

大孔树脂分离纯化广东紫珠中苯乙醇苷的工艺研究

聂 韡, 房海灵, 黄宝祥, 朱培林

江西省林业科学院, 江西 南昌 330032

摘要: 目的 研究大孔树脂分离纯化广东紫珠中苯乙醇苷类成分的工艺。方法 以连翘酯苷 B 和金石蚕苷的量之和为考察指标, 采用 HPLC 法考察 10 种大孔树脂对苯乙醇苷的吸附分离性能, 并考察分离纯化苯乙醇苷类成分的最佳工艺条件。结果 以 X-5 型大孔树脂为吸附剂, 优选的纯化工艺为树脂的最佳吸附量为 32.79 mg/g, 先以 4 BV 的水洗脱, 除去大部分水溶性杂质, 再以 7 BV 30%乙醇溶液洗脱, 体积流量为 2 BV/h, 所得提取物中苯乙醇苷的量达 52.8% ($n=3$)。结论 该优选的工艺简便可行, 可作为分离纯化广东紫珠中苯乙醇苷类成分的有效方法。

关键词: 广东紫珠; 大孔树脂; 苯乙醇苷; 连翘酯苷 B; 金石蚕苷

中图分类号: R284.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)18-2547-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.18.011

Separation and purification of phenylethanoid glycosides from *Callicarpa kwangtungensis* by macroporous resin

NIE Wei, FANG Hai-ling, HUANG Bao-xiang, ZHU Pei-lin

Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang 330032, China

Abstract: **Objective** To study the technology for separation and purification of phenylethanoid glycosides from *Callicarpa kwangtungensis* by macroporous resin. **Methods** The absorption and separation properties of 10 kinds of absorption resins were studied and the separation and purification technological process of phenylethanoid glycosides from *C. kwangtungensis* were optimized by HPLC with the total content of forsythiaside B and poliumoside as an index. **Results** Using X-5 resin column as adsorbent, the optional conditions were as follows: loading qualities were 32.79 mg/g, the resin was washed by 4 BV distilled water to remove impurity and 7 BV 30% ethanol to elute phenylethanoid glycosides, the eluting velocity was 2 BV/h, and the content of phenylethanoid glycosides in the extract was 52.8% ($n=3$). **Conclusion** This technology is simple and feasible, and the process with X-5 resin is an effective method to separate and purify phenylethanoid glycosides from *C. kwangtungensis*.

Key words: *Callicarpa kwangtungensis* Chun.; macroporous resin; phenylethanoid glycosides; forsythiaside B; poliumoside

广东紫珠 *Callicarpa kwangtungensis* Chun. 为马鞭草科紫珠属植物, 主要分布于江西、湖南、广东、广西、贵州、云南等地, 为《中国药典》2010年版新收载中药材品种^[1], 其药用部位为其地上部分, 具有收敛止血、清热解毒之功效^[2]。早期对广东紫珠的研究主要集中在黄酮类成分^[3-5], 而《中国药典》2010年版中广东紫珠定量限定标准为连翘酯苷 B 和金石蚕苷 2 种苯乙醇苷类成分, 且连翘酯苷 B 抗金黄色葡萄球菌和奇异变形杆菌的作用以及金石蚕苷抗氧化、抑制红血球溶血的作用与广东紫珠的药理作用密切相关^[6-8]。本课题组在前期研究中也

发现这 2 种成分在广东紫珠中的量较高, 目前对广东紫珠中苯乙醇苷类成分的研究只停留在成分分析上, 对其提取、纯化研究方面一直未见相关报道, 因此, 本研究采用大孔树脂吸附富集纯化广东紫珠中苯乙醇苷类成分, 以其中的主要成分连翘酯苷 B 和金石蚕苷的量为指标, 优选其纯化工艺参数, 建立适合工业化生产的纯化工艺方案, 为其进一步的新药开发提供数据参考。

1 仪器与材料

Waters 2695 高效液相色谱仪, 紫外检测器 (美国 Waters 公司); CP214 型分析天平 (奥豪斯仪器

收稿日期: 2013-04-18

基金项目: 国家青年自然科学基金项目 (81102799)

作者简介: 聂 韡 (1982—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为中药活性成分提取及质量评价。

Tel: (0791)83833641 E-mail: nw1025@hotmail.com

有限公司); 超声清洗器(洁康超声波有限公司; 超声波功率 120 W, 频率 40 kHz); RE-52 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

NKA、NKA-2、NKA-9、D301R、D101、AB-8、X-5、S-8、HPD500、H103 大孔吸附树脂(天津波鸿树脂科技有限公司); 药材产于江西省萍乡市芦溪县, 经江西省林业科学院朱培林研究员鉴定为马鞭草科紫珠属植物广东紫珠 *Callicarpa kwangtungensis* Chun. 的地上部分; 连翘酯苷 B(批号 111811-201001) 和金石蚕苷(批号 111812-201001) 对照品购自南京泽朗医药有限公司, 经检验质量分数大于 98%; 乙腈为色谱纯; 甲醇、甲酸等均为分析纯; 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 连翘酯苷 B 和金石蚕苷的测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取连翘酯苷和金石蚕苷对照品各 5.00 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 精密量取各对照品溶液 1 mL, 混匀, 制得混合对照品溶液, 进样前用微孔滤膜滤过, 去杂质, 备用。

2.1.2 色谱条件 色谱柱为 Sunfire C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液(18:82); 检测波长 332 nm; 体积流量 1 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL。色谱图见图 1。

2.1.3 线性关系考察 分别精密量取连翘酯苷 B 与金石蚕苷对照品溶液各 1 mL, 混合, 得混合对照品储备液, 注入高效液相色谱仪, 进样体积分别为 1、4、8、12、16、20 μL, 测定连翘酯苷 B、金石蚕苷的峰面积, 分别以连翘酯苷 B、金石蚕苷的量(μg)为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲

线, 得到连翘酯苷 B 的回归方程为 $Y=886\,531\,X+284\,290$, $r=0.995\,1$; 金石蚕苷的回归方程为 $Y=982\,413\,X+371\,749$, $r=0.999\,5$ 。

2.2 大孔吸附树脂富集纯化苯乙醇苷的工艺考察

2.2.1 上样溶液的制备 称取广东紫珠粗粉 100 g, 加 10 倍量 70%乙醇 36 °C 超声提取 45 min, 提取 4 次, 提取液滤过, 减压浓缩至 400 mL(约含生药 0.25 g/mL)。经 HPLC 法测定, 上样溶液中苯乙醇苷质量浓度(以连翘酯苷 B 和金石蚕苷的质量浓度之和计)为 10.93 mg/mL。

2.2.2 树脂预处理 将大孔树脂用 95%乙醇浸泡 24 h, 湿法装柱, 用无水乙醇洗至流出液浓缩之后无白色浑浊为止, 用蒸馏水洗至无醇味后备用。

2.2.3 大孔树脂静态吸附和解吸附实验 取 10 种不同型号树脂, 精密称取 2 g(干质量)于具塞锥形瓶中, 精密加入上样溶液 10 mL, 振荡 24 h 后滤过, 测定吸附前后溶液中连翘酯苷 B 和金石蚕苷的质量浓度, 计算吸附率。将静态吸附平衡后的树脂滤过抽干, 加 50%乙醇 10 mL 解吸附, 每 20 min 振摇 1 次, 振摇 4 h, 滤过, 测定滤液中连翘酯苷 B 和金石蚕苷的质量浓度, 计算解吸率, 结果见表 1。

$$\text{吸附率}=(C_0V_0-C_1V_1)/(C_0V_0)$$

$$\text{解吸率}=C_2V_2/(C_0V_0-C_1V_1)$$

C_0 为供试品溶液中连翘酯苷 B 和金石蚕苷的质量浓度之和, V_0 为供试品溶液体积; C_1 为流出液中连翘酯苷 B 和金石蚕苷的质量浓度之和, V_1 为流出液体积; C_2 为解吸液中连翘酯苷 B 和金石蚕苷的质量浓度之和, V_2 为解吸液体积

结果显示, 10 种不同型号的树脂除了 NKA-9 和 HPD500 之外, 其余 8 种型号的树脂均表现出极高的吸附率; 具有高吸附率的 8 种不同型号树脂中, X-5 的解吸率最高, 因此, 确定 X-5 作为富集纯化广东紫珠中苯乙醇苷的树脂。

2.2.4 树脂的静态吸附动力学过程 称取 X-5 树脂 2 g 于具塞锥形瓶中, 加入上样液 10 mL, 不时振摇, 于不同时间取样, 测定连翘酯苷 B 和金石蚕苷的量。绘制 X-5 树脂的吸附动力学曲线。结果见图 2。可见开始阶段吸附量增长非常快, 20 min 后吸附率增加减慢, 50 min 后吸附率趋于稳定。

2.2.5 动态吸附曲线的研究 取 10 g X-5 树脂(干质量)湿法装柱, 将上样溶液(质量浓度为生药 0.25 g/mL)缓慢上柱, 流出液每 10 mL 收集 1 份, 分别测定连翘酯苷 B 和金石蚕苷的量。绘制 X-5 树脂的动态吸附曲线, 结果见图 3。可见 10 g X-5 树脂上

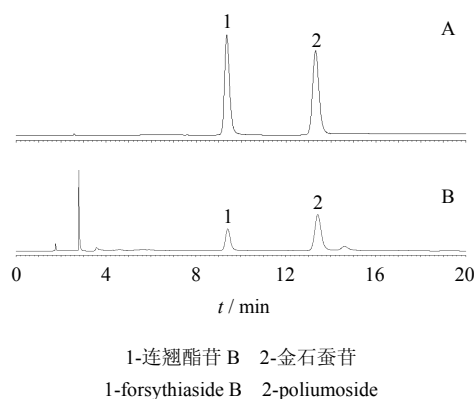


图 1 对照品 (A) 和广东紫珠样品 (B) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substance (A) and *C. kwangtungensis* (B)

表 1 10 种大孔吸附树脂的吸附率和解吸率

Table 1 Adsorption and desorption rates of 10 kinds of macroporous resins

树 脂	连翘酯苷 B+金石蚕苷 / (mg·mL ⁻¹)		吸附率 / %	解吸率 / %
	吸附后溶液	解吸后醇液		
NKA	0.297	0.793	97.55	66.93
D301R	0.165	1.529	98.66	26.37
AB-8	0.161	0.628	95.79	56.41
NKA-9	4.764	—	57.29	—
X-5	0.171	0.774	98.76	69.55
D101	0.263	0.736	98.08	65.91
NKA-2	0.009	0.779	99.90	68.56
H103	0.069	0.612	99.41	53.95
HPD500	0.966	—	91.52	—
S-8	0.447	1.015	96.24	60.11

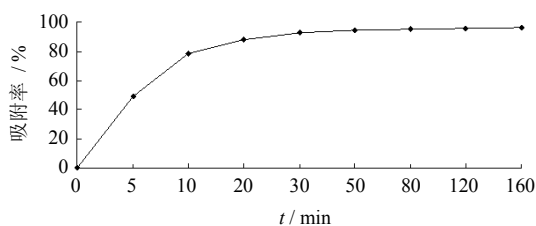


图 2 X-5 树脂吸附动力学曲线

Fig. 2 Static-adsorption kinetic curve of X-5 resin

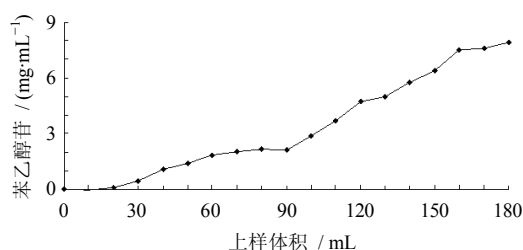


图 3 X-5 树脂动态吸附曲线

Fig. 3 Dynamic adsorption curve of X-5 resin

样 30 mL 后出现目标样品泄露现象, 因此, X-5 树脂与药材量质量比为 1:0.75。单位质量 X-5 树脂吸附苯乙醇苷为 32.79 mg/g (以连翘酯苷 B 和金石蚕苷的量之和计, 上样溶液中苯乙醇苷质量浓度为 10.93 mg/mL)。

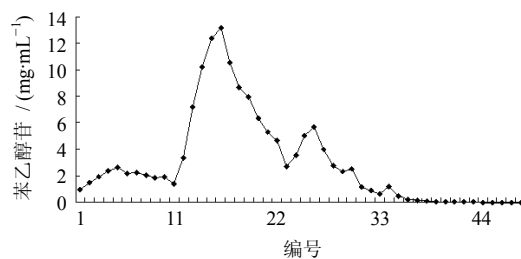
2.2.6 上样液质量浓度的选择 将广东紫珠粗提液中苯乙醇苷的初始质量浓度分别控制在 2.73、5.46、10.93、16.39、21.86 mg/mL, 以约 1 mL/min 的体积流量过柱, 进行动态吸附。结果吸附率分别为 38.69%、68.56%、89.34%、82.13%、81.59%, 质量浓度在低于 10.93 mg/mL 的区间内, 苯乙醇苷类成

分的吸附率均随着上样液质量浓度的增大而增大, 但在质量浓度高于 10.93 mg/mL 后, 苯乙醇苷类成分的吸附率开始有所降低, 且上样液质量浓度过高容易造成树脂内部过饱和堵塞树脂孔隙而影响吸附和解吸附。因此, 上样溶液中苯乙醇苷质量浓度为 10.93 mg/mL 较适宜。

2.2.7 上样体积流量对吸附量的影响 将上样溶液 100 mL 通过装有 10 g AB-8 大孔树脂的吸附柱里, 分别以 1、2、3、4、5 BV/h 体积流量进行动态吸附, 测定吸附后的苯乙醇苷质量浓度, 计算其饱和吸附量, 结果吸附率分别为 90.72%、85.34%、72.57%、58.88%、40.91%, 结果可知, 树脂的吸附量随体积流量的增大而下降, 这主要是因为上样体积流量过大时, 易造成广东紫珠中苯乙醇苷类成分还未能扩散到树脂的内表面就被冲出柱子, 从而造成吸附量下降。因此上样体积流量以 1 BV/h 较为适宜。

2.2.8 大孔树脂洗脱体积分数的选择 将经样品吸附饱和的树脂用水洗至无色, 再依次用 10%、30%、50%、70%乙醇洗脱, 各 11 份, 每份 10 mL, 测定连翘酯苷 B 和金石蚕苷的量, 绘制洗脱曲线。结果见图 4, 可见苯乙醇苷类成分主要集中在 30%~50% 乙醇洗脱液中, 且 30%乙醇洗脱能力最强, 因此, 选择 30%乙醇为洗脱溶剂。

2.2.9 体积流量对洗脱效果的影响 取经处理后的 X-5 树脂 10 g (干质量), 加乙醇浸泡溶胀, 湿法装柱, 树脂柱床体积约为 13 mL。取广东紫珠提取液 (苯乙醇苷的量 10.93 mg/mL, 以连翘酯苷 B 和金石蚕苷的量之和计) 30 mL 上样, 以 1 BV/h 的体积流量进行吸附, 用 30%乙醇洗脱, 体积流量分别为 1、2、3、4 BV/h, 分别收集洗脱液 100 mL, 测定连翘酯苷 B 和金石蚕苷的量, 结果洗脱液中连翘酯苷 B



1~11 号为 10%乙醇洗脱液 12~23 号为 30%乙醇洗脱液
24~35 号为 50%乙醇洗脱液 36~48 号为 70%乙醇洗脱液
1~11 10% ethanol elution 12~23 30% ethanol elution
24~35 50% ethanol elution 36~48 70% ethanol elution

图 4 X-5 树脂洗脱体积分数的考察

Fig. 4 Elution volume fraction of X-5 resin

和金石蚕苷质量浓度之和分别为 2.997、2.954、2.738、2.453 mg/mL, 洗脱率分别为 91.4%、90.1%、83.5%、74.8%。可见, 随着体积流量的不断增加, 洗脱溶剂对目标组分的洗脱率逐渐降低, 当体积流量为 2 BV/h 时, 虽然其洗脱率略低于 1 BV/h, 但理论上可以节省一半的时间, 因此, 确定最佳洗脱体积流量为 2 BV/h。

2.2.10 洗脱溶剂用量的考察 取经处理后的 X-5 树脂 10 g (干质量), 加乙醇浸泡溶胀, 湿法装柱, 树脂柱床体积约为 13 mL。再取广东紫珠提取液(苯乙醇苷的量 10.93 mg/mL, 以连翘酯苷 B 和金石蚕苷的量之和计) 30 mL 上样, 以 1 BV/h 的体积流量进行吸附, 先用水洗脱除杂, 并检测水洗脱液中连翘酯苷 B 和金石蚕苷的量。洗至水洗脱液蒸干无残渣, 再用 30%乙醇洗脱, 体积流量为 2 BV/h, 每 5 mL 收集 1 份, 测定连翘酯苷 B 和金石蚕苷的量。绘制洗脱曲线, 结果见图 5。结果显示, 用 4 BV 的水洗脱, 可洗去大部分水溶性杂质, 而目标组分不被洗脱。然后用 30%乙醇洗脱, 7 BV 的洗脱液即可基本将苯乙醇苷类组分完全洗脱。

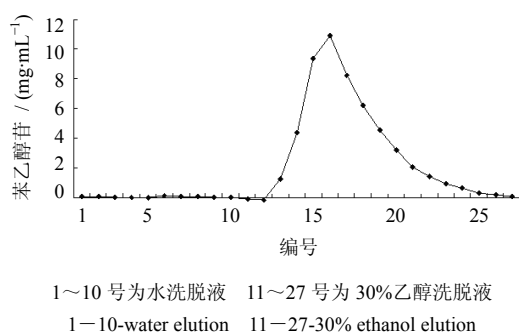


图 5 X-5 树脂动态解吸曲线
Fig. 5 Dynamic desorption curve of X-5 resin

2.3 验证实验

称取 X-5 大孔吸附树脂共 30 g (干质量) 3 份, 预处理后湿法装柱。将上样溶液 90 mL (苯乙醇苷的量 10.93 mg/mL, 以连翘酯苷 B 和金石蚕苷的量之和计) 以 1 BV/h 的体积流量进行吸附。先以 4 BV 的水洗脱, 除去大部分水溶性杂质, 再以 7 BV 的 30%乙醇溶液洗脱, 体积流量为 2 BV/h。收集 30%乙醇洗脱液, 减压浓缩至干, 测定。结果显示, 经大孔树脂分离纯化后的提取物中, 苯乙醇苷类成分的量(以连翘酯苷 B 和金石蚕苷计)分别为 54.7%、51.2%、52.5%, 平均量为 52.8%, RSD 为 3.3% ($n=3$), 而粗提浸膏中苯乙醇苷类成分的量(以连翘酯

苷 B 和金石蚕苷计)为 14.8%, 苯乙醇苷类成分(以连翘酯苷 B 和金石蚕苷计)平均转移率为 87.6%; 说明该分离纯化工艺效果良好, 重复性好。

3 讨论

大孔吸附树脂是 20 世纪 60 年代发展起来的新型吸附剂, 具有机械强度好、选择性好、吸附量高、解析容易、可反复使用、耐污染强等特点。尤其适用于纯化中药中极性较大的化学成分^[9]。广东紫珠中的苯乙醇苷类成分具有双糖链和酚羟基的极性片段, 为强极性化合物, 用大孔树脂进行分离纯化效果显著。

采用的大孔吸附树脂对广东紫珠中总苯乙醇苷的吸附量大, 解吸附完全, 可有效去除糖类、蛋白等水溶性杂质及大部分脂溶性杂质, 操作简便, 生产成本低, 纯化后的提取物中该类成分的量达到 50%以上, 纯度大幅提高, 为进一步充分开发广东紫珠的药用价值提供了研究基础, 且可以广泛应用于工业生产。

参考文献

- [1] Dan Y, Qian Z Z, L Y Z, *et al.* New collection of crude drugs in *Chinese Pharmacopoeia 2010* I. *Callicarpa* Linn. and related items [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(4): 272-288.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 陈艳华, 冯 锋, 任冬春, 等. 广东紫珠地上部分的化学成分 [J]. *中国天然药物*, 2008, 6(2): 120-122.
- [4] 刘成红, 曹 红, 邢俊波. HPLC 法测定广东紫珠及其制剂宫复康胶囊中木犀草素 [J]. *中草药*, 2006, 37(4): 539-541.
- [5] 黄丽莉, 金小春, 朱培林. 不同采收期及不同部位的广东紫珠总黄酮含量分析 [J]. *中国林副特产*, 2009(3): 10-12.
- [6] 周国平, 谢二磊, 盛杰曹, 等. HPLC 法同时测定江西不同产地广东紫珠药材中连翘酯苷 B 和金石蚕苷的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(10): 1623-1625.
- [7] Xie E L, Zhou G P, Ji T F, *et al.* A novel phenylpropanoid glycoside from *Callicarpa kwangtungensis* Chun. [J]. *Chin Chem Lett*, 2009, 20(7): 827-829.
- [8] Didry N, Seidel V, Dubreuil L, *et al.* Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra* [J]. *J Ethnopharmacol*, 1999, 67(2): 197-202.
- [9] 陶遵威, 张 岩, 王文彤. 大孔吸附树脂对苦豆子多糖纯化工艺研究 [J]. *现代药物与临床*, 2013, 28(4): 515-518.