

克敏芪丹方总黄酮苷的大孔树脂纯化工艺优选

王协和¹, 夏林丽¹, 贺宝莹¹, 宋英^{2*}

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

[摘要] 目的:筛选适合分离纯化克敏芪丹方中总黄酮苷的大孔吸附树脂并优选其纯化工艺参数。方法:以总黄酮苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的比吸附量、洗脱率为指标,考察 D101, AB-8, S-8 型大孔吸附树脂对有效成分含量的影响,通过单因素试验考察上样液浓度、上样量及乙醇用量对克敏芪丹方中总黄酮苷大孔树脂纯化工艺的影响。采用 HPLC 测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量,检测波长 260 nm;采用 UV 测定总黄酮苷含量,检测波长 509 nm。结果:药液浓缩至相对密度约 1.05 (60 ℃),加水稀释至 0.5 g·mL⁻¹,通过径高比 1:6 的 AB-8 型大孔树脂柱,加 1 BV 水洗除杂,上样吸附和除杂流速均为 2 BV·h⁻¹,上样量为每 1 g 树脂上 1.5 倍生药量药液;加 70% 乙醇 4 BV 洗脱,洗脱流速 4 BV·h⁻¹,收集洗脱液。总黄酮苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的转移率分别为 78.22%, 43.81%。结论:该纯化工艺合理、稳定,可推广于克敏芪丹方的大生产应用。

[关键词] 克敏芪丹方; 总黄酮苷; 大孔树脂; 纯化工艺; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0035-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140035

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160523.1023.016.html>

[网络出版时间] 2016-05-23 10:23

Optimization of Purification Process of Total Flavonol Glycosides in Kemin Qidan Prescription with Macroporous Resin

WANG Xie-he¹, XIA Lin-li¹, HE Bao-ying¹, SONG Ying^{2*}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610075, China;

2. Teaching Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

[Abstract] **Objective:** To select proper macroporous resin for separation and purification of total flavonol glycosides in Kemin Qidan prescription and to determine purification process parameters. **Method:** Taking adsorption ratio and elution rate of total flavonol glycosides and calycosin-7-O-β-D-glucoside as indexes, impacts of D101, AB-8 and S-8 macroporous resin on contents of total flavonol glycosides and calycosin-7-O-β-D-glucoside were investigated, single factor tests were adopted to select the concentration of sample liquid, sample loading quantity and the amount of 70% ethanol. **Result:** Optimum purification process was that condensing the sample solution to a relative density of 1.05 at 60 ℃, then centrifuging; centrifugal fluid was diluted to 0.5 g·mL⁻¹, AB-8 type macroporous resin was washed by 1 BV of water, whose diameter and height ratio was 1:6. The flow velocity of sample loading absorption and edulcoration was 2 BV·h⁻¹ and sample loading quantity was that each gram resin matched with solution containing 1.5 times raw medicinal material. Eventually, eluting with 4 BV of 70% ethanol by flow velocity of 4 BV·h⁻¹ and then collecting eluent. Transfer rates of total flavonol glycosides and calycosin-7-O-β-D-glucoside were 78.22% and 43.81%. **Conclusion:** This optimized purification process is credible, stable and applicable to mass production of Kemin Qidan prescription.

[Key words] Kemin Qidan prescription; total flavonol glycosides; macroporous resin; purification process; calycosin-7-O-β-D-glucoside

[收稿日期] 20150806(011)

[第一作者] 王协和,在读硕士,从事中药新制剂、新剂型、新技术研究, Tel:15208307167, E-mail:1648824245@qq.com

[通讯作者] * 宋英,教授,硕士生导师,主任药师,从事中药新制剂、新剂型、新技术研究, Tel:028-87783735, E-mail:1046849223@qq.com

克敏芪丹方为成都中医药大学附属医院的经验方,由黄芪、白术、防风、牡丹皮组成,具有益气活血、宣肺通窍的功效,用于治疗气虚血瘀导致的变应性鼻炎。该方以汤剂形式在临床上使用,为方便患者用药,拟将其改成鼻喷剂。鼻腔给药具有疗效确切、起效快等特点^[1]。但研究中发现其渗透压偏高,因此需要进一步纯化以平衡渗透压。大孔吸附树脂是一类具有较好吸附性能的有机高聚物吸附剂,当前在中药制剂纯化、天然药物中活性成分的提取分离方面显示了独特作用,目前已被广泛应用于黄酮类成分的提取纯化^[2-4]。前期药理研究表明克敏芪丹方的药理活性成分为黄酮类。故本实验以毛蕊异黄酮葡萄糖苷和总黄酮苷含量为指标,通过单因素试验优选克敏芪丹方总黄酮苷的大孔吸附树脂纯化工艺,为该有效部位的工业化生产和该复方的临床应用提供参考。

1 材料

UV-2700 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),TD5M-WS 型多管架自动平衡离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司),1100 系列高效液相色谱仪(美国惠普公司),JA2003 型上海电子天平(上海精密科学仪器有限公司),BP211D 型 1/10 万电子分析天平(德国赛多利斯公司)。

D101, S-8, AB-8 型大孔吸附树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司);黄芪、白术、防风等药材饮片均购于四川新荷花中药饮片股份有限公司,经成都中医药大学附属医院药剂科副主任药师盛蓉鉴定,均符合《中国药典》2015 年版(一部)相关项下的要求;毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111920-201203, 100080-200707),水为重蒸馏水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量测定

2.1.1 色谱条件^[5-7] Boston Phlex ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.2% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 13 min, 13% ~ 15% A; 13 ~ 23 min, 15% ~ 20% A; 23 ~ 30 min, 20% ~ 40% A; 30 ~ 40 min, 40% A; 40 ~ 42 min, 40% ~ 13% A),检测波长 260 nm,流速 1 mL · min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 10 μL。理论板数按毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰计 > 3 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品 5.11 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇

定容,摇匀,即得。

2.1.3 标准曲线绘制 精密吸取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液 0.3, 0.5, 1, 2, 5, 10 mL 至 10 mL 量瓶中,按 2.1.1 项下条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 30\,379X + 11.328$ ($r = 1.000$),线性范围 3.066 ~ 102.2 mg · L⁻¹。

2.1.4 供试品溶液的制备 精密量取样品溶液 2 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2 总黄酮苷的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品 12.19 mg,置 50 mL 棕色量瓶中,加乙醇适量,超声使溶解,放冷,加乙醇定容至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 检测波长的确定 吸取芦丁对照品溶液和样品溶液各 1 mL,置 25 mL 量瓶中,加水至 6 mL,加入 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加入 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加入 5% 氢氧化钠溶液 10 mL,加水至刻度,摇匀,放置 15 min。以相应试剂作空白,于 400 ~ 800 nm 扫描,结果在 509 nm 处对照品溶液和供试品溶液有较好的吸收,故选择检测波长 509 nm。

2.2.3 标准曲线的绘制 分别吸取芦丁对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL 置 25 mL 量瓶中,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液。以相应试剂作空白,于 509 nm 处测定吸光度 A 。以质量浓度为横坐标, A 为纵坐标,得回归方程 $Y = 12.735X - 0.016$ ($r = 0.9996$),线性范围 9.752 ~ 58.512 mg · L⁻¹。

2.3 样品溶液的制备 按处方比例称取各药材,除黄芪以,其他 3 味药加 10 倍量水浸泡 3 h,蒸馏提取 0.6 倍药材量芳香水,备用。蒸馏后的药液滤过;黄芪与白术、防风、牡丹皮药渣加 10 倍量水煎煮 3 次,每次 1 h,滤过,合并滤液,滤液浓缩至适量。

2.4 药液比考察 将药液加水稀释至不同质量浓度(1:1, 1:1.6, 1:2, 1:3, 1:5 g · mL⁻¹),于 3 000 r · min⁻¹ 离心 20 min,上清液加水定容至原体积,测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量,计算损失率分别为 24.82%, 17.19%, 17.20%, 13.40%, 8.38%; RSD 分别为 1.3%, 1.4%, 1.5%, 1.2%, 2.0%。结果表明上清液质量浓度越低,有效成分损失越少,但由于生产上离心设备容量有限,确定选择药液质量浓度 0.5 g · mL⁻¹ 进行离心,此时药液相对密度 1.05 (60 °C)。

2.5 树脂的预处理^[8] 用乙醇浸泡树脂 > 24 h,使

其充分溶胀,搅拌使气泡排出,湿法装柱。用乙醇冲洗至流出液加适量水(约 1:5)无白色浑浊,用水洗至流出液无醇味,用 5% 盐酸溶液 4 BV 以流速 5 BV·h⁻¹通过树脂层,加 5% 盐酸溶液 1 BV 浸泡 2 h,水洗至中性;用 5% 氢氧化钠溶液 4 BV 以流速 5 BV·h⁻¹通过树脂层,加 5% 氢氧化钠溶液 1 BV 浸泡 3 h,水洗至中性。

2.6 纯化工艺考察 树脂表面基团不同对成分的吸附能力不同,洗脱能力亦不同,通常以树脂的比吸附量和洗脱率为评价指标。考察 D101, AB-8, S-8 型大孔吸附树脂对药液中总黄酮苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的比吸附量和洗脱率。

2.6.1 树脂型号 精密称取 3 种型号树脂各 3 份,每份 5 g(湿重),分别置具塞锥形瓶中,精密加入 1 g·mL⁻¹药液 50 mL,每 10 min 振摇 1 次,每次 30 s,持续振摇 2 h,静置 24 h,分别吸取上清液,测定总黄酮苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量,计算比吸附量,其余过滤,用滤纸吸干树脂表面的药液,精密加入 95% 乙醇 50 mL,每 10 min 振摇 1 次,每次 30 s,持续振摇 2 h,静置 24 h,分别吸取上清液,测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷和总黄酮苷含量,计算各树脂的洗脱率,见表 1。比吸附量 = (上样液中指标成分的含量 - 吸附后药液中指标成分的含量) × 上样液体积 / 树脂质量,洗脱率 = (上样液中指标成分含量 - 吸附后药液中指标成分的含量) × 100% / 上样液中指标成分的含量。结果表明 S-8 型大孔树脂对毛蕊异黄酮葡萄糖苷的吸附性能较好,但洗脱率较差。D101, AB-8 型大孔树脂的吸附和洗脱效果相差不多,综合考虑,选择 AB-8 型大孔树脂。

表 1 克敏芪丹方总黄酮苷纯化工艺的大孔树脂型号筛选

Table 1 Selection of macroporous resin for purification of total flavonol glycosides in Kemin Qidan prescription

树脂型号	总黄酮苷		毛蕊异黄酮葡萄糖苷	
	比吸附量 /mg·g ⁻¹	洗脱率 /%	比吸附量 /mg·g ⁻¹	洗脱率 /%
D101	18.34	40.00	1.44	85.43
AB-8	19.16	42.34	1.50	84.52
S-8	22.95	12.07	2.28	67.01

2.6.2 上样液质量浓度 分别称取处理好的 AB-8 型树脂 50 g(湿重),湿法装柱,径高比 1:6,分别加入 0.25 g·mL⁻¹药液 200 mL,0.5 g·mL⁻¹药液 100 mL,1.0 g·mL⁻¹药液 50 mL 上柱;完全吸附后加水 2 BV 冲洗至无色,加 70% 乙醇 8 BV 以 4 BV·h⁻¹流速

洗脱,收集洗脱液,挥尽乙醇浓缩并定容至 1 g·mL⁻¹,测定,计算总黄酮苷转移率分别为 42.61%, 44.32%, 46.59%, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷转移率依次为 76.19%, 78.21%, 79.26%。故选择上样液质量浓度 0.5 g·mL⁻¹。

2.6.3 上样量 取 0.5 g·mL⁻¹样品溶液 890 mL(约相当于 6 BV),以 2 BV·h⁻¹的流速通过径高比 1:6 的树脂(50 g,树脂干重约 33.6 g)柱,分段收集洗脱液,每 0.5 BV 为 1 份,测定总黄酮苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量。以段数编号为横坐标,指标成分含量为纵坐标,绘制泄露曲线,见图 1。结果显示在洗脱过程中,毛蕊异黄酮葡萄糖苷成分含量泄露较少;而总黄酮苷在收集第 5 份流出液时,总黄酮苷泄露量已达 9.5%;此时流出液共 185 mL,除去树脂间体积约 20 mL,共 165 mL;此时树脂与 0.5 g·mL⁻¹的药液体积比为 1:2.2,树脂质量(湿重)与生药量的比例为 1:1.65。最后上样量确定为 1 g 树脂上 1.5 倍生药量的药液。

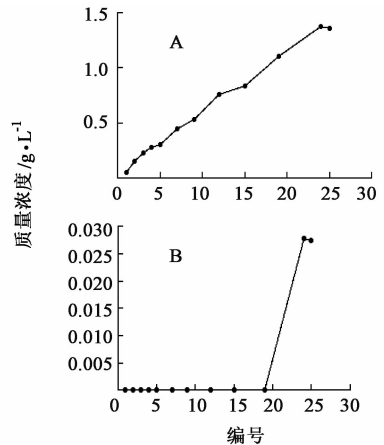


图 1 克敏芪丹方中总黄酮苷(A)和毛蕊异黄酮葡萄糖苷(B)的泄露曲线

Fig. 1 Leakage curves of total flavonol glycosides (A) and calycosin-7-O-β-D-glucoside (B) in Kemin Qidan prescription

2.6.4 醇洗用量 取 0.5 g·mL⁻¹上样液 200 mL,以 2 BV·h⁻¹的流速上样,加水 1 BV 清洗,加 70% 乙醇 8 BV 以 4 BV·h⁻¹流速洗脱,前 2 BV 洗脱液收集 1 次,之后每 1 BV 收集 1 次,浓缩至适当体积。以 70% 乙醇洗脱体积为横坐标,洗脱率为纵坐标,绘制洗脱曲线,见图 2。结果显示 70% 乙醇 3 BV 即可转移 98% 的毛蕊异黄酮葡萄糖苷葡萄糖苷和 95% 以上的总黄酮苷,为洗脱充分,最后选择 70% 乙醇用量 4 BV。

2.7 验证试验 称取预处理好的树脂 3 份,每份 50 g(相当于干树脂 100.7 g)装玻璃柱(直径 4.6

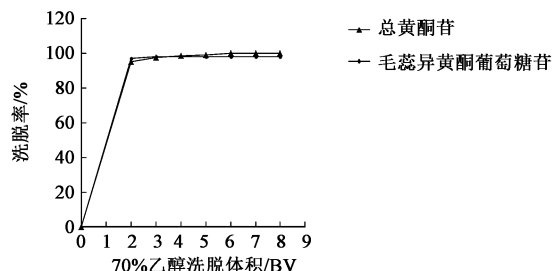


图 2 克敏芪丹方中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和总黄酮苷的洗脱曲线
Fig. 2 Elution curves of total flavonol glycosides and calycosin-7-O-β-D-glucoside in Kemin Qidan prescription

cm)内,径高比 1:6,柱体积约 220 mL,取 0.5 g·mL⁻¹上样液 3 份,每份 150 mL,按优选的工艺进行上样和洗脱,收集洗脱液并浓缩至相应体积,测定指标成分含量,见表 2。结果表明该纯化工艺稳定可行。

表 2 克敏芪丹方总黄酮苷纯化工艺的验证试验

Table 2 Verification test of purification process of total flavonol glycosides in Kemin Qidan prescription

编号	毛蕊异黄酮葡萄糖苷		总黄酮苷	
	转移率	纯度	转移率	纯度
1	78.52	1.24	43.25	14.07
2	76.91	1.26	44.62	13.92
3	79.22	1.28	43.56	14.45

3 讨论

大孔吸附树脂是以吸附性和筛选性原理相结合的一种表面吸附剂。其吸附能力的大小与树脂的比表面积、表面电性、孔径、能否与被吸附物形成氢键等有关。根据“相似相溶”原理进行洗脱^[9]。大孔吸附树脂在分离纯化中,是一个吸附与解吸附的过程,纯化的结果受多方面因素影响,如大孔吸附树脂型号、上样液浓度、上样量、洗脱液等,应综合考虑各种影响因素,以取得最佳分离效果。本研究中由于水提液中含有植物组织、尘土等杂质,加入到树脂柱上会使柱子堵塞,因此对提取液进行了前处理。常用的大孔树脂上柱液前处理方法包括过滤、离心、醇沉等。从预试验结果可知,离心法药液澄清,且操作简单,较醇沉法节约成本,故确定采用离心法。同时,在预试验中发现乙醇体积分数对药液的澄清度有较大影响,醇沉体积分数 50% 时有明显沉淀,醇沉体积分数 60% 时溶液混浊且出现沉淀,而醇沉体积分数 70% 时溶液澄清且沉淀不明显,故选择 70% 乙醇作为洗脱液。

本文选择了极性不同的 S-8, AB-8, D101 型大孔树脂,前者极性大,AB-8 型树脂中等极性,后者为非极性。黄酮类化合物的结构复杂多样,一般结构中存在酚羟基和糖苷键,是一类弱极性的化合物,溶解度因结构类型不同而有很大差异。游离黄酮类化合物一般不溶于水,易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂,而黄酮苷一般易溶于水、乙醇、甲醇等极性强的溶剂。总黄酮苷在洗脱过程中容易泄露可能是一些游离黄酮类化合物在 AB-8 型大孔树脂中吸附不牢固,易被洗脱出来;也可能是与洗脱液的浓度有关,乙醇体积分数越低,洗脱液极性越强,黄酮苷类化合物越容易被洗脱出来。而毛蕊异黄酮葡萄糖苷不易泄露可能是与其结构中具酚羟基有关。结果表明 AB-8 型大孔树脂对总黄酮苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的吸附量大且洗脱容易,确定的吸附与洗脱条件简单易行,用于克敏芪丹复方中总黄酮苷的分离富集,取得了良好的效果,可为建立可控的生产工艺流程和创新药物的开发研制提供参考。

[参考文献]

[1] 柴峰. 中药鼻康复喷剂在内窥镜鼻窦手术中的应用[J]. 四川中医, 2002, 20(8): 70-71.

[2] 郑亚杰, 张长弓, 李晓斌. 大孔吸附树脂分离纯化山楂总黄酮的研究[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2004, 33(2): 136-138.

[3] 朱梦良, 招丽君, 梁新丽, 等. 大孔吸附树脂分离纯化葛根总黄酮和葛根素的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 23-26.

[4] 覃金玲, 宋爱华, 黄付伟, 等. 大孔树脂分离纯化青皮中总黄酮的工艺研究[J]. 中国药师, 2012, 15(8): 1108-1110.

[5] 李圆圆, 宋英, 方芳, 等. HPLC 测定益心通脉合剂中丹参素钠和毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 64-67.

[6] 梁丽娟, 赵奎君, 屠鹏飞, 等. HPLC 法同时测定黄芪中 4 种黄酮类成分的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(15): 1385-1387.

[7] 李圆圆, 宋英, 方芳, 等. 正交设计优选益心通脉合剂提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 32-34.

[8] 赵惠茹, 马姣姣, 魏彩霞, 等. 大孔吸附树脂分离纯化蒲公英中总黄酮的工艺研究[J]. 中国药业, 2014, 23(12): 81-83.

[9] 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): 1380-1384.

[责任编辑 刘德文]