

脂对虎杖粗提物中的白藜芦醇进行初步富集、分离和纯化,使白藜芦醇的质量分数由粗提物中 9.25% 提高至 39.5%^[10]。本实验使用的 AB-8 大孔树脂对白藜芦醇具有较高的吸附量和解吸率,在收率为 75.9% 的前提下,使白藜芦醇的质量分数由粗提液中的 9.5% 提高到 50.0%,纯化倍数达 5.3 倍。

由于聚酰胺具有安全无毒的特点,因此在中草药有效成分的分离纯化中倍受青睐。赵金华将含白藜芦醇的提取液用聚酰胺柱进行两次柱色谱分离,4 析晶后得质量分数为 97.5% 的白藜芦醇^[11]。

在柱色谱分离纯化中,纯度的提高必然带来收率的相应降低,所以单用一种填料进行柱色谱分离纯化有效成分,并不能同时保证高纯度和高收率。用吸附机制不同的填料进行两步柱色谱,有利于产品的纯化。AB-8 型大孔树脂对白藜芦醇的吸附为疏水吸附,而聚酰胺为氢键作用。仅用大孔树脂纯化白藜芦醇,其质量分数为 50.0%,收率为 75.9%;仅用聚酰胺纯化,质量分数为 59.0%,收率为 80.7%。利用大孔树脂结合聚酰胺两步纯化白藜芦醇,产品质量分数可以达到 95.8%,总收率为 69.8%。该工艺操作简单,收率高,且大孔树脂和聚酰胺价格低廉,可再生,因此易于实现工业化生产。

参考文献:

[1] Bertelli A A, Ferrara F, Diana G, et al. Resveratrol, a natural stilbene in grapes and wine, enhances intraphagocytosis in

human promonocytes: a co-factor in antiinflammatory and anticancer chemopreventive activity [J]. *Int J Tissue React*, 1999, 21: 93-104.

[2] Filip V, Plockov á M, Šmidrkál J, et al. Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness [J]. *Food Chem*, 2003, 83: 585-593.

[3] Wang H, Liu L, Guo Y X, et al. Biotransformation of piceid in *Polygonum cuspidatum* to resveratrol by *Aspergillus oryzae* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75: 763-768.

[4] Wang H, Dong Y S, Xiu Z L. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of piceid, resveratrol and emodin from *Polygonum cuspidatum* by ethanol/ ammonium sulphate systems [J]. *Biotechnol Lett*, 2008, 30: 2079-2084.

[5] Yang F Q, Zhang T Y, Ito Y. Large-scale separation of resveratrol, anthraglycoside A and anthraglycoside B from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 919: 443-448.

[6] Chen L, Han Y S, Yang F Q, et al. High-speed counter-current chromatography separation and purification of resveratrol and piceid from *Polygonum cuspidatum* [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 907: 343-346.

[7] 周建军,张宏杰,杨培君,等. 汉中地区虎杖中白藜芦醇苷及苷元含量的测定[J]. *中草药*, 2002, 33(5): 414-416.

[8] Gu M, Su Z G, Janson J C. One-step purification of resveratrol and polydatin from *Polygonum cuspidatum* (Sieb. & Zucc.) by isocratic hydrogen bond adsorption chromatography on cross-linked 12% agarose [J]. *Chromatographia* 2006, 64, 701-704.

[9] 向海艳,周春山,杜邵龙. 大孔吸附树脂法分离纯化虎杖中白藜芦醇的研究[J]. *中草药*, 2005, 36(2): 207-210.

[10] 瞿卫林,陈晓祥,赵伯涛. 大孔吸附树脂分离虎杖中白藜芦醇的研究[J]. *中国野生植物资源*, 2005, 24(6): 60-64.

[11] 赵金华,康 晖,姚光辉,等. 虎杖苷和白藜芦醇的新制备方法[P]. 中国专利, CN 1546503A, 2004-11-17.

大孔树脂分离纯化川西獐牙菜中环烯醚萜苷类和吡酮类成分的工艺研究

马丽娜¹, 张铁军^{2*}, 田成旺², 王圣明², 韩世柳³, 赵 强³

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津药物研究院中药现代研究部, 天津 300193; 3. 天津大学, 天津 300072)

摘要:目的 研究大孔吸附树脂分离纯化川西獐牙菜中环烯醚萜苷类和吡酮类成分的工艺。方法 考察了 HPD-300、HPD-400、HPD-600、AB-8、DM-301 及 D-101 等 6 种吸附树脂对环烯醚萜苷类和吡酮类的指标成分獐牙菜苦苷和当药醇苷的动态吸附及洗脱性能,从中筛选出效果较好的树脂完成实验研究。结果 HPD-300 用于同时分离纯化环烯醚萜苷类和吡酮类成分,吸附洗脱性能良好,其吸附过程上样量为 0.9 g 生药/mL 树脂,上柱液 pH 值约为 8,体积流量为 2 BV/h;洗脱过程采用水洗除杂,7 BV 20%、5BV 70%乙醇梯度洗脱,洗脱率都在 90% 以上,所得 2 个固体样品中两类成分质量分数均可达 50% 以上。结论 HPD-300 用于同时富集环烯醚萜苷类和吡酮类成分效果最佳,是一种理想的分离纯化介质。

关键词:川西獐牙菜;环烯醚萜苷类;吡酮类;大孔吸附树脂

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)02-0227-05

* 收稿日期:2009-05-07

基金项目:天津市应用基础及前沿技术 research 计划(08JCZDJ C24700)

作者简介:马丽娜,女,硕士,主要进行中药研究与开发。

* 通讯作者 张铁军 Tel:(022)23006848

Purification technology of iridoid glycosides and xanthenes from *Swertia mussotii* by macroporous resin

MA Li-na¹, ZHANG Tie-jun², TIAN Cheng-wang², HAN Shi-liu³, ZHAO Qiang³

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 3. Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract : Objective To study the separation and purification technology of iridoid glycosides and xanthenes from *Swertia mussotii* by macroporous resin. **Methods** The dynamic adsorption and desorption characteristics of macroporous adsorption resins HPD-300, HPD-400, HPD-600, AB-8, DM-301, and D-101- for swertiamarin and swertianolin were investigated. On the base of the investigation, the better macroporous adsorption resin was chosen to finish the experiments. **Results** The adsorption and elution characteristics of HPD-300 used to separate and purify iridoid glycosides and xanthenes were very good. In the course of adsorption, the amount of used adsorption is 0.9 g dried medicinal herb/mL resin, with about 8 pH value of adsorption solution, and the volumetric rate is 2 BV/h; In the course of elution, the resin column chromatography was eluted gradiently with 7 BV 20% and 5 BV 70% EtOH after removing impurities with water. The elution rates were both more than 90%, and the contents of iridoid glycosides and xanthenes were both up to 50% in the two dried fractions of 20% and 70% ethanolic elutions. **Conclusion** HPD-300 is an ideal resin with the best enrichment for separating and purifying both iridoid glucosioles and xanthanones simultaneously.

Key words : *Swertia mussotii* Franch.; iridoid glycosides; xanthenes; macroporous resin

川西獐牙菜 *Swertia mussotii* Franch. 为龙胆科獐牙菜属植物,全草为常用藏药,藏药名“桑滴”,俗名“藏茵陈”。川西獐牙菜具有清热解毒、利胆退黄之功效,用于治疗肝胆疾病^[1]。该药材中主要活性成分有环烯醚萜类、吡啶酮类、三萜类等。现代药理研究表明,环烯醚萜类成分具有减轻或防止肝损伤^[2]、抗胆碱^[3]等作用,吡啶酮类成分具有保肝^[4,5]、抗病毒^[6]等活性。獐牙菜苦苷、当药醇苷分别为环烯醚萜苷类及吡啶酮类中的代表性成分。本实验旨在通过对大孔树脂分离纯化川西獐牙菜中环烯醚萜苷类及吡啶酮类过程中树脂的筛选、吸附洗脱工艺参数的研究,确定分离纯化环烯醚萜苷类及吡啶酮类成分的工艺路线。

1 仪器与材料

戴安液相色谱系统。HPD-300、HPD-400、HPD-600 大孔吸附树脂(沧州化工厂),AB-8 大孔吸附树脂(南开大学化工厂),DM-301、D-101- 大孔吸附树脂(天津市农药厂)。獐牙菜苦苷、当药醇苷对照品(自制,经色谱及光谱分析确认,质量分数为 98%以上);川西獐牙菜药材购自青海省玉树自治州,经天津药物研究院张铁军研究员鉴定。甲醇为色谱纯,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 獐牙菜苦苷、当药醇苷的 HPLC 法测定

2.1.1 对照品溶液的制备:依次精密称取獐牙菜苦苷、当药醇苷对照品适量,用甲醇配制成质量浓度为 70.8、30.6 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

2.1.2 色谱条件:色谱柱为 Diamonsil C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);体积流量为 1 mL/min;柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$;獐牙菜苦苷的流动相为甲醇-0.04%磷酸水(23:77),检测波长为 237 nm;当药醇苷的流动相为甲醇-0.04%磷酸水(45:55),检测波长为 254 nm。

2.1.3 标准曲线的绘制:将獐牙菜苦苷和当药醇苷对照品溶液稀释成一定的质量浓度,进样测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程。獐牙菜苦苷: $Y = 1769.8 X - 4.4751$, $R^2 = 1$, 线性范围为 0.14 ~ 1.41 μg ;当药醇苷: $Y = 3679.3 X + 7.5291$, $R^2 = 0.9999$, 线性范围为 0.153 ~ 1.224 μg 。

2.1.4 上柱液的制备:取一定量的川西獐牙菜药材,粉碎,加 12 倍量 90%乙醇回流提取 3 次,每次 1.5 h,滤过,合并滤液,65 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至 1 mL 药液/g 生药,在充分搅拌过程中加入一定量的蒸馏水,并调 pH 值为 8,离心,得上清液即为上柱液,质量浓度为 0.33 g 生药/mL 药液。

2.1.5 供试品溶液的制备:精密吸取 0.2 mL 上柱液两份,分置 25 mL 量瓶中,分别加各自流动相溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.1.6 药材中獐牙菜苦苷及当药醇苷的测定:分别

精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL 进样, 计算得药材中獐牙菜苦苷及当药醇苷的质量分数分别为 1.64 %、1.0 %; 上柱液中獐牙菜苦苷及当药醇苷得质量浓度分别为 6.04、1.79 mg/ mL。

2.2 大孔树脂纯化工艺考察

2.2.1 大孔树脂预处理: 新树脂用 95 %乙醇浸泡 12 h, 充分溶胀, 用 95 %乙醇洗至流出液加蒸馏水无白色浑浊, 且无异味, 再用蒸馏水洗至无醇味备用。

2.2.2 树脂的筛选: 取树脂 10 mL 6 份, 湿法装柱后, 每根树脂柱上样药液为 600 mL, 控制吸附过程体积流量为 1 BV/ h, 对 6 种树脂进行了动态吸附试验, 结果见图 1。

然后水洗除杂, 再依次用等量 10 %、30 %、50 %、70 %、95 %乙醇除杂洗脱各树脂柱, 结果见表 1。

洗脱率 = $C_D V_D / (C_D - C_E) V_A$

式中 C_D -洗脱液质量浓度, V_D -洗脱液体积, C_E -吸附前溶液质量浓度, C_E -吸附后流出液质量浓度, V_A -吸附液体积

由图 1 可以看出, 对于獐牙菜苦苷的吸附, HPD-300、HPD-400 的吸附量明显高于其他树脂,

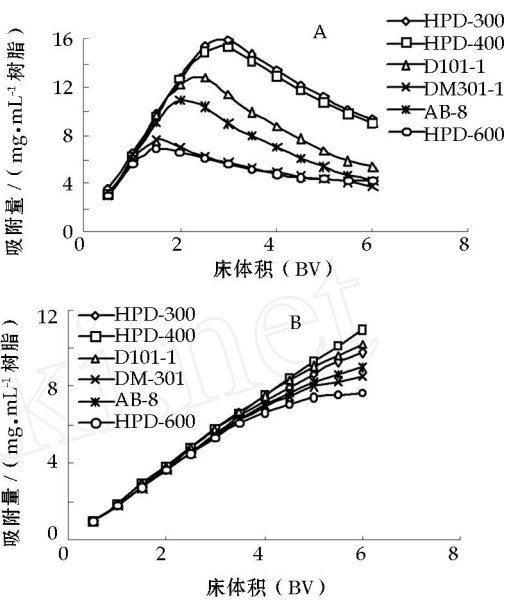


图 1 不同树脂对獐牙菜苦苷(A)和当药醇苷(B)的动态吸附曲线

Fig 1 Dynamic adsorption curves of swertiamarin (A) and swertianolin (B) by diverse resins

表 1 不同体积分数乙醇对獐牙菜苦苷和当药醇苷在各种树脂中的洗脱效果

Table 1 Desorption efficiency of different concentration ethanol on swertiamarin and swertianolin by diverse resins

树脂 型号	树脂 类型	比表 面积	洗脱率/ %						总量
			成分	10 %乙醇	30 %乙醇	50 %乙醇	70 %乙醇	95 %乙醇	
HPD-300	非极性	800 ~ 870	獐牙菜苦苷	77.4	13.0	—	—	—	90.4
			当药醇苷	4.83	12.1	46.8	30.5	0.6	94.8
HPD-400	中极性	500 ~ 550	獐牙菜苦苷	64.6	7.3	—	—	—	71.9
			当药醇苷	3.8	14.8	54.6	20.8	0.5	94.5
HPD-600	极性	550 ~ 600	獐牙菜苦苷	58.9	29.2	—	—	—	88.1
			当药醇苷	9.0	24.1	60.2	6.7	—	100
AB-8	弱极性	480 ~ 520	獐牙菜苦苷	93.7	6.2	—	—	—	99.9
			当药醇苷	11.7	21.9	55.7	10.7	—	100
DM-301	弱极性	≥330	獐牙菜苦苷	68.8	13.4	—	—	—	82.2
			当药醇苷	7.6	27.1	56.3	4.9	—	95.9
D-101-I	非极性	400 ~ 600	獐牙菜苦苷	84.3	5.2	—	—	—	89.5
			当药醇苷	5.0	9.2	53.4	18.6	0.7	86.9

对于当药醇苷的吸附, HPD-300、HPD-400、D-101-I 的吸附量相对于其他树脂较高。这与被吸附分子的极性、分子大小和吸附剂的极性、比表面积、孔径大小等因素密切相关。两类成分均具有一定的极性, 所以极性稍强的树脂对其具有较强吸附作用, 如 HPD-400。另外孔径较大的树脂对组分也易吸附, 如 D-101-I。而 HPD-300 虽为非极性树脂, 但其比表面积大, 所以对两种成分的吸附量很高。由吸附过程可知, HPD-300 和 HPD-400 对两类成分的吸附效果均符合要求。

由表 1 可知, 虽然 HPD-300、HPD-400 树脂对两类成分的吸附性能接近, 但 HPD-400 对獐牙菜苦

苷的脱附率较低。另外, 从表中可知, 30 %以下的乙醇基本上能将獐牙菜苦苷洗脱完全, 而当药醇苷主要集中在 50 %、70 %乙醇被洗脱下来。

以上分析结果表明, 非极性大孔树脂 HPD-300 对环烯醚萜苷类及呋酮类均具有良好的吸附脱附性能, 且若通过 20 %、70 %乙醇梯度洗脱, 可使环烯醚萜苷类及呋酮类成分达到很好的分离。

2.2.3 HPD-300 树脂上样量的确定: 取树脂 10 mL, 湿法装柱后, 吸附过程控制体积流量为 1 BV/ h, 分步收集流出液, 测定流出液中獐牙菜苦苷和当药醇苷的质量浓度, 结果见图 2 和表 2。

吸附量 = $(C_0 - C_e) \times V_A / V$

吸附率 = $(C_0 - C_e) / C_0 \times 100\%$

式中 C_0 吸附前溶液质量浓度, C_e 吸附后溶液质量浓度, V_A 吸附液体积, V 树脂体积

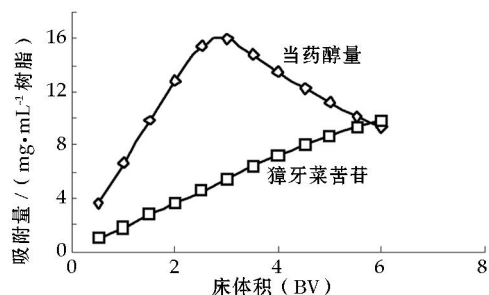


图 2 HPD-300 树脂吸附曲线

Fig 2 Adsorption curve of HPD-300 resin

表 2 HPD-300 树脂对獐牙菜苦苷、当药醇苷吸附量与吸附率的相互影响

Table 2 Mutual influence between adsorption quantity and rate of swertiamarin and swertianolin by HPD-300 resin

流出液体 积/BV	吸附量/(mg·mL)		吸附率/%	
	獐牙菜苦苷	当药醇苷	獐牙菜苦苷	当药醇苷
0.5	3.63	0.98	99.94	100
1.0	6.62	1.79	99.54	100
1.5	9.86	2.75	99.48	100
2.0	12.85	3.65	99.34	100
2.5	15.49	4.58	96.27	100
3.0	15.97	5.50	82.62	99.71
3.5	14.79	6.44	64.51	98.94
4.0	13.44	7.26	51.07	97.63

可以看出,獐牙菜苦苷和当药醇苷在 HPD-300 树脂上的吸附过程有很大差别。当树脂对于獐牙菜苦苷达到最大吸附时,当药醇苷还远远没有达到。由此可知,HPD-300 树脂对于獐牙菜苦苷来说,为快速吸附树脂,而对于当药醇苷来说,则是缓慢吸附树脂。另外,由獐牙菜苦苷吸附曲线可知,其达到最大吸附后,继续上样,其吸附量有所降低。原因可能是吸附过程也是吸附与脱附的竞争过程,上柱液本身具有一定的碱性,吸附达到一定程度,脱附占主导地位,故吸附量降低。

可以看出,獐牙菜苦苷和当药醇苷的吸附率随树脂吸附量增加而降低,但在当药醇苷的吸附率为 99.71% 时,獐牙菜苦苷的吸附率已经低于 90%,此时如继续上样,必须对流出液再吸附,或增加树脂用量,否则会造成活性成分损失。因此,实验确定上样量以獐牙菜苦苷为准,即 15.49 mg 獐牙菜苦苷 / mL 树脂,折合 0.9g 生药 / mL 树脂。

2.2.4 体积流量对动态吸附性能的影响:在同一实验条件下,控制吸附体积流量分别为 1、2、3 BV/h,

对 HPD-300 树脂进行吸附考察,结果见图 3。

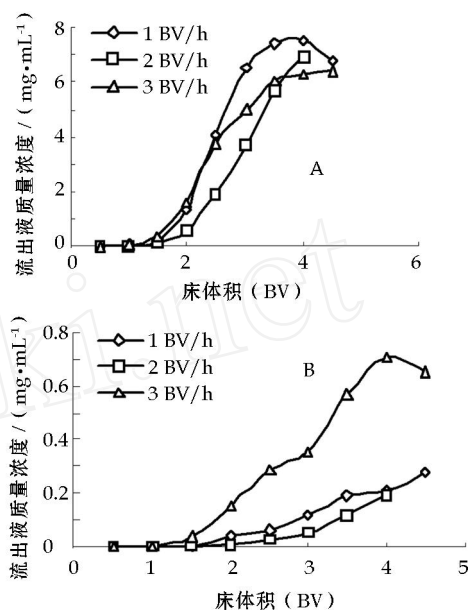


图 3 体积流量对獐牙菜苦苷(A)和当药醇苷(B)吸附的影响

Fig 3 Effects of flow rates on adsorption of swertiamarin (A) and swertianolin (B)

结果表明,体积流量为 2 BV/h 时 HPD-300 树脂吸附獐牙菜苦苷和当药醇苷性能均较理想。这是因为树脂吸附过程为径向扩散和轴向扩散的平衡过程,当体积流量过大时,轴向扩散显著增加,活性成分未来得及吸附,就通过了树脂柱。另外,本实验的上柱液为弱碱性,体积流量过慢时,上柱液作为洗脱溶剂的洗脱作用显著增强,活性成分吸附量降低。因此,用 HPD-300 树脂同时吸附獐牙菜苦苷及当药醇苷的最佳体积流量为 2 BV/h。

2.2.5 梯度洗脱曲线的绘制:利用 HPD-300 树脂对獐牙菜苦苷和当药醇苷的吸附脱附性能差异,对其进行梯度洗脱。按 2.2.2、2.2.3 确立的条件上样结束后,首先用 3 BV 水洗柱除杂,而后依次用 20%乙醇 5 BV、70%乙醇 6 BV 洗脱,体积流量为 2 BV/h,分步收集洗脱液,测定每份中獐牙菜苦苷、当药醇苷的质量浓度,洗脱结果见图 4。

由图可知,环烯醚萜苷类的指标成分獐牙菜苦苷主要集中在 20%乙醇的洗脱液中,吡酮类的指标成分当药醇苷主要集中在 70%乙醇的洗脱液中,两类成分基本上能够分开,又通过水洗除杂,从而达到环烯醚萜苷类和吡酮类成分同时纯化的目的。

2.2.6 洗脱终点的确定:为了考察洗脱溶剂的洗脱终点,按 2.2.4 项中方法装柱,上样,水洗后,20%、70%乙醇均洗脱 9 BV,洗脱体积流量为 2 BV/h,分

步收集醇洗液,分别测定 20 %乙醇洗脱液中的獐牙菜苦苷及 70 %乙醇洗脱液中的当药醇苷质量浓度,洗脱曲线见图 5。

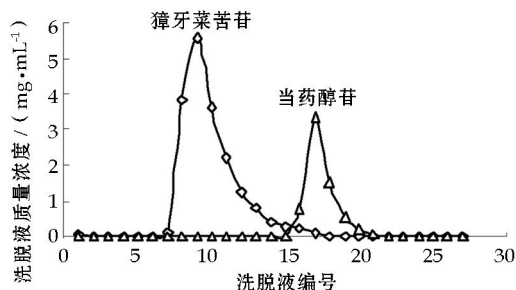


图 4 梯度洗脱曲线

Fig 4 Gradient elution curves

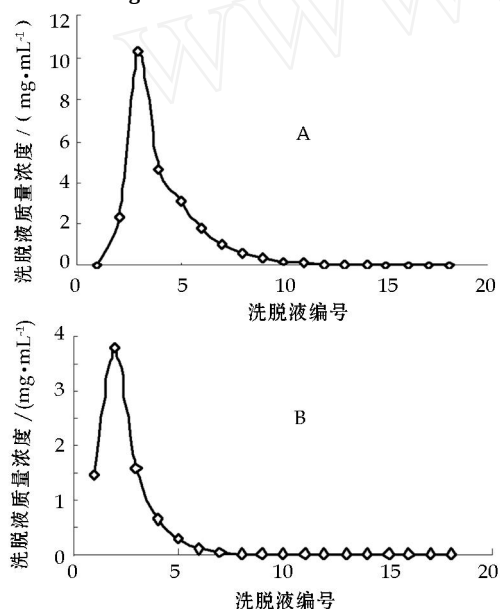


图 5 獐牙菜苦苷 (A) 和当药醇苷 (B) 的洗脱曲线

Fig 5 Elution curves of swertiamarin (A)

and swertianolin (B)

由图 5 可知,獐牙菜苦苷的洗脱曲线相对于当药醇苷较为平缓,需 6BV20 %乙醇洗脱液基本洗脱完全,而当药醇苷只需 70 %乙醇洗脱液 4 BV 就能基本洗脱完全,考虑到各方面的误差因素,确定 20 %乙醇洗脱 7 BV,70 %乙醇洗脱 5 BV。

综上,HPD-300 树脂对川西獐牙菜中环烯醚萜苷类和吡酮类分离纯化的最佳工艺条件:

吸附过程:上样量为 0.9 g 生药/ mL 树脂,上柱液 pH 值约为 8,吸附过程体积流量为 2 BV/ h。

洗脱过程:水洗除杂后,先用 7 BV 20 %乙醇洗脱,主成份为环烯醚萜苷类,再用 5 BV 70 %乙醇洗脱,主成份为吡酮类,洗脱体积流量为 2 BV/ h。

采用该工艺进行实验,收集所需组分,分别减压浓缩并干燥,得到固体样品。测定样品质量分数,结果 20 %乙醇洗脱样品中獐牙菜苦苷质量分数 $\geq 50\%$,当药醇苷质量分数 $\leq 1\%$;70 %乙醇洗脱样品中当药醇苷质量分数 $\geq 20\%$ (紫外分光光度法粗测吡酮类质量分数 $\geq 50\%$),獐牙菜苦苷质量分数 $\leq 1\%$ 。收率:20 %部分约为 4.4 %,70 %部分约为 3.9 %。

3 讨论

在上柱液的制备过程中,本实验考察了 pH 值为 6、7、8、9 水沉效果,以獐牙菜苦苷和当药醇苷在上清液中的质量浓度为指标综合评价,结果选定 pH 值为 8。这是因为吡酮类成分的水溶性较差,而该类化合物具有多酚结构呈弱酸性,因此在碱性环境中溶解性好;但实验表明獐牙菜苦苷在碱性较强的条件下质量浓度降低,特别是 pH 值为 9 时降低幅度较大,可能较强碱性的溶液容易使环烯醚萜苷类化合物的结构改变,导致质量浓度下降,所以确定水沉后调 pH 8。实验证明,经水沉调 pH 值的过程,獐牙菜苦苷和当药醇苷的损失率分别为 3 %~5 %、8 %~11 %,其结果基本满足要求。

采用大孔树脂法分离纯化川西獐牙菜中环烯醚萜类和吡酮类成分是可行的,该工艺可靠、稳定、安全,有效成分损失少,为其相应的药理、制剂研究打下一定的基础。

参考文献:

- [1] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1991.
- [2] 刘占文,陈长勤,金若敏,等. 龙胆苦苷的保肝作用研究[J]. 中草药,2002,33 (1):47.
- [3] Yamakura J, Kobayashi M, Matsuda H. Anticholinergic action of Swertia japonica and an active constituent[J]. J Ethnopharmacol,1991,33 (1):31.
- [4] 卞庆亚. 芒果苷对实验性肝损伤大鼠酶及形态变化影响的研究[J]. 中国实验动物学杂志,1999,9 (1):10.
- [5] Li J C, Feng L, Sun B H, et al. Hepatoprotective activity of the constituents in Swertia pseudochinensis [J]. Biol Pharm Bull, 2005,28:534.
- [6] Wang J N, Hou C Y, Liu Y L. Swertiafranchetiana, an HIV reverse transcriptase inhibitor and the first flavone-xanthone Dimer from Swertia franchetiana [J]. J Nat Prod, 1994, 57 (2): 211.