

甘草黄酮分离纯化工艺

刘佳, 季芳, 孙陶利, 倪京满*

(兰州大学药学院药剂学研究所, 兰州 730000)

[摘要] **目的:** 筛选具有酪氨酸酶抑制作用的甘草黄酮分离、纯化工艺。**方法:** 以甘草总黄酮含量及酪氨酸酶抑制率为指标, 对甘草黄酮分离纯化工艺进行优化, 同时考察不同分离条件对其酪氨酸酶抑制活性的影响。**结果:** 甘草黄酮的最佳分离纯化工艺为 30~60 目聚酰胺, 上样液 pH 6, 料液比(甘草黄酮粗提物-聚酰胺) 32.48:1, 上样液质量浓度 $3.215 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 洗脱剂乙醇体积分数 70%, 洗脱流速 $3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, 洗脱剂用量 1 BV。**结论:** 采用该优选工艺成本低, 收率高, 安全, 操作简便, 适合工业化大生产。

[关键词] 甘草黄酮; 酪氨酸酶; 聚酰胺; 分离纯化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0049-04

Separation and Purification Process of Total Flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis*

LIU Jia, JI Fang, SUN Tao-li, NI Jing-man*

(Pharmaceutical Research Institute, School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To select separation and purification technology for total flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* that have inhibitory action on tyrosinase. **Method:** With the content of total flavonoids and tyrosinase inhibitory rate as indexes, separation and purification technology of total flavonoids from *G. uralensis* was optimized, and effect of different separation conditions on tyrosinase inhibitory rate were investigated in the same time. **Result:** Optimal separation and purification process for total flavonoids was: polyamide was 30~60 mech, pH of sample solution was 6, solid-liquid ratio 32.48:1 (extract of total flavonoids from *G. uralensis*-polyamide), the concentration of sample solution was $3.215 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, desorption solvent was 70% ethanol, desorption velocity was $3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, and elution volume was 1 BV. **Conclusion:** This optimized technology had advantages of low cost, high yield, safe, easy to operate. It was suitable for industrial production.

[Key words] total flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis*; tyrosinase; polyamide; separation and purification

甘草为豆科甘草属多年生草本植物, 其有效成分主要有甘草甜素(又称甘草酸)、甘草次酸、甘草黄酮和甘草多糖^[1]。甘草黄酮以 2-苯基色原酮为母核, 具有抗氧化、抗 HIV、抗心律失常、美白、降糖

等生物活性^[2], 广泛应用于食品、医药、美容等行业中^[3]。

酪氨酸酶是一种含铜酶, 在黑色素生物合成过程中起着关键作用, 且黑色素合成量与酪氨酸酶的活性呈正相关^[4-6]。酪氨酸酶抑制剂(TI)主要通过抑制酪氨酸酶的活性, 阻断黑色素的合成反应链。甘草黄酮具有明确的酪氨酸酶抑制作用^[7], 在美白化妆品中已广泛应用^[8]。本研究以甘草总黄酮含量及酪氨酸酶抑制率为指标, 筛选甘草黄酮的最佳分离工艺, 考察各个因素对甘草黄酮酪氨酸酶抑制活性的影响。

[收稿日期] 20110901(003)

[基金项目] 甘肃省中医药重点项目(GZK-2009-1)

[第一作者] 刘佳, 硕士研究生, 从事药物新制剂与新剂型研究, Tel:13919299036, E-mail:liujiaand@163.com

[通讯作者] *倪京满, 教授, 博士生导师, 从事药物新制剂与新剂型研究, Tel:13088775264, E-mail:nijm@lzu.edu.cn

1 材料

UV-1700 型紫外分光光度计(日本岛津), ISO9001 型电子分析天平(sartorius), M200 型酶标仪(TECAN), 玻璃柱(1.5 cm × 20 cm), 96 微孔板。甘草苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 111610-200604), 甘草药材(兰州市黄河中药材市场, 经兰州大学生药教研室马志刚教授鉴定为豆科乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch 的根), 酪氨酸酶、曲酸(美国 Sigma 公司), 左旋多巴(L-DOPA, 美国 Sigma 公司), 聚酰胺(台州四甲生化厂), 95% 乙醇、氢氧化钠、醋酸和二甲基亚砜(DMSO)均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 总黄酮含量测定

2.1.1 对照品溶液的配制 精密称取甘草苷对照品 4.99 mg 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。冰箱内保存备用。

2.1.2 线性关系考察 精密吸取对照品储备液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL 于 10 mL 量瓶中, 准确加入 7% 氢氧化钠溶液 2.0 mL, 室温放置 5 min, 甲醇定容至刻度, 涡旋混匀, 即得对照品显色溶液。取各显色溶液及其参比溶液于 396 nm 处测定吸光度(A), 以 A 为纵坐标, 质量浓度 C 为横坐标进行线性回归, 得方程 $A = 0.0476C + 0.0007 (r = 0.9994)$, 线性范围 1.996 ~ 15.968 mg · L⁻¹。

2.2 酪氨酸酶活性抑制率的测定 反应体系为 96 微孔板, 以 L-DOPA 为底物, 在 0.05 mol · mL⁻¹ 的磷酸盐缓冲液(pH 6.5) 120 μL 中, 加适量待测样品溶液与酪氨酸酶 1 000 U, 25 °C 孵育 5 min, 加入 L-DOPA(2.5 mmol · L⁻¹), 37 °C 反应 10 min, 在 475 nm 波长处测定 A。

计算公式:

$$\text{酶活性抑制率} = [A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{背景}})] / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

$A_{\text{空白}}$ 为不加待测样品反应后的吸收度; $A_{\text{样品}}$ 为加入待测样品反应后的吸收度; $A_{\text{背景}}$ 为只加待测样品的吸收度。

2.3 聚酰胺的预处理 将聚酰胺放入 95% 乙醇中浸泡 24 h, 装柱, 用 95% 乙醇冲洗至流出液澄清无混浊, 蒸干残留物。5% 氢氧化钠洗至碱性, 10% 醋酸洗至酸性, 三重蒸馏水洗至中性。

2.4 样品溶液的制备 称取甘草 50 g, 加 95% 乙醇 200 mL 加热回流 1.5 h, 得甘草黄酮粗提物取一定量甘草粗提物, 加入适量乙醇溶解, 蒸馏水稀释, 于 50 °C 减压回收至无醇味, 摇匀, 即得 6.496 g · L⁻¹

样品溶液。

2.5 聚酰胺的筛选^[9-11]

2.5.1 静态吸附 准确称取处理好的 30 ~ 60, 60 ~ 80, 80 ~ 100, 100 ~ 200 目规格的聚酰胺各 1.0 g, 干燥后置 100 mL 具塞锥形瓶中, 分别精密加入含甘草总黄酮 3.200 g · L⁻¹ 的上样液 20 mL, 室温下震荡均匀, 放入摇床(30 °C, 转速 100 r · min⁻¹) 中震荡 12 h, 放置 12 h 后取出, 测定母液中总黄酮质量浓度分别为 1.309, 1.454, 1.371, 1.303 g · L⁻¹, 吸附率分别为 59.27%, 54.76%, 57.34%, 59.46%。由结果可知, 30 ~ 60, 100 ~ 200 目吸附能力最高, 达到 59% 以上。

2.5.2 静态解吸 将上述吸附后的聚酰胺用蒸馏水冲洗干净, 将其干燥后放入具塞锥形瓶中, 分别精密量取 70% 乙醇 30 mL 至具塞锥形瓶中, 在恒温摇床(35 °C, 转速 100 r · min⁻¹) 内振摇 12 h 取出, 测定解吸液中甘草黄酮质量浓度分别为 0.455, 0.218, 0.308, 0.221 g · L⁻¹, 酪氨酸酶抑制率分别为 64.41%, 65.33%, 68.69%, 67.67%, 解吸率分别为 35.83%, 18.58%, 20.07%, 17.35%。由结果可知, 30 ~ 60 目聚酰胺的解吸率最高, 达到 35% 以上。4 种规格聚酰胺对酪氨酸酶抑制活性基本没有影响, 抑制率也基本上相同, 故最佳规格聚酰胺为 30 ~ 60 目。

2.6 工艺参数考察及优化

2.6.1 pH 考察 精密量取 6 份含甘草总黄酮的样品溶液 10 mL 于 50 mL 烧杯中, 分别用 0.1 mol · mL⁻¹ NaOH 溶液和 0.1 mol · mL⁻¹ HCl 溶液调节样品溶液 pH, 得 pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 的甘草黄酮样品溶液, 以 2 mL · min⁻¹ · g⁻¹ 速度上样。将以上 6 份样品溶液分别上样于径高比 1:10 的聚酰胺层析柱中, 加蒸馏水 10 BV 洗至流出液澄清, 用 70% 乙醇 4 BV 以 2 mL · min⁻¹ · g⁻¹ 流速进行洗脱, 收集洗脱液, 测定洗脱液中黄酮含量分别为 0.792, 0.777, 0.865, 1.022, 0.443, 0.595 g · L⁻¹; 酪氨酸酶抑制率分别为 61.03%, 63.89%, 63.06%, 62.15%, 63.47%, 64.24%。故选择上样液最佳 pH 为 6。

2.6.2 料液比的考察 精密称取 6 份已处理的干燥聚酰胺, 每份 5.0 g, 湿法装柱。精密量取(pH 6, 总黄酮质量浓度 6.496 g · L⁻¹) 甘草黄酮样品溶液 5, 10, 15, 20, 25, 30 mL 以 2 mL · min⁻¹ 速度上样。分别用蒸馏水 10 BV 冲洗至流出液澄清, 70% 乙醇 4 BV 以 2 mL · min⁻¹ · g⁻¹ 流速进行洗脱, 收集洗脱液, 测

定黄酮含量分别为 0.233, 0.346, 0.552, 0.660, 0.985, 0.974 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 酪氨酸酶抑制率分别为 61.64%, 61.89%, 64.66%, 65.51%, 66.19%, 66.61%。故选择甘草黄酮与聚酰胺最佳料液比 32.48:1。

2.6.3 上样液质量浓度考察 精密称取 7 份已处理的干燥聚酰胺, 每份 5.0 g, 湿法装柱。精密量取总黄酮质量浓度分别为 0.331, 0.680, 1.492, 2.190, 3.215, 5.874, 7.418 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甘草黄酮样品溶液 (pH 6) 以 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度上样。分别用蒸馏水 100 mL 冲洗至流出液澄清, 70% 乙醇 4 BV 以 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 的流速进行洗脱, 收集洗脱液, 测定黄酮含量分别为 0.655, 0.741, 0.976, 0.717, 1.631, 1.257, 1.689 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 酪氨酸酶抑制率分别为 63.86%, 62.51%, 63.49%, 65.03%, 60.31%, 62.31%。故确定最佳上样质量浓度为 $3.215 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.6.4 洗脱溶剂浓度考察 精密称取 7 份已处理的干燥聚酰胺, 每份 5.0 g, 湿法装柱。精密量取质量浓度为 $3.076 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甘草黄酮样品溶液 (pH 6) 以 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 速度上样。蒸馏水 10 BV 洗至流出液澄清, 分别用体积分数为 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 的乙醇 4 BV 以 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 流速进行洗脱, 收集洗脱液, 测定黄酮含量分别为 0.813, 1.064, 1.066, 1.150, 1.318, 1.044, 1.108 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 酪氨酸酶抑制率分别为 47.89%, 59.07%, 66.67%, 61.85%, 68.78%, 56.46%, 62.76%。故确定最佳洗脱剂为 70% 乙醇。

2.6.5 洗脱流速的考察 精密称取 7 份已处理的干燥聚酰胺, 每份 5.0 g, 湿法装柱, 精密量取含总黄酮 $3.097 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甘草黄酮样品溶液 (pH 6) 以 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 速度上样。蒸馏水 10 BV 冲洗至流出液澄清, 70% 乙醇 4 BV 分别以 1, 2, 3, 4, 5, 6 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速进行洗脱, 收集洗脱液, 测定黄酮含量分别为 1.178, 1.191, 1.659, 0.950, 1.085, 1.022 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 酪氨酸酶抑制率分别为 61.71%, 67.40%, 62.38%, 63.46%, 63.48%, 62.85%。故确定最佳流速为 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.6.6 洗脱剂用量的考察 精密称取预干燥聚酰胺 5.0 g, 湿法装柱。精密量取质量浓度为 $3.097 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甘草黄酮样品溶液 (pH 6) 以 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 速度上样。蒸馏水 10 BV 冲洗至流出液澄清, 70% 乙醇以 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 流速洗脱, 每 3 mL 收集 1 份洗脱液, 测定黄酮含量, 结果见图 1。

由图 1 可知, 随着洗脱剂用量增大, 醇洗黄酮含

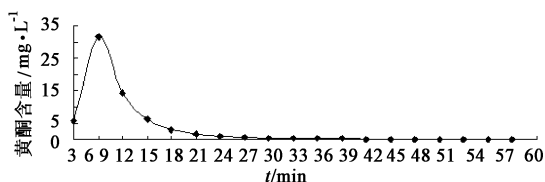


图 1 甘草黄酮洗脱剂用量考察

量增大。当洗脱剂用量超过 6 mL 时, 醇洗黄酮含量开始下降, 当洗脱剂用量为 18 mL 时, 黄酮含量较低, 基本将黄酮洗干净。故确定最佳洗脱剂用量为 100 mg 甘草黄酮粗提物用 1 BV 70% 乙醇洗脱。

2.7 验证试验 精密称取预处理好的干燥聚酰胺 5.0 g 1 份, 湿法装柱。精密量取 $3.087 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甘草黄酮样品溶液 (pH 6) 以 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 的速度上样。分别用 100 mL 蒸馏水冲洗至流出液澄清, 用 70% 乙醇 2 BV 以 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 的流速进行洗脱, 收集洗脱液, 测定黄酮含量及酪氨酸酶抑制率。将此验证试验重复 3 次。结果显示, 甘草黄酮的含量分别为 5.177, 4.998, 5.012 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 酪氨酸酶抑制率为 66.67%, 66.21%, 65.97%。说明该优选工艺稳定可行。

3 讨论

与以往相似研究相比, 本试验不同之处在于以总黄酮含量为评价指标的基础上, 同时结合酪氨酸酶抑制率考察, 从而确定该优选工艺。本实验优选工艺收率高、成本低、安全、操作简便、环保, 适合工业化大生产。本方法不足之处在于甘草黄酮含量的测定方法较为单一, 有待改进。

[参考文献]

- [1] 汲晨锋, 姜薇. 甘草多糖的化学与药理研究[J]. 哈尔滨商业大学学报, 2004, 20(5): 515.
- [2] 孙芸, 阿依努尔·吾买尔. 甘草黄酮的提取方法及药理作用研究进展[J]. 新疆中医药, 2009, 27(1): 72.
- [3] 张志东, 楚敏, 宋素琴, 等. SP825 大孔树脂静态吸附甘草总黄酮的研究[J]. 农产品加工: 学刊, 2007(8): 15.
- [4] 傅博强, 李欢, 王小如, 等. 甘草黄酮类化合物对酪氨酸酶单酚酶的抑制[J]. 天然产物研究与发展, 2005, 17(4): 391.
- [5] 沈钧, 何莉萍, 张瑞斌. 甘草提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(8): 940.
- [6] 马晶波, 冯树芳, 李锋, 等. 甘草黄酮对 B16 黑色素瘤细胞代谢的影响[J]. 复旦学报, 2003, 30(4): 353.

高乌甲素微乳体外透皮吸收

李西林^{1*}, 栾晶¹, 王慧², 马艳¹

(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 上海泽润生物科技有限公司, 上海 201203)

[摘要] 目的: 研究高乌甲素微乳的体外透皮能力。方法: 采用改良 Franz 扩散池和离体小鼠皮肤作为透皮屏障, 通过 HPLC 测定高乌甲素质量浓度, 计算透皮速率, 筛选高乌甲素微乳最佳组方。结果: 高乌甲素微乳外观澄清透明, 其粒径、载药量、渗透系数分别为 16.6 nm, 5.21 g·L⁻¹, 12.74 cm·h⁻¹, 粒径分布范围窄。结论: 高乌甲素微乳具有良好透皮能力, 达到预期要求。

[关键词] 高乌甲素; 微乳; 透皮吸收

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0052-03

In vitro Percutaneous Absorption of Lappaconitine Micromulsion

LI Xi-lin^{1*}, LUAN Jing¹, WANG Hui², MA Yan¹

(1. College of Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;
2. Shanghai Zerun Biotechnology Co. Ltd, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To study on *in vitro* percutaneous absorption capacity of lappaconitine micromulsion. **Method:** Using improved Franz diffusion cell and excised mice skin as transdermal barrier, the content of lappaconitine was determined by HPLC. Optimum prescription of lappaconitine micromulsion was screened by calculating transdermal rate. **Result:** Lappaconitine microemulsion was clear and transparent, particle size, drug loading, permeation coefficient of lappaconitine micromulsion were 16.6 nm, 5.21 g·L⁻¹, 12.74 cm·h⁻¹, respectively. Distribution of particle size was narrow. **Conclusion:** Lappaconitine micromulsion had a good transdermal absorption capacity, it achieved desired requirement.

[Key words] lappaconitine; microemulsion; percutaneous absorption

高乌甲素(lappaconitine)是从毛茛科植物高乌头根中提取的一种二萜类生物碱,具有显著的消肿、解热、局部麻醉等作用,用于治疗中度以上疼痛,为

国内首创的非成瘾性镇痛新药。但高乌甲素口服生物利用度较低,半衰期较短,需长时间口服给药,且有一定的毒性,鉴于以上问题,将其制成透皮吸收制

[收稿日期] 20111213(015)

[基金项目] 上海市教育委员会科研项目(07cz038)

[通讯作者] *李西林,博士,教授,从事中药新剂型研究, Tel:021-51322188, E-mail:lixilin121@sohu.com

[7] 马晶波, 黄岚, 冯树芳, 等. 甘草黄酮对黑色素细胞生物学作用的比较[J]. 中华皮肤科杂志, 2003, 36(10):586.
[8] SHI Yan, CHEN Q X. Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase. [J]. Food Chem, 2005, 92:707.
[9] ZHANG J P, CHEN Q X. Inhibitory effects of salicylic acid family compounds on the diphenolase activity of

mushroom tyrosinase. [J]. Food Chemistry, 2006(95):579.
[10] 张伟, 葛志强. 聚酰胺树脂分离纯化复方山楂提取物中总黄酮的研究[J]. 中草药, 2009, 1(40):63.
[11] 白云娥, 漆小梅. 聚酰胺分离金莲花总黄酮[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(5):512.

[责任编辑 全燕]