

大孔吸附树脂纯化愈肾颗粒中总黄酮工艺

谢雪,张宏达,陈昱竹,任国杰,王晓玲,许枏*
(辽宁中医药大学,辽宁大连 116600)

[摘要] 目的:研究大孔吸附树脂法纯化愈肾颗粒总黄酮最佳工艺。方法:以总黄酮的比吸附量、解析率、洗脱率等指标,选用 7 种大孔吸附树脂对愈肾颗粒总黄酮进行纯化。结果:HPD100 型大孔吸附树脂对愈肾颗粒的总黄酮具有较好的分离纯化能力。最佳工艺条件为 2 BV 的愈肾颗粒供试品溶液为上样量(含生药量为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),吸附速率为 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,分别用水 2 BV、30% 乙醇 3 BV、50% 乙醇 4 BV 洗脱,洗脱流速 $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,合并 30% 乙醇和 50% 乙醇洗脱液,浓缩,即为纯化的总黄酮。结论:纯化后总黄酮含量提高到 76% 以上,HPD100 型大孔吸附树脂可较好的纯化愈肾颗粒总黄酮。

[关键词] 大孔吸附树脂;总黄酮;愈肾颗粒;纯化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0008-03

Purification Technology of Total Flavonoids from Yushen Granules by Macroporous Resin

XIE Xue, ZHANG Hong-da, CHEN Yu-zhu, REN Guo-jie, WANG Xiao-ling, XU Nan*
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To study on optimum purification technology of total flavonoids from Yushen granules by macroporous resin. **Method:** With adsorption capacity, desorption rate and elution rate as indexes, purified total flavonoids of Yushen granules by seven macroporous resin. **Result:** HPD100 macroporous resin showed good separation and purification capabilities of total flavonoids from Yushen granules. The optimum technology conditions were as follows: 2 BV sample (dose of raw drug was $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) of Yushen granules formula was passed through the column with flow rate of $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, eluted by 2 BV water, 3 BV 30% ethanol, 4 BV 50% ethanol respectively, elution flow rate was $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$. Combined 30% and 50% ethanol elutes were concentrated to yield the purification of total flavonoids. **Conclusion:** The purity of total flavonoids was up to 76%. HPD100 could be well used in purifying total flavonoids from Yushen granule.

[Key words] macroporous resin; total flavonoids; Yushen granules; purification

愈肾颗粒是辽宁中医药大学附属医院院内制剂,由丹参、黄芪、白花蛇舌草等 8 味药的水煎液制成的颗粒剂,临床治疗紫癜性肾炎效果良好^[1]。前

期化学成分研究表明,其主要成分为大、中性极性化合物。总黄酮类成分含量约占总成分的 20% 以上,且具有一定程度的保护肾脏内皮细胞活性作用。为深入地研究复方的活性成分和药效作用机理,有必要对复方中总黄酮进行富集和纯化,从而为制剂工艺的优化提供科学依据。大孔吸附树脂具有吸附快、易解吸、吸附容量大、可再生,使用寿命长,成本低等优点,现已广泛应用于中药有效成分的富集^[2]。采用该方法富集纯化总黄酮的优势已有大量文献报道^[3]。本试验以比吸附量及洗脱率为指标,对 D101, HPD700, HPD100, HPD450, XAD16, DM130,

[收稿日期] 20110518(008)

[基金项目] 十一五重大新药创制项目(2009ZX09103-394)

[第一作者] 谢雪,在读研究生,从事中药化学成分及活性研究, Tel: 0411-87586014, E-mail: 0115jenny@163.com

[通讯作者] * 许枏,副教授,从事中药化学成分及活性研究, E-mail: xudanbs@163.com

XAD7HP等7种型号适于中等极性和大极性成分纯化分离的不同类型大孔吸附树脂^[4]进行考察,针对不同型号大孔树脂对复方中总黄酮的吸附和解析能力,筛选出对愈肾颗粒总黄酮具有良好纯化能力的树脂,并探讨了制备工艺。

1 材料

FA1004B型1/万分析天平(上海精密科学仪器有限公司),U3010型紫外分光光度计(日立)。D101,HPD700,HPD100,HPD450,DM130型树脂(河北沧州宝恩化工有限公司),XAD16,XAD7HP型树脂(罗门哈斯公司)。

芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号100080-200707),愈肾颗粒(辽宁中医药大学附属医院),所用试剂包(乙醇、甲醇等)均为分析纯,水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 愈肾颗粒加水配制成含生药量为 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,备用。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的芦丁对照品 10 mg ,置 50 mL 量瓶中,加 50% 甲醇适量,超声处理使溶解,放冷,加 50% 甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.3 紫外吸收光谱测定 精密取对照品溶液 3 mL ,供试品溶液 1 mL ,分别置于 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇至 6 mL ,加 5% NaNO_2 溶液 0.3 mL ,摇匀,放置 6 min ,加 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.3 mL ,摇匀,放置 6 min ,加 NaOH 溶液 3 mL ,加 50% 甲醇至刻度,摇匀,放置 15 min ,以相应试剂为空白,立即照紫外-可见分光光度法(2010年版《中国药典》一部附录VA),在 $400\sim 800\text{ nm}$ 进行扫描, 499 nm 处均有最大吸收,最终选定 499 nm 为检测波长。

2.4 标准曲线的绘制^[5-6] 精密吸取芦丁对照品溶液 $0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6\text{ mL}$,分别置于 10 mL 量瓶中,照对照品溶液的紫外吸收测定的方法,于 499 nm 处分别测定吸光度。以吸光度为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。得回归方程为 $Y = 8.1258X + 0.0243$ ($r = 0.9997$),线性范围 $5.08\sim 121.92\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.5 不同型号树脂筛选研究

2.5.1 树脂的预处理 分别称取D101,HPD700,HPD100,HPD450,XAD16,DM130,XAD7HP型树脂各 50 g ,用 95% 乙醇浸泡 24 h ,装入色谱柱中,用乙

醇洗脱,至流出的液与水(1:5)混合不产生白色浑浊,再以纯化水冲洗至无醇味,即得。

2.5.2 大孔吸附树脂型号的选择 精密吸取供试品溶液各 6 mL ,分别上样于装有已处理好的 3 mL 不同类型树脂的色谱柱,流速为 $1\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。上样后预吸附 0.5 h ,然后依次用蒸馏水, 30% 乙醇, 50% 乙醇, 70% 乙醇, 90% 乙醇洗脱,洗脱体积 4 BV ,流速为 $4\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。分别收集各部分洗脱液,减压浓缩,转移至 250 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度。精密吸取 4 mL 于 10 mL 量瓶中按2.3项下方法,于 499 nm 处分别测定吸光度,计算解析率(表1)。

表1 不同树脂对芦丁吸附与解析

树脂型号	比上样量 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	比吸附量 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	比洗脱量 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	解析率 $\%$
D101	15.78	13.79	12.11	87.82
AB-8	15.02	9.57	6.56	75.84
XAD16	15.78	13.07	12.24	87.04
XAD7HP	15.64	13.86	9.62	69.40
DM130	15.58	14.01	11.94	85.25
HPD100	15.48	14.73	13.62	94.72
HPD450	15.61	13.58	10.89	80.25
HPD700	15.48	12.05	11.16	92.55

注:比上柱量=(上柱液中总黄酮量-过柱液中总黄酮量)/树脂体积;比吸附量=(上柱液中总黄酮量-过柱液中总黄酮量-水洗液中总黄酮量)/树脂体积;比洗脱量=乙醇洗脱下来的总黄酮量/树脂体积;解析率=(比洗脱量/比吸附量) $\times 100\%$ 。

由表1可以看出,HPD100比吸附量和解析率均高于其他树脂,具有易吸附、易解析的特点,故选用HPD100大孔吸附树脂分离纯化愈肾颗粒的总黄酮。

2.6 愈肾颗粒总黄酮分离纯化研究

2.6.1 泄漏曲线的绘制 取已处理好的HPD100大孔吸附树脂 10 mL (相当于干树脂 6 g),湿法装柱($1\text{ cm}\times 35\text{ cm}$),平衡后,上样供试品溶液,流速 $1\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$,收集流出液,每 5 mL 为1个流份,共收集 20 份,前4个流份分别减压浓缩,转移至 5 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,精密吸取 1 mL 于 10 mL 量瓶中,按2.3项下方法,分别测定吸光度。后 16 个流份按2.5.2项下操作,分别测定吸光度,计算总黄酮含量,绘制泄漏曲线(图1)。

由图1可知,上样量为 25 mL 时,泄漏率为 10% ,确定 20 mL (2 BV)为最大上样量。

2.6.2 水洗用量的考察 将供试品溶液 20 mL 上大孔吸附树脂柱,分别用 $1, 2, 3, 4, 5\text{ BV}$ 的水洗除杂,流速 $4\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$,测定洗脱液中总黄酮含量分别

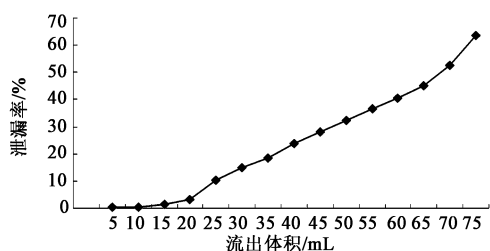


图 1 愈肾颗粒总黄酮泄漏曲线

为 0.06, 0.11, 0.15, 0.17, 0.19 mg; 并将洗脱液干燥至恒重, 干膏质量分别为 0.55, 0.64, 0.66, 0.66, 0.67 mg; 结果可知水对总黄酮含量影响较小, 当水量超过 2 BV 时, 水洗液的干膏量无明显差别, 所以用 2BV 水洗为宜。

2.6.3 洗脱溶媒及其用量的确定 精密吸取供试品溶液 20 mL 依法上柱, 先用 2 BV 蒸馏水以 4 BV·h⁻¹ 流速除杂, 再以流速 4 BV·h⁻¹ 依次用 30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇、90% 乙醇洗脱, 以 1 BV/份收集流份。分别取 30% 乙醇、50% 乙醇的各流份, 按 2.5.2 下操作, 测定吸光度; 另分别取 70% 乙醇、90% 乙醇各流份, 减压浓缩, 转移至 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度。精密吸取 2 mL 于 10 mL 量瓶中, 按 2.3 项下操作, 测定吸光度, 分别计算洗脱率(表 2)。

表 2 洗脱溶媒及其用量

洗脱溶媒乙醇 体积分数 /%	总黄酮洗脱率/%			
	1 BV	2 BV	3 BV	4 BV
30	4.96	19.93	16.80	8.00
50	9.07	15.44	12.74	3.72
70	2.20	1.93	0.89	0.55
90	0.85	0.43	0.27	0.21

注: 洗脱率 = (洗脱液中总黄酮量/树脂吸附总黄酮量) × 100%; 总黄酮上样量 237.29 mg。

结果表明, 30% 乙醇和 50% 乙醇可将 90% 以上的总黄酮洗脱下来, 而 70% 乙醇和 90% 乙醇洗脱下来的总黄酮量小于总洗脱量的 10%。由此可见 30% 乙醇和 50% 乙醇对总黄酮具有良好的解吸附作用, 故洗脱溶媒确定为 30% 乙醇和 50% 乙醇。经考察 30% 乙醇、50% 乙醇的用量分别为 3 BV 和 4 BV 可将 95% 总黄酮从树脂上洗脱下来。

根据试验结果, 确定大孔吸附树脂纯化愈肾颗粒中总黄酮的最佳工艺条件为采用 HPD100 型大孔吸附树脂, 2 BV 的愈肾颗粒供试品液(含生药量为 1 g·mL⁻¹) 上样, 吸附速率为 1 BV·h⁻¹, 2 BV 水洗除

杂, 3 BV30% 乙醇洗脱, 4 BV50% 乙醇洗脱, 洗脱流速 4 BV·h⁻¹, 收集 30% 乙醇和 50% 乙醇洗脱部分, 即为复方的总黄酮部分, 纯化后愈肾颗粒总黄酮量占总量的 76% 以上。

2.7 验证试验 精密吸取样品溶液 20 mL, 平行 3 份, HPD100 大孔吸附树脂 10 mL 吸附, 依次用水 2 BV、30% 乙醇 3 BV、50% 乙醇 4 BV 洗脱, 收集乙醇部分, 减压浓缩至 50 mL, 精密吸取 0.15 mL 于 10 mL 量瓶中, 按 2.3 项下操作, 测定吸光度, 计算洗脱率分别为 95.10%, 94.68%, 96.21%; 总黄酮质量分数分别为 75.21%, 76.93%, 78.32%。

3 讨论

试验选用的树脂包括中极性、弱极性和非极性 3 种类型, 从吸附和解吸附试验可以看出, HPD100 型大孔吸附树脂对愈肾颗粒中总黄酮具有较好的分离纯化能力。

由于处方中的黄酮类成分以黄酮和黄酮醇类化合物为主, 包括槲皮素、芦丁、山奈酚、蒙花苷等, 因此总黄酮含量测定选定芦丁为对照品。

愈肾颗粒水溶性良好, 20 mL 含总黄酮可达 240 mg 左右。根据 2010 年版《中国药典》要求, 目前取样量(6 ~ 20 mL) 制备供试品溶液需要稀释 250 ~ 500 倍左右, 如果增加取样量, 稀释倍数也会相应增加, 反复稀释过程中必然会带来更大的实验操作误差, 因此确定药液用量为 6 ~ 20 mL。经反复预试, 在目前的药液取样量条件下, 10 mL 树脂可以保证总黄酮的吸附, 验证试验结果显示重现性较好。

[参考文献]

- [1] 张君, 郭振武, 董娜, 等. 消斑愈肾剂治疗小儿紫癜性肾炎的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1994, 14(5): 298.
- [2] 侯世祥, 田恒康. 大孔吸附树脂在中药复方分离纯化工艺中的应用[J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(3): 131.
- [3] 邢攀科, 杨洁红, 张宇燕, 等. 大孔吸附树脂分离纯化补阳还五汤中总黄酮[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 1.
- [4] 高伟城, 蓝晓庆, 潘馨. 大孔吸附树脂在分离纯化总黄酮化合物中的应用[J]. 海峡药学, 2009, 21(7): 26.
- [5] 中国药典. 一部[S]. 2010: 29.
- [6] 钟明媚, 陈飞虎, 袁丽萍, 等. 大孔树脂对鬼针草总黄酮的吸附分离特性研究[J]. 中药材, 2007, 30(3): 338.

[责任编辑 全燕]