

聚酰胺树脂纯化油菜花粉黄酮部位工艺研究

杨必成¹, 刘 海², 杨义芳^{1*}, 黄春跃¹, 金丽丽¹, 刘征宇³, 蒋贝妮^Δ

1. 上海医药工业研究院, 上海 200240

2. 赣南医学院药学院, 江西 赣州 341000

3. 南昌大学医学院, 江西 南昌 330000

摘要:目的 研究聚酰胺树脂精制纯化油菜花粉抗前列腺增生黄酮部位工艺及参数。方法 以总黄酮质量分数为考察指标, 通过不同条件下聚酰胺树脂对油菜花粉黄酮静态和动态吸附与解吸特性的研究, 确定聚酰胺树脂对油菜花粉抗前列腺增生黄酮部位的最佳精制工艺; 采用优选的最佳精制工艺对油菜花粉黄酮粗提物进行多次精制, 得到高质量分数的油菜花粉抗前列腺增生的黄酮部位。结果 在室温和 pH 值为 10.0, 油菜花粉黄酮粗提物质量浓度为 8 mg/mL 时, 以 80%乙醇 1.5 mL/min 体积流量洗脱效果最佳。结论 油菜花粉黄酮粗提物经过聚酰胺树脂精制纯化后黄酮的质量分数由粗品的 24.65%提高到 74.90%, 提高了 2.03 倍, 说明聚酰胺树脂精制纯化油菜花粉抗前列腺增生黄酮部位是可行的。

关键词: 油菜花粉; 前列腺增生; 黄酮; 聚酰胺树脂; 精制纯化

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)11-2240-04

Purification of flavonoids from pollen of *Brassica campestris* with polyamide resin

YANG Bi-cheng¹, LIU Hai², YANG Yi-fang¹, HUANG Chun-yue¹, JIN Li-li¹, LIU Zheng-yu³, JIANG Bei-ni

1. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200240, China

2. College of Pharmacy, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China

3. College of Medicine, Nanchang University, Nanchang 330000, China

Key words: pollen of *Brassica campestris* L.; benign prostatic hyperplasia; flavonoids; polyamide resin; refined purification

油菜花粉是十字花科植物油菜 *Brassica campestris* L. 的雄性配子体, 不仅含有丰富的营养成分, 而且还含有许多与生命科学有关的药效成分。国内外临床实践均证明花粉具有良好的治疗前列腺疾病的作用^[1-2]。以油菜花粉为原料的普乐安片(前列康)是由天然植物油菜花粉直接入药, 是未经任何提取纯化的粗制剂, 疗效确切^[3], 无明显不良反应报道, 但其具有剂量大、疗程长、见效慢的缺点。为开发出高效低毒的抗前列腺增生的油菜花粉制剂, 本课题组以炎症和丙酸睾酮诱导的大鼠前列腺增生为药理筛选模型, 以阿司匹林、舍尼通和前列康为阳性对照, 以小鼠耳肿胀、大鼠足跖肿胀、前列腺脏器指数和前列腺增生组织学变化(间质水肿、间质充血、炎细胞浸润、纤维组织增生)对油

菜花粉进行筛选, 确定了油菜花粉黄酮部位为油菜花粉抗前列腺增生活性部位, 油菜花粉中的黄酮类化合物具有明显抑制前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen, PSA)的分泌和抑制 5 α -还原酶活性等作用, 为油菜花粉抗前列腺增生的有效成分和药效物质基础^[4]。

聚酰胺树脂是由酰胺聚合而成的一类高分子物质, 它对黄酮类化合物具有较强的吸附性能, 主要通过氢键和范德华力吸附^[5]。本实验采用聚酰胺树脂精制纯化油菜花粉黄酮粗提物, 通过不同条件下聚酰胺树脂对油菜花粉黄酮静态和动态吸附与解吸特性的研究, 确定聚酰胺树脂对油菜花粉抗前列腺增生黄酮部位的最佳精制工艺, 为开发抗前列腺增生的油菜花粉制剂提供理论参考。

收稿日期: 2011-05-13

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项“十一五”计划资助项目(2009ZX09301-007); 上海市自然科学基金资助项目(06ZR14078); 上海市中药现代化专项资助项目(08DZ1971801; 09DZ1975200)

作者简介: 杨必成(1985—), 男, 博士研究生, 专业方向为天然产物的制备与分析。Tel: 15210842585 E-mail: ybc258429312@126.com

*通讯作者 杨义芳 Tel: (021)62473018 E-mail: yangyf4912@163.com

Δ 为中国药科大学 2005 级中药学专业实习生

1 仪器与材料

UV—2500 (PC) S 可见紫外分光光度计 (日本岛津公司); 电子分析天平 (1/100 000) 为 Sartorius 公司产品; Waters 515 HPLC 泵; Waters 2487 紫外检测器; HS 色谱数据工作站 V4.0+; R502B 旋转蒸发器 (上海申生科技有限公司); ZHWY—3112B 恒温摇瓶机 (上海乔跃电子有限公司); BT01—100 恒流泵 (保定兰格恒流泵有限公司); BS—100A 自动部分收集器 (上海沪西分析仪器厂); PHB—1 便携式 pH 计 (上海三信仪表厂)。芦丁对照品 (批号 100080-200306, 中国药品生物制品检定所); 油菜花粉由安徽省宣城市百康蜂业提供, 经江苏省中国科学院植物研究所舒濮研究员利用电子显微鉴定为油菜花粉; 聚酰胺吸附树脂 (80~100 目) 浙江台州市路桥四甲生化塑料厂; 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 UV 法测定油菜花粉总黄酮^[6]

精密称取芦丁对照品 20.4 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加 95%乙醇置水浴上微热使溶解, 放冷, 加 95%乙醇稀释至刻度, 摇匀。即得 0.204 mg/mL 芦丁对照品溶液。精密吸取芦丁对照品溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 加入 30%乙醇 10 mL, 5%亚硝酸钠 0.7 mL, 5 min 后加入 10%硝酸铝 0.7 mL, 6 min 后加入 10%氢氧化钠 5 mL, 用 30%乙醇定容至 25 mL, 摇匀, 静置 20 min。以水作参比, 在 510 nm 波长处测定吸光度 (A) 值。以 A 值 (Y) 为纵坐标, 质量浓度 (X) 为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.011 X+0.038 6$, $r=0.999 0$; 表明芦丁在 8.16~48.96 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.2 聚酰胺树脂的活化处理^[7]

称取一定量的聚酰胺树脂, 过 60 目筛。将树脂充分淋洗, 用蒸馏水浸泡 24 h。将聚酰胺树脂滤过, 并用蒸馏水反复冲洗。将泡好的聚酰胺树脂装入长度约为 50 cm、直径约为 4.2 cm 清洗干净的玻璃色谱柱中。装好后加入 2 mol/L 氢氧化钠溶液 100 mL, 浸泡 4 h, 并用蒸馏水洗至中性; 然后用 4 mol/L 盐酸 300 mL 浸泡 8 h, 并用蒸馏水洗至中性; 最后用 80%乙醇 400 mL 浸泡 10 h, 并用蒸馏水洗至无醇味为止, 备用。

2.3 不同条件下聚酰胺树脂静态吸附与解吸特性研究

2.3.1 温度对聚酰胺树脂静态吸附性能的影响 称

取 12 份活化的聚酰胺树脂各 0.5 g, 精密称定, 分别加入具塞三角瓶中。再加入 348.64 $\mu\text{g/mL}$ 油菜花粉黄酮粗提物溶液 6.5 mL, 然后分别在 25、28、30、37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温振荡 (180 r/min, 每组 3 个重复) 12 h 后收集 3 mL 上清液, 取上清液 1.0 mL 按标准曲线的制备方法测定 A 值。根据回归方程计算上清液中的总黄酮质量浓度, 计算吸附量和吸附率, 并对同组处理取平均值。结果见表 1, 温度对聚酰胺树脂的静态吸附性能有一定影响, 但不同温度下的溶液的 A 值差别不大, 所以采用室温作为聚酰胺树脂吸附时的环境温度。

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

$$D=(C_0-C_r) /C_0$$

Q 吸附量 (mg/g), C_0 初始质量浓度 (mg/mL), C_r 剩余质量浓度 (mg/mL), V 溶液体积 (mL), W 树脂质量 (g), D 吸附率 (%)

表 1 温度对聚酰胺树脂静态吸附性能的影响 ($n=3$)

Table 1 Effect of different temperatures on static adsorption of polyamide resin ($n=3$)

温度/ $^{\circ}\text{C}$	吸附量/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	吸附率/%
25	2.58	73.10
28	2.33	72.42
30	2.50	73.34
37	2.61	73.10

2.3.2 pH 对聚酰胺树脂静态吸附性能的影响 称取 6 份活化的聚酰胺树脂各 0.5 g, 精密称定, 分别置具塞三角瓶中, 加入 348.64 $\mu\text{g/mL}$ 不同 pH 值的油菜花粉黄酮粗提物溶液 6.5 mL, 25 $^{\circ}\text{C}$ 下, 180 r/min 振荡 12 h 后收集 3 mL 上清液, 取上清液 1.0 mL 按标准曲线的制备方法测定 A 值, 根据回归方程计算上清液中的总黄酮质量浓度, 结果见表 2。

表 2 pH 值对聚酰胺树脂静态吸附性能的影响

Table 2 Effect of different pH values on static adsorption of polyamide resin

pH 值	吸附量/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	吸附率/%
8.0	3.61	91.07
8.5	3.55	94.38
9.0	2.98	94.28
9.5	3.45	94.98
10.0	3.61	95.11
10.5	3.29	93.65

随着介质 pH 值的增加, 吸附率逐渐增加, 但当 pH 值达到 10.5 时, 吸附率明显降低。因为在碱性比较强时容易破坏黄酮化合物的母核, 所以选择介质的 pH 值在 10.0 条件下吸附油菜花粉黄酮粗提物。

2.3.3 洗脱剂对聚酰胺树脂的静态解吸效果的影响 考虑到油菜花粉黄酮粗提物作为药品原料的安全性, 选择乙醇溶液为洗脱剂。称取 6 份活化的聚酰胺树脂各 0.5 g, 精密称定, 于具塞三角瓶中, 加入 348.64 $\mu\text{g/mL}$ 油菜花粉黄酮粗提物溶液 6.5 mL, 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡吸附 12 h 至饱和, 再分别加入水及 20%、40%、60%、80%、100%乙醇溶液 30 mL, 恒温振荡解吸 3 h 后, 观察洗脱液颜色和澄清度, 取洗脱液 1.0 mL 按标准曲线的制备方法测定 A 值, 根据回归方程计算洗脱液中的总黄酮质量浓度, 计算洗脱量及解吸率。结果见表 3, 100%乙醇的洗脱能力最好, 其次为 80%、60%乙醇。水的洗脱能力最差。用水及 20%、40%乙醇洗脱, 洗脱液有混浊, 说明洗脱时油菜花粉黄酮粗提物中所含的杂质也被洗脱下来。所以选择 60%、80%、100%乙醇作为洗脱剂进行后续试验。

表 3 洗脱剂对聚酰胺树脂的静态解吸的影响
Table 3 Effect of different eluent concentrations on static desorption of polyamide resin

洗脱剂	现 象	洗脱量/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	解吸率/ %
水	洗脱液淡黄色, 有混浊, 树脂呈土黄色	0.22	6.28
20%乙醇	洗脱液淡黄色, 有混浊, 树脂呈土黄色但较淡	0.36	10.29
40%乙醇	洗脱液微黄色, 有混浊, 树脂呈淡黄色	0.65	18.57
60%乙醇	洗脱液淡黄白色, 微混, 树脂呈淡黄微带白色	1.97	56.28
80%乙醇	洗脱液淡黄白色, 比较淡, 微混, 树脂呈淡黄白色	2.68	76.57
100%乙醇	洗脱液白色微黄, 微混, 树脂呈白色	3.17	90.58

2.4 不同条件下聚酰胺树脂动态吸附与解吸特性研究

2.4.1 体积流量对聚酰胺树脂动态吸附性能的影响 称取 0.5 g 聚酰胺树脂, 以湿法装入内径为 1.2 cm 的色谱柱中, 使柱高为 10 cm; 室温下采用恒流

泵控制, 选择不同体积流量 (1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min) 对同一质量浓度 (4 mg/mL) 的油菜花粉黄酮粗提物溶液进行上柱吸附, 采用部分收集器收集流出液, 每隔一定的时间 (2 min) 对流出液采用黄酮类化合物特异性显色反应盐酸-镁粉反应进行一次饱和和检验, 如有饱和反应则停止吸附。计算吸附量及吸附率, 结果见表 4。体积流量在 1~2.5 mL/min 时吸附量随体积流量的增大而下降, 体积流量过大, 树脂的吸附量下降, 提早泄露, 并且试验中可观察到油菜花粉黄酮粗提物在树脂上的分布未呈明显的梯度变化, 即吸附过程的稳定性差; 体积流量过小, 树脂的吸附量过大, 吸附时间延长, 生产效率低。考虑工作效率和吸附效果, 选择吸附体积流量 1.5 mL/min 较适当。

表 4 体积流量对聚酰胺树脂动态吸附性能的影响
Table 4 Effect of flow rate on dynamic adsorption of polyamide resin

体积流量/ ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	吸附量/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	吸附率/%	达饱和时间/ min
1.0	3.67	96.57	88
1.5	2.87	75.52	46
2.0	1.82	47.36	22
2.5	1.66	43.68	16

2.4.2 料液质量浓度对聚酰胺树脂动态吸附性能的影响 称取 0.5 g 聚酰胺树脂, 以湿法装入内径 1.2 cm 的色谱柱中, 使柱高为 10 cm; 室温条件下, 以体积流量为 1.5 mL/min 对 2、4、8、12、16 mg/mL 油菜花粉黄酮粗提物溶液进行上柱, 并用部分收集器收集流出液, 每隔 2 min 对流出液采用黄酮类化合物特异性显色反应盐酸-镁粉反应进行一次饱和和检验, 如有饱和反应则停止吸附。油菜花粉黄酮粗提物溶液的质量浓度是影响聚酰胺树脂吸附性能的重要因素之一。吸附树脂的吸附容量一般以较低质量浓度进行较为有利。如果原液质量浓度偏高, 则泄漏点早, 处理量小, 树脂使用周期短, 从而树脂再生次数增多; 如果原液质量浓度偏低, 工作效率降低。结果见表 5, 油菜花粉黄酮粗提物溶液的质量浓度为 2、4、8 mg/mL 时, 吸附量较适宜, 还观察到, 油菜花粉黄酮粗提物溶液的质量浓度为 8 mg/mL 时, 吸附过程的稳定性好, 且吸附时间也较适宜。因此, 选择质量浓度为 8 mg/mL 油菜花粉黄酮粗提物溶液作为吸附料液。

表 5 料液质量浓度对聚酰胺树脂动态吸附的影响
Table 5 Effect of different concentrations of liquid on dynamic adsorption of polyamide resin

质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	吸附量/ (mg·g ⁻¹)	吸附率/%	达饱和时间/ min
2	3.34	95.42	50
4	2.93	83.71	44
8	2.67	76.28	40
12	2.13	60.85	32
16	1.87	53.42	28

2.4.3 洗脱剂用量对聚酰胺树脂动态解吸效果的影响 分别将吸附油菜花粉黄酮粗提物溶液达到饱和的树脂湿法上柱,使柱高为 10 cm,调整恒流泵使体积流量为 1.5 mL/min,然后用 60%、80%、100%乙醇溶液 200 mL 分别进行洗脱,比较洗脱效果。结果见图 1。

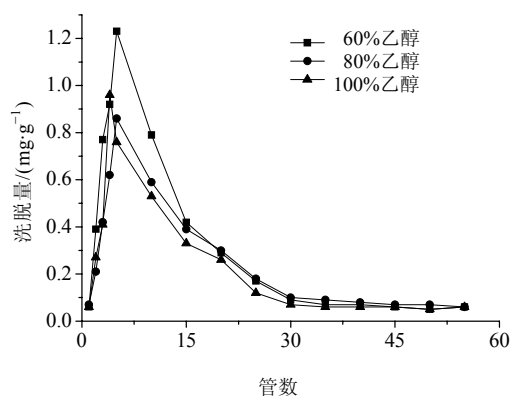


图 1 60%、80%、100%乙醇溶液动态洗脱曲线
Fig. 1 Dynamic elution curves of polyamide resin with 60%, 80%, and 100% ethanol

2.5 聚酰胺树脂法精制油菜花粉黄酮结果

取喷雾干燥的粉末用适量热水溶解后上已预处理好的聚酰胺柱吸附,柱饱和以后停止上柱,用蒸馏水过柱至流出液清亮为止,再用 80%乙醇过柱解吸,收集颜色较深部分的流出液,浓缩后抽真空干燥。对抽真空干燥所得物重复再过 2 次聚酰胺柱。

对粗品、一次柱所得物、二次柱所得物、三次柱所得物按芦丁比色法测总黄酮质量分数。结果见表 6。

表 6 树脂法精制油菜花粉黄酮粗提物结果
Table 6 Purification of flavone crude extract from pollen of *B. campestris* by resin method

精制次数	黄酮/%
粗品	24.65
1	44.76
2	60.22
3	74.90

3 讨论

在室温和 pH 值为 10.0,油菜花粉黄酮粗提物质量浓度为 8 mg/mL 时,以 80%乙醇 1.5 mL/min 体积流量洗脱效果最佳。油菜花粉黄酮粗提物经过聚酰胺树脂精制纯化后黄酮质量分数由粗品的 24.65%提高到 74.90%,提高了 2.03 倍。说明聚酰胺树脂精制纯化油菜花粉抗前列腺增生黄酮部位是可行的。

参考文献

- [1] 杨必成,杨义芳.花粉治疗前列腺疾病的物质基础研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 144-145.
- [2] 李 坤,杨义芳,李永辉.油菜花粉抗前列腺增生与炎症的活性部位研究 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 798-801.
- [3] 周 越,吴海啸.普乐安片治疗良性前列腺增生的临床疗效及其与疗程关系研究 [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1588-1590.
- [4] 李 坤.油菜花粉抗良性前列腺增生有效成分群及其作用机理研究 [D]. 上海:上海医药工业研究院, 2008.
- [5] 冯志毅,赵献敏,王彦志,等.卷柏总黄酮纯化工艺研究 [J]. 中成药, 2009, 31(4): 544-546.
- [6] 易艳东,余男才,马 威,等.马齿苋水提液中的总黄酮的含量测定 [J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(5): 424-425.
- [7] 杨武英,上官新晨,徐明生,等.聚酰胺树脂精制青钱柳黄酮的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(2): 320-324.