

## 水解法提取纯化刺槐素的工艺研究

朱性海, 王秀敏, 连惠龙, 金鑫, 李丽萍

(厦门大学 药学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:**目的 优选野菊花中刺槐苷的水解工艺。方法 采用均匀设计法,以高效液相色谱法(HPLC)测定野菊花中刺槐素含量,探讨影响刺槐素提取效率的因素,并筛选出最佳提取条件。结果 最佳水解工艺为盐酸与药液比为5:2,盐酸浓度3 mol/L,水解时间为3 h,水解温度为100 ℃。结论 HPLC法测定野菊花中刺槐素含量的方法,快速、可行。均匀设计法优选的野菊花中刺槐素提取工艺,操作简单,节约时间,提取率比原工艺有明显提高。

**关键词:** 野菊花; 刺槐素; 均匀设计; 水解工艺

中图分类号:R284.2 文献标识码:A 文章编号:1005-1678(2012)03-0275-03

### Extraction and purification technique of acacetin by hydrosis

ZHU Xing-hai, WANG Xiu-min, LIAN Hui-long, JIN Xin, LI Li-ping

(School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract: Purpose** To optimize the hydrosis technique of acaciin in *Chrysanthemum*. **Methods** With the amounts of acacetin as observation parameters by HPLC, uniform design method was used for the optimization of extraction. **Results** The best hydrosis condition was as follows: The ratio of hydrochloric acid to liquid is 5:2, hydrochloric acid is 3 mol/L, time is 3 h, and temperature is 100 ℃. **Conclusion** The determination methods of acacetin content by HPLC is fast and feasible. The optimized condition is efficient, economic and simple. The extraction rate is more significantly improved than the original process.

**Key words:** *Chrysanthemum*; acacetin; uniform design; hydrosis technique

野菊花为菊科植物野菊、北野菊或岩香菊的头状花序<sup>[1]</sup>。野菊花中主要含有挥发油、野菊花素A、刺槐苷(acaciin)、蒙花苷等成分。其中刺槐苷的水解产物刺槐素具有抗炎、抗过氧化、抑菌、促进白血球吞噬等作用<sup>[2]</sup>。

刺槐素可以抑制肿瘤细胞的生长,具有良好的应用前景<sup>[3]</sup>。本文采用均匀设计实验,以高效液相色谱法(HPLC)测定野菊花中刺槐素含量,探讨野菊花中刺槐素提取的影响因素,并筛选出最佳提取条件。

#### 1 材料

刺槐素对照品(纯度99.1%,厦门大学医学院药学系邱彦副教授提供,经四大波谱确证为刺槐

素);野菊花药材(厦门鹭燕制药有限公司);Sephadex LH20 葡聚糖凝胶(GE公司);甲醇、冰乙酸(色谱纯,TEDIA公司);其他试剂均为分析纯。

SHIMADZU 20AD 高效液相色谱仪(日本SHIMADZU公司);KQ500B 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);Eppendorf Centrifuge 5804R 离心机(美国Eppendorf公司)。

#### 2 方法与结果

##### 2.1 HPLC 测定刺槐素含量

2.1.1 色谱条件 色谱柱为Agilent Eclipse ODS-2(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-水(含0.05%冰乙酸)(75:25),流速为1.0 mL/min,检测波长为340 nm,柱温30 ℃。

2.1.2 对照品溶液的制备 取刺槐素对照品适量,精密称定,置50 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,配制成浓度为0.2 mg/mL的对照品贮备液。

2.1.3 线性关系的考察 分别精密吸取刺槐素对照品贮备液0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mL,置10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,各进样20 μL,记录色谱图(图

**收稿日期:** 2011-01-25

**基金项目:** 福建省科技计划重点项目(No. 2011Y0051); 厦门市科技计划项目(No. 3502Z20103009)

**作者简介:** 朱性海,男,硕士研究生,研究方向为药物分析;王秀敏,女,通信作者,副教授,硕士研究生导师,主要从事药剂学研究, Tel: 0592-2189597, E-mail: wangxm@xmu.edu.cn.

1) 测定峰面积,以峰面积( $A$ )对浓度( $C$ ,mg/mL)进行线性回归,得回归方程: $A = 126.4 C + 898.2$ , $r = 0.999$ 。结果表明,刺槐素在 0.01 ~ 0.10 mg/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

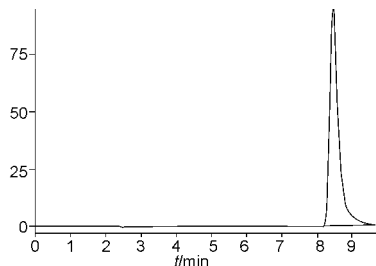


图 1 刺槐素的 HPLC 图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of acacetin

2.1.4 稳定性试验 取供试品溶液,分别于制备后的 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进行测定,其峰面积 RSD 小于 3%。结果表明供试品溶液在配制后 10 h 内稳定。

2.1.5 精密度试验 精密配制低、中、高 3 种浓度 (0.01, 0.04, 0.10 mg/mL) 的对照品溶液,各进样测定 5 次。3 种浓度溶液的峰面积的 RSD ( $n = 5$ ) 分别为 1.6%, 0.7%, 0.3%; 每日配制低、中、高 3 种浓度对照品溶液进行测定,连续 5 d,峰面积的 RSD ( $n = 5$ ) 分别为 2.1%, 1.1%, 0.5%。结果表明,日内精密度和日间精密度均符合要求。

2.1.6 重复性试验 取供试品溶液,重复进样 6 次,其峰面积 RSD 为 1.0%。

## 2.2 刺槐素的提取

2.2.1 野菊花的粗提 野菊花药材 1 kg,加 3 倍量 80% 乙醇,浸泡 3 次,每次 1 周,过滤,合并滤液,减压回收乙醇,再过大孔树脂 (AB-8) 0 ~ 100% 乙醇梯度洗脱,通过 HPLC 检测各个洗脱组分,合并含有刺槐素的乙醇洗脱液。

2.2.2 样品的处理 取含有刺槐素的乙醇洗脱液 5 mL,氮气吹干,加三氯甲烷 7 mL,超声 30 min,溶解,4 °C,6 000 r/min 离心 10 min。取上清液 2 mL,吹干,加甲醇 7 mL,超声 30 min,溶解,6 000 r/min 离心 10 min。取上清液 4 mL,过 0.45  $\mu$ m 滤膜,进行 HPLC 测定,测得水解前的样品中刺槐素含量为 13.37 ng/mL。

2.2.3 刺槐苷水解工艺的考察 乙醇洗脱液回收乙醇后,取该溶液 20 mL,进行单因素预实验,确定以加酸量、酸浓度、水解时间、水解温度为考察因素<sup>[4]</sup>,每个因素分别建立 6 个水平,因素水平表见表 1。

根据均匀设计的原理<sup>[5]</sup>,对表 1 的因素和水平进行均匀设计,得出均匀设计表,进行 4 因素 6 水平水解试验,对水解的影响因素进行考查,见表 2。

表 1 因素水平表

Tab.1 Factors and levels

| 水平 | 加酸量 A<br>/mL | 酸浓度 B<br>/(mol/L) | 时间 C<br>/h | 温度 D<br>/°C |
|----|--------------|-------------------|------------|-------------|
| 1  | 5            | 1                 | 1          | 50          |
| 2  | 10           | 2                 | 2          | 60          |
| 3  | 20           | 3                 | 3          | 70          |
| 4  | 30           | 4                 | 4          | 80          |
| 5  | 40           | 5                 | 5          | 90          |
| 6  | 50           | 6                 | 6          | 100         |

表 2 均匀设计试验

Tab.2 Uniform design

| 试验  | 加酸量 A<br>/mL | 酸浓度 B<br>/(mol/L) | 时间 C<br>/h | 温度 D<br>/°C |
|---|--------------|-------------------|------------|-------------|
| A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> | 5            | 2                 | 3          | 100         |
| A <sub>2</sub> B <sub>4</sub> C <sub>6</sub> D <sub>5</sub> | 10           | 4                 | 6          | 90          |
| A <sub>3</sub> B <sub>6</sub> C <sub>2</sub> D <sub>4</sub> | 20           | 6                 | 2          | 80          |
| A <sub>4</sub> B <sub>1</sub> C <sub>5</sub> D <sub>3</sub> | 30           | 1                 | 5          | 70          |
| A <sub>5</sub> B <sub>3</sub> C <sub>1</sub> D <sub>2</sub> | 40           | 3                 | 1          | 60          |
| A <sub>6</sub> B <sub>5</sub> C <sub>4</sub> D <sub>1</sub> | 50           | 5                 | 4          | 50          |

2.2.4 样品中刺槐素的含量测定方法 按表 2 进行水解工艺的均匀设计试验后,每次试验都得到水解液和析出物两部分,水解液和析出物分别处理后,进行含量测定。

2.2.4.1 水解液的处理 取均匀设计试验后的水解液各 5 mL,按 2.2.2 项下方法处理,得水解液样品,HPLC 测定结果见表 3。

2.2.4.2 析出物的处理 由于水解后得到的刺槐素在水中溶解度小,会在器壁析出。所以用三氯甲烷 10 mL,溶解圆底烧瓶壁上的物质,超声 30 min,氮气吹干,用水稀释成与对应水解液中相同的体积,然后取 5 mL,按 2.2.2 项下方法处理,得析出物样品,HPLC 测定结果见表 3。

表 3 均匀设计实验结果

Tab.3 The results of uniform design experiments

| 样品组别  | 刺槐素含量/(ng/mL) |          |
|---|---------------|----------|
|   | 水解液           | 析出物      |
| A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> | 3.63          | 2 156.68 |
| A <sub>2</sub> B <sub>4</sub> C <sub>6</sub> D <sub>5</sub> | 22.90         | 144.47   |
| A <sub>3</sub> B <sub>6</sub> C <sub>2</sub> D <sub>4</sub> | 30.99         | 570.33   |
| A <sub>4</sub> B <sub>1</sub> C <sub>5</sub> D <sub>3</sub> | 0.52          | 435.64   |
| A <sub>5</sub> B <sub>3</sub> C <sub>1</sub> D <sub>2</sub> | 1.30          | 307.77   |
| A <sub>6</sub> B <sub>5</sub> C <sub>4</sub> D <sub>1</sub> | 1.74          | 1 342.29 |

2.2.4.3 回归分析 野菊花未水解前样品中刺槐素含量极少,故样品需要水解。水解后,水解液中的刺槐素含量不到器壁上析出物的 1%,故认为该水解工艺水解完全。因此只对析出物进行回归分析。由方差分析结果可知, $P < 0.05$ ,表明采用线性回归

是可信的。得到的多元一次方程为:  $Y = -340\ 072\ 421 + 3\ 501\ 047 X_1 + 930\ 671 X_2 + 674\ 589 X_3 + 3\ 323\ 212 X_4$ 。

2.2.5 最佳水解工艺 由于所有的斜率都是正数,在本次试验的因素范围内,数值越大水解效果越好。但是因素 B 和 C 的影响相对小于 A 和 D 的影响,因此我们可以在确定加酸量以及加热时间的前提下,根据实验的需要以及节省成本的角度,来适当选取其他两个因素。确定最佳水解工艺为用盐酸与药液比为 5:2,盐酸浓度 3 mol/L,时间为 3 h,温度为 100 °C。

2.2.6 刺槐素的分离、纯化 由表 3 可知,水解后的水溶液中残留的刺槐素含量较低,需要大量的氢氧化钠中和盐酸。本着节省成本及时间的目的,舍去残留在水中的含量不足 1% 的刺槐素。将器壁析出的黑色物质用三氯甲烷溶解,进行硅胶柱分离,用三氯甲烷-甲醇(50:1)进行洗脱,所得组分分别进行回收,回收后用 HPLC 进行检测。收集含有刺槐素组分的部分。

将含有刺槐素的部分,进行葡聚糖凝胶柱分离,洗脱剂为三氯甲烷-甲醇(1:1),收集各个组分,进行 HPLC 检测,得到刺槐素部分。重结晶进一步纯化,HPLC 图见图 2,并通过质谱、核磁共振等进行结构鉴定,证实为刺槐素。刺槐素为纯度 99%,产率为 6.5%。

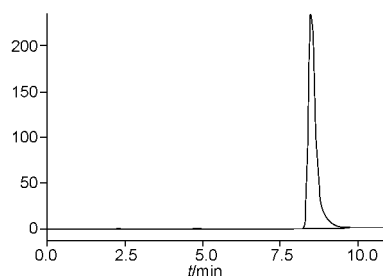


图 2 重结晶后刺槐素的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of acacetin after recrystallization

### 3 讨论

均匀设计是一种多因素与多水平实验的设计方法,它能有效的处理多水平的试验。且让实验点在实验范围内均匀分布,与单因素实验相比,减少了实验次数,并能准确地预测和优化实验条件和结果,具有方便、实用、预测性好等特点,是优选中药成分提取条件的一种非常实用的方法。近十年来,均匀设计在国内得到了广泛的应用。

刺槐素具有较好的抗炎和抗肿瘤作用,其对直肠癌、非小细胞肺癌、乳房癌、前列腺癌、肝癌均有良好的治疗效果,而对人类正常成纤维细胞毒性较小,因其高效低毒而具有良好的应用前景。但国内外报道的刺槐素的提取方法较少,多以提取总黄酮为主,并且提取方法较为繁琐。而野菊花价格低廉,药材中游离刺槐素的含量约为万分之三,含量较少。但野菊花中含有多种含刺槐素的苷,因此选取合适的水解工艺十分重要。经过均匀设计优选后得到的水解方法,可以得到大量的刺槐素。该法经济、快速,较为实用,从而也为刺槐素进一步研究开发提供了研究基础。

#### 参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2010: 295.
- [2] Hsu Y L, Kuo P L, Lin C C. Acacetin inhibits the proliferation of Hep G2 by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis [J]. *Biochem Pharmacol* 2004 67: 823-829.
- [3] Hsu Y L, Kuo P L, Lin C C. Acacetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells [J]. *Cancer Lett* 2004 212: 53-60.
- [4] 李静, 张莉, 曹玲, 等. 高效液相色谱法测定首乌丸中大黄素的含量[J]. *中国生化药物杂志* 2009 30(2): 118-120.
- [5] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [6] 杨宏莉, 张宏馨, 王燕, 等. 山药多糖对 2 型糖尿病大鼠肾病的预防作用研究[J]. *中国药房* 2010 21(15): 1345-1347.
- [7] 刘蕊. 黄酮类化合物的药理作用研究进展[J]. *黑龙江医药*, 2010 23(2): 234-236.
- [8] 李志洲. 苦瓜中黄酮类化合物的提取及抗氧化性研究[J]. *中国生化药物杂志* 2007 28(4): 264-266.

(上接第 274 页)

- [4] 雷作熹, 罗仁, 董晓蕾, 等. STZ 诱导糖尿病肾病大鼠模型的建立[J]. *中国实验动物学报* 2005 13(3): 163-165.
- [5] 李世芬, 王心如, 胡奇, 等. 链脲佐菌素不同方法诱导 SD 大鼠糖尿病肾病模型的研究[J]. *中国现代医学杂志* 2010 14(7): 2109-2113.