

聚酰胺树脂精制裸花紫珠总黄酮的工艺优选

张鹏威¹, 苏文琴¹, 刘晓^{2*}, 刘勇³

(1. 海南医学院药学院, 海口 571199; 2. 温州市中医院, 浙江温州 325000;
3. 温州医科大学附属第二医院, 浙江温州 325027)

[摘要] **目的:** 优选聚酰胺树脂分离纯化裸花紫珠总黄酮的工艺条件。**方法:** 以总黄酮含量为指标, 利用静态-动态吸附-洗脱试验考察聚酰胺树脂纯化总黄酮的行为, 通过单因素试验考察饱和吸附量、pH、洗脱溶剂用量等工艺参数。**结果:** 最佳精制工艺参数为上样液质量浓度 0.073 g·mL⁻¹, 上样量 2 BV, 上样液 pH 3.0, 加水 3 BV 洗脱杂质, 用 80% 乙醇 3 BV 洗脱, 收集乙醇洗脱液; 总黄酮纯度由 5.6% 提高至 42.3%, 平均保留率 89.6% (RSD 3.56%)。**结论:** 采用聚酰胺树脂纯化裸花紫珠总黄酮的效果良好, 为裸花紫珠新制剂的开发提供实验依据。

[关键词] 裸花紫珠; 总黄酮; 聚酰胺树脂; 单因素试验; 静态-动态吸附试验; 纯化工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0023-03

[doi] 10.11653/syjf2014060023

Optimization of Purification Technology for Total Flavonoids from *Callicarpa nudiflora* by Polyamide Resin

ZHANG Peng-wei¹, SU Wen-qin¹, LIU Xiao^{2*}, LIU Yong³

(1. School of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou 571199, China;

2. Wenzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wenzhou 325000, China;

3. The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology of total flavonoids from *Callicarpa nudiflora* by polyamide resin. **Method:** With the content of total flavonoids as index, adsorption and elution behavior of polyamide resin for total flavonoids was investigated by static-dynamic adsorption-elution test, single factor tests were adopted to optimize purification technology for total flavonoids taking saturated adsorption, pH, elution volume and other parameters. **Result:** Optimum purification technology parameters were as follows: the concentration of sample solution 0.073 g·mL⁻¹, sample volume of 2 BV, pH of sample solution 3.0, eluted impurities with 3 BV water, then eluted with 3 BV of 80% ethanol; Purity of total flavonoids was up to 42.3% from 5.6%, average retention rate was 89.6% (RSD 3.56%). **Conclusion:** Purification effect of total flavonoids from *C. nudiflora* by polyamide resin was feasible, and this study could provide experimental basis for development of new formulations from *C. nudiflora*.

[Key words] *Callicarpa nudiflora*; total flavonoids; polyamide resin; single factor test; static-dynamic adsorption test; purification technology

[收稿日期] 20131024(024)

[基金项目] 海南省重点科技计划项目(ZDXM20120095); 浙江省公益技术研究社会发展项目(2012C23082); 海南医学院科研培育基金项目(HY2010-011)

[第一作者] 张鹏威, 博士, 副教授, 从事药物制剂开发和药物质量标准研究, Tel:0898-66894429, E-mail:zpw0803@163.com

[通讯作者] * 刘晓, 硕士, 副主任医师, 从事中药制剂开发研究, Tel:0577-88078316, E-mail:57914983@qq.com

裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. 主要分布于广东、广西、海南等地,具有抗菌、止血、散瘀消肿之功效,主治各种炎症、外伤出血、跌打肿痛、风湿肿痛、肺结核咳血、胃肠出血等^[1],其主要有效成分为黄酮类化合物,如紫珠萜酮、芹菜素、木樨草素、槲皮素、芦丁及其配糖体等^[2-3]。目前已上市裸花紫珠制剂的提取工艺多采用水煎煮法,质量控制主要以芦丁为指标成分测定总黄酮含量^[4],但有关裸花紫珠总黄酮提取工艺的报道较少。本实验采用聚酰胺树脂吸附法提取精制裸花紫珠总黄酮,通过单因素试验优选提取工艺参数,为裸花紫珠制剂的开发提供参考。

1 材料

UV-1600 型紫外分光光度计(天津拓普)。聚酰胺树脂(40~60目,河北沧州宝恩化工有限公司),芦丁对照品(批号 100080-200707,中国食品药品检定研究院),裸花紫珠水提浸膏(海南九芝堂药业有限公司,含水量 39.2%),水为蒸馏水,试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 裸花紫珠总黄酮的含量测定^[4]

2.1.1 标准曲线的绘制 精密称取芦丁对照品 10 mg,置 50 mL 量瓶中,加 60% 乙醇溶解并稀释到刻度,得对照品储备液。精密吸取该储备液 0,1,2,3,4,5,6 mL 分别置于 25 mL 量瓶中,各加水至 6 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加 4% 氢氧化钠溶液 10 mL,加水定容至刻度,摇匀,放置 15 min。以第 1 管为空白对照,于 507 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $A = 15.223C + 0.0002$ ($r = 0.9991$),线性范围 8~48 mg·L⁻¹。

2.1.2 样品测定 取待测溶液,精密吸取适量溶液(1~6 mL),照 0 项下方法,自“分别置于 25 mL 量瓶中,各加水至 6 mL”开始操作,测定各样品溶液 A,根据回归方程计算总黄酮含量。

2.2 聚酰胺树脂的预处理 取聚酰胺树脂装入玻璃柱中,用 95% 乙醇冲洗至洗出液呈无色,将洗脱液滴入水中无浑浊产生即可,放尽乙醇,置于烘箱中 50℃ 烘干,备用。

2.3 上样液的制备 取裸花紫珠水提浸膏,加适量水稀释成不同质量浓度上样液。

2.4 聚酰胺树脂精制工艺优选

2.4.1 饱和吸附量考察 准确称取干燥的聚酰胺

树脂 0.50 g,共 9 份,分别置于离心管中,依次加入总黄酮质量浓度 9 g·L⁻¹ 的裸花紫珠提取液 0.4,0.8,1.6,2.0,2.4,2.8,4.0,5.6,7.2 mL,各加水至 20 mL,每隔一段时间振摇 1 次,吸附 24 h 使其充分平衡,测定平衡液中总黄酮质量浓度,计算吸附量,结果见图 1,表明当上样液中总黄酮质量浓度达 0.073 g·mL⁻¹ 时,上样 20 mL 时刚好达到吸附饱和。

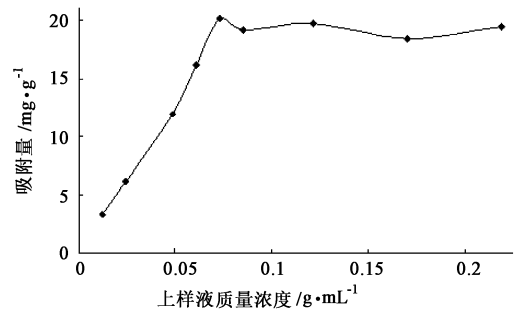


图 1 上样液质量浓度对裸花紫珠总黄酮吸附量的影响

2.4.2 pH 考察 黄酮类化合物为多羟基酚类,呈弱酸性,故 pH 对其吸附性能具有一定影响。室温下准确称取聚酰胺树脂 0.50 g,共 5 份,各加入总黄酮质量浓度 0.073 g·mL⁻¹ 的上样液 20 mL,用 HCl 或 NaOH 溶液调节溶液 pH 分别为 1.0,3.0,5.0,7.0,9.0,其他操作同 2.4.1 项,结果总黄酮吸附量依次为 22.1,28.3,19.1,3.1,0.68 g·L⁻¹,表明 pH 3 时总黄酮吸附率最高;当 pH < 3 时,吸附率下降,原因是由于酸性较低,聚酰胺树脂分子中酰胺基可结合质子发生质子化反应^[5];随着 pH 升高,总黄酮吸附率急剧降低,因为黄酮类化合物的弱酸性逐渐被中和,溶液中酚羟基被离子化,故黄酮类化合物被吸附能力下降,该结果与罗朵生等^[6] 研究结果一致,故确定上样液 pH 3.0。

2.4.3 静态吸附动力学曲线 精密称取干燥聚酰胺树脂 0.50 g,加入 pH 3 的上样液(总黄酮质量浓度 0.073 g·mL⁻¹) 20 mL,室温搅拌,每隔 30 min 取溶液测定总黄酮质量浓度,绘制吸附动力学曲线,结果见图 2,表明聚酰胺吸附裸花紫珠总黄酮速度较快,30 min 可达到饱和吸附量的 57%,90 min 即可达到饱和吸附量的 90%,最后逐渐趋于吸附平衡。

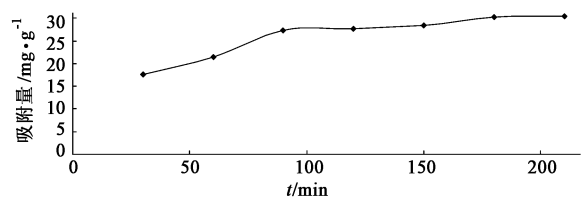


图 2 裸花紫珠总黄酮的静态吸附速率曲线

2.4.4 泄漏曲线考察 准确称取干燥聚酰胺树脂 5 g,量取 pH 3 的上样液(总黄酮质量浓度 $0.073 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),以流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 连续通过树脂柱(径高比 1:8)^[6],收集流出液,每 20 mL 为 1 个流份,测定 A,计算总黄酮含量,绘制泄漏曲线见图 3,结果显示上样液体积为 20 mL 时,总黄酮泄露率 4.63%,之后随上样液体积的增大,总黄酮泄露率逐渐增大,故确定树脂质量-上样液体积(1:4),即约相当于每 g 干树脂吸附 0.292 g 干浸膏中裸花紫珠总黄酮。

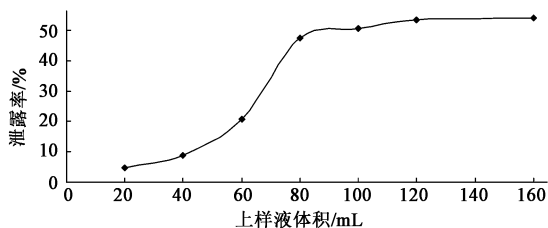


图3 裸花紫珠总黄酮在聚酰胺树脂柱上的泄露曲线

2.4.5 洗脱溶剂考察 精密称取干燥聚酰胺树脂 5.0 g,按优选的工艺条件进行吸附,加水 4 BV (1 BV = 10 mL)洗脱,收集水洗液,每 1 BV 收集 1 份;依次用体积分数为 20%,40%,60%,80% 的乙醇溶液各 2 BV 洗脱,洗脱流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,分别收集洗脱液。结果测得水洗液干膏质量分别为 93.8,35.7,11.0,4.4 mg,乙醇洗脱液中总黄酮累计洗脱率分别为 7.4%,65.9%,83.1%,91.3%,表明加水 3 BV 即可洗脱总杂质质量的 97.0%,故确定水洗用量 3 BV,选择 80% 乙醇为洗脱溶剂。

2.4.6 洗脱剂用量考察 精密称取干燥聚酰胺树脂 5.0 g,按优选的工艺条件进行吸附,加水 3 BV 洗脱,弃去洗脱液,加 80% 乙醇洗脱,洗脱液流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,收集洗脱液,每 1 BV 为 1 份,测定 A,计算总黄酮累积洗脱率分别为 29.7%,78.8%,88.4%,92.5%,故确定乙醇用量 3 BV。

2.4.7 验证试验 取干燥聚酰胺树脂 5.0 g,取 pH 3 上样液(总黄酮质量浓度 $0.073 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)以 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 连续通过树脂柱(径高比 1:8),按优选的工艺条件进行洗脱,收集乙醇洗脱液,测定出膏率和总黄酮含量。洗脱液减压干燥得总黄酮提取物,计算总黄酮平均保留率 89.6% (RSD 3.56%),总黄酮纯度由原浸膏的 5.6% 提高至 42.3%,说明该工艺在保留有效成分基础上能大幅提高有效成分纯度。

3 讨论

聚酰胺树脂为有机高聚吸附剂,具有选择性好、吸附容量大、解吸容易等优点,应用于含酚羟基类化合物的富集纯化效果较好^[7-9]。但植物提取物中均富含鞣质,鞣质为多元酚化合物,易被聚酰胺吸附且吸附力极强,不易被醇洗脱^[5],故树脂在重复使用后会引发树脂表面吸附饱和,导致吸附性能下降,应采用合适的方法进行活化处理,如加 5% NaOH 溶液浸泡处理即可基本除尽鞣质^[10]。此外聚酰胺树脂粉体粒径较细,本文所用树脂粒径是目前常用粒径中最粗的,但上样及洗脱时液体流出速度较慢,本文选择的吸附和洗脱速度均接近最大流速,要增加流速可考虑采用加压或减压技术。

[参考文献]

- [1] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所,中国医学科学院药物研究所,北京医科大学药学院,等. 中药志. 第5册[M]. 北京:人民卫生出版社,1994:147.
- [2] 高飞鹏,汪豪,叶文才,等. 裸花紫珠叶的化学成分[J]. 中国药科大学学报,2010,41(2):120.
- [3] 蔡金平,董琳,关薇薇,等. 裸花紫珠的研究进展[J]. 现代药物与临床,2012,27(1):60.
- [4] 谌乐刚,宋永强. 分光光度法测定裸花紫珠药材水提取物中总黄酮的含量[J]. 华西药学杂志,2005,20(5):449.
- [5] 黄松,丁婕,陶艳,等. 聚酰胺树脂精制甜茶总黄酮的工艺研究[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(3):311.
- [6] 罗朵生,朴胜华,黄利华,等. 聚酰胺树脂精制绞股蓝总黄酮的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(17):17.
- [7] 郭清梅. 聚酰胺纯化仙鹤草总黄酮的研究[J]. 海峡药学,2013,25(3):51.
- [8] 贾薇,陈家仪,曾元儿,等. 聚酰胺纯化枳实总黄酮的工艺研究[J]. 中药新药与临床药理,2012,23(5):586.
- [9] 苏红,兰燕宇,马琳,等. 采用聚酰胺除赤芍冻干粉中赤芍提取物鞣质的工艺研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(6):632.
- [10] 徐任生. 天然产物化学[M]. 北京:科学出版社,1993:30.

[责任编辑 全燕]