

聚合物纳米微球制备金丝桃素

王金林¹, 李前琼^{1,2}, 王晓利¹, 张俊松^{1*}

(1. 深圳职业技术学院, 广东 深圳 518055; 2. 广东药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 利用聚合物纳米微球材料分离纯化金丝桃素。方法: 采用 PEK 微球对金丝桃素提取物进行富集, 运用 PDCX 微球纯化, 通过 ODS 柱制备高纯度金丝桃素, 通过单因素试验优选纯化工艺。采用 HPLC 测定金丝桃素含量, 流动相甲醇-0.006 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄ (7:1, 加 H₃PO₄ 调 pH 6.5), 检测波长 590 nm。结果: PEK 微球对金丝桃素的静态饱和吸附量 8.5 mg·g⁻¹, 解析率 89.6%, 经 PEK 微球动态柱富集的金丝桃素样品纯度 3.2%, 回收率 89.9%; 经 PDCX 微球纯化后, 金丝桃素纯度 33.0%, 回收率 80.1%; 经 ODS 柱制备的金丝桃素纯度达 91.6%, 回收率 86.7%。结论: 该制备工艺高效、环保、经济, 适用于金丝桃素等不稳定性成分的分离纯化。

[关键词] 金丝桃素; PEK 微球; PDCX 微球; 分离纯化工艺; 贯叶金丝桃

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0034-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014070034

Preparation of Hypericin by Polymer Nanospheres

WANG Jin-lin¹, LI Qian-qiong^{1,2}, WANG Xiao-li¹, ZHANG Jun-song^{1*}

(1. Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China;

2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare high purity of hypericin by polymer nanospheres. **Method:** Hypericin extract was enriched by PEK nanospheres, then PDCX nanospheres further purification, high-purity of hypericin was prepared by ODS column, single factor tests were adopted to optimize purification technology. HPLC was employed to determined the content of hypericin with mobile phase of methanol-0.006 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄ (7:1, added H₃PO₄ adjusted pH to 6.5) and detection wavelength of 590 nm. **Result:** Static saturated adsorption capacity of PEK nanospheres for hypericin was 8.5 mg·g⁻¹ with elution ratio of 89.6%, after extract was enriched by PEK nanospheres column, purity of hypericin was 3.2% with recovery rate of 89.9%; Purity of hypericin was 33.0% through PDCX nanospheres chromatography, recovery rate was 80.1%; Hypericin with a purity of 91.6% was obtained by ODS column chromatography, recovery rate was 86.7%. **Conclusion:** This preparation process was efficient and economical, which was suitable for separation and purification of hypericin and other unstable ingredients.

[Key words] hypericin; PEK nanospheres; PDCX nanospheres; separation and purification technology; *Hypericum perforatum*

贯叶金丝桃又名贯叶连翘, 具有清热解毒、收敛

止血、利湿等功效^[1]。金丝桃素属萘啶二萜酮类化合物, 具有抗病毒、抗肿瘤^[2-4]、抗抑郁、抗菌消炎等药理活性。金丝桃素为贯叶金丝桃中最具生物活性的物质, 但含量极低(约 0.04%, 萘啶二萜酮类化合物按金丝桃素计)且稳定性较差, 对光照、温度、pH 等敏感^[5]。同时贯叶金丝桃中存在与金丝桃素结构、性质极其类似的伪金丝桃素, 伪金丝桃素含量约为金丝桃素的 3 倍, 致使金丝桃素分离纯化困难。

[收稿日期] 20130726(011)

[基金项目] 深圳职业技术学院重点科研项目(08KJba019)

[第一作者] 王金林, 硕士, 助理研究员, 从事药物化学研究, Tel:0755-26019010, E-mail:wjl0506@szpt.edu.cn

[通讯作者] * 张俊松, 硕士, 教授, 从事药物化学研究, Tel: 0755-26019366, E-mail: junsongzhang@yahoo.com.cn

目前国内对金丝桃素分离纯化方法的研究较少^[6]。本实验利用新型单分散聚合物纳米微球介质对金丝桃素进行分离纯化,制备高纯度的金丝桃素。

1 材料

FB-1 型恒流泵(上海金达生物仪器有限公司), LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),依利特 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), JMF-320 型多级闪蒸器(河南金鼎科技发展有限公司), 5810R 型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司), MFS-II 型三维旋混仪(深圳潘西诺生物科技有限公司), Alpha2-4 型冻干机(德国 CHRIST 公司)。

中压柱(2.5 cm × 15 cm, 上海沪西分析仪器厂), 中压柱(1.0 cm × 10 cm, GE 公司), 金丝桃素对照品(瑞士 Alexis 公司, 批号 L15535/a, 纯度 > 99%), 贯叶金丝桃浸膏(常州神马植物提取有限公司), 甲基丙烯酸酯型聚合物纳米微球(PEK 微球, 粒径 42 μm)、苯乙烯型聚合物纳米微球(PDCX 微球, 粒径 30 μm)均由深圳纳微科技有限公司惠赠, 水为蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 PEK 微球富集金丝桃素

2.1.1 样品溶液的制备 称取贯叶金丝桃浸膏 1 kg, 加 60% 乙醇 6 L 避光超声提取 30 min, 加入 10% 明胶溶液 1.5 L, 加无水乙醇调醇浓度至 75%, 静置过夜, 滤过, 滤液闪蒸浓缩, 即得。经 HPLC 检测, 金丝桃素质量浓度 0.6 g·L⁻¹。

2.1.2 PEK 微球的预处理 取 PEK 微球, 加无水乙醇浸泡过夜, 弃去悬浮物, 水洗至无醇味, 备用。

2.1.3 静态吸附-洗脱试验 精密称取经预处理、干燥后的 PEK 微球 0.5 g, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入样品溶液 25 mL, 置三维旋混仪上, 避光恒温振荡 24 h, 离心(4 000 r·min⁻¹, 10 min), 测定上清液中金丝桃素质量浓度, 色谱条件为依利特 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流动相甲醇-0.006 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄ (加 H₃PO₄ 调 pH 6.5, 7:1), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 590 nm, 进样量 10 μL。取吸附饱和的 PEK 微球, 加入 80% 乙醇 25 mL 振荡洗脱 24 h, 离心, 取上清液, 测定上清液中金丝桃素质量浓度, 计算 PEK 微球的饱和吸附量和洗脱率。

$$Q = (C_0 - C_1) V / m; D = C_2 V_2 / Qm \times 100\%$$

式中 Q 为饱和吸附量, C_0 为提取液中金丝桃素质量浓度, C_1 为吸附后上清液中金丝桃素质量浓

度, V 为提取液体积, m 为微球质量, D 为洗脱率, C_2 为解吸液中金丝桃素质量浓度, V_2 为洗脱液体积。经计算, PEK 微球的饱和吸附量 8.5 mg·g⁻¹, 洗脱率 89.6%。

2.1.4 动态吸附-洗脱试验

2.1.4.1 上样流速考察 精密称取预处理好的干燥 PEK 微球 2 g, 装柱, 样品溶液分别以 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 mL·min⁻¹ 流速通过 PEK 微球柱, 按 2.1.3 项下色谱条件测定流出液中金丝桃素含量, 结果动态吸附量分别为 7.0, 7.0, 4.1, 1.2 mg·g⁻¹, 故选择上样流速 2.0 mL·min⁻¹。

2.1.4.2 上样量考察 取样品溶液以 2.0 mL·min⁻¹ 的流速上样, 收集流出液, 每 10 mL 为 1 管, 按 2.1.3 项下色谱条件测定流出液中金丝桃素含量, 结果显示金丝桃素含量随上样量增加而增加, 金丝桃素上样量在 20 ~ 30 mL 内出现泄漏, 上样量 > 30 mL 后泄漏增多, 饱和点 60 mL, 故选择上样量 10 mL (1 BV) 较合适。

2.1.4.3 动态洗脱 分别用水和体积分数 10%, 30%, 40%, 50%, 60% 的乙醇溶液以 2.0 mL·min⁻¹ 流速洗脱, 结合 TLC 和 HPLC 检测金丝桃素, 确定梯度洗脱程序为依次加水, 10% 乙醇, 30% 乙醇, 40% 乙醇洗脱除杂, 加 60% 乙醇洗脱富集, 洗脱体积分别为 2.5, 3, 6, 4, 8 BV, 按 2.1.3 项下色谱条件金丝桃素含量, 计算回收率 89.9%, 金丝桃素纯度 3.2%。

2.2 PDCX 微球纯化金丝桃素

2.2.1 PDCX 微球的预处理 取 PDCX 微球, 加无水乙醇浸泡过夜, 弃去悬浮物, 水洗至无醇味, 备用。

2.2.2 洗脱剂的选择 取 PEK 微球富集的金丝桃素样品, 加 50% 丙酮溶解作为上样液。将预处理好的 PDCX 微球装柱, 依次用 30% 乙醇、丙酮、甲醇各 2 BV 平衡后, 上样, 依次加体积分数 30%, 50%, 70% 的乙醇、甲醇、丙酮进行梯度洗脱, 收集各溶剂的洗脱液, 计算金丝桃素样品纯度分别为 26.3%, 28.4%, 33.0%, 回收率分别为 71.5%, 72.3%, 80.3%, 流动相消耗体积分别为 15, 18, 8 BV, 说明用甲醇和乙醇梯度洗脱耗时较长, 且金丝桃素纯度较低; 而选用丙酮梯度洗脱时流动相消耗少, 且金丝桃素纯度和收率都较高, 故选用丙酮进行梯度洗脱。

2.2.3 上样液质量浓度考察 将经 PEK 微球富集的金丝桃素样品, 加 50% 丙酮配制成金丝桃素质量浓度分别为 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9 g·L⁻¹ 的上样液, 上样量 1/3 BV, 加丙酮梯度洗脱, 计算金丝桃素

纯度分别为 34.5%, 33.0%, 24.0%, 17.6%, 14.8%, 回收率分别为 84.2%, 80.1%, 70.1%, 62.5%, 58.4%, 表明当上样液质量浓度 $>0.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 金丝桃素的纯度和回收率下降较大, 综合洗脱剂消耗量和洗脱周期考虑, 选择上样液质量浓度 $0.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.4 上样量考察 取 $0.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 上样液, 上样量分别为 1/5, 1/4, 1/3, 1/2, 1 BV, 加丙酮梯度洗脱, 计算洗脱液中金丝桃素纯度分别为 33.6%, 33.4%, 33.0%, 24.7%, 18.6%, 回收率分别为 84.4%, 82.0%, 80.1%, 69.0%, 56.6%。结果表明上样量为 1/5 ~ 1/3 BV 时, 金丝桃素的回收率和纯度相差不大; 而上样量 $>0.5 \text{ BV}$ 时, 金丝桃素纯度和回收率下降较大, 故选择上样量 1/3 BV。

2.3 金丝桃素的精制 经 PDCX 微球纯化后金丝桃素样品溶液, 浓缩, 上样至 ODS 柱, 加甲醇- $0.006 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液 (7:1, 用 H_3PO_4 调 pH 6.5) 洗脱, 洗脱流速 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 收集洗脱液, 按 2.1.3 项下色谱条件测定金丝桃素纯度 91.6%, 回收率 86.7%。

3 讨论

聚合物纳米微球具有机械强度高、化学稳定性好、可耐受较宽的 pH 和多种有机溶剂等优点, 且粒径分布均一、可控, 可有效避免沟流、压力不稳等缺点, 故聚合物纳米微球适用于药物的分离和纯化^[7]。PEK 微球对金丝桃素的静态吸附量较大, 解吸附率高, 但分离度较低, 故 PEK 微球仅适合于金丝桃素的富集。PDCX 微球对金丝桃素具有较高的分离度, 故选择 PDCX 微球纯化金丝桃素。PDCX 微球较 PEK 微球机械强度小, 使用乙醇水溶液洗脱时, 金丝桃素被固定相保留的质量较大, 洗脱速度慢, 耗流动相, 易造成金丝桃素回收率偏低, 而使用丙酮洗脱可较好地克服洗脱效率偏低的现象。

金丝桃素的纯化方法较多, 包括硅胶^[8]、聚酰胺、大孔树脂、Sephadex LH-20^[9] 柱色谱, 高速逆流色谱法等。但金丝桃素在硅胶、聚酰胺等分离介质上存在较多的死吸附, 导致金丝桃素损失较多且收率较低; 而 Sephadex LH-20 柱虽可获得高纯度的金

丝桃素, 但其不耐酸碱且载药量低。本文使用的聚合物纳米微球, 具有载药量高、回收率较高等优点, 且整个工艺过程中仅使用乙醇、丙酮等低毒性溶剂作为流动相, 工艺高效、环保。

金丝桃素的化学性质非常不稳定, 对光照、温度和空气中氧敏感, 在提取、分离、纯化过程中应尽可能避免强光照射和高温环境。本文采用多级闪蒸器浓缩金丝桃素样品溶液, 并通过冷冻干燥得到金丝桃素干燥品, 较为有效地避免了金丝桃素在制备过程中被氧化、分解。

[参考文献]

- [1] 中国科学院西北植物研究所. 秦岭植物志. 第 1 卷 [M]. 北京: 北京科学出版社, 1981: 303.
- [2] Wang X L, Guo Y, Yang S, et al. Cellular and molecular mechanisms of photodynamic hypericin therapy for nasopharyngeal carcinoma cells [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2010, 334(3): 847.
- [3] 王晓利, 王彩虹, 郭懿, 等. 光诱导金丝桃素对人鼻咽癌细胞 CNE-2 的毒作用和凋亡研究 [J]. 中成药, 2010, 32(8): 1296.
- [4] Cole C D, Liu J K, Sheng X M, et al. Hypericin-mediated photodynamic therapy of pituitary tumors: preclinical study in a GH4C1 rat tumor model [J]. J Neurooncol, 2008, 87(3): 255.
- [5] Bilia A R, Bergonzi M C, Morgenni F, et al. Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations [J]. Int J Pharm, 2001, 213(1/2): 199.
- [6] 李晓坤, 于雷, 郝鹏飞, 等. 金丝桃素的酶提取工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 46.
- [7] 段宝玲, 张雪霞, 任风芝, 等. 一种高纯度替考拉宁的制备方法: 中国, 201210221636 [P]. 2012-06-30.
- [8] 崔颖, 梁剑平, 王玲, 等. 贯叶连翘中金丝桃素的提取分离方法 [J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(3): 26.
- [9] Karioti A, Vincieri F F, Bilia A R. Rapid and efficient purification of naphthodianthrones from St. John's wort extract by using liquid-liquid extraction and SEC [J]. J Sep Sci, 2009, 32(9): 1374.

[责任编辑 全燕]