

炮制 20 h 的地黄比较, 差异是 832 cm^{-1} 峰逐渐变弱且高波段移至 836 cm^{-1} , 820 cm^{-1} 峰明显增, 770

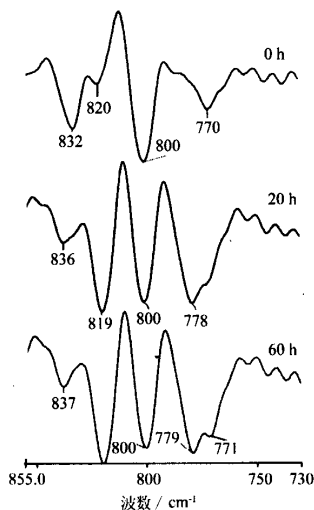


图 3 熟地黄不同炮制时间的二阶导数谱
Fig. 3 Second derivative spectra of Prepared Radix Rehmanniae processed for different times

cm^{-1} 峰减弱并高波段移至 778 cm^{-1} , 并与 819 cm^{-1} 峰、 800 cm^{-1} 峰一并成强度相当的一组三强峰。炮制 20 h 与炮制 60 h 的样品相比, 主要是 778 cm^{-1} 峰逐渐出现 771 cm^{-1} 一特征化的小肩峰。以此, 可以用地黄炮制 20 h 来量化(数字化)熟地黄传统的经验标准: “黑如漆, 甜如饴”; 以加黄酒未炮与炮制 60 h 分别来量化传统的经验炮制理论: “不及则功效难求, 太过则气味反失”。

3 结论

傅立叶红外光谱二阶导数谱法在地黄及其不同提取部位、炮制品的鉴定应用中具有明显的专属性和特征性。综合以上方法学考察和实例分析, 可以看出, 红外光谱二阶导数谱在中药复杂混合物体系中应用的优势明显, 凸现其专属性、特征性强的特点必将在中药的药源开发、品质优劣、真伪鉴别及制剂工艺流程的质量控制等发挥重要的作用。

Reference:

- [1] Sun S Q, Zhou Q, Qing Z. The Two-Dimensional Relevant Infrared Spectrum of Chinese Materia Medica (中药二维相关红外光谱鉴定图集) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003.

大孔吸附树脂分离纯化菟丝子黄酮的研究

吴 春, 陈林林

(哈尔滨商业大学 化学中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

菟丝子别名黄丝、黄藤子、豆寄生, 为旋花科菟丝子属植物菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 的干燥成熟种子, 含有黄酮等多种生物活性物质。菟丝子黄酮的提取方法通常采用有机溶剂萃取法, 但所得粗提物黄酮的量较低。为提高黄酮类化合物的质量分数, 本实验选择大孔吸附树脂对菟丝子黄酮进行纯化, 为吸附树脂分离纯化菟丝子中的黄酮类化合物提供实验依据。

1 仪器与材料

SHZ-A 水浴恒温振荡器, 上海跃进医疗器械厂; 瑞士普利塞斯 XT4200C 型天平; 721 分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司。

菟丝子黄酮由南方小粒菟丝子提取所得^[1]。

AB-8、D-101、H-103、NKA-9、S-8、X-5 型大孔

吸附树脂, 南开大学化工厂; 芦丁, 中国医药(集团)上海化学试剂公司; 其他试剂均为分析纯试剂。

2 方法与结果

2.1 菟丝子总黄酮的测定

2.1.1 标准曲线的绘制: 准确称取芦丁对照品(105℃干燥至恒重)适量于 100 mL 烧杯中, 用 30% 乙醇溶液溶解后转移至 250 mL 量瓶中, 加 30% 乙醇至刻度, 配成 0.317 6 mg/mL 的对照品溶液。

准确吸取对照品溶液 1.00、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 mL 分别置于 25 mL 量瓶中。用 30% 的乙醇补充至 12.5 mL, 加入 1 mL NaNO_2 (5%) 摇匀, 放置 5 min 后加入 1 mL $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ (10%), 6 min 后再加入 5 mL 1 mol/L NaOH 溶液, 混匀, 用 30% 乙醇稀释至刻度。10 min 后以试剂空白为参比, 于 500

收稿日期: 2006-02-03

基金项目: 黑龙江省自然科学基金重点项目(ZJY04-08)

作者简介: 吴 春(1962—), 女, 天津人, 教授, 硕士生导师, 1988 年获东北师范大学化学系理学硕士学位, 先后主持黑龙江省自然科学基金等多项, 发表论文 40 余篇, 主要从事天然产物研究与开发。 Tel: (0451)84852147 E-mail: wuchun 2005@sohu.com

nm 处测定吸光度值,利用最小二乘法绘制标准曲线,得芦丁质量浓度(Y mg/mL)对吸光度(A)的回归方程 $Y=0.1153A-0.00108$, $r=0.9998$ 。

2.1.2 测定:取 1 mL 提取液于 25 mL 量瓶中,其余步骤与标准曲线的绘制相同,测定吸光度值,通过标准曲线方程计算总黄酮的质量浓度。

2.2 静态吸附和解吸试验

2.2.1 静态吸附方法:准确称取经预处理的湿树脂 1.5 g,置于磨口锥形瓶中,加入 30 mL 菟丝子黄酮粗提取液,盖紧瓶塞,于室温下连续振荡 12 h,转速为 110 r/min,充分吸附后滤过,测定滤液中剩余黄酮的质量浓度,计算吸附率。

吸附率 = $[(\text{原液质量浓度} \times 30 \text{ mL} - \text{滤液质量浓度} \times \text{滤液体积}) / \text{原液质量浓度} \times 30 \text{ mL}] \times 100\%$

2.2.2 静态解吸方法:向滤去吸附液并达到吸附平衡的树脂中加入 30 mL 一定体积分数的乙醇,室温

下连续振荡,充分解吸后滤过,测定滤液中黄酮质量浓度,计算解吸率。解吸率 = $[\text{浸提液质量浓度} \times \text{浸提液体积} / (\text{原液质量浓度} \times 30 \text{ mL} - \text{滤液质量浓度} \times \text{滤液体积})] \times 100\%$

2.2.3 大孔吸附树脂的筛选:将经过预处理的树脂 AB-8、D-101、H-103、NKA-9、S-8、X-5 型分别按照静态吸附、解吸步骤进行试验,结果见表 1。可见, NKA-9 的吸附率最低,原因是黄酮具有多酚结构和糖苷键,呈弱极性,有利于弱极性和极性树脂的吸附,而 NKA-9 的极性过强,因此不利于吸附。H-103、S-8 的吸附、解吸效果好于其他几种树脂, S-8 的孔径较小,比表面积较大,因而吸附率较高,但由于其极性稍强而不易解吸, H-103 的吸附率虽次于 S-8,但解吸时只有少量滞留于树脂中,大部分能被洗脱下来。综合考虑,应选择 H-103 型大孔吸附树脂进行纯化试验。

表 1 吸附树脂对菟丝子中总黄酮吸附效果的影响

Table 1 Adsorption effects of macroporous resin on total flavonoids of *Semen Cuscutae*

树脂类型	吸附率/%	解吸率/%	树脂类型	吸附率/%	解吸率/%
AB-8	74.630	75.814	NKA-9	71.862	78.211
D-101	75.446	80.484	S-8	87.314	80.262
H-103	76.908	97.364	X-5	75.024	77.720

2.2.4 吸附液 pH 值的确定:由于吸附过程中吸附质以分子状态被吸附,因此吸附质要保持分子状态才会达到较好的效果。黄酮类化合物为多羟基酚类,呈弱酸性,所以试验选择酸性或弱酸性 pH 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 的缓冲溶液,利用 H-103 型大孔树脂对菟丝子黄酮进行静态吸附确定吸附液的 pH 值,结果见图 1。可见,当提取液酸性过强, pH 值为 2.0 时,虽吸附率较高,但在吸附过程中已有其他物质生成,吸附后提取液颜色变化明显。随着 pH 值增大,吸附率增大,当 pH 值达到 4.0 时为最高点,此时,黄酮类化合物保持分子状态,满足形成氢键的条件。继续增加 pH 值,吸附率有所下降,因此吸附液的 pH 值应选择为 4.0。

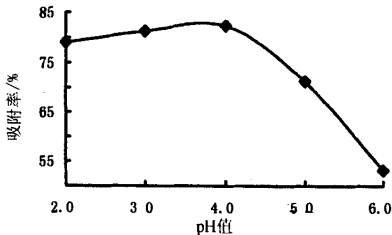


图 1 pH 值对吸附效果的影响

Fig. 1 Effects of pH value on adsorption

2.2.5 洗脱剂乙醇体积分数的确定:黄酮类化合物

易溶于甲醇、乙醇、丙酮等有机溶剂中,但由于甲醇和丙酮的毒性和挥发性而选择乙醇作为洗脱剂。实验选用体积分数为 10%~80%乙醇溶液对吸附饱和的吸附液按照解吸步骤进行解吸,测定解吸率,确定洗脱剂乙醇的体积分数。结果见图 2。可见,乙醇体积分数为 60% 时解吸率最高,即解吸液中的黄酮的量最高,表明此体积分数的乙醇极性与提取液中黄酮的极性相近,易于洗脱。

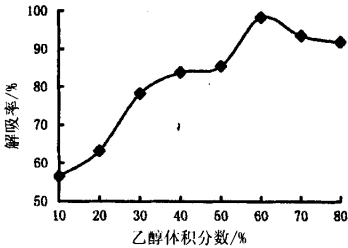


图 2 体积分数对解吸效果的影响

Fig. 2 Effects of alcohol concentration on desorption

2.3 动态吸附和解吸试验:将处理好的树脂湿法装入树脂柱(60 cm×2 cm)后,加入一定量的菟丝子黄酮粗提液,调节流速,吸附一定时间后,测定流出液中的黄酮的质量浓度,以确定吸附率。再用水洗柱,以除去多糖类等杂质,最后加入一定体积分数的乙醇

作为洗脱剂进行洗脱,收集洗脱液,测定黄酮的质量浓度,以确定解吸率。

2.3.1 动态吸附流速的确定:将 H-103 大孔吸附树脂湿法装柱后,加入 pH 4 的菟丝子黄酮提取液,以每流出 5 mL 吸附液测定总黄酮的质量浓度。以流出液体积为横坐标,流出液总黄酮的量为纵坐标

做泄漏曲线,结果见表 2。可见,体只流量为 0.5 mL/min 时泄漏点出现较晚,当体积流量大于 0.5 mL/min 时,泄漏点均提前。原因是体积流量过快,吸附液还没有与树脂充分吸附就已随吸附液流出,而体积流量过慢耗时,又会造成经济上的浪费,因此本实验选择吸附液的体积流量为 0.5 mL/min。

表 2 吸附液体积流量吸附效果的影响

Table 2 Effects of flow rate absorbing solution on adsorption

体积流量/(mL·min ⁻¹)	流出液黄酮质量浓度/(mg·mL ⁻¹)									
	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	35 mL	40 mL	45 mL	50 mL
0.5	0.112	0.223	0.265	0.586	0.845	0.864	0.875	0.889	0.960	0.962
1.0	0.187	0.364	0.416	0.817	0.897	0.912	0.920	0.958	0.962	0.966
0.5	0.215	0.405	0.467	0.836	0.876	0.954	0.958	0.963	0.967	0.968
2.0	0.308	0.445	0.689	0.853	0.955	0.960	0.962	0.964	0.968	0.969

2.3.2 最佳吸附时间的确定:样品上柱后在柱中的静置时间与样品和柱材料的吸附作用有关。将 pH 4 的提取液以 0.5 mL/min 加入到树脂柱中,按照不同的静置时间,测定流出液的总黄酮的质量浓度,结果见图 3。可见,静置时间为 10~50 min 时吸附曲线缓慢上升,静置时间在 50~60 min 时吸附率增大的幅度较大,而后即趋势平缓,因此静置时间 60 min 为吸附最佳点。

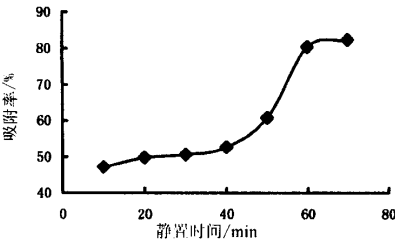


图 3 吸附时间及吸附效果的影响

Fig. 3 Effects of absorbing time on adsorption

2.3.3 最佳上柱量的确定:30 g 湿树脂装柱后,分别取与树脂比例为 2、4、6、8、10、12 (mL/g) 的吸附液进行动态吸附,测定流出液的质量浓度,确定二者的最佳配比,结果见图 4。可见,随着上柱液的增加,吸附率下降。在二者比例为 2~8 时,下降趋势缓慢;继续增大比例,吸附率下降幅度增大,此时已超过了树脂的饱和吸附量,已有部分黄酮成分损失。而上柱量过少,将使纯化周期过长,因此从经济因素考虑,吸附液量与树脂的最佳比例为 8 : 1 (mL/g)。

2.3.4 洗脱剂用量的确定:精确吸取与树脂比例为 8 的提取液,按 0.5 mL/min 的流速上柱,静置 60 min 后,先用水洗脱,再用与树脂量比为 5、6、7、8、9、10、11 (mL/g) 的 60% 乙醇解吸,测定流出液总黄

酮的质量浓度,计算解吸率,确定洗脱剂的最佳用量,结果见图 5。可见,随着洗脱剂用量增大,解吸率提高,但当洗脱剂量大于 8 时解吸率的增大幅度已不明显,从节省溶剂的角度考虑,选择洗脱剂乙醇的量与树脂比例为 8 : 1 (mL/g)。

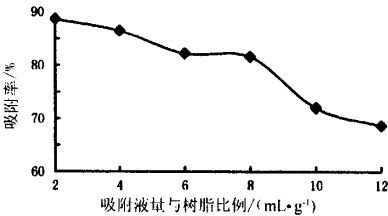


图 4 吸附液量与树脂比对吸附效果的影响

Fig. 4 Effects of ratio between absorbing solution and resin on adsorption

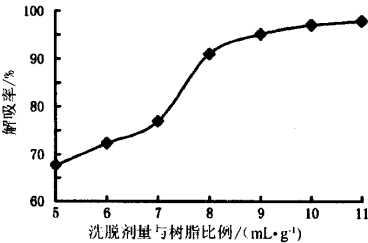


图 5 洗脱液量对解吸效果的影响

Fig. 5 Effects of eluant amount on desorption

2.3.5 解吸时间的确定:在吸附饱和的树脂柱中加入 8 倍于树脂量的 60% 乙醇,测定静置不同时间的洗脱液黄酮的质量浓度,确定解吸时间,结果见图 6。可见,解吸 40 min 后黄酮的累计量已无明显变化,说明此时已基本解吸完全,故确定解吸时间为 40 min。

2.4 工艺验证:取 30 g H-103 型大孔树脂,按质量体积比为 1 : 8 的比例精密吸取 pH 3~4 的提取液,

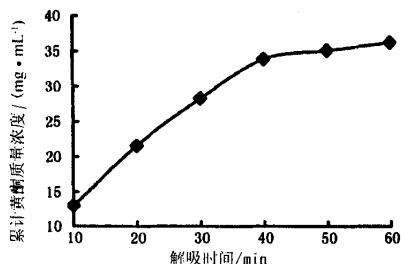


图6 解吸时间对解吸效果的影响

Fig. 6 Effects of eluting times on desorption

以吸附流速为 0.5 mL/min 上样, 吸附 60 min 后, 先用水洗脱, 再用体积质量比为树脂量 8 倍的 60% 乙醇解吸 40 min, 收集洗脱液, 干燥, 即为总黄酮,

质量分数为 88%, 洗脱率 91%。

3 结论

H-103 型大孔树脂对菟丝子黄酮具有较强的吸附能力, 经该树脂吸附, 乙醇洗脱, 可将粗提物黄酮的含量提高到 88%, 洗脱率高于 90%, 具有工艺简单, 耗费有机溶剂少, 成本低等特点, 验证结果表明, 利用 H-103 型大孔树脂富集菟丝子黄酮, 方法操作简便, 可行, 为菟丝子黄酮类物质的分离和鉴定提供了基础。

Reference:

- [1] Chen L. L., Wu C., Jiang Y. Q. Studies on extracting procedure of total flavonoids from *Semen Cuscutae* [J]. *J Harbin Univ Commer* (哈尔滨商业大学学报), 2004, 20(6): 644-647.

大孔吸附树脂纯化秦艽中龙胆苦苷

蔺建新^{1,2}, 李茂星^{2*}, 张汝学², 贾正平², 高德玉¹, 许永全¹

(1. 武威市凉州医院, 甘肃 武威 733000; 2. 兰州军区总医院 药材科, 甘肃 兰州 730050)

秦艽是龙胆科龙胆属草本植物秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall.、麻花秦艽 *G. straminea* Maxim.、粗茎秦艽 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk. 或小秦艽 *G. dahurica* Fisch. 的干燥根, 主产甘肃、青海等地, 为重要传统中药, 具有祛风湿、止痛、清湿热的功效。秦艽中的化学成分, 早期研究认为主要含生物碱类成分, 但近年的化学分析结果表明, 秦艽中含有大量龙胆苦苷 (gentiopicoside) 等裂环烯醚萜苷, 为其苦味成分^[1]。大孔吸附树脂是近年来发展起来的一类有机高聚物吸附剂, 其具有较好的吸附性能, 吸附作用同表面吸附、表面电性或形成氢键等有关。本实验以秦艽中的主要成分龙胆苦苷和总固物为指标, 考察了 HPD-100 大孔吸附树脂富集纯化秦艽中龙胆苦苷的工艺。

1 仪器与材料

LC-6A 高效液相色谱仪 (日本岛津), SPD-6A 紫外检测器 (日本岛津), ANASTAS 色谱工作站 (天津); HPD-100 型大孔吸附树脂 (河北沧州宝恩化工有限公司); 龙胆苦苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 110770-200308); 甲醇为色谱纯, 水为重蒸馏水, 乙醇为药用级。秦艽购自兰州市黄河

中药市场, 经兰州医学院赵汝能教授鉴定为秦艽 *G. macrophylla* Pall. 的干燥根。

2 方法和结果

2.1 龙胆苦苷的测定^[2]: 取秦艽提取液及上柱后各部分的干燥物适量, 用乙醇超声溶解并定容至 25 mL, 作为供试品溶液。再取龙胆苦苷对照品适量, 精密称定, 加乙醇使成 0.5 mg/mL 溶液, 作为对照品溶液。采用高效液相色谱法进行测定。色谱柱: C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (3: 7); 检测波长: 270 nm; 柱温: 25 °C; 体积流量: 1 mL/min; 进样量: 20 μL。

2.2 大孔树脂的处理: 取 HPD-100 型大孔吸附树脂适量, 丙酮加热回流洗脱, 洗脱至洗脱液蒸干后无残留物。以乙醇湿法装柱, 继续用乙醇冲柱, 不时检查流出液, 至与水混合不呈白色浑浊为止。然后以大量的蒸馏水洗去乙醇, 备用。

2.3 工艺参数考察

2.3.1 秦艽药材的提取: 取秦艽药材 50 g, 粉碎成粗粉, 用 8~10 倍量 70% 乙醇加热回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 提取液滤过, 合并滤液, 低温减压回收乙醇用蒸馏水定容至 1 000 mL, 备用 (含生药 0.05 g/mL)。

收稿日期: 2006-03-13

作者简介: 蔺建新 (1978—), 男, 甘肃武威人, 药师主要研究方向为中药新药研究与开发。 Tel: (0935) 2232946

* 通讯作者 李茂星 Tel: (0931) 8975884