

聚酰胺柱层析法分离回心草总黄酮的研究

蔡 鹰^{1,2}, 陆晓和¹, 魏群利¹ (1. 南京军区南京总医院, 江苏 南京 210002; 2. 中国人民解放军第 454 医院, 江苏 南京 210002)

摘要 目的: 确定聚酰胺柱层析法分离回心草总黄酮的条件。方法: 对聚酰胺用量、乙醇洗脱浓度、洗脱速度等方面进行考察。结果: 干法上样, 聚酰胺用量以药材: 聚酰胺 = 1: 1 为佳, 以 50% 的乙醇为洗脱溶剂, 2 倍柱体积 /h 为最佳的洗脱速率。结论: 聚酰胺可较好地用于回心草总黄酮的分离富集。

关键词 回心草; 聚酰胺; 总黄酮

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 1006 - 0111 (2009) 01 - 0058 - 03

Studies of isolation for total flavonoids in *Rhodobryum giganteum* by polyamide column adsorption chromatography

CAI Ying^{1,2}, LU Xiao-he¹, WEI Qun-li¹ (1. Department of Pharmacy, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002, China; 2. No. 454 Hospital of PLA, Nanjing 210002, China)

ABSTRACT Objective: To select the optimal condition of polyamide column adsorption chromatography for separating the total flavonoids in *Rhodobryum giganteum* (Schwaegr.) Par. **Methods:** The amount of polyamide, the eluting reagent and the eluting rate were studied. **Results:** It was suitable when the herb amount polyamide amount was 1: 1, and 50% ethanol was the suitable eluting reagent. The flow rate of eluent was 2 times volume of column/h. **Conclusion:** polyamide is suitable for the separation and collection of the total flavonoids from *Rhodobryum giganteum* (Schwaegr.) Par.

KEY WORDS *Rhodobryum giganteum* (Schwaegr.) Par.; polyamide; total flavonoids

回心草为真藓科植物大叶藓 *Rhodobryum roseum* (Hedw.) Limpr 以及暖地大叶藓 *Rhodobryum giganteum* (Schwaegr.) Par 的干燥或新鲜全草, 分布于东北、华北、华东和西南地区, 其中云南省为主要产地, 是我国云南省少数民族共用的传统草药, 傣族、彝族、景颇族、纳西族等均有用药历史。《中药大辞典》称具有清热明目, 养心安神, 镇咳祛痰的功效, 主治心悸怔忡, 神经衰弱, 目赤肿痛等。本院通过多年的实验研究, 发现回心草对动脉硬化有较好的治疗作用。

由于回心草主要在民间作草药使用, 因而对回心草化学成分的研究报道不多。戴畅^[1]从其中分离得到 26 个化合物, 鉴定了其中 23 个化合物。其中含黄酮类化合物: 芹菜素, 槲皮素等。黄酮类成分对心血管疾病有显著的药理活性。通过化学成分预试验我们发现回心草的水提液含大量多

糖, 醇提液含大量叶绿素, 对成分鉴定和测量造成很大困难, 通过聚酰胺柱处理后, 盐酸-镁粉反应明显, 说明黄酮类成分得到富集。目前, 聚酰胺已广泛应用于中药有效部位或有效成分的分离, 且对黄酮类、酚类、醌类等物质的分离远比其他方法优越, 具有可逆、分离效果高等特点。为了富集回心草的黄酮类成分, 我们采用聚酰胺为载体进行分离研究, 考察了聚酰胺分离纯化回心草总黄酮的条件, 以期对回心草的进一步开发和利用提供参考。

1 仪器与材料

UV-1700 紫外分光光度计 (日本岛津公司); 芦丁对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 0080-9705); 聚酰胺 [中国医药集团上海化学试剂公司产品 (50~60 目)]; 回心草药材 (亳州中药材公司), 经南京中医药大学中药鉴定教研室岳魏鉴定, 为真藓科植物暖地大叶藓 *Rhodobryum giganteum* (Schwaegr.) Par 的干燥全草, 试剂亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、甲醇均为分析纯。

作者简介: 蔡鹰 (1967-), 女, 副主任药师, 在职博士后。Tel: (025) 80863169, E-mail: caiying1967@126.com.

通讯作者: 陆晓和。Tel: (025) 80860160, E-mail: Luxiaohe@medmail.com.cn.

2 方法与结果

2.1 标准曲线的绘制^[2] 精密称取在 105 °C 干燥至恒重的芦丁对照品 111.5 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 30 mL, 置水浴上微热使溶解, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得芦丁标准溶液 (0.223 mg/mL)。精密吸取芦丁标准溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 各加水至 6 mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL, 使混匀, 放置 6 min, 加 10% 硝酸铝溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 5% 氢氧化钠试液 10 mL, 再加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 以第 1 管作为空白对照, 在 500 nm 处测吸收度, 以吸收度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线。求得回归方程: $A = 8.0717C - 0.0113$, $r = 0.9991$, 对照品在 0.00892 ~ 0.05352 mg/mL 呈良好线性关系。

2.2 对照品的稳定性试验 照“2.1 项下方法, 对照品溶液经显色后, 于不同时间在 500 nm 处测吸收度。实验结果表明, 对照品溶液在显色后 120 min 内吸收度稳定。因此, 测定吸收度应在 120 min 内完成。

2.3 样品中总黄酮的含量测定 各洗脱液蒸干后加 50% 甲醇适量溶解, 置 25 mL 容量瓶中, 以下按照标准曲线制备方法进行操作, 测定吸光度, 由得到的回归方程计算样品中总黄酮的含量。

2.4 总黄酮的分离研究^[3,4]

2.4.1 聚酰胺的预处理 因聚酰胺树脂残留有甲苯等有机残留物, 有较强的毒性, 对产品有不良影响, 因此使用前应作预处理: 用 95% 乙醇浸泡聚酰胺树脂 24 h, 湿法装柱, 用 95% 乙醇淋洗至洗脱液与蒸馏水混合 (1:5) 不呈白色浑浊, 再用蒸馏水洗至无醇味, 然后用 3 倍柱体积 0.5 mol/L HCl、NaOH 溶液洗脱, 加入蒸馏水浸泡树脂 1 h 后, 水洗至中性, 用 3 倍柱体积 0.5 mol/L HCl 溶液洗脱, 加入蒸馏水浸泡树脂 1 h 后, 水洗至中性, 备用。

2.4.2 聚酰胺用量的考察 干法上样, 18g 回心草药材 60% 醇提物浓缩至稠膏状, 加 60% 乙醇适量, 按药材生药量: 聚酰胺重量 = 3:1 充分混合, 置烘箱中 80 °C 烘干, 备用。未加药的聚酰胺湿法装柱, 装于 2.5 cm 的玻璃柱, 水排至液面与聚酰胺平齐, 分别按拌药的聚酰胺: 未拌药的聚酰胺 = 1:1、1:2、1:3, 上样, 先以水洗, 洗出液无色, 弃去水洗液; 再用 50% 的乙醇 500 mL 洗脱, 洗脱物测总黄酮含量, 以考察其合适的聚酰胺用量。

结果见表 1。

表 1 聚酰胺用量的考察

聚酰胺用量	洗脱的总黄酮量 (mg)
1:1 (共 12g)	52.12
1:2 (共 18g)	64.26
1:3 (共 24g)	60.34

从表 1 可以看出, 拌药的聚酰胺: 未拌药的聚酰胺 = 1:2 时, 洗脱的总黄酮量最大。

2.4.3 总黄酮在聚酰胺柱上的洗脱曲线 18 g 药材 60% 醇提液浓缩后用 6 g 聚酰胺搅拌均匀, 烘干, 备用。12 g 未加药的聚酰胺装于 2.5 cm 的玻璃柱, 湿法装柱, 水排至液面与聚酰胺平齐, 加入拌上药的聚酰胺, 先以水洗, 洗出液无色 (500 mL 水), 弃去水洗液; 再用 20%、30%、40%、50%、60% 不同浓度的乙醇洗脱, 以考察其对总黄酮的洗脱率。

表 2 不同浓度乙醇对回心草中总黄酮洗脱能力的考察

乙醇洗脱浓度 (%)	18 g 药材洗脱的总黄酮量 (mg)	换算成总黄酮量 (mg/g 生药)
20	14.36	0.80
30	14.02	0.78
40	14.51	0.81
50	25.92	1.44
小计	68.81	3.82
60	1.42	0.08
单用 50	65.52	3.64

从表 2 可以看出, 20%、30%、40% 乙醇洗脱的总黄酮量相近, 至 50% 时洗脱量接近翻一倍, 至 60% 时黄酮洗脱量极少, 洗脱物几乎全为绿色色素, 单独用 50% 乙醇洗脱总黄酮量与分别从 20 ~ 50% 乙醇每一步洗脱总黄酮量的总和接近, 所以认为 50% 乙醇是合适的洗脱溶剂。

2.4.4 洗脱速率的确定^[5] 照 2.4.3 方法, 50% 乙醇洗脱, 考察不同洗脱速率对结果的影响。结果见表 3。

表 3 不同洗脱速度对回心草中总黄酮量的影响

洗脱速度	洗脱的总黄酮量 (mg)
1 倍柱体积 /h	62.33
2 倍柱体积 /h	59.24
3 倍柱体积 /h	42.31

从表 3 可以看出, 洗脱速率对结果有一定影响, 太慢耗时太长, 太快又洗脱不完全, 2 倍柱体积 /h 是比较适宜的洗脱速度。

2.4.5 转移率的考察 按 2.3 样品中总黄酮的含

量测定方法测定 18 g 药材总黄酮量为 77.12 mg, 比较 2.4.3 表 2 结果, 18 g 药材单独用 50% 乙醇洗脱得 65.52 mg 总黄酮, 转移率达 84.95%, 基本符合要求。

2.5 回心草总黄酮的制备 18 g 回心草药材 60% 醇提物浓缩至稠膏状, 加 60% 乙醇适量, 按药材生药量: 聚酰胺重量 = 3:1 充分混合, 置烘箱中 80 ℃ 烘干, 备用。未加药的聚酰胺湿法装柱, 水排至液面与聚酰胺平齐, 按拌药的聚酰胺: 未拌药的聚酰胺 = 1:2, 上样, 先以水洗, 洗出液无色, 弃去水洗液; 再用 50% 的乙醇 500 mL 洗脱, 于 60 ℃ 减压回收乙醇, 至稠膏状, 于 60 ℃ 减压干燥, 得回心草总黄酮。测定其中的总黄酮含量, 结果见表 4。

表 4 回心草提取物中的总黄酮含量测定结果

批号	洗脱物重量 (mg/g 生药)	洗脱的总黄酮量 (mg/g 生药)	洗脱物总黄酮含量 (%)
080111	12.12	3.81	31.4
080201	12.50	3.92	31.4
080226	12.92	3.65	28.3

从表 4 可以看出, 上聚酰胺柱后 50% 乙醇洗脱物总黄酮含量能达到 30% 左右, 说明聚酰胺对回心草中的总黄酮有较好的富集作用。

3 讨论

3.1 由于芦丁和黄酮类化合物都是以 2-苯基色原酮为母核的结构, 具有相同的吸光度测试性质, 均在 500 nm 附近有最大吸收, 所以采用芦丁为对照品测定回心草总黄酮的含量。

3.2 用干法上样是为了减少水溶性差的黄酮类成分的丢失, 传统的上样都是取样品水溶液的上清液上样, 因为本样品是 60% 醇提物, 该法势必造成水溶性差的黄酮类成分的丢失。干法上样保留了这部分成分, 使结果更准确。

3.3 采用 60% 乙醇作为药材提取溶剂, 是药效跟踪的结果。

参考文献:

- [1] 戴畅. 藜类植物回心草的化学成分和生物活性研究 [D]. 北京: 解放军总医院军医进修学院, 2006.
- [2] 中华药典 2005 版一部 [S]. 2005, 246.
- [3] 白云娥, 漆小梅, 赵华, 等. 聚酰胺分离金莲花总黄酮 [J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(5): 512.
- [4] 黄优生, 谢明勇, 张中伟, 等. 山楂总黄酮的测定 [J]. 南昌大学学报 (理科版), 2006, 30(5): 475.
- [5] 王化田, 龚钢明. 大孔树脂纯化红景天工艺的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(2): 117.

收稿日期: 2008-06-18

(上接第 53 页)

状况进行系统调研的基础上, 修订医疗机构处方集, 并对医院的药物使用体系进行规划和调整, 以确保医疗机构药房的正常运转。

3.4 药品价格问题 一直是各国关注的焦点, 也是公众急切想要解决的问题。美国医药市场虽然一直处于世界的前列, 但由于人口趋于老龄化和疾病谱扩大等客观问题的存在, 造成其卫生机构支出趋势逐年上涨。美国政府相应采取了健全立法、加强监管、扩大医疗保险覆盖面、缩短新药审查时间等一系列措施, 以从宏观上控制药品费用的增长。我国药品价格问题同样备受政府和社会关注, 近几年来全国各省市相继采取了多种形式的药品集中招标采购模式以降低药品价格, 但收效不明显。通过本文的分析, 美国对药品费用增长的控制措施更多地从增长源头着手, 如缩短新药审评时间来降低开发成本, 健全立法和扩大医保覆盖面来分摊增长的费用等方法, 对于我国如何有效控制不断增长的药品费用具有重要的借鉴意义。

参考文献:

- [1] JAMES M, Hoffman. Projecting future drug expenditures-2004 [J]. Am J Health Syst Pharm, 2004, 61(1): 145.
- [2] Shah ND, Vermeulen LC, Santell JP, et al. Projecting future drug expenditures-2002 [J]. Am J Health Syst Pharm, 2002, 59(2): 131.
- [3] JAMES M, Hoffman. Projecting future drug expenditures-2005 [J]. Am J Health Syst Pharm, 2005, 62(1): 149.
- [4] JAMES M, Hoffman. Projecting future drug expenditures-2006 [J]. Am J Health Syst Pharm, 2006, 63(1): 123.
- [5] JAMES M, Hoffman. Projecting future drug expenditures-2007 [J]. Am J Health Syst Pharm, 2007, 64(2): 298.
- [6] 张涛. 全球药市销售创新高 [N]. 医药经济报, 2008, 10-27(4).
- [7] JAMES M, Hoffman. Projecting future drug expenditures-2008 [J]. Am J Health Syst Pharm, 2008, 65(1): 234.
- [8] 杨艳, 陈盛新, 纪晖. 美国卫生机构药品支出趋势与影响因素分析 [J]. 药学实践杂志, 2004, 22(4): 205.
- [9] <http://www.bioon.com/biology/news/276450.shtml> 华文生技网.

收稿日期: 2009-01-04