总固形物的量, 并测定洗脱液中总黄酮的量, 计算总黄酮质量分数及收率。另取上柱前供试液, 干燥称质量, 并测定相应指标。结果见表1。

总固形物收率=洗脱液固形物量/上柱前药液固形物量
总黄酮质量分数=洗脱液中总黄酮量/洗脱液固形物量
总黄酮收率=洗脱液中总黄酮量/上柱前药液中总黄酮量

表1 聚酰胺洗脱分析
Table 1 Elution of polyamide

样 品	总固形物 收率/%	总黄酮		硅钨酸 反应
		质量分数/%	收率/%	
上柱前药液	100.00	8.42	100.00	+
水洗脱液	67.00	0.32	2.53	+
20%乙醇洗脱液	2.57	10.80	3.31	—
40%乙醇洗脱液	5.76	14.00	9.56	—
60%乙醇洗脱液	15.60	34.20	63.30	—
80%乙醇洗脱液	7.84	7.31	6.81	—
95%乙醇洗脱液	1.13	3.80	0.51	—

结果表明, 药液以聚酰胺吸附, 通过分段洗脱, 黄酮类可与生物碱类成分有效分离, 且黄酮类可得到初步富集。其中, 生物碱类和干扰性杂质主要集中在水洗脱部分, 20%~80%乙醇洗脱液中可回收85%的总黄酮而总固形物降至31%。因此, 药液经聚酰胺吸附后, 可先用水洗脱除去生物碱和大量水溶性杂质, 再采用适宜方法纯化、富集。

2.2.2 大孔树脂型号筛选 取等量不同型号大孔树脂, 预处理后装柱。供试品溶液6等份分别拌入相同量的聚酰胺粉末 (经计算上样液中所含总黄酮量均小于预试验中各树脂吸附量), 挥去溶剂后置于小渗漉筒中, 以等量水洗脱至流出液近无色 (6 BV)。将水洗脱后的聚酰胺分别置于预先以水为填充溶剂的大孔树脂柱上部, 用70%乙醇洗脱, 收集70%醇洗脱液6 BV。测定洗脱液中总黄酮的量及固形物的量, 计算总黄酮质量分数和收率, 并进行综合评分。结果见表2。利用大孔树脂吸附和分子筛的双重作用, 经聚酰胺初步精制的供试溶液进入大孔树脂柱后将得到进一步分离纯化。由表2可知, 非极性及弱极性树脂对苦参黄酮富集程度较高。6种树脂中AB-8在总黄酮质量分数和收率方面效果最好, 因此, 选用AB-8为试验优选树脂。

综合评分=总黄酮收率×0.5+总黄酮质量分数×0.5

2.2.3 大孔树脂洗脱溶剂的初步考察 精密量取供试品溶液适量 (约相当于2.0 g 浸膏), 拌入2.0 g 干燥聚酰胺粉末, 挥去溶剂后, 置于小渗漉筒中, 以水洗至流出液近无色 (6 BV) 后置于预先以水为溶剂填充的AB-8大孔吸附树脂柱上部, 依次用

20%、40%、60%、80%、95%乙醇洗脱,分别收集洗脱液 6 BV,测定洗脱液中固形物量和总黄酮量,计算黄酮质量分数和收率,另取上柱供试液测定相应指标。结果见表 3。

表 2 7 种型号大孔吸附树脂对苦参总黄酮洗脱效果的考察
Table 2 Elution for total flavonoids on seven kinds of macropous resins

树脂型号	总黄酮		综合评分
	质量分数/%	收率/%	
NKA-II	40.0	47.1	43.6
DM-301	42.6	60.2	51.4
DM-130	51.1	66.0	58.5
NKA-9	45.5	70.7	58.1
D-101-1	46.9	62.4	54.7
AB-8	50.2	70.2	60.2
D-101	47.9	65.9	56.9

表 3 AB-8 树脂梯度洗脱分析

Table 3 Gradient elution on AB-8 macropous resin

样 品	固形物得率/%	总黄酮	
		质量分数/%	收率/%
上柱前药液	100.00	8.42	100.00
20%乙醇洗脱液	1.31	4.68	0.73
40%乙醇洗脱液	2.41	32.60	9.33
60%乙醇洗脱液	5.88	63.90	44.60
80%乙醇洗脱液	3.42	46.90	19.00
95%乙醇洗脱液	1.03	3.10	0.38

结果表明,供试液经聚酰胺初步精制后再通过大孔树脂柱,40%~80%乙醇洗脱部分总固形物得率仅为 12%,总黄酮收率达 73%,并在 60%乙醇洗脱部分富集程度最高。根据洗脱溶剂初步考察结果,拟定弃去 20%乙醇洗脱部分,进一步筛选 60%、70%、80%乙醇洗脱效果,以确定最佳洗脱溶剂。

2.2.4 最佳洗脱溶剂的选择 精密量取供试品溶液 3 份,分别拌入等量干燥聚酰胺粉末中,挥去溶剂后,置于 3 个小渗漉筒中,用水洗至流出液近无色(6 BV)后分别置于预先以 20%乙醇为填装溶剂 AB-8 大孔吸附树脂柱上部,弃去 20%乙醇洗脱部分后,分别用 60%、70%、80%乙醇洗脱,收集洗脱液各 6 BV,测定洗脱液中固形物量和总黄酮量,计算黄酮质量分数和收率。结果(表 4)表明,不同体积分数乙醇洗脱效果的综合评分为:80%乙醇>

表 4 不同洗脱溶剂洗脱效果考察

Table 4 Elution of different eluents

样 品	总黄酮		综合评分
	质量分数/%	收率/%	
60%乙醇洗脱液	57.5	52.9	55.2
70%乙醇洗脱液	52.2	69.8	61.0
80%乙醇洗脱液	52.9	74.9	63.9

70%乙醇>60%乙醇,故确定 80%乙醇为最佳洗脱溶剂。

2.2.5 浸膏与聚酰胺用量比的确定 精密量取供试品溶液 4 份,各供试液用相应量的聚酰胺粉末拌匀,使供试液所对应浸膏-聚酰胺用量比分别为 0.5:1、1:1、2:1、3:1,相同量水洗脱后,置树脂柱上部,分别置于预先以 20%乙醇为填装溶剂、等量的 AB-8 大孔吸附树脂柱上部,弃去 20%乙醇洗脱部分后,以 80%乙醇洗脱,分别收集洗脱液 6 BV,测定洗脱液中固形物量和总黄酮量,计算总黄酮质量分数和收率。结果(表 5)表明,浸膏和聚酰胺比为 1:1 时,苦参总黄酮的质量分数和收率最高,说明:(1)聚酰胺对总黄酮的吸附性较大,当浸膏-聚酰胺用量比小于 1:1 时,洗脱过程中游离的聚酰胺吸附位点可造成黄酮类成分的损失;(2)当浸膏-聚酰胺用量比大于 1:1 时,由于聚酰胺对黄酮和杂质的吸附和截留同时减少,使在水洗脱除杂过程中,大量黄酮流失,致使黄酮质量分数和收率均下降。综上确定浸膏和聚酰胺的用量比为 1:1。

表 5 浸膏-聚酰胺用量比考察结果

Table 5 Ratio of extract to polyamide

浸膏-聚酰胺	总黄酮		综合评分
	质量分数/%	收率/%	
0.5:1	53.7	71.9	62.8
1:1	53.5	75.3	64.4
2:1	52.3	63.0	57.6
3:1	48.8	57.5	53.1

2.2.6 浸膏与大孔树脂用量比的确定 精密量取供试品溶液 4 份,拌合等量的聚酰胺粉末,水洗脱后,分别置于 AB-8 大孔吸附树脂柱上部,使其浸膏-干树脂的用量比分别为 1:2、1:3、1:4、1:5,弃去 20%乙醇洗脱部分后,以 80%乙醇洗脱,分别收集洗脱液 6 BV,测定洗脱液中固形物量和总黄酮量,计算总黄酮质量分数和收率。结果(表 6)表

表 6 浸膏与干树脂用量比考察结果

Table 6 Ratio of extract to macroporous resin

浸膏-干树脂	总黄酮		综合评分
	质量分数/%	收率/%	
1 : 2	51.3	70.9	61.1
1 : 3	54.1	72.9	63.5
1 : 4	50.0	67.1	58.6
1 : 5	51.7	67.8	59.8

明, 浸膏和干树脂比为 1 : 3 时, 可获得较高的质量分数和收率, 故确定浸膏与树脂用量的最佳比为 1 : 3。

2.2.7 动态洗脱曲线的绘制 精密量取供试品溶液适量, 拌入等量干燥聚酰胺粉末中, 挥去溶剂后, 置于小渗漉筒中, 以水洗至流出液近无色后置于 3 倍量 AB-8 大孔吸附树脂柱上部, 弃去 20% 乙醇洗脱部分, 以 80% 乙醇洗脱, 体积流量为 2 BV/h, 按柱保留体积分段收集洗脱液, 测定洗脱液中总黄酮的量, 计算其收率。以总黄酮收率对洗脱体积作图, 绘制洗脱曲线。图 1 表明, 3 倍柱体积的 80% 乙醇可将苦参总黄酮基本解吸完全。

2.2.8 正交试验 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验对苦参总黄酮纯化工艺中除杂乙醇体积分数 (A)、洗脱体积流量 (B) 和洗脱体积 (C) 3 个因素进一步优化筛选。上样溶液所含浸膏量与聚酰胺用量比保持为 1 : 1, 预先以水洗至流出液近无色后分别置于 3 倍于浸膏量的大孔树脂柱上, 按表 7 进行试验, 测定

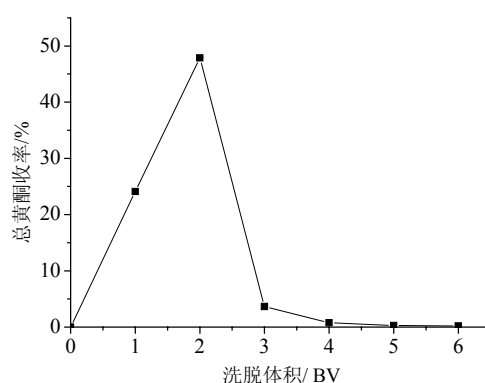


图 1 动态解吸曲线图

Fig. 1 Dynamic desorption curve

洗脱液总黄酮的量, 计算其质量分数和收率, 并将二者的综合评分值作为评价指标, 方差分析见表 8。结果表明, 这 3 种因素对试验结果的影响大小顺序为 $A > C > B$, 最佳纯化工艺条件为 $A_3B_3C_1$, 即上样后用 30% 乙醇洗脱至洗脱液近无色, 弃去; 再用 80% 乙醇以 3 BV/h 的体积流量洗脱, 收集 3 BV 洗脱液较好。通过方差分析, 树脂与药材量的比值对试验结果具有显著影响, 而洗脱溶剂用量和洗脱体积流量则无显著影响。

2.2.9 验证试验 按最佳纯化工艺重复实验 3 次, 结果 3 批样品总黄酮收率为 $(72.1 \pm 3.7)\%$, 质量分数为 $(53.6 \pm 2.2)\%$ 。结果表明, 聚酰胺-大孔树脂联用分离纯化苦参总黄酮的工艺稳定可行。初步确定苦参总黄酮的富集纯化工艺为: 采用 AB-8 树脂, 湿法装柱, 径高比约为 1 : 4 ~ 1 : 6。取适量药

表 7 总黄酮纯化工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验结果Table 7 $L_9(3^4)$ orthogonal test on enriching technology of total flavonoids

试验号	A/%	B/(BV·h ⁻¹)	C/BV	D (空白)	收率/%	质量分数/%	综合评分
1	20 (1)	1 (1)	3 (1)	1	70.4	50.8	60.6
2	20 (1)	2 (2)	4 (2)	2	70.0	45.9	58.0
3	20 (1)	3 (3)	2 (3)	3	70.7	46.0	58.3
4	40 (2)	1 (1)	4 (2)	3	62.6	49.4	56.0
5	40 (2)	2 (2)	2 (3)	1	72.8	44.9	58.9
6	40 (2)	3 (3)	3 (1)	2	70.4	51.4	60.9
7	30 (3)	1 (1)	2 (3)	3	75.2	59.2	67.2
8	30 (3)	2 (2)	3 (1)	1	81.0	55.2	68.1
9	30 (3)	3 (3)	4 (2)	2	78.7	53.0	65.9
K_1	176.9	183.8	189.6	185.4			
K_2	175.8	185.0	179.9	186.1			
K_3	201.2	185.1	184.4	182.4			
R	11.1	8.3	18.1	6.1			

表8 方差分析
Table 8 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	显著性
A	137.429	2	68.714	53.349	$P < 0.05$
B	0.349	2	0.174	0.135	
C	15.709	2	7.854	6.098	
D	2.576	2	1.288		
$F_{0.05}(2, 2) = 19.0$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.0$					

材提取液,置水浴蒸至近干,加少量95%乙醇溶解,与1:1浸膏量的聚酰胺粉拌合,挥干溶剂。将聚酰胺置渗漉筒中,水洗脱至流出液近无色,取出,置于3倍量(干质量,按浸膏量计算)大孔树脂柱顶端,先以30%乙醇洗脱至近无色,弃去,再用80%乙醇洗脱,收集洗脱液3 BV,减压蒸干,即得总黄酮富集物。

2.3 苦参总黄酮富集方法比较

将本方法与目前常用的3种黄酮富集方法进行比较,以总黄酮质量分数和收率为评价指标,结果见表9。聚酰胺-大孔树脂联用法较其他方法相比,总黄酮质量分数得到明显提高。在质量分数提高的同时,收率也保持较高水平,这使其在低浓度黄酮富集方面显示出极大的优势。

表9 总黄酮不同富集方法结果比较

Table 9 Results comparison on different enriching methods of total flavonoids

富集方法	总黄酮		综合评分
	质量分数/%	收率/%	
原药液	8.42	100.0	—
醋酸乙酯萃取法	17.00	32.0	24.5
醇提酸沉法	39.10	82.5	60.8
聚酰胺法	44.70	62.4	53.6
聚酰胺(水洗)- 大孔吸附树脂法	52.90	73.3	63.6

3 讨论

聚酰胺、大孔吸附树脂是分离黄酮类物质的常用材料,由于其吸附机制不同,两者在分离纯化中各有优缺点。在实验中发现,将聚酰胺与大孔吸附

树脂联用可充分发挥两者优势,弥补不足。本实验选择以聚酰胺作吸附剂,一方面,经水洗可除去大部分水溶性杂质,并与主要药效成分苦参碱类有效分离,另一方面,聚酰胺对色素及部分脂溶性成分仍保持较好的截留,减轻了对大孔树脂柱的污染和负担。经初步分级的上柱液再经大孔树脂纯化,再利用树脂吸附和分子筛作用即可极大地提高产物的纯度。这种方法操作简单,柱再生方便,黄酮富集率高,具有广阔的市场应用前景。

实验中还发现,由于苦参生物碱存在于聚酰胺水洗脱部分,而这部分洗脱液经生物碱富集工艺精制后,生物碱纯度更高,极大地提高了苦参药材的使用率,为合理应用药材打下良好基础。

参考文献

- [1] 顾关云,肖年生,蒋昱. 苦参的化学成分、生物活性和药理作用 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(5): 265-271.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 赵平,张颖君,山本浩文,等. 苦参异戊烯基黄酮类化合物的化学、活性及其生物合成研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2004, 26(2): 172-178.
- [4] 张敏. 苦参中异戊二烯基黄酮对磷脂酶 $C_{\gamma 1}$ 的抑制作用 [J]. 中草药, 1998, 29(2): 137.
- [5] 李巍,梁鸿,尹婷,等. 中药苦参主要黄酮类成分的研究 [J]. 药学学报, 2008, 43(8): 833-837.
- [6] Kim S J, Son K H, Chang H W, et al. Tyrosinase inhibitory prenylated flavonoids from *Sophora flavescens* [J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26(9): 1348-1350.
- [7] 高红宁,金万勤,郭立玮. 微滤-大孔树脂法精制苦参中氧化苦参碱和苦参总黄酮 [J]. 西北药学杂志, 2004, 19(1): 12-13.
- [8] 高红宁,金万勤,郭立玮. 微滤-大孔树脂法精制苦参中氧化苦参碱和苦参总黄酮的比较研究 [J]. 广东药学院学报, 2003, 19(4): 334-341.
- [9] 高红宁,金万勤,郭立玮,等. AB-8树脂对苦参总黄酮的吸附性能研究 [J]. 中草药, 2001, 32(10): 887-889.
- [10] 刘鄂湖,鄢丹,蔡光明,等. 大孔吸附树脂技术在中药中应用现存问题分析与探讨 [J]. 中草药, 2007, 38(5): 附3-附5.
- [11] 卢丽萍,张蕾,廖琼峰,等. 苦参中总黄酮含量测定方法的研究 [J]. 今日药学, 2011, 23(2): 146-148.