

大孔吸附树脂对龙胆中龙胆苦苷吸附分离研究

耿平, 查建蓬, 付焱, 张嫡群*, 周娟*

(河北医科大学 新药开发中心, 河北 石家庄 050017)

龙胆是一种常用中药, 有清湿热、利肝胆的功能, 所含龙胆苦苷等水溶性成分为主要活性成分。分离龙胆苦苷的方法多为硅胶或聚酰胺柱色谱^[1-3], 往往需多次上柱, 提纯效果不理想。大孔树脂具有理化性质稳定、吸附选择性独特, 吸附效率高、不受无机盐类存在的影响、易再生等优点。本实验选择 7 种大孔树脂分离龙胆中龙胆苦苷, 并采用 HPLC 法测定龙胆苦苷含量。

1 仪器与材料

德国 Knauer 公司高效液相色谱仪, K1001 高效液相泵, UVK-2501 检测器, K-1500 低压梯度混合器。Heidolph Laborota 4000 旋转薄膜蒸发器(德国), GR-202 型电子分析天平(A & D Company), 富华 THZ-82 恒温振荡器(金坛市富华仪器有限公司), 玻璃色谱柱(200 mm × 15 mm, 400 mm × 35 mm)。

龙胆购于河北省药材公司, 经本校药学院陈举云教授鉴定为条叶龙胆 *Gentiana manshurica* Kitag. 的干燥根及根茎。龙胆苦苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 770-200105), 乙醇(分析纯), 甲醇(色谱纯)。SP700 树脂(日本三菱化学公司), X-5、S-8、D₄₀₂₀、AB-8、NKA、NKA-9 大孔吸附树脂(南开大学化工厂), 各种树脂物理性能见表 1。

表 1 7 种大孔树脂的物理性能

Table 1 Physical property of seven kinds of macroporous resins

树脂	极性	粒径范围/mm	含水量/%	比表面积/(m ² ·g ⁻¹)	平均孔径/mm	孔隙率/%	孔容/(mL·g ⁻¹)
SP700	非极性	0.25	60~70	1200	90		2.3
X-5	非极性	0.3~1.25	45~60	500~600	29.0~30.0	50~60	1.20~1.40
AB-8	弱极性	0.3~1.25	60~70	480~520	13.0~14.0	42~46	0.73~0.77
NKA	非极性	0.3~1.0	65~75	570~590	20.0~22.0		
D ₄₀₂₀	非极性	0.3~1.25	70~80	540~580	10.0~10.5	74~78	2.88~2.92
S-8	极性	0.3~1.25		100~120	28.0~30.0		0.78~0.82
NKA-9	极性	0.3~1.25		250~290	15.5~16.5	46~50	

2 方法与结果

2.1 龙胆苦苷粗提液的制备: 称取龙胆草粗粉 200

g, 95% 乙醇 2 000 mL 提取。室温浸提两次, 每次 1 周, 40℃ 温提两次, 每次 4 h, 滤过, 合并滤液, 减压回收乙醇浓缩至稠膏状。加稠膏量蒸馏水, 冰箱 4℃ 冷置 12 h, 滤过, 滤液于 50℃ 水浴挥至无醇味, 取 25 mL 置 250 mL 量瓶中, 加水至刻度, 即得。

2.2 树脂预处理: 树脂加 95% 乙醇浸泡处理后, 湿法装柱, 用 95% 乙醇淋洗至洗脱液加等量蒸馏水不浑浊, 再用蒸馏水洗至无醇味, 备用。

2.3 标准曲线的制备: 精密称取龙胆苦苷对照品 14.42 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。准确吸取 0.3、0.6、0.9、1.2、1.5 mL 分置 5 mL 量瓶中, 加甲醇制成系列质量浓度的溶液, 取 10 μL 注入高效液相色谱仪。以峰面积为纵坐标, 龙胆苦苷进样量为横坐标进行线性回归, 得回归方程: $Y = 1243942.788X + 38129.9$, $r = 0.9999$, 线性范围: 0.865~4.326 μg。

2.4 龙胆苦苷的 HPLC 法测定: 色谱条件: 色谱柱: Hypersil C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(30:70); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 室温; 检测波长: 270 nm; 进样量: 10 μL。

2.5 静态吸附试验: 准确称取预处理的湿树脂各 1.0 g, 置于 50 mL 具塞磨口三角瓶中, 精密加入 25 mL 吸附原液, 室温下振荡 24 h, 充分吸附后, 滤过, 对滤液进行 HPLC 法测定, 与原液的测定结果比较, 按下式计算吸附容量, 结果见表 2。

$$\text{吸附量} = \frac{(\text{原液浓度} - \text{吸附液浓度}) \times \text{溶液体积}}{\text{干树脂质量}}$$

2.6 解吸率测定: 取上述吸附饱和的树脂分别加 30% 乙醇溶液 25 mL, 振荡 12 h。测定解吸液中龙胆苦苷的量, 按下式计算解吸率, 结果见表 2。

$$\text{解吸率} = \frac{\text{解吸液质量浓度} \times \text{解吸液体积}}{(\text{原液质量浓度} - \text{吸附液质量浓度}) \times \text{吸附液体积}} \times 100\%$$

SP700、X-5、AB-8、NKA 4 种树脂具有较大的吸附量和较高的解吸率, 用于下面的实验研究。

2.7 吸附动力学过程: 在有充分时间吸附的情况下, 有些树脂可能有相近的饱和吸附量, 但各树脂理

* 收稿日期: 2003-10-03

作者简介: 耿平(1979—), 女, 河北东光人, 2001 级硕士研究生, 研究方向为天然产物分离。

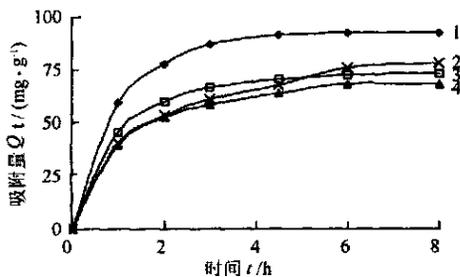
* 通讯作者 Tel: (0311) 6266335 Fax: (0311) 6052053 E-mail: jill217@163.com

化性质和结构不同,其吸附动力学过程各异。按照 2.5 项下方法,测定 4 种树脂在 t 时刻 ($t = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8$ h) 时的吸附量 Q_t (mg/g),以 Q_t 对 t 作图,得吸附动力学曲线,见图 1。

表 2 7 种大孔树脂静态吸附效果

Table 2 Different effects of static state adsorption in seven kinds of macroporous resins

树脂型号	湿树脂质量 /g	干树脂质量 /g	吸附量 / (mg·g ⁻¹)	解吸率 / %
SP700	1.0	0.680 6	92.96	97.80
X-5	1.0	0.606 7	79.09	98.78
AB-8	1.0	0.607 5	73.67	94.26
NKA	1.0	0.635 6	68.31	93.99
D ₄₀₂₀	1.0	0.621 2	32.82	82.18
S-8	1.0	0.631 6	28.77	53.47
NKA-9	1.0	0.641 5	10.79	29.38



1-SP700 2-AB-8 3-X-5 4-NKA

图 1 树脂对龙胆苦苷吸附动力学曲线

Fig. 1 Static-adsorption dynamic curve of resins for gentiopicoside

2.8 吸附速率的测定:树脂的吸附能力除了由吸附量表现外,吸附速率也是重要的参考指标,体现了树脂吸附达平衡的快慢,吸附达平衡快则效率高。Langmuir^[4]的吸附速率方程可用于各树脂的比较。

$$\ln Q_e / (Q_e - Q_t) = K_t, \text{ 变换为 } -\ln(1 - Q_t / Q_e) = K_t$$

Q_t 为 t 时刻树脂的吸附量; Q_e 为平衡时树脂的吸附量; K 为吸附平衡速率常数

对于各树脂,用 $-\ln(1 - Q_t / Q_e)$ 对时间 t 作直线回归,得各树脂吸附平衡速率常数 K ,结果见表 3。

表 3 树脂的吸附平衡速率常数 (25 °C)

Table 3 Adsorption-balance rate constant of resins (25 °C)

树脂	K/h^{-1}	相关系数
SP700	0.732 7	0.977 4
X-5	0.761 1	0.978 6
AB-8	0.575 1	0.991 4
NKA	0.573 6	0.975 0

2.9 树脂柱色谱分离:分别取粗提液通过 4 种已处理好的树脂柱,按《中华人民共和国药典》2000 年版一部龙胆薄层鉴别方法监测,与龙胆苦苷对照品相

应位置上刚出现斑点即停止上样,先以蒸馏水洗至洗脱液还原糖反应为阴性(Molish 反应),再依次以 10%、20%、30%、40%、50%、95% 乙醇水溶液洗脱,薄层监测,收集富含龙胆苦苷的洗脱液,经浓缩干燥后采用 HPLC 测定龙胆苦苷含量,对不同树脂的分离效果进行比较,见表 4。

表 4 不同树脂分离效果比较

Table 4 Comparison of different resins on separation

树脂	洗脱液	洗脱液质量浓	龙胆苦苷质量分数	提取率
	体积/BV	度/(mg·mL ⁻¹)	以固形物计/%	/(mg·g ⁻¹)
SP700	5	0.641 2	92.33	13.57
X-5	6	0.401 0	68.50	11.94
AB-8	3	0.770 4	72.65	13.96
NKA	5	0.591 4	94.00	12.42

4 种树脂吸附龙胆苦苷的动力学过程大致相同。起始阶段吸附量较大,AB-8、NKA 树脂吸附量逐渐增大,达平衡时间较长;SP700、X-5 树脂达平衡较快,为快速吸附型树脂。比较吸附平衡常数 K ,亦可看出后两者达平衡较快。从吸附量和时间的关系来说,SP700 树脂的吸附性能最理想。

X-5、S-8、AB-8、NKA 树脂都是 10% 乙醇溶液将龙胆苦苷洗脱下来,以后各梯度只有 20%、30% 乙醇洗脱液在浓缩近干时点样,才能检出少量龙胆苦苷,且斑点明显小于杂质斑点。故 10% 乙醇即可将龙胆苦苷解吸下来,且纯度较高。X-5 树脂吸附容量较大,但其分离纯度相对不高,色谱峰放大后可见明显的前延峰。AB-8 型树脂吸附容量适中,洗脱液用量少,解吸集中(洗脱液中龙胆苦苷含量高),且提取率高。NKA 树脂的突出特点是分离纯度高。SP700 树脂纯度和提取率都高,很适合龙胆苦苷的分离。

3 讨论

树脂吸附作用的根本因素是吸附剂与吸附质之间的范德华力。龙胆苦苷分子由非极性的裂环环烯醚萜母核和极性糖基(Glu)组成。前者可与苯乙烯型树脂骨架结构上苯环部位形成范德华引力^[5],后者使其具有一定的水溶性和形成氢键的能力。本实验所用树脂均为聚苯乙烯型,由表 2 可见,非极性或弱极性树脂具有较大的吸附容量;极性树脂对龙胆苦苷的吸附量都偏小且解吸困难,提示为龙胆苦苷中的极性糖基与树脂上的极性基团牢固结合所致。

孔径的大小直接影响不同大小的分子自由出入,从而使树脂具有选择性。因此,只有当孔径对于吸附质足够大时,比表面积才能充分发挥作用^[6]。孔径合适,吸附量随比表面积增大而增大。龙胆

苦苷相对分子质量为 356.32,分子较小,所选树脂都有足够大的孔径^[4]。结合表 1、表 2,吸附容量大的树脂都具有较大的比表面积,SP700 具有明显大得多的比表面积,因此吸附量显著高于其他树脂。

孔容的大小直接影响树脂的体积比表面积(每 1 mL 湿树脂所具有的比表面积 m^2/mL)。实际应用中,体积比表面积对吸附容量起着重要作用,孔容增大引起体积比表面积下降,使吸附容量降低。D₄₀₂₀树脂,孔容大是其吸附容量较小的原因之一。AB-8 树脂孔容小,体积比表面积大,因而吸附量较大。

本实验结果表明非极性树脂 SP700 吸附容量大,易解吸,富集纯度高,对龙胆苦苷具有优良的吸附性能。

致谢:我校 99 级实习生陶荣亚、程伟、刘明峰参与部分工作。

水溶性儿茶素微胶囊的制备研究

田云¹,卢向阳^{1*},何小解²,黄成江¹,罗泽民¹,肖红波^{1*}

(1. 湖南农业大学 生化与发酵工程实验室,湖南 长沙 410128; 2. 中南大学湘雅二医院 小儿肾病研究室,湖南 长沙 410011)

儿茶素作为天然抗氧化剂和自由基清除剂,已广泛应用于食品、医药及化工等领域^[1]。但由于儿茶素中的酚羟基很活泼,在外界各种条件下极易发生氧化、聚合或缩合,从而失去抗氧化活性及其他生物学功能,使之在贮存和应用中受到了很大限制。而微胶囊技术则是解决这一问题的有效途径^[2]。

采用微胶囊技术可以对各种有效成分或配料进行包囊化,目前,油性物质的微胶囊技术已经比较成熟,而水溶性物质的微胶囊则研究得较少,国外已经商品化的水溶性物质的微胶囊产品主要有硫酸亚铁^[3]、柠檬酸等,国内对该方面的研究主要有碳酸氢钠^[4]、维生素 C^[5]、左旋肉碱^[6]等。本实验采用喷雾干燥法研究水溶性儿茶素的微胶囊,以期制备理化性质稳定的儿茶素微胶囊产品,使儿茶素的应用更加广泛、有效。

1 材料与设备

1.1 材料与设备:儿茶素(湖南金农生物资源股份有限公司);LPG-5 型高速离心喷雾干燥机(常州

References:

- [1] Tan R X, Hu J, Kong J D, et al. The new secoiridoid glycosides from *Gentiana algida* [J]. *Planta Med*, 1997, 63(6): 567-569.
- [2] Tan R X, Kong L D, Wei H X. Secoiridoid glycosides and an antifungal anthranilate derivative from *Gentiana tibetica* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 47(7): 1223-1226.
- [3] Kakuda R, Iijima T, Yaoita Y, et al. Secoiridoid glycosides from *Gentiana scabra* [J]. *Nat Prod*, 2001, 64(12): 1574-1575.
- [4] Ma X P, Jiang Z H, Yang Y Q, et al. Study on adsorption of ginkgo flavones with macroporous resins [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1997, 22(9): 539-542.
- [5] Bi Y Q, Hou X H, Mao S J, et al. The study of characteristics of adsorption and separation of different glycoside on macroporous resins [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(3): 217-220.
- [6] Han L. *Practical New Technology of Chinese Materia Medica* (实用中药制剂新技术) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002.

市干燥设备厂);Milipore 超纯水机(密理博贸易有限公司);高效液相色谱仪(日本岛津公司,包括 SPD-10AT 紫外检测器、LC-10AP VP 泵、Class-1 VP 色谱工作站);S-570 型扫描电子显微镜;离子溅射仪。

1.2 方法

1.2.1 儿茶素微胶囊的制备:将乳化剂 A(聚乙二醇)和乳化剂 B 用乙醇混合溶解,然后将用乙醇溶解的儿茶素缓慢加入该溶液中,充分混合乳化,将该乳化液进行喷雾干燥,得微胶囊产品。喷雾条件:进风温度为 130 左右;出风温度为 95 左右。

1.2.2 儿茶素微胶囊的产率和效率

产率 = 产品中儿茶素总量 / 加到悬浮体系中的儿茶素量 × 100 %

效率 = (1 - 产品表面的儿茶素量 / 产品中儿茶素总量) × 100 %

1.2.3 儿茶素含量的测定:精密称取适量微胶囊,置研钵中加少量蒸馏水研磨成糊状,浸提 24 h,滤

* 收稿日期:2003-11-03

基金项目:国家科技部攻关计划项目(2001BA535C);湖南省教育厅重点资助项目(02A015)

作者简介:田云(1979-),男,湖南沅江人,硕士研究生,研究方向为天然产物开发与利用。Tel: (0731) 4635292

E-mail: tianyun79616@163.com

* 通讯作者