

聚酰胺树脂精制绞股蓝总黄酮的工艺优选

罗朵生¹, 朴胜华¹, 黄利华¹, 郭姣^{2*}

- (1. 国家中医药管理局高脂血症“调肝降脂”重点研究室, 国家中医药管理局“脂代谢”三级实验室, 广东药学院, 广州 510006;
2. 广东省代谢性疾病中医药防治重点实验室, 广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] **目的:** 优选聚酰胺树脂分离纯化绞股蓝总黄酮的工艺条件。**方法:** 采用紫外分光光度法, 以总黄酮含量为考察指标, 研究在静态和动态条件下, 聚酰胺树脂吸附和洗脱总黄酮的行为, 筛选出聚酰胺树脂精制绞股蓝总黄酮的最优工艺参数。**结果:** 最佳工艺参数为生药质量浓度 $0.35 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 上样液 pH 3, 温度为室温, 4 BV 60% 乙醇洗脱。此工艺条件下, 总黄酮纯度由粗品的 23.91% 提高到 81.97%, 纯化物中总黄酮保留率高达 90.11%。**结论:** 采用聚酰胺树脂纯化绞股蓝总黄酮效果良好, 适用于工业化生产。

[关键词] 绞股蓝; 总黄酮; 聚酰胺树脂; 精制

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)17-0017-03

Optimization of Purification Technology for Total Flavonoids from *Gynostemma pentaphyllum* by Polyamide Resin

LUO Duo-sheng¹, PIAO Sheng-hua¹, HUANG Li-hua¹, GUO Jiao^{2*}

- (1. Key Unit of Modulating Liver to Treat Hyperlipemia, State Administration of Traditional Chinese Medicine (SATCM), Level 3 Laboratory of Lipid Metabolism SATCM, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong TCM Key Laboratory for Metabolic Diseases, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology for total flavonoids from *Gynostemma pentaphyllum* by polyamide resin. **Method:** With the content of total flavonoids as index, UV spectrophotometry was used, adsorption and elution behavior of polyamide resin for total flavonoids was investigated under static and dynamic conditions, and to select optimum technology parameters of purification technology for total flavonoids by polyamide resin. **Result:** Optimum purification technology parameters were: at room temperature, the concentration of crude drug $0.35 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 3.0 and 4 BV 60% ethanol as eluant. Under these conditions, purity of total flavonoids increased from 23.91% to 81.97%, retention rate of total flavonoids in the purified was up to 90.11%. **Conclusion:** Purified effect of total flavonoids from *G. pentaphyllum* by polyamide resin was preferable, it was suitable for industrial production.

[Key words] *Gynostemma pentaphyllum*; total flavonoids; polyamide resin; purification

绞股蓝具有清热解毒、止咳祛痰、益气养阴等作 用, 是 2010 年版《中国药典》未收载品种^[1]。研究

[收稿日期] 20120308(004)

[基金项目] 广州市科技计划项目(2009Z1-E361); 广东省自然科学基金团队项目(10351022401000000); 广东省教育部产学研结合项目(2009B090300349)

[第一作者] 罗朵生, 硕士, 助理研究员, 从事中药物质基础研究, Tel:020-39352609, E-mail:lds0901@163.com

[通讯作者] * 郭姣, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中医药防治代谢性疾病的研究, Tel:020-39359898, E-mail:gyguoyz@163.com

表明,绞股蓝中含有皂苷、黄酮、多糖、氨基酸及维生素等化学成分,目前对绞股蓝化学成分的研究主要集中在其皂苷类成分,对黄酮类成分研究较少。近年来黄酮类化合物日益引起人们重视,国内外研究发现大多数黄酮类化合物具有显著的生理活性,如抗氧化和清除氧自由基作用、抗癌、改善心脑血管循环、扩张冠状动脉血管等作用^[2]。因此,绞股蓝黄酮类化合物具有重要的研究价值。绞股蓝中含有的黄酮类成分主要为槲皮素、芦丁、商陆素和异属李素等^[3]。本试验旨在优选聚酰胺树脂精制绞股蓝总黄酮的工艺条件,为绞股蓝及其相关产品中黄酮类物质研究的开发应用提供实验依据。

1 材料

Dionex ultimate 3000 型高效液相色谱仪(德国戴安公司),槲皮素对照品(批号 H-009-110526,成都瑞芬恩生物科技有限公司),绞股蓝药材购于广州致信药业有限公司,经广东药学院何伟教授鉴定为葫芦科绞股蓝属植物绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 的干燥全草,聚酰胺树脂(60~100 目,河北沧州宝恩化工有限公司),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 聚酰胺树脂的预处理 取聚酰胺树脂装入玻璃柱中,用丙酮冲洗至洗出液无色,用 95% 乙醇冲洗,倒出,置于烘箱中 80 °C 烘干,备用。

2.2 上样液的制备 取绞股蓝药材,加 10 倍量 70% 乙醇加热回流提取 2 次,每次 1 h,滤过,合并滤液,减压回收乙醇至无醇味,加水溶解,得生药质量浓度 0.35 g·mL⁻¹ 溶液。

2.3 总黄酮的测定^[4]

2.3.1 标准曲线的绘制 精密称取干燥恒重的槲皮素对照品 10.05 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。精密吸取对照品溶液 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 mL,分别置 10 mL 量瓶中,精密加入 5% 亚硝酸钠 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,精密加入 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,加入 4% 氢氧化钠溶液 4 mL,分别用 70% 乙醇定容至刻度,摇匀,放置 15 min,置比色皿中,以空白溶液作对照,在 510 nm 处测吸光度(A)。以质量浓度对 A 绘制标准曲线,得回归方程 $C = 0.2393A - 0.0014$ ($r = 0.9997$)。结果表明,槲皮素在 0.008~0.048 g·L⁻¹ 与 A 呈良好线性关系。

2.3.2 样品测定 取供试品溶液,按 2.3.1 项下方法测定各样品溶液的 A,测定 3 次,取平均值,根据

回归方程计算绞股蓝总黄酮的质量浓度。

2.4 聚酰胺树脂精制工艺优选

2.4.1 上样液质量浓度考察 室温(25 °C)下,准确称取干燥的聚酰胺树脂 0.25 g,置离心管中,加水 20 mL 活化树脂 4 h,使其吸水饱和,滤掉多余水,分别加入质量浓度为 0.05,0.1,0.15,0.2,0.25,0.3,0.35 g·mL⁻¹ 的吸附液 10 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(Q)分别为 39.7,72.8,104.5,131.3,158.4,175.3,183.3 mg·g⁻¹。故选择上样液质量浓度 0.35 g·mL⁻¹。

2.4.2 pH 考察 黄酮类化合物为多羟基酚类,呈弱酸性,因此 pH 对其吸附性能有一定影响。本试验考察了聚酰胺树脂对 pH 分别为 1.0,3.0,5.0,7.0,9.0,11.0 的上样液的吸附情况。室温下准确称取聚酰胺树脂 0.25 g,具体操作同 2.4.1 项,加入 0.35 g·mL⁻¹ 上样液 10 mL,用 HCl 或 NaOH 溶液调节溶液 pH,结果 Q 分别为 304.7,376.7,289.9,157.4,69.1,10.3 mg·g⁻¹。由结果可知,pH 对吸附量影响较大,pH 3 左右时,吸附量大;在 pH < 3 的酸性吸附液中,树脂吸附率随 pH 降低而减小,推测由于在一定酸度下,聚酰胺树脂分子中的酰胺基可以结合质子发生质子化反应^[5],胺树脂吸附黄酮类化合物是依靠聚酰胺树脂中的酰胺键的羰基与黄酮类化合物中的酚羟基形成氢键而吸附,所以溶液低 pH 降低了聚酰胺树脂的吸附能力;当 pH > 3 时,聚酰胺树脂吸附能力随 pH 升高而下降。因为黄酮类化合物大多含有酚羟基,故显酸性,随 pH 增大,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,因此黄酮类化合物被吸附能力下降。所以过高或过低 pH 均不利于聚酰胺树脂的吸附,本试验选择 pH 3。

2.4.3 总黄酮静态吸附动力学曲线 准确称取干燥聚酰胺树脂 0.25 g,具体操作同 2.4.1 项,加入 0.35 g·mL⁻¹,pH 3 的吸附液 10 mL,在室温下搅拌,在不同时间取溶液测定总黄酮质量浓度,绘制吸附动力学曲线,见图 1。由图 1 可知,吸附开始时吸附速率最大,在 40 min 时,吸附量达到饱和量的 50% 左右,之后逐渐平缓,180 min 后趋于平衡。

2.4.4 泄漏曲线的考察 准确称取干燥聚酰胺树脂 5 g,取 0.35 g·mL⁻¹,pH 3 的上样液以流速 2 BV·h⁻¹ 连续通过树脂柱(径高比 1:8),每个流份收集 20 mL,测定吸光度并计算流份中总黄酮质量浓度(图 2)。经考察,当上样量为 40 mL 时(约 4

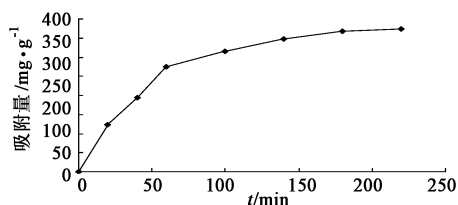


图1 聚酰胺树脂对总黄酮的静态吸附速率曲线

BV)开始有上样液总黄酮量5%泄漏,此时吸附生药量14 g,相当于每克聚酰胺树脂吸附生药2.8 g。

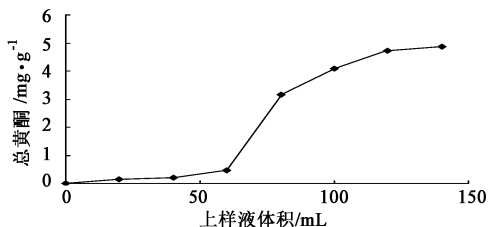


图2 总黄酮在聚酰胺树脂上的吸附曲线

2.4.5 洗脱溶剂考察 按上述吸附条件,精密量取处理后样品溶液通过树脂柱,用6 BV去离子水洗脱,前3 BV每BV收集1份,后3 BV合并为一份,依次用体积分数为20%,40%,60%,80%的乙醇各20 mL洗脱,洗脱液流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,分别收集洗脱液,测定水洗脱物干膏质量分别为0.468,0.053,0.021,0.004 g;乙醇洗脱液中总黄酮累计洗脱率分别为38.3%,58.4%,90.2%,92.4%。由结果可知,在1 BV水洗脱液中杂质质量为总杂质质量的85.8%,之后杂质洗脱量很少;60%乙醇累计洗脱率为90.22%,故确定洗脱溶剂为60%乙醇。

2.4.6 洗脱剂用量的考察 按照上述吸附条件,精密量取处理后样品溶液通过树脂柱,用3 BV水洗脱,量取60%乙醇60 mL洗脱,洗脱液流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,分段收集洗脱液,制备供试品溶液,测定总黄酮解析率分别为34.9%,81.0%,86.9%,92.8%,96.6%,结果显示4 BV 60%乙醇可达到92.8%洗脱率,故确定60%乙醇用量为4 BV。

2.5 验证试验 准确称取干燥聚酰胺树脂5 g,取 $0.35 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,pH 3的上样液40 mL上柱,以3 BV

水洗,加4 BV 60%乙醇洗脱,洗脱液流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,收集洗脱液,留样,测定其中总黄酮含量。洗脱液回收乙醇,减压干燥,称重,计算总固形物得率。取干燥物适量,测定其中总黄酮含量。计算总黄酮平均保留率90.11%。说明该工艺可行。

3 讨论

绞股蓝有降血压之功效,“星火计划”中将其列为“名贵中药材”之首位,目前尚未有系统研究和法定质量标准,尤其是针对绞股蓝总黄酮类成分,尚未见其有关分离纯化的文献报道。聚酰胺树脂为一种有机高聚吸附剂,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有较好的效果^[6-7]。本研究通过静态吸附试验,无论是静态吸附量还是静态解吸率,聚酰胺都比较理想,故选择聚酰胺对绞股蓝总黄酮进行纯化试验。绞股蓝总黄酮通过聚酰胺树脂分离纯化后,黄酮含量由粗品的23.91%提高到81.97%,纯度提高3.43倍,为其中试和工业化大生产提供了可靠的科学依据。

[参考文献]

- [1] 卢金清,陈黎,肖波,等. 绞股蓝药材黄酮类成分 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材,2007,30(8):929.
- [2] 刘芳,胡坪,Annika Kster. 绞股蓝药材黄酮类化合物的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药,2009,31(4):493.
- [3] 钟辉. 绞股蓝黄酮指纹图谱研究[J]. 湖北中医学院学报. 2010,12(3):31.
- [4] 张伟,葛志强,蒋建兰. 聚酰胺树脂分离纯化复方山楂提取物中总黄酮的研究[J]. 中草药,2009,40(1):63.
- [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] 苗建武,陈绍民,王超. 等聚酰胺树脂分离纯化丹参总酚酸的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):28.
- [7] 柯仲成,桂双英,周亚球. 聚酰胺树脂吸附纯化贯叶金丝桃中金丝桃苷的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(11):9.

[责任编辑 仝燕]