

文章编号：(2008)05-0276-07

用大孔树脂纯化柿叶总黄酮工艺考察

周文亮, 孙蕴哲, 唐 星

(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要：目的 筛选大孔树脂纯化柿叶总黄酮的最佳工艺，为后续研究提供基础。方法 以大孔树脂对总黄酮的吸附率和解吸附率为指标筛选树脂种类；以吸附温度、供试液中总黄酮的质量浓度和供试液 pH 值为指标，考察不同条件下 AB-8 大孔树脂对柿叶总黄酮的吸附量；以固体物中柿叶总黄酮的纯度为指标，确立洗脱用醇的体积分数及洗脱方法；采用紫外-可见分光光度法、HPLC 法测定总黄酮的含量。结果 选择 AB-8 大孔树脂；最佳纯化工艺为上样液总黄酮质量浓度 $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，pH 5.0，温度 25℃；最佳洗脱方式是用 5 倍柱体积的水及体积分数分别为 10%、20%、30% 的乙醇依次洗脱，弃去洗脱液后再用 5 倍柱体积的体积分数为 50% 的乙醇洗脱；HPLC 法测定总黄酮的含量为 76%。结论 AB-8 大孔树脂对柿叶总黄酮纯化的综合性能较好，适合于工业化大生产。

关键词：药剂学；纯化；高效液相色谱法；黄酮；AB-8 大孔树脂；柿

中图分类号：R 94 **文献标志码：**A

柿叶为柿树科柿树属植物柿(*Diospyros kaki* L.f.)的新鲜或干燥叶，味苦，性寒，具有下气平喘、生津止渴、清热解毒等作用。其入药始见于明《滇南本草》记载“经霜叶敷臃疮”，《本草再新》记载用于“治咳嗽吐血，止咳生津”，主要用于止血、降压及治疗冠心病心绞痛、胃溃疡出血、肺结核出血、功能性子宫出血等内脏出血病症^[1]。国内外对柿叶化学成分的研究已有很多报道，其主要有效成分为黄酮类、三萜类、有机酸类、香豆素类、植物甾醇类、挥发性成分等^[2]。有关柿叶总黄酮纯化工艺的研究并不多见。本研究中，作者以柿叶总黄酮的纯度为指标，通过正交设计考察大孔吸附树脂对柿叶总黄酮的静态、动态吸附性能，筛选大孔树脂纯化柿叶总黄酮的最佳工艺，为后续研究提供基础。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪(L-7100泵、L-7420紫外检测器、L-7200自动进样器、HSM色谱工作站，日本Hitachi公司)，RE-3000旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)，PHS-3C精密酸度计(上海理达仪器厂)，HZQ-C空气浴振荡器(哈尔滨东明医疗仪器厂)，UV-7504紫外可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司)，玻璃柱(25.0 cm×1.5 cm，自制)。

D101、AB-8大孔树脂、聚酰胺大孔树脂(安徽蚌埠天星大孔树脂有限责任公司)，体积分数为95%的乙醇(医用，沈阳莱博科贸有限公司)，芦丁、槲皮素、山奈酚(中国药品生物制品检定所)，柿叶黄酮粗提物(桂林三棱生物制品有限公司)，其他试剂(分析纯，市售)。

收稿日期：2008-03-20

作者简介：周文亮(1981-)，男(汉族)，安徽枞阳人，硕士研究生，E-mail liangdog813@126.com；唐星(1964-)，男(汉族)，陕西西安人，教授，主要从事缓控释制剂及中药制剂现代化研究，Tel. 024-23986343，E-mail tangpharm@sina.com。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量测定方法的建立

2.1.1 紫外-可见分光光度法

2.1.1.1 标准溶液的制备与测定

精密称取干燥至质量恒定的芦丁标准品约10 mg, 置50 mL量瓶中, 用体积分数为95%的乙醇溶解, 并定容至刻度, 分别精密移取该溶液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL置25 mL量瓶中, 加入体积分数为5%的NaNO₂溶液1.0 mL, 摇匀, 放置6 min后加入体积分数为10%的Al(NO₃)₃溶液1.0 mL, 摇匀, 放置6 min后加入体积分数为4%的NaOH溶液10 mL, 摇匀, 用体积分数为95%的乙醇定容, 静置15 min后于波长510 nm处测定吸光度。以芦丁质量浓度(ρ)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标进行回归, 得标准曲线回归方程 $A=1.217\times 10^{-1}\rho+6.9\times 10^{-3}$, $r=0.9987$, 线性范围为14.5~57.7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.1.1.2 供试液的制备与含量测定

精密移取柿叶黄酮样品液2.0 mL置25 mL量瓶中, 加入体积分数为5%的NaNO₂溶液1.0 mL, 摇匀, 放置6 min后加入体积分数为10%的Al(NO₃)₃溶液1.0 mL, 摇匀, 放置6 min后加入体积分数为4%的NaOH溶液10 mL, 摇匀, 用体积分数为95%的乙醇定容, 静置15 min后于波长510 nm处测定吸光度。

2.1.2 HPLC法

2.1.2.1 色谱条件的选择

色谱柱: HiQsilC₁₈W柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 流动相: 甲醇-体积分数为0.1%的磷酸溶液(体积比55:45); 检测波长: 360 nm; 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 30 ; 进样量: 10 μL 。槲皮素峰与山奈素峰理论塔板数均大于5 000。

2.1.2.2 标准曲线的绘制

分别精密称取干燥至质量恒定的标准对照品槲皮素和山奈酚各约5 mg, 置25 mL量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 分别精密移取该溶液0.2、0.6、1.0、1.6、2.0、3.0 mL置10 mL量瓶中, 用甲醇定容, 进样测定, 以进样质量浓度(ρ)为横坐标, 平均峰面积(A)为纵坐标进行回归, 得标准曲线回归方程, 槲皮素: $A=1.35188\times 10^5\rho-7.45650\times 10^3$, $r=0.9999$, 线性范围为2.12~31.8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 山奈酚: $A=1.43860\times 10^5\rho-9.11\times 10^2$, $r=0.9994$, 线性范围为0.57~8.55 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.1.2.3 供试品溶液的制备

精密称取一定量柿叶黄酮提取物, 加入甲醇和体积分数为36%的浓盐酸适量, 制备成25 mL盐酸浓度为2.0 mol·L⁻¹的溶液, 置50 mL圆底烧瓶中, 摇匀, 90 加热回流2 h, 冷却, 精密移取5.0 mL至25 mL量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液^[3]。

2.1.2.4 总黄酮的含量测定

按“2.4.2.1”条色谱条件进样测定, 按总黄酮的质量 = 槲皮素的质量×2.55 + 山奈酚的质量×2.59 计算柿叶总黄酮的量。

2.2 大孔树脂的纯化

2.2.1 大孔树脂预处理

新的大孔树脂在使用前用体积分数为95%的乙醇浸泡24 h以上,大孔树脂充分溶胀后,湿法装柱;用体积分数为95%的乙醇淋洗至流出液加水混合(体积比为1:2)不产生白色浑浊为止,再用纯净水洗至无醇味;用5倍柱体积的体积分数为5%的氢氧化钠溶液淋洗,水洗至中性;用5倍柱体积的体积分数为5%的盐酸淋洗,水洗至中性,备用。

2.2.2 大孔树脂种类的选择

文献报道^[4-6],非极性大孔树脂和弱极性大孔树脂,相对极性大孔树脂而言对柿叶总黄酮有更好的吸附性能。因此,本研究中初选D101(非极性)、AB-8(弱极性)及聚酰胺(弱极性)3种大孔树脂,以其对总黄酮的吸附率和解吸附率为指标筛选最佳树脂。

称取预先处理好的3种大孔树脂各约1.0 g置50 mL具塞锥形瓶中,加水25.0 mL,再加过量的柿叶黄酮粗提物约1.0 g,置空气浴振荡器中,室温下 $100 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 震摇24 h,使粗提物中的总黄酮被充分吸附,过滤,取续滤液用紫外-可见分光光度法测定总黄酮的含量。

将吸附饱和后的大孔树脂置50 mL具塞锥形瓶,加体积分数为95%的乙醇,室温下置空气浴振荡器中, $100 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 震摇24 h,使总黄酮充分解吸附,过滤,取续滤液用紫外-可见分光光度法测定总黄酮的含量。

根据测定结果分别计算3种大孔树脂的静态吸附率和解吸附率。静态吸附率($w_{\text{adsorption}}/\%$)=(吸附前总黄酮质量浓度-吸附后总黄酮质量浓度)/吸附前总黄酮质量浓度 $\times 100\%$;静态解吸附率 $w_{\text{desorption}}/\%$ = 解吸附后总黄酮质量浓度/(吸附前总黄酮质量浓度-吸附后总黄酮质量浓度) $\times 100\%$ 。结果见表1。

Table 1 Adsorption capacity of different types of macroporous resin ($n=3$)

| Macroporous resin | $w_{\text{adsorption}}/\%$ | $w_{\text{desorption}}/\%$ |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|
| D101 | 23.6 | 87.1 |
| AB-8 | 63.8 | 96.3 |
| Polyamide | 60.2 | 93.9 |

结果表明,D101大孔树脂对柿叶总黄酮的吸附和解吸附性能较差;AB-8大孔树脂及聚酰胺大孔树脂对柿叶总黄酮均有良好的吸附及解吸附性能,AB-8大孔树脂的吸附和解吸性能稍优于聚酰胺。因此,本研究中最终选择AB-8大孔树脂纯化柿叶总黄酮。

2.3 AB-8大孔树脂吸附性能考察

2.3.1 静态吸附性能

影响大孔树脂吸附性能的因素主要有吸附温度、供试液浓度和供试液pH值^[7-8]。本研究中以吸附温度、供试液中总黄酮的质量浓度和供试液pH值为3个因素,分别设置了3个水平,考察了不同条件下AB-8大孔树脂对柿叶总黄酮的静态吸附量。正交试验设计结果见表2。

Table 2 Factor-level of the orthogonal design

| Level | Factor | | |
|-------|----------------|-----------------------|--|
| | <i>A</i> pH | <i>B</i> $\theta/$ | <i>C</i> $\rho/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ |
| 1 | 3 | 15 | 40 |
| 2 | 5 | 25 | 60 |
| 3 | 7 | 35 | 80 |

取一定量经处理的AB-8大孔树脂置具塞锥形瓶中,加入不同质量浓度和pH值的供试液,置空气浴振荡器中,在设定温度下 $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 震摇24 h,使之充分吸附,过滤,取续滤液用紫外-可见分光光度法测定总黄酮的含量。

取吸附后大孔树脂,加入体积分数为95%乙醇25 mL,室温 $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 震摇24 h,过滤,取续滤液用紫外-可见分光光度法测定总黄酮的含量。以解吸附的柿叶总黄酮的质量为指标,正交试验结果见表3,方差分析见表4。

Table 3 Results and analysis of the orthogonal experiment

| No | <i>A</i> | <i>B</i> | <i>C</i> | <i>D</i> (vacant) | <i>m</i> (total flavonoids)/mg |
|----------|----------|----------|----------|-------------------|--------------------------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 13.2 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 14.5 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 12.5 |
| 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 15.6 |
| 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 16.9 |
| 6 | 2 | 3 | 3 | 3 | 15.4 |
| 7 | 3 | 1 | 1 | 1 | 12.1 |
| 8 | 3 | 2 | 2 | 2 | 12.7 |
| 9 | 3 | 3 | 3 | 3 | 11.9 |
| K_1 | 13.400 | 13.633 | 13.767 | 14.000 | |
| K_2 | 15.967 | 14.700 | 14.000 | 14.000 | |
| K_3 | 12.233 | 13.267 | 13.833 | 13.600 | |
| <i>R</i> | 3.734 | 1.433 | 0.233 | 0.400 | |

Table 4 Analysis of variance

| Source of variation | S_S | <i>V</i> | S_{mean} | <i>F</i> | <i>P</i> |
|-------------------------------------|--------|----------|-------------------|----------|----------|
| pH | 21.887 | 2 | 10.943 | 68.396 | <0.05 |
| $\theta/$ | 3.327 | 2 | 1.663 | 10.396 | |
| $\rho/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ | 0.087 | 2 | 0.043 | 0.271 | |
| Errors | 0.320 | 2 | 0.160 | | |

由表3、4结果可知, pH的影响>温度的影响>样品质量浓度的影响。在高pH条件下吸附的量少,

低pH条件下溶液易浑浊不易吸附。由于大孔树脂吸附物质的过程是放热过程，低温有利于柿叶总黄酮吸附的完成。质量浓度过高，动态上样吸附时易造成大孔树脂柱堵塞；质量浓度过低，上样体积变大，上样时间变长，不利于总黄酮的吸附。因此，最优上样条件是 $A_2B_2C_2$ ，即上样总黄酮质量浓度为 $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，样品液调pH至5.0，上样温度为 25°C 。

2.3.2 动态吸附性能

将柿叶黄酮粗提物配制成pH为5.3、质量浓度为 $67.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 总黄酮溶液，缓慢加入到已处理好的AB-8大孔树脂柱中，控制流速为 $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ，每50.0 mL为1个流份，紫外-可见分光光度法测定总黄酮的含量，吸附曲线见图1。从第20流份开始，总黄酮出现泄漏现象，到第41流份后，AB-8大孔树脂对柿叶总黄酮的动态吸附趋于饱和，此时大孔树脂的吸附总量约为 130.0 mg 。为避免生产过程中造成总黄酮的泄漏损失，规定每mL大孔树脂的上样量不得超过 3.5 mg 。

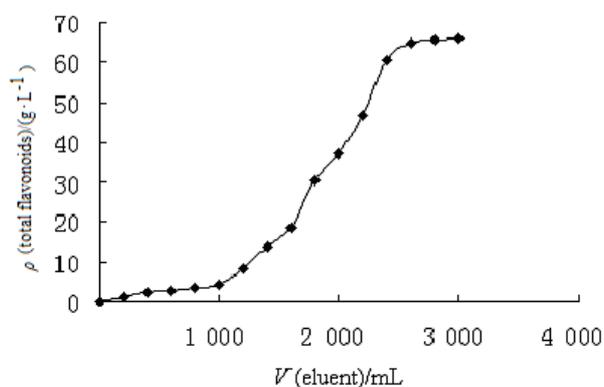
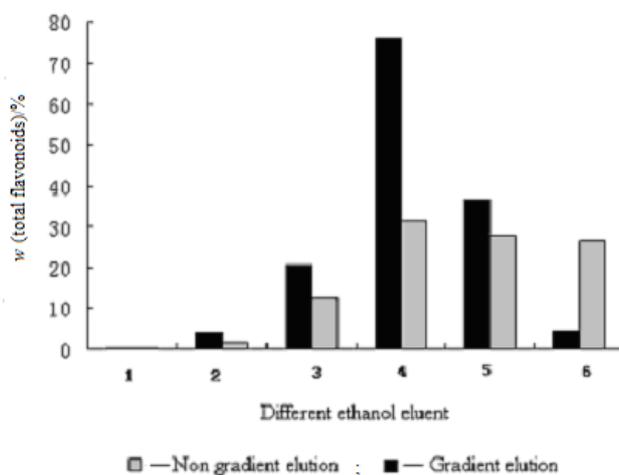


Fig. 1 Cumulative leakage curve of the sample

2.4 洗脱液种类及洗脱方法的选择

采用乙醇-水系统为洗脱液。取已配制好的柿叶总黄酮上样液适量，以 $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速上样，上样结束后，先用5倍柱体积的水洗柱除去水溶性杂质，再依次用5倍柱体积、体积分数为10%、20%、30%、50%、70%、90%的乙醇连续洗脱，流速为 $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ，分别收集洗脱液；另取6根大孔树脂柱，分别同法上样、水洗除杂，各柱分别用体积分数为10%、20%、30%、50%、70%、90%的乙醇洗脱，各5倍柱体积，流速为 $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ，将所得洗脱液浓缩后真空干燥，以固体物中柿叶总黄酮的纯度为评价指标，确立洗脱用醇的体积分数及洗脱方式，HPLC法测定总黄酮的含量，结果见图2。



1—10 % Ethanol; 2—20 % Ethanol; 3—30 % Ethanol; 4—50 % Ethanol; 5—70 % Ethanol; 6—90 % Ethanol

Fig. 2 Influence of ethanol contents on the elution of total flavonoids

用不同体积分数的乙醇连续洗脱同一根大孔树脂柱所得到的固体物中总黄酮的纯度明显高于相应质量浓度下非连续洗脱所得到的固体物中黄酮的纯度；用体积分数为30 %的乙醇洗脱后再用体积分数为50 %的乙醇洗脱所得到的洗脱液干燥后固体物中总黄酮的含量最高（质量分数>70 %，HPLC法）。因此，最终采用的洗脱方法为：用5倍柱体积的水除杂后，再分别用5倍柱体积、体积分数为10 %、20 %、30 %乙醇依次洗脱，最后用5倍柱体积的体积分数为50 %的乙醇洗脱。

3 讨论

a. 目前，总黄酮的含量测定主要采用分光光度法^[9]，此法用时短，操作简便，适合大量样品含量的测定，但样品易受其他因素的干扰，且显色溶液不稳定，需及时测定。柿叶中黄酮类化合物主要为槲皮素和山奈酚及其苷类^[2]。因此，可将混合物中的各种苷类物质水解成苷元，以槲皮素、山奈酚为指标，再利用HPLC法测定。HPLC法能基本反映中间体黄酮成分的定量概貌，但操作复杂，耗时较长，不适合大量样品的测定。本研究中，将紫外-可见分光光度法与HPLC法结合，在考察大孔树脂对柿叶总黄酮的动静态吸附时采用了分光光度法，缩短了分析时间，最终含量测定结果准确。

b. 大孔树脂是近年发展起来的一类有机高分子聚合物吸附剂，其物理化学性质稳定，吸附选择性强，易于解吸和再生，广泛用于中药中间体的纯化。树脂的极性和空间结构是影响吸附性能的重要因素，树脂吸附的机制是吸附剂与吸附质之间的范德华力。柿叶总黄酮具有多酚结构和糖苷键，显弱极性，有利弱极性树脂的吸附。AB-8树脂是弱极性树脂，比表面积大，对柿叶总黄酮有很好的吸附性能。本研究中通过考察影响AB-8大孔树脂对柿叶总黄酮的动静态吸附的pH、温度、样品的质量浓度等因素，得出了纯化柿叶总黄酮的最佳工艺。

4 结论

AB-8大孔树脂对柿叶总黄酮的吸附及解吸附性能优于其他大孔树脂，适合于总黄酮的工业化纯

化;最佳纯化工工艺为上样液总黄酮质量浓度 $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5.0, 温度 25°C ;最佳洗脱方式为分别用5倍柱体积的水、体积分数10%、20%、30%的乙醇溶液依次洗脱后再用5倍柱体积、体积分数为50%的乙醇溶液洗脱。

参考文献:

- [1] 王树松. 柿叶的研究进展[J]. 河北中医, 1998, 20(1): 63-64.
- [2] 林娇芬, 林河通, 谢联辉, 等. 柿叶的化学成分、药理作用、临床应用及开发利用[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(7): 90-96.
- [3] 贝伟剑, 罗杰, 吴爱奎, 等. HPLC法测定柿叶浸膏中槲皮素和山柰酚[J]. 中草药, 2005, 36(7): 1014-1015.
- [4] 罗显华, 郁建生. 大孔吸附树脂分离纯化草珊瑚总黄酮工艺[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(11): 2703-2706.
- [5] 闫磊, 何再安, 刘焱文. 大孔树脂分离纯化山楂总黄酮的研究[J]. 湖北中医学院学报, 2007, 9(2): 33-35.
- [6] 韩博, 陈文, 景文娟. AB-8大孔吸附树脂对甘草总黄酮的吸附[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(3): 265-267.
- [7] 龙继红. 大孔吸附树脂纯化天然药物有效成分的影响因素[J]. 华西药学杂志, 2007, 22(2): 237-238.
- [8] 曾元儿, 王凤云, 江滨绵, 等. 茵陈提取液的大孔树脂静态吸附工艺影响因素考察[J]. 中成药, 2007, 29(2): 199-202.
- [9] 颜仁梁, 刘志刚. 中草药中药制剂中总黄酮类化合物含量测定方法综述[J]. 广州医药, 2005, 36(6): 6-10.

Purification of total flavonoids from leaves of *Diospyros kaki* using macroporous resin

ZHOU Wen-liang, SUN Yun-zhe, TANG Xing

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To select the optimal process parameters for refining total flavonoids from the leaves of *Diospyros kaki* using macroporous resin. **Methods** Factors influencing the purification efficiency, such as types of macroporous resin, adsorption temperature, properties of the eluent, concentration and pH of the sample solution, were investigated. **Results** Compared with D101 and polyamide, AB-8 macroporous resin had the best property for total flavonoids purification. The optimal process conditions were: the concentration of total flavonoids $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5.0, temperature 25°C . The eluents were water, 10%, 20%, 30% and 50% ethanol respectively and they flowed through the macroporous resin one by one with five times of the column volume. The obtained eluent of 50% ethanol was evaporated and the content of total flavonoids was 76% measured by HPLC. **Conclusions** The AB-8 macroporous resin showed a good adsorption property and can be used to refine total flavonoids in industrial production.

Key words: pharmaceuticals; purification; HPLC; flavonoid; AB-8 macroporous resin; *Diospyros kaki* L.f

(责任编辑 高明)