

# 高速逆流色谱法分离制备孜然黄酮

吴素玲, 孙晓明\*, 张卫明, 杨 艳, 张锋伦  
(南京野生植物综合利用研究院, 江苏南京 210042)

**摘要:**应用高速逆流色谱法分离制备了孜然中的黄酮类成分。以氯仿:甲醇:水=4:4:2(v:v:v)为两相溶剂系统,在主机转速为850r/min、流速1.8mL/min、检测波长254nm条件下进行分离制备。所得分离收集液经高效液相色谱法检测,结果表明,从孜然黄酮粗提物中分离得到了纯度超过90%的两种黄酮类成分;经干燥得样品重分别为26mg和24mg。

**关键词:**高速逆流色谱, 孜然, 黄酮类成分

## Separation and purification of the flavonoid from *Cuminum cyminum* L by high speed countercurrent chromatography

WU Su-ling, SUN Xiao-ming\*, ZHANG Wei-ming, YANG Yan, ZHANG Feng-lun

(Nanjing Research Institute for the Comprehensive Utilization of Wild Plants, Nanjing 210042, China)

**Abstract:** High-speed countercurrent chromatography (HSCCC) with a two-phase solvent system composed of chloroform-methanol-water (4:4:2) was applied to separate and purify two flavonoids from *Cuminum cyminum* L. The mobile phase was performed at a flow rate of 1.8mL/min, while the apparatus rotated at 850r/min and detected at 254nm. Two kinds of flavones were obtained and yielded 26mg and 24mg respectively. The results showed that the purities of two flavones were more than 90% determined by high performance liquid chromatography (HPLC) which was a simple and rapid method.

**Key words:** high speed countercurrent chromatography (HSCCC); *Cuminum cyminum* L; flavonoid

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2012)11-0215-03

高速逆流色谱 (High Speed Countercurrent Chromatography, 简称HSCCC) 是近20年迅速发展起来的新型液-液分配色谱技术, 其特点是不需要固态载体, 现已在天然产物分离纯化领域得到广泛应用。与传统柱层析法相比, 它具有分离速度快、样品吸附低、分离重现性好等优点<sup>[1]</sup>。在短时间内实现样品在互不相溶的两相溶剂系统中高速分配, 继而达到连续逆流萃取分离物质的目的<sup>[2]</sup>, 经紫外检测器在线监测, 可分段收集目标成分, 若与制备液相色谱结合, 则可快速、大量的制得相应纯度的标准品。孜然 (*Cuminum cyminum* L) 是伞形科 (Umbelliferae) 孜然芹属 (*Cuminum* L.) 植物, 通过紫外分光光度法对不同产地孜然种子进行黄酮含量的测定, 结果表明其黄酮含量可达4%以上。黄酮类化合物作为一种功能成分, 具有多种生理功能及药理作用, 本文继孜然总黄酮的提取和纯化的工艺研究<sup>[3]</sup>, 采用高速逆流色谱法对孜然黄酮提取物进行进一步分离纯化, 为孜然黄酮成分的定性和结构鉴定提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

收稿日期: 2011-08-16 \* 通讯联系人

作者简介: 吴素玲 (1963-), 女, 副研究员, 主要从事食品开发方面的研究。

基金项目: 国家十一五科技支撑计划 (2006BAD06B02)。

孜然 于2008年5月采收于新疆铁热木乡产地; 酒精 食品级, 市售; 聚酰胺树脂 中国人民解放军83305部队701厂产品, 柱层析用, 14~30目; HSCCC分离用溶剂 (氯仿、甲醇等) 均为分析纯, 南京化学试剂有限公司; HPLC分析用甲醇 色谱纯, 美国TEDIA; HPLC分析用水 娃哈哈纯净水; 磷酸 分析纯, 南京化学试剂有限公司; 微孔过滤膜等。

高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司; HG101-2电热鼓风干燥箱 南京电器三厂制造; 电子天平EL-410s 美国setra; WLD07S-05型微波设备 南京三乐微波技术发展有限公司; TU-1800紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; LXJ-II型离心沉淀机 上海医用分析仪器厂; RE-52AA旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; 801型真空干燥箱 江苏省东台县电器厂; CHA-S气浴恒温振荡器 江苏金坛新一佳仪器; KQ-600E超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; TBE300A高速逆流色谱仪 (包括TBP-50A泵、TBD-2000紫外检测器和TC-1050恒温循环器) 上海同田生化技术有限公司; Agilent 1200高效液相色谱仪 安捷伦科技有限公司; 色谱柱 Zorbax C<sub>18</sub> (5μm, 150×4.6mm), 安捷伦科技有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 孜然黄酮的提取和纯化 取孜然籽进行粉碎, 采用微波蒸馏连续提取工艺条件 (微波功率250W、微

波提取时间60min、60%乙醇(体积分数)用量250mL)进行提取,得黄酮浓度为3.877mg/mL的溶液。黄酮提取液采用大孔树脂D-160,以下列工艺条件分离孜然黄酮:即黄酮提取液体积与大孔树脂D-160的质量之比(mL/g)为4:1,在中性条件下静态吸附1h,然后用300mL 80%乙醇溶液作为洗脱剂,1BV/h流速进行动态洗脱。洗脱液减压浓缩至适量,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,移至干燥器中,冷却得到分离产物,测定其黄酮含量为67.88%。经液相色谱分析表明,采用D-160大孔吸附树脂纯化分离孜然总黄酮具有良好的效果,黄酮类物质的吸收峰更加明显,杂峰明显减少,见图1。主要四个分离良好的色谱峰通过DAD检测器的光谱分析,光谱图基本相似如图2,在260nm和350nm附近有明显的紫外吸收峰,具有黄酮类物质的特征紫外吸收光谱带,初步推断化合物1、2、3、4为黄酮类物质。

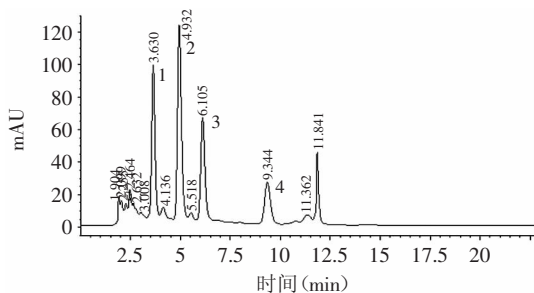


图1 D-160型大孔吸附树脂纯化后的孜然总黄酮液相色谱图  
Fig.1 Liquid chromatogram of purifying flavones from the fruit of cumin

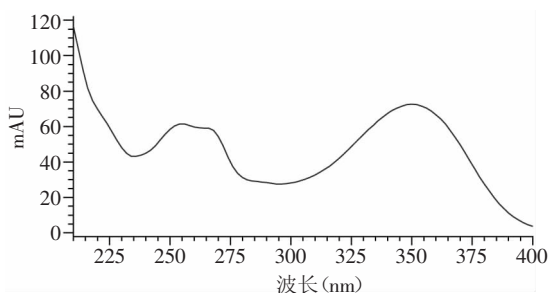


图2 色谱峰通过DAD检测器的光谱图  
Fig.2 Chromatogram peak passed the DAD detector

1.2.2 HSCCC溶剂系统的选择 在高速逆流色谱中,合适的溶剂系统是逆流色谱分离的关键。文献[4]要求首先其沉降时间小于30s,由于分层时间过长的溶剂体系,在高速逆流色谱仪中运转时,将不能达到好的分离效果。其次溶剂系统合适的K值范围是0.5~2,当 $CS/CM \ll 0.5$ 时,出峰时间太快以致峰之间的分离度较差;当 $CS/CM \gg 1$ 时,出峰时间太长且峰形变宽;而当 $0.5 < CS/CM < 2$ 时,可以在合适的时间内,得到分离度较好的峰形<sup>[4-5]</sup>。

沉降时间的测定方法:在15mL的刻度试管中按溶剂系统的比例加入混合溶剂约10mL,密封试管上下振荡10次后静置,分层的时间记为沉降时间。

分离系数K的测定方法:称取30mg孜然黄酮提取物,用4mL甲醇超声溶解,取0.2mL加入不同的溶剂系统中,充分振摇,静置分层,分取上、下层溶液,

按液相要求过滤后,分别取上下相各15 $\mu$ L进行HPLC分析,用HPLC测定上相中组分峰面积为 $A_1$ ,下相中组分峰面积为 $A_2$ ,分配系数 $K=A_1/A_2$ 。

液相条件:Agilent 1200,四元泵;Eclipse XDB-C<sub>18</sub>,分离柱(4.6mm $\times$ 150mm,5 $\mu$ m);柱温20 $^{\circ}$ C;DAD检测器;流动相:甲醇:水(加0.04%磷酸)=45:55;流速为0.8mL/min;进样量:15 $\mu$ L;检测波长254nm。

本研究对沉降时间小于30s的10种溶剂体系进行分离系数K的测定。

1.2.3 HSCCC实验参数的设定 在逆流色谱中,影响分离的因素还有分离温度、主机转速和流动相流速等<sup>[6-9]</sup>。流动相流速主要影响分离时间长短,从预实验中得到,流动相流速快不利于固定相的保留,而低流速虽然可以满足提高固相保留率的要求,但是分离时洗脱时间太长,且耗费大量的流动相,本实验选取流速为1.8mL/min。主机转速也能影响固定相保留率,转速高则固定相保留率高,但分离管易损坏,而且当转速为800~850r/min时,固相保留率达到最高峰值,因此主机转速设定为850r/min。分离时选择与配制溶剂体系上下相时的环境温度相接近的温度即25 $^{\circ}$ C,可以避免溶剂体系的上下相在分离线圈中重新分配。

1.2.4 HSCCC的工作流程和所收集流分的HPLC图谱分析 配制溶剂系统,充分振荡后静置过夜;分离上下层溶剂,超声排气30min。取上层液为固定相,下层液为流动相。精确称取样品400mg,用15mL固定相超声溶解再离心后备用。打开循环水浴预热,当水浴温度达到设置温度25 $^{\circ}$ C后将固定相以10.0mL/min的流量充满分离柱;开启主机转速控制器,使高速逆流色谱仪螺旋管柱按顺时针方向旋转到850r/min,再调泵流以1.8mL/min泵入流动相,同时对检测器进行预热;待接收到流动相约15~20min和检测到的曲线平稳后进行进样,开启检测器,以254nm波长进行监测,根据色谱图的出峰情况收集各峰流分。

对经HSCCC分离纯化所收集的各峰流分纯度进行HPLC图谱分析。HPLC的色谱条件与1.2.2同。

## 2 结果与讨论

### 2.1 HSCCC溶剂系统的选择

对沉降时间小于30s的10种溶剂体系进行分离表1 孜然籽中的黄酮在不同比例的溶剂体系中的分配系数值

Table 1 Partition coefficient of the target compounds in the solvent system

溶剂体系	体积比	化合物3 分配系数K	化合物4 分配系数K
氯仿:甲醇:水	4:3:2	$\infty$	18.723
	4:4:2	4.140	1.837
	4:4:6:2	6.103	2.361
	4:5:2.5	6.703	2.326
	3.5:6.5:4	$\infty$	6.864
乙酸乙酯:甲醇:水	3.3:4:2.7	19.468	4.367
	5:1:5	0	0
正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水	5:2:5	0	0
	1:1:1:1	0	0
正己烷:氯仿:甲醇:水	1.5:3:3:2	$\infty$	$\infty$

系数K的测定,结果见表1。

通过HPLC分析,在乙酸乙酯-甲醇-水(5:1:5)、(5:2:5)和正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(1:1:1:1)的溶剂体系中,在上相中无法检测到目标化合物。而在正己烷-氯仿-甲醇-水(1.5:3:3:2)的溶剂体系中,在下相中无法检测到目标化合物。以上三种溶剂系统的分离效果都不好。而在氯仿-甲醇-水体系中,可以同时在上相和下相中检测到目标化合物3、4,通过HPLC经过分配系数值的测定,氯仿-甲醇-水(4:4:2)对于孜然籽中的黄酮类成分具有最好的分离效果。因此选择HSCCC溶剂系统为氯仿:甲醇:水=4:4:2。

### 2.2 HSCCC分离图谱及流分的HPLC图谱分析

孜然黄酮类化合物的高效逆流色谱分离图谱结果见图3。

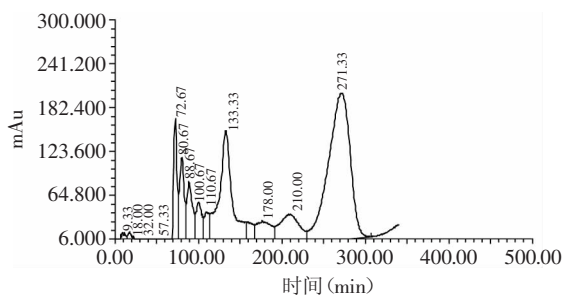


图3 孜然总黄酮的HSCCC分离图谱

Fig.3 HSCCC chromatogram of total flavones from the fruit of cumin

由图3可见,在本实验条件下经HSCCC分离纯化500min后,根据色谱图可接收到两个流分:流分I和流分II。

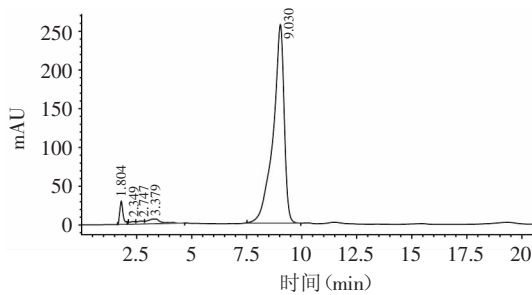


图4 流分I的高效液相色谱图

Fig.4 Liquid chromatogram of the Compound I

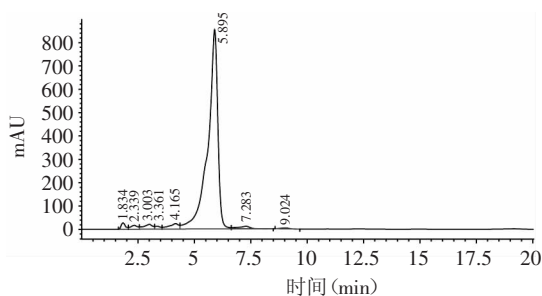


图5 流分II的高效液相色谱图

Fig.5 Liquid chromatogram of the Compound II

通过对流分I和流分II的HPLC图谱进行分析,结果如图4和图5。

经HPLC检测分析,结果表明,所得流分I和II在不同检测波长下均为单一色谱峰,其纯度超过90%。与D-160型大孔吸附树脂纯化后的孜然总黄酮液相色谱图比较,它们是孜然总黄酮4号分离峰和3号分离峰。将制备所得各流分蒸去溶剂,烘干称重。可得到流分I 26mg,流分II 24mg。

### 3 结论

本实验应用高速逆流色谱法对孜然黄酮提取物进行了分离纯化,在HSCCC溶剂系统为氯仿:甲醇:水=4:4:2,在主机转速850r/min、流速1.8mL/min、检测波长254nm条件下得到2个明显的峰;分别收集这2个峰,采用HPLC对其纯度进行检测,用峰面积归一法测得两个分离峰接收液纯度都高于90%;经干燥得样品重分别为:流分I 26mg,流分II 24mg。此方法重现性好,可以批次分离制备黄酮。

应用HSCCC分离黄酮类化合物,具有简便、快速、分离效率高的特点,由于不用固态载体作固定相,避免了载体填充所形成的不可逆吸附,减少了样品的损耗,对于有效的分离纯化孜然黄酮类物质具有较好的实际应用价值。

但从D-160型大孔吸附树脂纯化后的孜然总黄酮液相色谱图中,我们可以得到化合物1、2、3、4,在260nm和350nm附件有明显的紫外吸收峰,具有黄酮类物质的特征紫外吸收光谱带,初步判断为黄酮物质。此方法只对孜然黄酮部分目标化合物3、4实现分离制备,要实现4个可能目标化合物的分离制备还有待以后寻找可行的溶剂系统。为孜然黄酮的进一步定性和结构鉴定提供一定的帮助。

### 参考文献

- [1] 张天佑. 逆流色谱技术 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2001: 171.
- [2] 孙媛媛, 唐玉海. 高速逆流色谱技术在中草药有效成分分离中的应用[J]. 西北药学, 2003, 18(6): 282-283.
- [3] 杨艳, 孙晓明, 吴素玲, 等. 孜然总黄酮的提取和纯化的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(5): 290-292.
- [4] 曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 39-54, 198-210.
- [5] 祝顺琴, 谈锋. 高速逆流色谱在天然产物分离中的应用[J]. 中国医药工业, 2005, 36(12): 788-791.
- [6] 陈山, 韩忠, 袁竹连. 高速逆流色谱法纯化糖厂混合汁浮渣中的黄酮类物质[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(8): 69-71.
- [7] 马晓丰, 屠鹏飞, 陈英杰, 等. 高速逆流色谱法分离纯化黄芪中的芒柄花素和毛蕊异黄酮[J]. 色谱, 2005, 23(3): 299-301.
- [8] 彭金咏, 许丽娜, 韩旭, 等. 大麻药中两个新异戊烯基黄酮的高速逆流色谱分离制备[J]. 分析化学研究报告, 2007, 35(10): 1444-1448.
- [9] 刘云, 翁桂新. 高速逆流色谱法分离制备乌药叶中的黄酮类成分[J]. 色谱, 2007, 25(5): 735-739.