

聚酰胺树脂吸附纯化贯叶金丝桃中金丝桃苷的研究

柯仲成^{1*}, 桂双英², 周亚球²

(1. 黄山学院化学系制药工程教研室, 安徽 黄山 245041;

2. 安徽中医学院药学院药剂教研室, 安徽 合肥 230031)

[摘要] 目的: 研究聚酰胺树脂纯化贯叶金丝桃中金丝桃苷的工艺条件。方法: 采用 HPLC 法测定金丝桃苷的含量; 单因素法考察聚酰胺树脂对金丝桃苷的吸附性能以及洗脱参数。结果: 聚酰胺树脂对提取液中金丝桃苷的最佳分离条件为: 上柱液浓度为 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、流速为 $3.6 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 金丝桃苷比吸附量达 $2.33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 金丝桃苷纯度可达 28.96%。结论: 聚酰胺树脂可用于贯叶金丝桃中金丝桃苷的分离富集。

[关键词] 聚酰胺树脂; 贯叶金丝桃; 金丝桃苷; 吸附; 纯化

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)11-0009-03

Application of Polyamide Resin in Purification of Hyperoside from *Hypericum perforatum* L.

KE Zhong-cheng^{1*}, GUI Shuang-ying², ZHOU Ya-qiu²

(1. Huangshan University, Huangshan 245041, China; 2. Anhui College of TCM, Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To study the technological parameters of the purification process of hyperoside from *Hypericum perforatum* extractive. **Methods:** HPLC was used to analyze the content of hyperoside in the samples from the different technological process, and the adsorption and elution parameters were investigated. **Results:** The optimal parameters were as follows: the sample extract solution, whose content of hyperoside was $1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, was passed through the packed column with a flow rate of $3.6 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$. The adsorption rate of hyperoside was $2.33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, and the purity of hyperoside in the eluate reached 28.96%. **Conclusion:** Polyamide resin can be used to purify hyperoside in the extraction of *Hypericum perforatum* L.

[Key words] polyamide resin; *Hypericum perforatum* L.; hyperoside; adsorption; purification

贯叶金丝桃为常用中药,具有舒肝解郁,清热利湿,消肿止痛等功效。其主要有效成分为金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、槲皮苷等化合物,简称贯叶金丝桃总黄酮^[1,2]。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,应用于黄酮类等成分的富集纯化有较好的效果^[3,4]。但本法技术条件要求较高,其吸附效果易受上样液浓度、流速、洗脱剂等的影 响。本实验旨在通过对聚酰胺树脂富集、纯化金丝桃苷工艺条件与参数的研究,探索其工艺流程,建立质量控制方法,从而确立富集、纯化金丝桃苷的可行方法。

1 仪器试剂与材料

岛津 LC-10A 高效液相色谱仪(日本),贯叶金丝桃药材为藤黄科金丝桃属植物贯叶金丝桃 *Hypericum perforatum* L. 的干燥地上部分(采自四川古蔺地区,经安徽中医学院中药鉴定教研室潘鲁敏副教授鉴定);金丝桃苷对照品(批号:111521-200303)由中国药品生物制品检定所提供;聚酰胺(40#,湖南岳阳中国石化聚酰胺技术开发中心);甲醇、乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯;重蒸馏水自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Alltima C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 乙腈-水-磷酸(175: 825: 1) 为流动相, 检测波长 360 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 20 μL, 柱温为 40 °C。

2.2 金丝桃苷的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的金丝桃苷对照品 5.2 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 制成 0.208 mg·mL⁻¹ 金丝桃苷对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取贯叶金丝桃药材 100 g, 以 70% 乙醇 8 倍量回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压回收乙醇, 真空干燥得贯叶金丝桃提取物。取提取物约 40 mg, 精密称定, 加甲醇溶解后滤过, 定容至 50 mL 量瓶中, 制成供试品溶液。

2.2.3 标准曲线的绘制 精密吸取金丝桃苷对照品溶液 0.5, 1, 2, 3, 4 mL, 分别用甲醇定容至 10 mL, 配制得系列对照品溶液。分别进样 20 μL, 记录峰面积值 Y, 以 C 为横坐标, Y 为纵坐标, 得回归方程 $Y = 1.75 \times 10^6 C + 9.46 \times 10^4$, $r = 0.9999$, 说明金丝桃苷在(10.4~ 83.2) μg·mL⁻¹ 范围内具有良好的线性关系。

2.2.4 精密度试验 同一份对照品溶液, 浓度为 20.8 μg·mL⁻¹, 进样 20 μL, 重复 6 次, 测定峰面积, 结果 RSD 为 1.47%, 说明精密度良好。

2.2.5 重复性试验 按 2.2.2 项下取同一批贯叶金丝桃药材提取物 6 份, 制备样品溶液, 分别进样 20 μL, 测得峰面积 RSD 为 1.36%, 表明重复性较好。

2.2.6 稳定性试验 取供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 进样 20 μL, 测定峰面积, RSD 为 1.24%, 结果表明在 8 h 内样品溶液稳定性较好。

2.2.7 加样回收率试验 精密称取已知金丝桃苷的贯叶金丝桃提取物 40 mg, 精密加入金丝桃苷对照品(0.235 mg·mL⁻¹) 5 mL, 依法制备供试品溶液。分别进样 20 μL 测定峰面积, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 金丝桃提取物加样回收率试验结果

样品量 (mg)	加样量 (mg)	实测量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1.186	1.175	2.364	100.25		
1.224	1.175	2.361	96.77		
1.207	1.175	2.345	96.85	98.21	1.58
1.167	1.175	2.329	98.89		
1.189	1.175	2.359	99.57		
1.212	1.175	2.351	96.94		

2.2.8 样品的含量测定 按 2.2.2 项方法制备样品溶液, 精密吸取 20 μL, 进高效液相色谱仪, 测定金丝桃苷含量, 提取物中金丝桃苷含量为 2.62%。

2.3 工艺条件与参数优化^[5]

2.3.1 聚酰胺树脂预处理 聚酰胺树脂用乙醇充分浸泡溶胀, 湿法装柱, 用乙醇在柱上流动洗至乙醇液与水混合(1:2) 不呈白色混浊为止, 然后以大量水洗至无醇味。

2.3.2 静态吸附与解吸 精密称取聚酰胺处理好的树脂 1.0 g 于 100 mL 锥形瓶中, 精密加入金丝桃苷浓度为 1.168 mg·mL⁻¹ 的样品水溶液 10 mL, 盖紧瓶塞, 每隔 5 min 振摇 10 s, 持续 3 h, 然后静置 24 h, 使其吸附达到平衡后过滤, HPLC 法测定滤液中金丝桃苷含量。按下式计算比吸附量: 比吸附量 = (原液浓度 - 吸附液浓度) × 溶液体积 / 干树脂质量。对达到吸附饱和的树脂用 50% 乙醇 10 mL 解吸, 于 25 °C 在恒温振荡器中振荡 5 h, 滤过, 取滤液定容, HPLC 法测定滤液中金丝桃苷含量, 计算解吸率(%)。结果见表 2。

2.3.3 动态吸附 将 3 份金丝桃苷浓度为 1.168 mg·mL⁻¹ 的样品水溶液分别缓慢加入装有聚酰胺树脂的层析柱(树脂床体积为 50 mL), 控制流速分别为 2.0, 3.0, 4.0 mL·min⁻¹, 每 5 mL 收集 1 次流份, 测定

每个流份的金丝桃苷含量, 计算聚酰胺树脂对金丝桃苷的动态比吸附量, 结果见表 3。

表 2 聚酰胺树脂对金丝桃苷的静态比吸附量和解吸率

样品	比吸附量($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	解吸率(%)
1	2.53	81.64
2	2.48	82.53
3	2.60	81.77
平均	2.54	81.98

表 3 流速对树脂吸附量的影响

NO	流速($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	吸附量(mg)
1	2.0	109.4
2	3.0	116.8
3	4.0	100.7

由表 3 可知, 聚酰胺树脂对金丝桃苷的吸附以 $3.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速即 $3.6\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 为较佳, 在此流速下动态吸附曲线见图 1。图 1 显示: 第 20 流份开始, 树脂有泄漏, 泄漏前的比吸附量为 $2.33\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

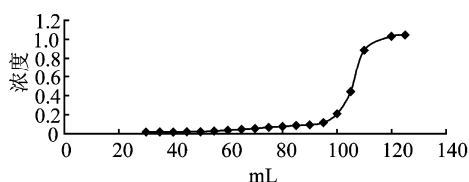


图 1 聚酰胺树脂对金丝桃苷的动态吸附曲线

2.3.4 上样液浓度的确定 用浓度不同的贯叶金丝桃提取物水溶液进行静态吸附试验。结果见图 2。由图 2 可知金丝桃苷浓度是影响树脂吸附性能的重要因素之一, 样品溶液中金丝桃苷浓度为 $1.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为宜。

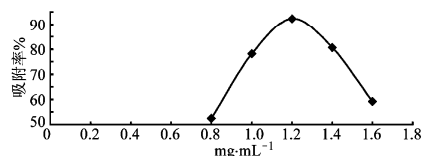


图 2 上样液浓度与吸附率的关系

2.3.5 洗脱曲线的考察 按上述条件将已吸附好样品的树脂依次用水、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 乙醇梯度洗脱, 每个浓度洗脱 5 个柱体积, 分别收集于 5 个试管中, HPLC 测定金丝桃苷含量, 绘制洗脱曲线(见图 3)。

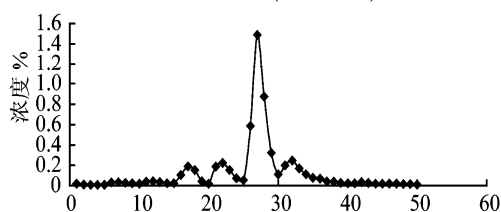


图 3 金丝桃苷洗脱曲线

由图 3 可知: 蒸馏水、10% 乙醇、20% 乙醇几乎洗不下金丝桃苷; 30%、40% 可以洗下少许, 50% 乙醇大部分将金丝桃苷洗脱, 60% 乙醇洗脱液中也有少量的金丝桃苷, 70%、80%、90% 乙醇中几乎没有金丝桃苷。确定 50% 乙醇为最佳洗脱剂。并且 5 BV 的浓度明显降低, 可认为树脂上的金丝桃苷已经基本洗脱完全。故确定洗脱剂的用量为 5 BV。

2.3.6 验证试验 称取 22 g 贯叶金丝桃药材提取物, 用蒸馏水溶解制备成上样液(金丝桃苷为 $1.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 依法上柱, 平行 3 份, 分别用 5 BV 水、5 BV 20% 乙醇、5 BV 50% 乙醇洗脱, 收集 50% 乙醇洗脱液, 回收乙醇, 减压干燥, 称得固形物重量, 并测定其金丝桃苷含量, 结果见表 4。

表 4 验证试验结果

实验号	金丝桃苷(mg)	固形物重量(g)	金丝桃苷纯度(%)
1	303.7	1.056	28.76
2	331.4	1.123	29.51
3	290.2	1.014	28.62
平均	308.4	1.064	28.96

3 讨论

采用聚酰胺树脂分离提纯贯叶金丝桃中金丝桃苷是可行的。当上样液金丝桃苷浓度为 $1.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 流速 $3.6\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 时, 聚酰胺树脂对金丝桃苷的吸附效果良好, 比吸附量达 $2.33\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$; 5 BV 的 50% 乙醇可将吸附在树脂上的金丝桃苷洗脱下来。通过该工艺, 可以有效去除糖类水溶性杂质及脂溶性杂质, 选择性地保留有效成分, 使金丝桃苷的含量由原提取物的 2.62% 提高到 28.96%。该产品颜色较浅, 吸潮性较低, 有利于制成各种制剂。

与静态吸附相比, 动态吸附的比吸附量偏低, 这可能与动态吸附过程中药液在树脂上停留时间大大缩短有关, 从而影响了树脂的吸附效果。

[参考文献]

- [1] 谢羽能, 吴 哄, 周素娣. 贯叶连翘两个黄酮的分离与鉴定[J]. 中药材, 2001, 24(11): 803-804.
- [2] 殷志琦, 叶文才, 赵守训. 贯叶连翘的化学成分研究[J]. 中草药, 2001, 32(6): 487-488.
- [3] 贝伟剑, 彭文烈, 罗 杰. 柿叶黄酮的大孔吸附树脂分离提纯富集[J]. 中成药, 2005, 27(3): 257-261.
- [4] 赵 丹, 肖 平. 越南巨竹竹叶中黄酮的提取纯化初步研究[J]. 四川食品与发酵, 2006, 42(134): 10-13.
- [5] 周心艳, 陈明宏. 贯叶连翘中金丝桃甙提取方法的研究[J]. 陕西中医, 1999, 20(8): 374-375.