

仁天然药用油厂的出厂检验报告),而分子蒸馏方法则可使其质量分数超过40%,因而具备了更好的应用前景。

3 讨论

根据正交试验考察了分子蒸馏中进料速度、刮膜速率、蒸馏温度对广藿香挥发油中广藿香醇提取率和质量分数的影响,经过综合分析可知,蒸馏温度的影响远远大于进料速度和刮膜速率的影响。

进一步考察温度对广藿香醇的提取率和质量分数的影响,结果随着温度的升高,广藿香醇的质量分数逐渐升高,但提取率却随着质量分数的增加而降低。综合考虑,蒸馏温度为65℃,进料速度为120 mL/h,刮膜速率为150 r/min时,广藿香醇质量分数达40.71%,提取率为76.55%,此参数条件最适

合产业化放大。

分子蒸馏技术与已有提取工艺相结合,实现药效标识性成分的提取与纯化,可得到比原有的水蒸气蒸馏法更高的有效成分的量,是一种有效的中药活性成分纯化方法。

参考文献:

- [1] Kazuo I, Takeshi K. The screening of Chinese crude drugs from Ca antagonist activity: identification of active principles from the aerial part of *Pogostemon cablin* and the fruits of *Prunus mume* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(2): 345-348.
- [2] 胡海燕, 彭劲甫, 黄世亮, 等. 分子蒸馏技术用于广藿香油纯化工艺的研究[J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(4): 320-322.
- [3] 刘廷礼, 丘 琴, 崔兆杰, 等. 气相色谱-质谱联用分析广藿香挥发油成分含量[J]. *中草药*, 1999, 30(12): 903-904.
- [4] 许松林, 徐世民, 干爱华. 天然产物分离的新技术—分子蒸馏[J]. *中草药*, 2001, 32(6): 562-563.
- [5] 黄月纯, 魏 刚. 气相色谱法测定广藿香中百秋里醇的含量[J]. *时珍国医国药*, 2006, 17(4): 503-504.

聚酰胺树脂分离纯化复方山楂提取物中总黄酮的研究

张 伟^{1,2}, 葛志强¹, 蒋建兰¹

(1. 天津大学化工学院 制药工程系, 天津 300072; 2. 廊坊师范学院化学与材料学院, 河北 廊坊 065000)

摘要:目的 研究聚酰胺树脂分离纯化复方山楂提取物的工艺及参数。方法 以总黄酮为考察指标, 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。结果 聚酰胺树脂对总黄酮为优惠吸附, 在生药质量浓度为0.255 g/mL、pH值4左右、温度为室温条件下吸附性能最好, 采用50%和75%乙醇溶液梯度洗脱效果最佳。结论 通过聚酰胺树脂分离纯化后, 纯化物中总黄酮保留率高达93.0%, 纯化物质量仅为纯化前的8.12%。说明采用聚酰胺树脂分离纯化复方山楂提取物是可行的。

关键词: 复方山楂提取物; 总黄酮; 聚酰胺树脂; 分离纯化; 吸附; 洗脱

中图分类号: R284.2; R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)01-0063-04

复方山楂提取物系由制何首乌、山楂、泽泻、荷叶、蒲黄、炒决明子6味中药经水提醇沉得到, 具有滋肝补肾、活血化瘀的功效。该提取物中含有黄酮类、蒽醌类、生物碱类成分^[1], 其中黄酮类化合物为主要药效成分, 主要来源于山楂、蒲黄、荷叶。山楂黄酮通过增强低密度脂蛋白受体活性和提高抗氧化能力, 抑制血清总胆固醇、低密度脂蛋白-胆固醇、APoB水平升高和防止高密度脂蛋白及APoA1水平下降, 从而预防脂质代谢紊乱及增强体内胆固醇清除^[2]。蒲黄黄酮是通过提高tPA活性、保护EC、抑制外源性胆固醇吸收等多种途径降低胆固醇和抗动脉粥样硬化^[3]。荷叶黄酮可明显降低血清胆固醇

及甘油三酯^[4]。聚酰胺树脂是由酰胺聚合而成的一类高分子物质, 它对黄酮类化合物有较强的吸附性能^[5], 主要通过氢键和范德华力吸附。本研究研究了复方山楂提取物中总黄酮在聚酰胺树脂上的吸附特性, 包括影响吸附量的单因素试验、静态吸附速率、静态解吸率和动态吸附、动态解吸率等。

1 仪器与材料

TU—1900 双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用公司; B üchi R201 旋转蒸发仪; BS210S 电子天平, 德国赛多利斯; Alpha1—2 冷冻干燥机, 德国 Christ 公司。

复方山楂提取物, 自制; 芦丁对照品, 批号

收稿日期: 2008-04-23

作者简介: 张伟(1976—), 男, 河北河间人, 硕士, 2000年毕业于河北工业大学化学工艺专业, 2007年毕业于天津大学化工学院, 主要从事中药现代化工程研究。E-mail: zwfriends@163.com

*通讯作者 蒋建兰 Tel: (022) 27400388 E-mail: jiang0202@126.com

0080-9705,中国药品生物制品检定所;聚酰胺树脂(14~30目),色谱用,上海医药(集团)上海化学试剂公司;试剂均为分析纯,天津大学科威公司。

2 方法与结果

2.1 聚酰胺树脂的预处理:取聚酰胺树脂装入色谱柱中,用丙酮以0.3 BV/h(树脂体积倍数)冲洗至洗出液无色,最后用5倍柱体积的95%乙醇冲洗,流速0.3 BV/h,倒出,置于烘箱中90℃烘干,备用。

2.2 上样液的制备:按处方量称取6味中药材,加水浸泡8 h,煎煮30 min,滤过,再加水,煎煮30 min,滤过,合并滤液,浓缩,然后加乙醇,充分搅拌,静置24 h,滤过,滤液浓缩至无乙醇味,加水溶解,得到相当生药质量浓度为0.255 g/mL溶液。

2.3 总黄酮的测定^[6]

2.3.1 标准曲线的绘制:精密称取干燥恒重的芦丁对照品13.0 mg,置50 mL量瓶中,加60%乙醇至刻度,定容,摇匀,即得,备用。精密吸取对照品溶液0.0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、2.8、3.2 mL,分别置10 mL量瓶中,分别加60%乙醇溶液至5 mL,精密加入5%亚硝酸钠0.3 mL,摇匀,放置6 min,再精密加入10%三氯化铝溶液0.3 mL,摇匀,放置10 min,再加入4%氢氧化钠溶液4 mL,分别用60%乙醇定容至刻度,摇匀,置比色皿中,以空白溶液作对照,在510 nm处测吸光度(A)值。以质量浓度(C)对A绘制标准曲线,计算得回归方程 $C = 0.0867A - 0.003$, $r = 0.9998$ 。结果表明,芦丁在0.0104~0.0832 mg/mL与吸光度呈良好线性关系。

2.3.2 样品测定:取供试品溶液,按标准曲线的绘制项下方法测定各样品溶液的吸光度值,测定3次,取平均值,根据回归方程计算得总黄酮的质量浓度。

2.4 聚酰胺树脂静态吸附与洗脱

2.4.1 吸附等温曲线:室温(16℃)下,准确称取干燥的聚酰胺树脂0.250 g置具塞试管中,加水浸泡树脂4 h,使其吸水饱和,滤掉多余水,然后分别加入含生药量为0.0255、0.051、0.102、0.153、0.204、0.255、0.357 g/mL的吸附液10 mL,吸附24 h,期间每隔一段时间振摇一次,使其充分平衡。测定平衡液中总黄酮的质量浓度,并计算相应吸附量(Q),得到吸附量与总黄酮质量浓度的吸附等温曲线见图1,以lnQ对lnC作图得到Freundlich曲线见图1。

$$Q = (C_0 - C_e)V/W$$

Q为吸附量(mg/g), C_0 为吸附起始质量浓度(mg/mL),

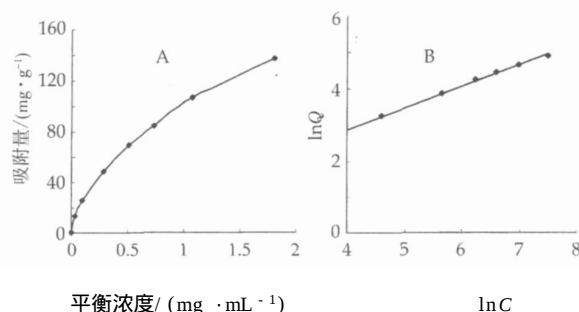


图1 聚酰胺树脂对总黄酮吸附的吸附等温线(A)和吸附等温线的Freundlich曲线(B)

Fig. 1 Isothermal adsorption curve (A) and its Freundlich curve (B) of total flavonoids adsorbed by versamide

C_e 为吸附平衡质量浓度(mg/mL), V 为吸附液体积(mL), W 为树脂质量(g)

由吸附等温线可知,聚酰胺树脂吸附总黄酮表现为优惠吸附,吸附过程符合Freundlich吸附等温式,其回归方程为 $\ln Q = 0.60033 \ln C + 0.46625$, $r = 0.9993$;即满足 $Q = KC^{1/n}$,其中常数 $1/n = 0.60033$, $K = 1.594$ 。 K 值粗略表示吸附能力的大小, $1/n$ 值粗略表示吸附强度的大小。说明聚酰胺树脂对山楂提取物总黄酮有良好的吸附性能,吸附能力大,吸附强度小,易解吸。

2.4.2 pH值对吸附的影响:黄酮类化合物为多羟基酚类,呈弱酸性,因此要找出吸附的最佳条件,有必要考察pH值对吸附性能的影响。本实验研究了聚酰胺树脂分别在pH值为3.00、3.98、4.97、6.00、7.00、8.00、9.00、10.00的上样液中的吸附情况。室温下准确称取聚酰胺树脂0.250 g,具体操作同2.4.1项,加入含生药量0.255 g/mL的上样液10 mL,用HCl或NaOH溶液调节溶液的pH值,其变化规律见图2。

可以看出pH值对吸附量影响较大,pH值在4

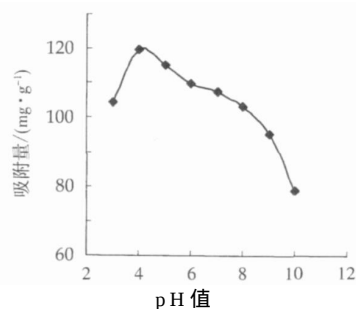


图2 pH值对聚酰胺树脂吸附总黄酮的影响

Fig. 2 Effects of pH value on total flavonoids adsorbed by versamide

左右时,吸附量大;在 pH 值 < 4 的酸性吸附液中,树脂吸附率随 pH 值降低而减小,这是由于在一定酸度下,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^[7],而聚酰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,所以溶液低的 pH 值降低了聚酰胺树脂的吸附能力;当 pH 值 > 4 时,聚酰胺树脂吸附能力随 pH 值升高而下降。因为黄酮类化合物大多含有酚羟基,故显酸性,随着 pH 值的增大,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也下降。所以过高或过低的 pH 值都不利于聚酰胺树脂的吸附,进行吸附的最佳 pH 值在 4 左右。

2.4.3 温度对吸附的影响:分别研究了在 15、20、25、30、35、40 下聚酰胺树脂吸附的规律,室温(16)下准确称取聚酰胺树脂 0.250 g,具体操作同 2.4.1 项,加入含生药量 0.255 g/mL pH 3.96 的吸附液 10 mL,结果见图 3。

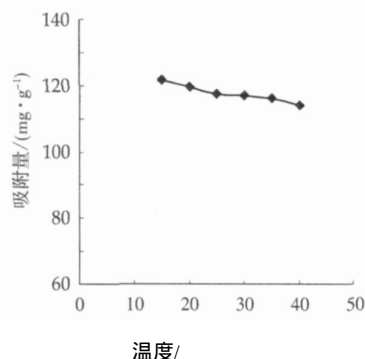


图 3 温度对聚酰胺树脂吸附总黄酮的影响

Fig. 3 Effects of temperature on total flavonoids adsorbed by versamide

吸附过程的自由能变化 $G = H - TS$,聚酰胺树脂吸附总黄酮的过程是自发过程, $G < 0$; 经过吸附后总黄酮得到富集,系统熵减小, $H < 0$, 即吸附过程伴随放热,因此温度的升高,不利于聚酰胺树脂的吸附。根据图 3 所知,其结果与理论相符。但在 15~40 的低温范围时,温度影响并不明显,吸附量只下降了 6%,所以在常温下温度对聚酰胺树脂吸附总黄酮影响不是主要因素。

2.4.4 总黄酮静态吸附动力学曲线:准确称取干燥聚酰胺树脂 0.500 g,具体操作同 2.4.1 项,加入含生药量 0.255 g/mL pH 3.96 的吸附液 10 mL,在室温 16 下搅拌,在不同时间取溶液测定总黄酮的质量浓度,绘制吸附动力学曲线,见图 4。可以看

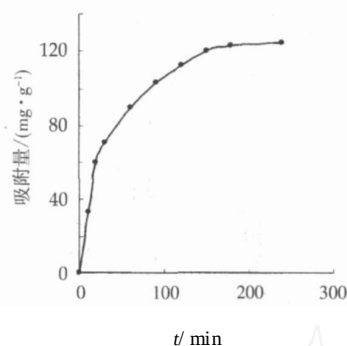


图 4 聚酰胺树脂的静态吸附速率曲线

Fig. 4 Static adsorption rate curve of total flavonoids adsorbed by versamide

出,吸附开始时吸附速率最大,在 20 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。

2.4.5 洗脱剂的选择:常用的洗脱剂有水、甲醇、乙醇、丙酮、醋酸乙酯、酸、碱以及它们的混合液,都有较强的洗脱能力,但甲醇具有毒性,丙酮等洗脱能力过强,易洗脱下大量杂质。考虑到实际工作中的其他问题,采用乙醇-水为洗脱剂。取干燥聚酰胺树脂 2.500 g,具体操作同 2.4.1 项,加入含生药量 0.255 g/mL, pH 值为 3.96 的吸附液 60 mL,充分平衡后,滤过,取湿树脂 0.880 g 至具塞试管中,分别加入水,10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%乙醇溶液 20 mL,洗脱 24 h,每隔一段时间振摇一次。取样测溶液中总黄酮的质量浓度,得到洗脱曲线,见图 5。可知当乙醇体积分数低于 20%时,其洗脱效果不理想;在 50%以上洗脱能力较强,70%乙醇洗脱率为 69.5%,效果最佳。根据本结果,确定采用乙醇 50%、75%的梯度洗脱。

2.4.6 聚酰胺树脂穿透曲线:在静态吸附确定的条件下,将上样液上柱吸附,以收集液中总黄酮的质量

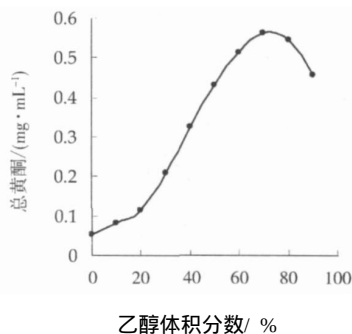


图 5 乙醇不同体积分数对洗脱性能的影响

Fig. 5 Effects of various ethanol concentration on elution property

浓度为上柱液的 5 % 为穿透点。到达穿透点时,收集体积为 2 倍柱体积,此时吸附生药量 63.11 g,相当于每克聚酰胺树脂吸附生药 2.42 g。

2.5 聚酰胺树脂动态吸附与洗脱

2.5.1 聚酰胺树脂动态吸附:取干燥聚酰胺树脂 26.09 g,装入直径 2.18 cm 树脂柱,树脂层高度 31.8 cm,装柱体积 118.6 mL。取生药质量浓度为 0.255 g/mL, pH 3.98, 温度 16 的提取液上柱,以 1.53 mL/min 连续通过树脂层,收集不同时间段的流出液,测定流出液中总黄酮质量浓度。以总黄酮质量浓度为纵坐标,上柱的累积生药量为横坐标,绘制吸附曲线,见图 6。

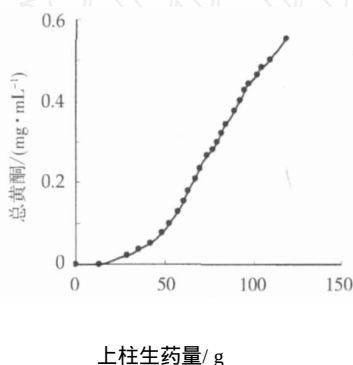


图 6 总黄酮在聚酰胺树脂上的吸附曲线

Fig. 6 Adsorption curve of total flavonoids adsorbed by versamide

2.5.2 聚酰胺树脂动态解吸:取已吸附药液的树脂柱,用 12 倍树脂体积的去离子水洗脱后,用 9 倍树脂体积的 50 % 乙醇洗脱,再用 11 倍树脂体积的 75 % 乙醇洗脱。收集洗脱液,测定水洗脱物干质量和乙醇洗脱液中总黄酮质量浓度,并以此为纵坐标,洗脱体积为横坐标,绘制洗脱曲线,并计算乙醇洗脱液中累积总黄酮质量。在常温下,分别用水,50 %、75 % 乙醇对已吸附的聚酰胺树脂进行洗脱,得到水洗脱曲线和乙醇洗脱曲线见图 7。由图 7-A 可知,在第 1 倍水体积中洗脱的杂质质量为总杂质质量的 85.3 %,之后洗脱量很少。由图 7-B 可知,第 1 倍体积仍为水洗脱,第 2 倍为过渡洗脱剂,9 倍柱体积后乙醇体积分数由 50 % 提高到 75 %;前 7 倍 50 % 乙醇洗脱总黄酮量为总的洗脱黄酮量的 77.23 %,所以在更换洗脱剂后,洗脱量变化很小。

2.6 纯化物的收集:用旋转蒸发仪减压浓缩收集的乙醇洗脱液,回收乙醇至无醇味,并冷冻干燥,得冻

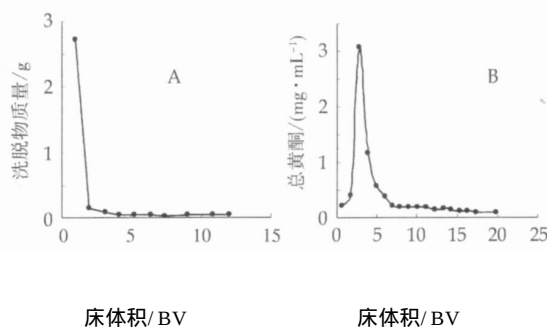


图 7 水(A)和乙醇(B)洗脱聚酰胺树脂上总黄酮的洗脱曲线

Fig. 7 Desorption curves of total flavonoids adsorbed by versamide eluted with water (A) and ethanol (B)

干粉,称定质量,计算纯化物中总黄酮的质量分数(总黄酮的质量分数 = 总黄酮质量/冻干粉的质量 × 100 %)。原处方的冻干粉质量为 19.033 g,总黄酮质量分数为 6.99 %,纯化后的冻干粉质量为 1.544 g,总黄酮质量分数为 80.1 %。纯化后的冻干粉质量仅为纯化前的 8.12 %,而总黄酮保留率高达 93.0 %。

3 结论

通过本实验研究,吸附液含生药量为 0.255 g/mL、pH 值为 4 左右、温度为常温时聚酰胺树脂吸附效果最佳,在此条件下聚酰胺树脂的吸附为优惠型吸附。采用 50 % 和 75 % 乙醇溶液梯度洗脱效果较好。

采用聚酰胺树脂柱色谱法分离纯化复方山楂提取物,工艺简单,成本低,收率高,且经动物药效实验证明,纯化物药效与纯化前无显著性差异,说明此分离纯化工艺可行。

参考文献:

- [1] 刘浩然,田宇旺.天然产物降脂活性成分综述[J].湖南中医药导报,2002,8(12):742-745.
- [2] 林秋实,陈吉棣.山楂及山楂黄酮预防大鼠脂质代谢紊乱的分子机制研究[J].营养学报,2000,22(2):131-136.
- [3] Zhao J, Zhang C Y, Xu D M, et al. The antiatherogenic effects of components isolated from *Pollen Typhae* [J]. *Thromb Res*, 1990, 57(6):957-966.
- [4] 杜力军,孙虹,李敏,等.荷叶大豆及其合剂调脂活性部位的研究[J].中草药,2000,31(7):526-528.
- [5] 田燕.黄酮类化合物在聚酰胺树脂上的层析行为[J].大连医科大学学报,2002,24(2):147-148.
- [6] 刘斌,石任兵,王伟.蒲黄总黄酮含量测定方法研究[J].北京中医药大学学报,2001,24(4):23-25.
- [7] 何星存,邹月娥,伍正清,等.聚酰胺树脂吸附机理的研究[J].广西师范大学学报:自然科学版,1997,15(3):58-61.